

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA  
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

MESTRADO EM ENGENHARIA ALIMENTAR

***Actividade Antioxidante de Aguardentes Vínicas Envelhecidas Portuguesas  
e Francesas***

**Rita Barreira Alves de Mira**

Orientador: **Doutora Sara Canas**

Co-orientador: **Mestre Anabela Amaral**

Beja

2009

O presente trabalho foi realizado no Instituto Nacional de Recursos Biológicos - L-INIA/Dois Portos, no Departamento de Enologia – Secção de Aguardentes, Sub-produtos e Derivados.

## **Agradecimentos**

À ESAB e ao Professor João Canada por me ter aberto novamente as portas para a continuação do meu enriquecimento científico. Claro que com a ajuda das minhas orientadoras de mestrado: à Professora Anabela Amaral pela sua disponibilidade e orientação, ensinamentos, pelo seu empenho e dedicação nas aulas de Enologia e que me fizeram despertar para este mundo do vinho; à Eng<sup>a</sup> Sara Canas, que foi mais do que orientadora, uma amiga que me acompanhou de forma incansável e auxiliou em todos os momentos deste trabalho. Por todos os ensinamentos, pela sabedoria transmitida, pelo profissionalismo e exigência, pelo rigor científico exemplar, o meu sincero e sentido obrigado.

Seguidamente não posso deixar de agradecer à Eng<sup>a</sup> Isabel Spranger e à Eng<sup>a</sup> Conceição Leandro, pela ajuda e apoio no desbloqueio de alguns obstáculos, pela simpatia, carinho e convivência diária.

À Eng<sup>a</sup> Ilda Caldeira pela sua disponibilidade, simpatia e boa disposição contagiante.

Ao Eng<sup>o</sup> Belchior o grande Mestre das aguardentes, pelos seus conselhos, pela sua simpatia e transmissão de bem-estar com a vida.

Ao Eng<sup>o</sup> Curvelo-Garcia por receber na EVN os estagiários da melhor maneira possível e por lutar e acreditar na importância da investigação científica no sector vitivinícola em Portugal.

A todos os colegas e estagiários que passaram, ao Tiago e ao Alberto pela simpatia e convívio agradável, e aos que ainda ficam.

A todos os funcionários, membros e investigadores dos Departamentos de Enologia e Viticultura, pela simpatia, disponibilidade e pela forma como me acolheram.

*Já sinto saudades.....*

A todas as amigas, colegas e companheiras desta jornada de mestrado e por mais uma etapa ultrapassada na minha vida.

Por fim, não posso deixar de agradecer a toda a minha família, em particular aos meus pais, à minha irmã Margarida, ao Pedro, aos meus sobrinhos queridos, à Ana Maria, à Avó Ni e também aos meus avós que estão lá em cima, mas sei que olham por mim... A estabilidade familiar e o apoio, foi essencial para que todos os obstáculos fossem ultrapassados.

Agradeço a tudo e a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

*A todos, o meu muito obrigado!*

## **Antioxidant activity of Portuguese and French Commercial Aged brandies**

### **ABSTRACT**

The aged wine brandy presents high alcoholic content resulting from the distillation of wine and the ageing process in wooden barrels, that constitutes the unique source of phenolic compounds. Several evidences exist suggesting the involvement of phenolic compounds as protector agents in diseases related with the oxidative stress, because of its antioxidant power. From a nutraceutical point of view, the main purpose of this study was to evaluate the antioxidant activity of Portuguese and French commercial brandies. The results obtained showed a low correlation between antioxidant activity and phenolic composition. The most significant correlations were found for gallic and elagic acids, which indicates that these phenolic acids contribute significantly for the antioxidant activity of the brandies. Taken into account the available literature, we believe that for the first time a correlation between the furanic aldehydes and antioxidant activity of wine spirits was established, showing to be positive for the 5-methylfurfural and negative for the hydroxymethylfurfural. In addition, it was shown that the addition of caramel to spirits due to the increase of 5-methylfurfural, contributes for their antioxidant activity. The Portuguese and French commercial brandies showed a reduced antioxidant activity.

**Key-Words:** Wine brandies; wood; ageing; nutraceutical drinks; antioxidants; low molecular weight compounds.

## **Actividade Antioxidante de Aguardentes Vínicas Envelhecidas Portuguesas e Francesas**

### **RESUMO**

A aguardente vínica velha é uma bebida com elevado teor alcoólico, resultante da destilação exclusiva do vinho, sendo posteriormente envelhecida em vasilha de madeira, que constitui a sua única fonte de compostos fenólicos. Existe evidência do envolvimento dos compostos fenólicos, como agentes protectores, nas doenças relacionadas com o stress oxidativo, devido ao seu poder antioxidante. Numa perspectiva nutracêutica, com o presente estudo pretendeu-se avaliar a actividade antioxidante de aguardentes vínicas comerciais portuguesas e francesas. Os resultados revelaram uma correlação não significativa entre a actividade antioxidante e o índice de polifenóis totais. Foi observada uma correlação muito significativa entre a actividade antioxidante e o teor em ácidos gálico e elágico, o que indica que estes ácidos fenólicos contribuem significativamente para o potencial antioxidante de aguardentes envelhecidas. Atendendo à bibliografia consultada, é estabelecida pela primeira vez, uma correlação entre o teor de aldeídos furânicos e a actividade antioxidante de aguardentes vínicas, que demonstrou ser positiva para o 5-metilfurfural e negativa para o HMF. Observou-se ainda a forte contribuição da adição de caramelo nas aguardentes para a sua actividade antioxidante, por via do aumento de 5-metilfurfural. As aguardentes comerciais portuguesas e francesas analisadas demonstraram fraca actividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Aguardentes vínicas; madeira; envelhecimento; bebidas nutracêuticas; antioxidantes; compostos de massa molecular baixa.

## Índice

Índice de quadros	i
Índice de figuras	ii
Lista de abreviaturas	iv
I – INTRODUÇÃO	1
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
II.1 – HISTÓRIA E UTILIZAÇÕES DA AGUARDENTE	3
II.2 – AGUARDENTE VÍNICA	4
II.2.1 – Factores que condicionam a aguardente branca	4
II.2.1.1 – Origem Geográfica	4
II.2.1.2 – Castas	7
II.2.1.3 – Características do vinho para destilação	10
II.3 – TECNOLOGIA DE DESTILAÇÃO	11
II.3.1 – Destilação em alambique do tipo “Charentais”	12
II.3.2 – Destilação em coluna	15
II.4 – ENVELHECIMENTO EM MADEIRA	16
II.4.1 – Factores condicionantes no envelhecimento de aguardentes	17
II.4.1.1 – Vasilha de madeira	18
II.4.1.1.1 – Composição química da madeira	18
II.4.1.1.2 – Extracção dos compostos da madeira pela aguardente	21
II.4.1.1.3 – Influência da espécie botânica da madeira	22
II.4.1.1.4 – Influência do tratamento térmico da vasilha	24
II.4.1.1.5 – Estado de utilização da vasilha	25
II.4.1.1.6 – Dimensão da vasilha	26
II.4.1.2 – CONDIÇÕES DE ENVELHECIMENTO	27
II.4.1.2.1 – Condições da cave	27
II.4.1.2.2 – Operações tecnológicas realizadas durante o envelhecimento	28
II.4.1.2.3 – Influência do tempo de envelhecimento	29
II.4.1.3 – Influência do título alcoométrico do destilado	30
II.4.1.4 – Influência do oxigénio	31
II.5 – AGUARDENTE E SAÚDE	32
II.5.1 – Actividade antioxidante e stress oxidativo	33
II.5.2 – Propriedades dos compostos extraíveis da aguardente	35
II.5.3 – Actividade antioxidante da aguardente e os efeitos benéficos para a saúde	36
II.5.4 – Factores condicionantes da actividade antioxidante da aguardente	37
II.5.5 – Efeitos adversos associados ao consumo da aguardente	38
III – MATERIAIS E MÉTODOS	40
III.1 – MATERIAIS	40
III.1.1 – Aguardentes	40
III.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS	42
III.2.1 – Determinação do índice de polifenóis totais	42

III.2.2 – Identificação e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta resolução – HPLC	42
III.2.2.1 – Amostras	42
III.2.2.2 – Padrões e solventes	43
III.2.2.3 – Condições cromatográficas	43
III.2.2.4 – Identificação dos picos cromatográficos	44
III.2.3 – Determinação da actividade antioxidante	44
III.3 – MÉTODOS ESTATÍSTICOS	47
III.3.1 – Média e Desvio-Padrão	47
III.3.2 – Correlação linear	47
III.3.3 – Regressão Linear – Análise de Variância	47
III.3.4 – Análise Multivariada	47
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
IV.1 – OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DPPH <sup>•</sup> PARA DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AGUARDENTES VÍNICAS COMERCIAIS	49
IV.2 – ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AGUARDENTES	53
IV.2.1 – Actividade antioxidante determinada através do método do DPPH <sup>•</sup>	53
IV.3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AGUARDENTES	55
IV.3.1 – Teor de polifenóis totais	55
IV.3.2 – Compostos fenólicos de massa molecular baixa	57
IV.3.2.1 – Ácidos fenólicos	58
IV.3.2.2 – Aldeídos fenólicos	59
IV.3.2.3 – Aldeídos furânicos	60
IV.4 – Correlações entre a actividade antioxidante e a composição química das aguardentes	62
IV.4.1 – Actividade antioxidante e o teor de polifenóis totais	62
IV.4.2 – Actividade antioxidante e os compostos fenólicos de massa molecular baixa	62
IV.4.2.1 – Ácidos fenólicos	62
IV.4.2.2 – Aldeídos fenólicos	63
IV.4.3.3 – Aldeídos furânicos	64
IV.5 – ANÁLISE GLOBAL DOS RESULTADOS	65
V – CONCLUSÕES	67
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
Anexos	

## Índice de Quadros

Quadro I – Castas autorizadas e recomendadas para a produção de aguardente vínica nas diferentes denominações de origem portuguesas	9
Quadro II – Classificação dos aldeídos fenólicos da madeira	20
Quadro III – Identificação e características das aguardentes comerciais	41
Quadro IV – Padrões utilizados em HPLC	43
Quadro V – Análise da variância de regressão correspondente à curva de calibração $y = 0,678 x + 0,051$	51
Quadro VI - Análise da variância de regressão correspondente à curva de calibração $y = 0,725 x + 0,001$	52
Quadro VII - Análise da variância de regressão correspondente à curva de calibração $y = 0,052 x + 0,003$	52
Quadro VIII – Correlação entre os ácidos fenólicos e a actividade antioxidante das aguardentes	62
Quadro IX – Correlação entre os aldeídos fenólicos e a actividade antioxidante das aguardentes	63
Quadro X – Correlação entre os aldeídos furânicos e actividade antioxidante das aguardentes	64



## Índice de Figuras

Figura 1 – Localização geográfica das regiões de Cognac e de Armagnac	5
Figura 2 – Região de Cognac	5
Figura 3 – Região de Armagnac	6
Figura 4 – Regiões portuguesas produtoras de aguardente DOC	7
Figura 5 – Uvas da casta Ugni Blanc	8
Figura 6 – Constituição do alambique “Charentais”	12
Figura 7 – Esquema representativo da dupla destilação	15
Figura 8 – Constituição da coluna de destilação	15
Figura 9 – Envelhecimento de aguardente	17
Figura 10 – Diagrama representativo da composição química da madeira	18
Figura 11 – Evolução da cor da aguardente ao longo do tempo de envelhecimento	30
Figura 12 – Aguardente envelhecida em vasilha de madeira	32
Figura 13 – Situação de stresse oxidativo	34
Figura 14 – Situação de equilíbrio	35
Figura 15 – Reacção do DPPH <sup>•</sup> com uma molécula antioxidante F-H	44
Figura 16 – Esquema representativo do registo espectrofotométrico obtido ao longo do tempo, num ensaio de captação de DPPH <sup>•</sup>	45
Figura 17 – Cinéticas de inibição de DPPH <sup>•</sup> nas diferentes concentrações ( $8,5 \times 10^{-5}$ ; $6,5 \times 10^{-5}$ ; $4 \times 10^{-5}$ ) para 10 µl de aguardente	49
Figura 18 – Cinéticas de inibição do DPPH <sup>•</sup> com concentração de $4 \times 10^{-5}$ em diferentes volumes de aguardente (10 µl, 20 µl e 100 µl).	50
Figura 19 – Representação da curva de calibração de Trolox para expressão da concentração de DPPH <sup>•</sup> ( $4 \times 10^{-5}$ ) e 100 µl.	51
Figura 20 - Representação da curva de calibração de Trolox para expressão da concentração de DPPH <sup>•</sup> ( $8,5 \times 10^{-5}$ ) e 100 µl.	51
Figura 21 - Representação da curva de calibração de Trolox para expressão da concentração de DPPH <sup>•</sup> ( $8,5 \times 10^{-5}$ ) e 10 µl.	52
Figura 22 – Valores médios da actividade antioxidante das aguardentes das diversas regiões	54
Figura 23 – Valores médios do índice de polifenóis totais (g/dm <sup>3</sup> de ácido gálico) das aguardentes das diversas regiões	55
Figura 24 – Tempo de envelhecimento das aguardentes das diversas regiões	56
Figura 25 – Cromatogramas a 280 nm (A) e 320 nm (B) dos compostos de massa molecular baixa de uma aguardente Lourinhã e uma aguardente preparada	57

Figura 26 – A – Concentrações médias ( $\text{g/dm}^3$ ) dos ácidos gálico, elágico e vanílico; B – Concentrações médias ( $\text{g/dm}^3$ ) dos ácidos sirínico e ferúlico nas aguardentes das diversas regiões	58
Figura 27 – A - Concentrações médias ( $\text{g/dm}^3$ ) de vanilina e siringaldeído; B – Concentrações médias ( $\text{g/dm}^3$ ) de coniferaldeído e sinapaldeído nas aguardentes comerciais das diversas regiões	60
Figura 28 - A Concentrações médias ( $\text{g/dm}^3$ ) de furfural e hidroximetilfurfural; B – Concentrações médias ( $\text{g/dm}^3$ ) de 5-metilfurfural nas aguardentes comerciais das diversas regiões	61
Figura 29 – Projecção das aguardentes, da percentagem de inibição do DPPH*, do índice de polifenóis totais e dos compostos de massa molecular baixa no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais	65

## Lista de abreviaturas

5mfurf – 5-metilfurfural

A – Armagnac

A.P. – álcool puro

A280 – absorvência a 280 nm

A320 – absorvência a 320 nm

A515 – absorvência a 515 nm

AA – actividade antioxidante

Abs – Absorvência

A<sub>f</sub> – absorvência final

A<sub>i</sub> – absorvência inicial

Al – Alentejo

B – Bairrada

BNIA – Bureau National Interprofessionnel De Armagnac

BNIC - Bureau National Interprofessionnel Du Cognac

BR – Beiras

C – Cognac

cfalf – coniferaldeído

D – Douro

DPPH<sup>•</sup> - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

E – Estremadura

elag – ácido elágico

ERO – Espécies reactivas de oxigénio

EU – União Europeia

F<sup>•</sup> - Radical

FDA – Food and Drug Administration

ferul – ácido ferúlico

furf – furfural

gal – ácido gálgico

H<sup>•</sup> - Radical

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

HMF – 5-hidroximetilfurfural

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

Ipt – Índice de polifenóis totais

IVV – Instituto da Vinha e do Vinho

L – Lourinhã

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

min – minutos

mM – milimoles

n – número de observações

ns – diferença não significativa  
NTSYS – Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System  
OUT – Operational Taxonomic Unit  
P – Preparadas  
p – probabilidade  
PCA – análise em componentes principais  
R – Ribatejo  
R<sup>•</sup> - radical livre  
Reg. CE – Regulamento da comunidade europeia  
sg – ácido siríngico  
sgald – siringaldeído  
snald – sinapladeído  
SQ – soma dos quadrados  
TAV – título alcométrico volúmico  
UV – Vis – Ultravioleta Visível  
van – ácido vanílico  
vanil – vanilina  
VV – Vinhos Verdes  
VS – Very Special  
VSOP – Very Special Old Pale  
x – média  
XO – Extra Old  
 $\Delta A$  – diferença de absorvência

## **I - INTRODUÇÃO**

O vinho e seus derivados sempre estiveram de alguma forma vinculados à história do homem, seja por serem bebidas com sabor e personalidade próprias seja, também, por trazerem potenciais benefícios à saúde. Com base num importante estudo epidemiológico (Projecto MONICA) levado a cabo pela Organização Mundial de Saúde, nas décadas de 80 e 90, envolvendo 21 países e cerca de dez milhões de pessoas, foi observado pela comunidade científica uma ocorrência baixa de doenças cardiovasculares em França, comparativamente com outros países do norte da Europa, apesar das semelhanças no consumo de ácidos gordos saturados (elevado), hábitos de fumo e falta de exercício físico. Este facto ficou conhecido como o “paradoxo francês”. O paradoxo francês foi explicado e sustentado pela chamada dieta mediterrânica, caracterizada por ter um padrão alimentar saudável, devido ao consumo regular e elevado de alimentos ricos em compostos fenólicos - vegetais, frutas, frutos secos, azeite, chá e vinho tinto - com reconhecida actividade antioxidante, com efeitos benéficos para a saúde.

Despoletado essencialmente pelo paradoxo francês, nos últimos anos desenvolveu-se um grande interesse da indústria alimentar e da comunidade científica pelos alimentos e bebidas nutracêuticos, que contêm compostos com elevada actividade antioxidante, o que significa que podem ter efeitos positivos tanto na conservação de alimentos e bebidas, como na preservação da saúde humana quando presentes regularmente na dieta. Importa salientar que, no Sudoeste de França, na região de Armagnac, este paradoxo é ainda mais acentuado. Esta particularidade foi atribuída ao consumo de Armagnac, a aguardente vínica aí produzida e envelhecida em madeira de carvalho, rica em compostos fenólicos. Deste modo, é importante compreender os factores que afectam e favorecem a qualidade nutracêutica deste tipo de bebidas espirituosas.

Em trabalhos recentes realizados, com aguardentes de ensaio, constatou-se que a vasilha de madeira e o processo de envelhecimento assumem uma importância fundamental na qualidade final da aguardente, condicionando as suas características físico-químicas, organolépticas e propriedades antioxidantes.

Pela dificuldade de se avaliar o efeito da actividade antioxidante de certos alimentos e bebidas sobre a fisiologia e a saúde humana, torna-se necessário encontrar nestes alimentos indicadores que se correlacionem com os seus efeitos biológicos *in vivo*. Um destes indicadores é a composição fenólica. Outro indicador é a actividade antioxidante em relação à captação de radicais livres.

Assim, com o presente trabalho pretende-se definir o perfil da capacidade antioxidante de aguardentes vínicas comerciais portuguesas e francesas e correlacioná-lo com a composição fenólica, de forma a avaliar a sua qualidade nutracêutica.

Atendendo a este objectivo, o trabalho é estruturado em quatro capítulos, sendo o primeiro capítulo relativo ao estado actual do conhecimento no respeitante aos factores que condicionam o envelhecimento e, portanto, as características físico-químicas, organolépticas e nutracêuticas da aguardente vínica envelhecida; um segundo capítulo descritivo das aguardentes comerciais estudadas (37) e das determinações analíticas efectuadas (teor de polifenóis totais, compostos de massa molecular baixa determinados por HPLC e actividade antioxidante determinada pelo método do DPPH<sup>•</sup>); um terceiro em que são apresentados e discutidos os resultados obtidos nestas condições experimentais; e um quarto, com as principais conclusões.

## **II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1 – HISTÓRIA E UTILIZAÇÕES DA AGUARDENTE**

A destilação é uma técnica muito antiga, descoberta pelos primeiros alquimistas (Plouvier, 2008) e, por isso, torna-se difícil afirmar onde e quando começaram a ser realizadas as primeiras destilações do vinho. Vários historiadores afirmam que a destilação foi usada pelos chineses, 3000 A.C., que descreveram várias fórmulas de destilação e denominavam a aguardente obtida de “espíritos fortes”. Em 2000 A.C. os egípcios já conheciam bem a arte de destilar, que só mais tarde chegou aos países mediterrânicos, aos gregos e romanos. Desde o início, todos estes povos produziam um líquido que era usado para fins medicinais e para a elaboração de perfumes (Léauté, 1990; Plouvier, 2008). Segundo Plouvier (2008), o processo de destilação foi, mais tarde, desenvolvido pelos árabes e foi da língua árabe que derivaram as palavras “álcool” e “alambique”.

Durante o domínio árabe, a técnica e o segredo da destilação difundiram-se rapidamente pela Europa. Nessa época existia uma aura de mistério, mitologia e magia em torno das aguardentes que, durante séculos, foram consideradas como contendo poções mágicas e como sendo portadoras do elixir para a longevidade e cura de doenças.

Os franceses começaram a produzir aguardente entre os séculos XV e XVI e foi um químico francês, Arnaud de Villeneuve, que destilou o primeiro vinho, ao qual chamou “eau-de-vie”, a água da vida, que se dizia fortalecer o corpo e prolongar a vida (Léauté, 1990; Cantagrel, 2008; Garreau, 2008). Ao longo do tempo, os equipamentos de destilação vão sendo aperfeiçoados e, conseqüentemente, os métodos e técnicas de destilação atingem quase a perfeição. Assim, surgiram em França duas das bebidas espirituosas (aguardentes) mais sofisticadas e famosas no mundo, o Cognac e o Armagnac. O Armagnac é o mais antigo destilado francês e, segundo a lenda, nasceu no coração de Gascogne, sendo a bebida favorita de D'Artagnan, o famoso mosqueteiro do romance de Alexandre Dumas. O Cognac e o Armagnac são aguardentes de grande qualidade que evoluem em contacto permanente com vasilhas de carvalho Limousin ao longo dos anos, adquirindo a cor e o “bouquet” que os tornam únicos.

Em Portugal utilizam-se essencialmente os processos de destilação franceses e o envelhecimento é realizado normalmente em vasilhas de carvalho.

## **II.2 – AGUARDENTE VÍNICA**

A aguardente vínica é uma bebida com elevado título alcoométrico, resultante da destilação do vinho. Nos países da União Europeia (UE), denomina-se aguardente vínica a bebida espirituosa obtida exclusivamente pela destilação de vinho ou de vinho tratado ou pela redestilação de um destilado de vinho, com um título alcoométrico máximo de 86 % v/v, um teor de substâncias voláteis igual ou superior a 125 g/hl A.P. (álcool puro) e um teor de metanol máximo de 200 g /hl A.P. (Reg. CE 110/08).

Após a destilação, a aguardente vínica branca apresenta uma transparência e limpidez características, tendo como componentes principais: água, elevado teor em etanol e grande riqueza em compostos voláteis - ésteres, ácidos alifáticos, álcoois superiores, acetais, furfural (Nikanen, 1998). A aguardente vínica também se caracteriza pela ausência de compostos fenólicos (Léauté, 1990; Leclaire *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2008). Portanto, o seu aroma natural é devido à presença de aldeídos, de ácidos gordos, de ésteres e de álcoois superiores (Léauté, 1990).

### **II.2.1 - Factores que condicionam a qualidade da aguardente branca**

A qualidade da aguardente branca é condicionada, em grande parte, pelas características do vinho que lhe dá origem. A localização das vinhas, a escolha das castas e a época da vindima são factores determinantes para produzir um bom vinho para destilação (Belchior, 1987; Léauté, 1990; Cantagrel 2008; Garreau 2008). Também a tecnologia de destilação determina a qualidade da aguardente branca (Cantagrel 2008; Garreau 2008).

#### **II.2.1.1 - Origem Geográfica**

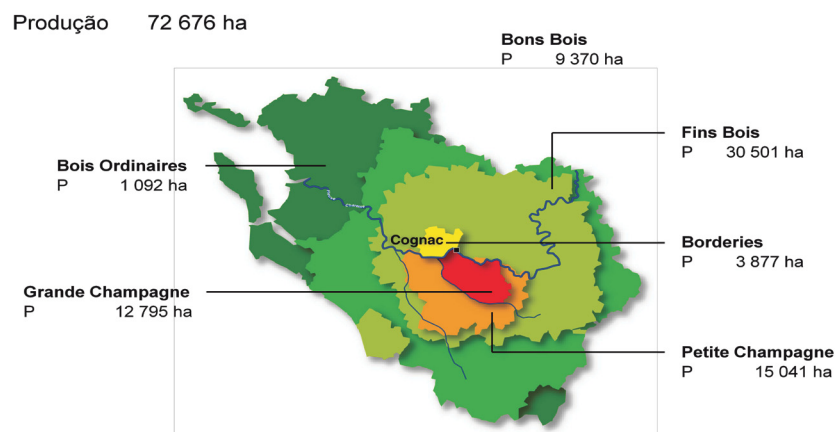
Em França, a qualidade do Cognac e do Armagnac está intimamente ligada à qualidade da matéria-prima que, por sua vez, é influenciada pela natureza do solo e pelo clima, resultante da sua localização geográfica (Léauté 1990; Cantagrel, 2008; Garreau, 2008) – Figura 1.





**Figura 1** - Localização geográfica das regiões de Cognac e de Armagnac (adaptado de BNIA)

A região de Cognac situa-se no sudoeste de França, sobre o eixo fluvial da região de Charente. Esta região subdivide-se, em função da qualidade da aguardente que produz, em seis sub-regiões, que em conjunto formam um mosaico que abrange toda a produção do Cognac: Grande Champagne, Petit Champagne, Borderies, Fins Bois, Bons Bois e Bois Communs, tal como indicado na Figura 2.

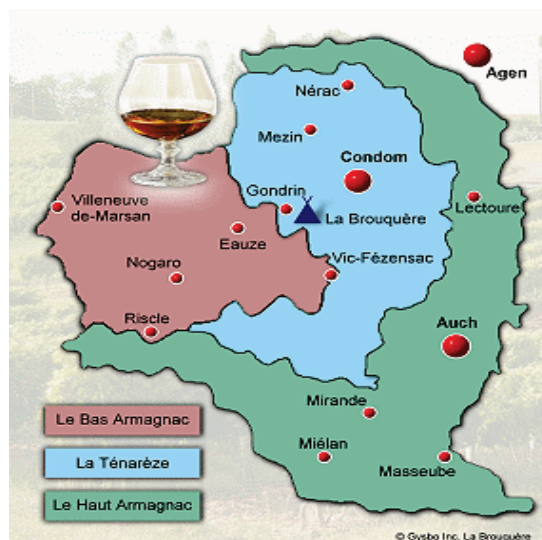


**Figura 2**- Região de Cognac (adaptado de BNIC, 2005). P- produção em hectares (ha).

Segundo Cantagrel (2008), a região de Cognac beneficia de condições excepcionais do ponto de vista climático e geológico. É uma região marcada por um clima de temperaturas amenas e uma humidade relativa elevada, devido à proximidade do rio Charente, e também, por influência do ar marítimo. As características geológicas da região de Cognac são delineadas essencialmente pelas zonas de Grand e Petit Champagne e pela zona de Borderies, com dois tipos de solos distintos. Na zona de Champagne o solo é muito friável,

com proporções importantes de carbonato de cálcio, enquanto nas Borderies predomina o solo silício-argiloso (Cantagrel, 2008).

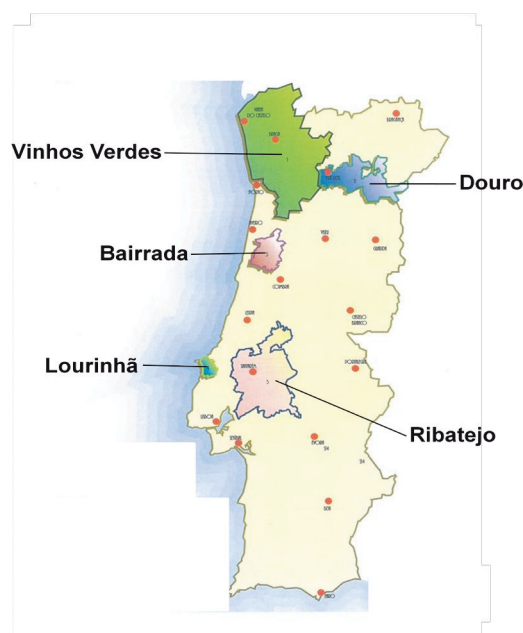
A região de Armagnac situa-se também no sudoeste de França e subdivide-se em três zonas: Bas-Armagnac, Ténarèze e Haut-Armagnac – Figura 3.



**Figura 3** - Região de Armagnac (adaptado de BNIA, 2005).

Esta região, localizada no interior, possui um clima mais quente e seco que Cognac, devido à menor influência do ar oceânico. Segundo Garreau (2008), os solos da região de Armagnac são argilo-calcários bem estruturados, que permitem a expansão das raízes em profundidade e, devido à abundância e variação de lençóis freáticos no subsolo, fazem com que as vinhas resistam bem aos anos mais quentes e de maior secura.

Em Portugal existem cinco regiões produtoras de aguardentes vínicas envelhecidas com direito a Denominação de Origem (D.O.): Lourinhã, Vinhos Verdes, Ribatejo, Douro e Bairrada – Figura 4.



**Figura 4** - Regiões portuguesas produtoras de aguardente DOC (adaptado do IVV, 2008).

Neste contexto merece destaque a região da Lourinhã por ser a única região demarcada do país exclusivamente para a produção de aguardente e é uma das três regiões do espaço Europeu, em posição de igualdade com as de Cognac e de Armagnac. A Lourinhã, demarcada em 1992, está sujeita a um conjunto de regras consignadas em legislação própria: características dos solos, castas autorizadas e recomendadas, práticas de vinificação, título alcoométrico e tempo de estágio.

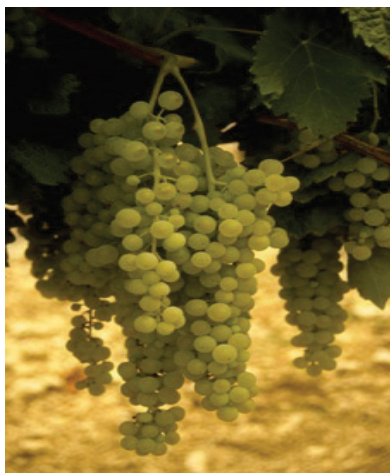
Também a Beira interior, a Estremadura e o Alentejo são regiões produtoras de aguardente vínica, embora com menor expressividade.

Devido à diversidade geográfica entre regiões, as vinhas destinadas à produção de vinhos aptos para a produção de aguardente vínica de qualidade, devem estar instaladas em solos específicos, com características muito próprias, consoante cada região: solos mediterrânicos pardos, parabarros de arenitos finos, argilas, solos calcários pardos, solos litólicos de arenitos, aluviossolos, podzóis, entre outros.

#### **II.2.1.2 - Castas**

A selecção das castas é um factor de extrema importância para a qualidade da aguardente, e as castas brancas são as que originam vinhos com melhor aptidão para destilar e produzir aguardentes com características organolépticas mais apreciadas. Na produção de Cognac e de Armagnac, utilizam-se três castas: a Ugni Blanc, a Colombard e a

Folle-Blanche. Na região de Cognac a Ugni Blanc ocupa 83 % da área total de vinha (Cantagrel, 2008) – Figura 5.



**Figura 5** - Uvas da casta Ugni Blanc (adaptado de BNIC, 2005).

Esta casta apresenta características que a tornam única na produção de aguardentes, originando um vinho ácido, com aroma fino e pouco persistente e com uma riqueza alcoólica não muito elevada (Cantagrel, 2008). Outro aspecto importante, que faz com que esta casta seja preferida em relação a outras é a sua maturação tardia, que impede que os compostos aromáticos da uva sejam destruídos por oxidação (Garreau, 2008). No entanto, as uvas destinadas à produção de vinho para destilação não devem possuir aromas muito intensos, pois dão origem a aguardentes excessivamente aromatizadas (Belchior, 1987a).

As aguardentes portuguesas obtêm-se a partir de vinhos elaborados com uva branca e tinta de castas recomendadas e autorizadas de cada região. No Quadro I., são apresentadas as castas que possuem melhor aptidão para a produção de aguardente vínica em cada região com Denominação de Origem Controlada.

**Quadro I** - Castas autorizadas e recomendadas para a produção de aguardente vínica nas diferentes denominações de origem portuguesas.

<b>Castas</b>			
<b>Autorizadas – 25 %</b>		<b>Recomendadas – 75%</b>	
<b>Brancas</b>	<b>Tintas</b>	<b>Brancas</b>	<b>Tintas</b>
<b>Lourinhã<sup>1</sup></b>		<b>Lourinhã<sup>1</sup></b>	
Cercial; Fernão Pires; Rabo de Ovelha; Siria; Seara Nova; Vital	Carignan; Periquita; Tinta Miúda	Alicante; Alvadurão; Boal-Espinho; Marquinhos; Malvasia rei; Tália	Cabinda
<b>Vinhos Verdes<sup>2</sup></b>		<b>Vinhos Verdes<sup>2</sup></b>	
Branco Escola; Cainho; Cascal; Cascal; Douradinha; Esgança; Esganinho; Esganoso; Esganoso-Lima; Fernão Pires; Folgasão; Formosa; Godelho; Lameiro; Mavasia fina; Malvasia Rei; Rabigato; São Mamede; Semilão	Amaral; Alicante Bouchet; Docal; Doce; Espadeiro-Mole; Labrusco; Mourisco; Pical; Poeirinha; Sousão; Touriga; Verdeal; Verdelho	Alvarinho; Azul-Branco; Aveso; Batoca; Loureiro; Pedernã; Trajadura	Azal-Tinto; Borraçal; Brancelho; Espadeiro; Padeiro-de-Basto; Pedral; Rabo Ovelha; Vinhão
<b>Ribatejo<sup>3</sup></b>		<b>Ribatejo<sup>3</sup></b>	
Alicante Branco; Chardonnay; Malvasia-Rei; Pinot Branco	Aragonez; Merlot; Pinot-Tinto; Touriga Francesa; Touriga Nacional	Arinto; Fernão Pires; Rabo Ovelha; Tália; Trincadeira das Pratas; Vital	Baga; Camarate; Cabernet Sauvignon; Periquita; Tinta Miúda; Trincadeira-Preta
<b>Douro<sup>4</sup></b>		<b>Douro<sup>4</sup></b>	
<b>Brancas</b>		<b>Tintas</b>	
Alicante Branco; Alvarelhão Branco; Arinto; Aveso; Batoca; Bical; Branco Especial; Branco Guimarães; Caramela; Carrega Branco; Cercial; Chasselas; Côdega de Larinho; Diagalves; Dona Branca; Donzelinho Branco; Estreito Macio; Fernão Pires; Folgasão; Gouveio; Gouveio Estimado; Gouveio Real; Jampal; Mavasia Fina; Malvasia Parda; Malvasia Rei; Moscadet; Moscatel Galego Branco; Mourisco Branco; Pé comprido; Pinheira Branca; Praça; Rabigato; Rabigato Franco; Rabigato Moreno; Rabo de Ovelha; Ratinho; Samarrinho; Sarigo; Semillon; Sercial; Siria; Tália; Tamarez; Terrantez; Touriga Branca; Trigueira; Valente; Verdial Branco; Viosinho; Vital		Alicante Bouschet; Alvarelhão; Alvarelhão Ceitão; Arogonéz; Aramon; Baga; Barca; Barreto; Bastardo; Camarate; Carignan; Carrega Tinto; Casculho; Castelã; Castelão; Cidaddelhe; Concieira; Cornifesto; Corropio; Donzelinho Tinto; Engomada; Espadeiro; Gonçalves; Grand Noir; Granjeal; Jaen; Lourel; Malandra; Malvasia Preta; Marujo; Melra; Mondet; Marisco Semente; Nevorira; Patorra; Petit Bouchet; Pinot Noir; Português Azul; Preto Martinho; Ricoca; Roseira; Rufete; Satareno; São Saúl; Sevolhão; Sousão; Tinta Aguiar; Tinta Barroca; Tinta Carvalha; Tinta Fontes; Tinta Francisca; Tinta Lameira; Tinta Martins; Tinta Mesquita; Tinta Penajóia; Tinta Pereira; Tinta Pomar; Tinta Tabuaço; Tinto Cão; Tinto Sem Nome; Touriga fêmea; Touriga Franca; Touriga Nacional; Trincadeira; Valdosa; Varejoa	
<b>Bairrada<sup>5</sup></b>		<b>Bairrada<sup>5</sup></b>	
<b>Brancas</b>		<b>Tintas</b>	
Arinto; Bical; Cercial; Chardonnay; Fernão Pires; Pinot Blanc; Rabo de Ovelha; Sauvignon; Sercealinho; Verdelho		Alfrocheiro; Arogonéz; Baga; Bastardo; Camarate; Castelão; Cabernet Sauvignon; Jaen; Merlot; Pinot Noir; Rufete; Syrah; Tinta Barroca; Tinto Cão; Touriga Franca; Touriga Nacional	

Fonte: 1-Decreto-Lei n.º 323/94, 2-Decreto-Lei n.º 449/99, 3-Decreto-Lei n.º 45/2000, 4-Decreto-Lei n.º 190/2001, 5-Decreto-Lei n.º 301/2003.

### **II.2.1.3 - Características do vinho para destilação**

As características de um vinho para destilar são diferentes das características de um vinho para consumo. Os vinhos destinados ao fabrico de aguardentes vínicas devem apresentar um sabor sem defeitos e um aroma fino e desenvolvido (Léauté, 1990; Cantagrel, 2008). A produção de boas aguardentes exige vinhos provenientes de uvas sãs e com características específicas, que permitam a sua conservação durante alguns meses sem necessidade de aplicação de dióxido de enxofre (Belchior, 1987). Segundo vários autores (Belchior, 1987; Léauté, 1990; Ledauphin *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2008), os destilados de vinho que apresentam melhor qualidade são aqueles que não contêm dióxido de enxofre, pois a sua presença origina, ao longo da destilação, a formação de compostos sulfurados, designados genericamente por mercaptanos, que conferem aromas desagradáveis à aguardente.

Por outro lado, a acidez fixa do vinho deve ser elevada (superior a 4g de ácido tartárico/dm<sup>3</sup>), para garantir a estabilidade microbiológica e condições anti-sépticas e, deste modo, proteger e conservar o vinho até ao momento da destilação (Belchior, 1987; Garreau, 2008). De acordo com Garreau (2008), não é raro encontrar mostos destinados à produção de Armagnac com pH inferior a 3. A elevada acidez durante a destilação parece também favorecer: a hidrólise de certos constituintes do vinho, que originam a libertação de compostos aromáticos do grupo dos terpenos, os quais conferem às aguardentes aromas intensos e específicos; a formação, em pequena quantidade, de acetato de etilo (Ferrari *et al.*, 2004; Ledauphin *et al.*, 2006).

O título alcoométrico dos vinhos para destilação não deve ser elevado, uma vez que mostos com baixo teor de açúcares originam vinhos com reduzida acidez volátil, o que confere melhores características ao destilado. Para além disso, vinhos com um título alcoométrico baixo originam, também, aguardentes com um título alcoométrico ligeiramente mais baixo, constituindo assim um factor de qualidade, pois para produzir a mesma quantidade de destilado é necessário maior volume de vinho pouco alcoólico, fazendo com que exista maior concentração de substâncias aromáticas (Léauté, 1990; Belchior, 1987; Cantagrel, 2008; Garreau, 2008).

O teor de taninos do vinho a destilar deve ser baixo, já que concentrações elevadas destes compostos são responsáveis pela adstringência, aspereza e amargo do destilado. É, assim, preferível recorrer a vinhos brancos ou a tintos vinificados de bica aberta (Lafon *et al.*, 1964).

Também se recomenda a destilação precoce dos vinhos, para evitar alterações provocadas por bactérias e/ou leveduras, ou por oxidações no decorrer da conservação. Segundo Belchior (1987), para a obtenção de aguardentes de qualidade não deverão ocorrer reacções de oxidação nos vinhos. É, por isso, aconselhável destilar o vinho assim que termine a fermentação. Tanto em Portugal como em França, os vinhos devem ser destilados até dia 31 de Março, pois a partir desta altura, devido ao calor, já é bastante difícil conservá-los (Belchior 1987; Garreau, 2008).

### **II.3 – TECNOLOGIA DE DESTILAÇÃO**

Vários trabalhos (Cantagrel, 2008; Jurado *et al.*, 2008; Payan, 2007) têm demonstrado que as características do destilado, correlacionadas com o processo de destilação e pelo modo como é conduzido, condicionam a qualidade da aguardente envelhecida. O processo de destilação não é um método científico mas sim uma arte, de saber destilar, com o objectivo de preservar as características do vinho, de modo a favorecer a existência de aromas específicos e eliminar substâncias indesejáveis do ponto de vista organoléptico e nutracêutico (Belchior, 1987; Léauté, 1990; Cantagrel, 2008).

As características do vinho e a técnica de destilação determinam a passagem para o destilado de diferentes compostos, uma vez que condicionam as várias reacções – esterificações, acetalizações e hidrólises (Belchior, 1987).

A destilação consiste em aquecer o vinho até à fase de ebulição e condensar os vapores que vão sendo libertados. É uma técnica que permite a separação do álcool e dos compostos voláteis do vinho (Belchior, 1987; Léauté, 1990; Cantagrel, 2008; Garreau, 2008). No decurso da destilação ocorrem variações dos compostos voláteis já existentes no vinho (Léauté, 1990). Já que a facilidade de volatilização dos diferentes compostos está relacionada com os seus pontos de ebulição e com a influência de todas as outras substâncias da mistura. Com efeito, nem todos os compostos voláteis do vinho, que são

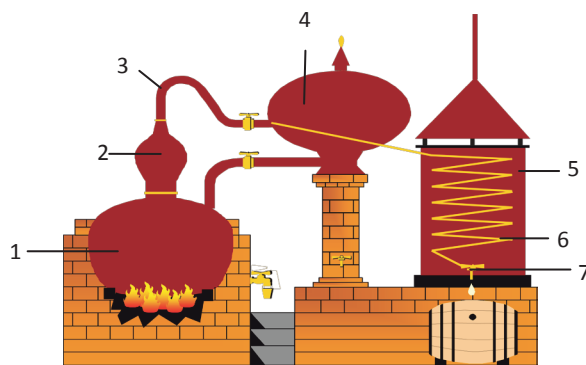
arrastados pelo vapor hidroalcoólico, passam com a mesma velocidade na destilação, pois pertencem aos mais diferentes grupos químicos: álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos azotados, entre outros.

A tecnologia usada na destilação é variável com o tipo de equipamento, pois as características deste sistema e a forma específica como a destilação é nele conduzida implicam necessariamente a obtenção de aguardentes com características distintas. Concretamente, o Cognac resulta de um processo de dupla destilação em alambique “Charentais”, e o Armagnac é obtido numa única destilação em coluna. Em Portugal, na produção de aguardente é utilizado o alambique ou a coluna de destilação (Belchior, 1987), conforme a região e o produtor.

### II.3.1 - Destilação em alambique do tipo “Charentais”

Para a produção de uma boa aguardente vínica o alambique deve ser de cobre, pelas vantagens que apresenta: maleável; bom condutor do calor; resistente à corrosão provocada pelo calor e pelo vinho; reage com os componentes do vinho formando sais de compostos sulfurados e ácidos gordos; constitui um catalisador favorável para as reacções dos compostos do vinho (Leauté, 1990; Cantagrel 2008; Garreau, 2008).

O alambique é um equipamento formado por diferentes elementos com funções distintas, mas todos eles importantes para a produção de aguardente vínica de qualidade – Figura 6.



**Figura 6** - Constituição do Alambique Charentais. 1-caldeira, 2-chapéu ou capitel, 3-colo de cisne, 4- aquece-vinhos ou pré-aquecimento, 5-condensador, 6-serpentina, 7-porta-alcoómetro (adaptado de BNIC, 2005).

A **caldeira** é o recipiente que recebe o vinho e é concebida para adquirir o calor directo da chama (lenha, queimadores a gás, entre outros), propiciando uma boa uniformidade de



aquecimento do vinho (Léauté, 1990; Cantagrel 2008), e serve como regulador e acumulador de energia entre a fonte de calor e o vinho (Belchior, 1987).

O **chapéu ou capitel** é a parte do alambique que se situa logo acima da caldeira e a sua forma e volume determinam a concentração, selecção e separação dos diferentes compostos voláteis do vinho (Cantagrel, 2008). Portanto, a função do capitel é canalizar os vapores formados na caldeira, permitindo uma condensação parcial dos mesmos, melhorando, assim, a separação dos constituintes do vinho: durante o processo os componentes voláteis sofrem condensação no capitel e retornam à caldeira, onde são redestilados - processo de refluxo ou de rectificação (Léauté, 1990).

O **colo de cisne** é a parte contígua e curva do capitel e destina-se a conduzir os vapores provenientes do capitel para a serpentina (Cantagrel, 2008).

O **aquece-vinhos** ou **pré-aquecimento** do alambique é uma estrutura optativa e tem como principal função a recuperação do calor: o vapor quente da destilação ao passar pelo pré-aquecedor permite o pré-aquecimento do vinho nele existente e que se destina à próxima destilação (Cantagrel, 2008).

A **serpentina** segue-se ao colo de cisne, sendo formada por um tubo cilíndrico em espiral, que está submerso em água, dentro do condensador. A parte inicial da serpentina apresenta um diâmetro mais largo, para facilitar a condensação e vai progressivamente diminuindo até chegar ao porta- alcoómetro (Léauté, 1990).

O **condensador** é um reservatório com água que permite a condensação do destilado. Como existe uma entrada contínua de água fria, na parte inferior do condensador, e ocorre libertação de calor através da serpentina em virtude da condensação do vapor, é normal a existência de um elevado gradiente de temperatura da água presente no condensador (10 °C na parte inferior e 70 a 80 °C à superfície). Durante a condensação, a reacção do cobre com os componentes do destilado (componentes sulfurados e ácidos gordos) origina combinações insolúveis (Cantagrel *et al.*, 1990), que são removidas por filtração, no **porta - alcoómetro**. O **alcoómetro**, colocado no porta-alcoómetro, permite controlar o progresso da destilação, verificando continuamente o título alcoométrico e a temperatura de saída do destilado (Léauté, 1990; Cantagrel 2008; Garreau, 2008).

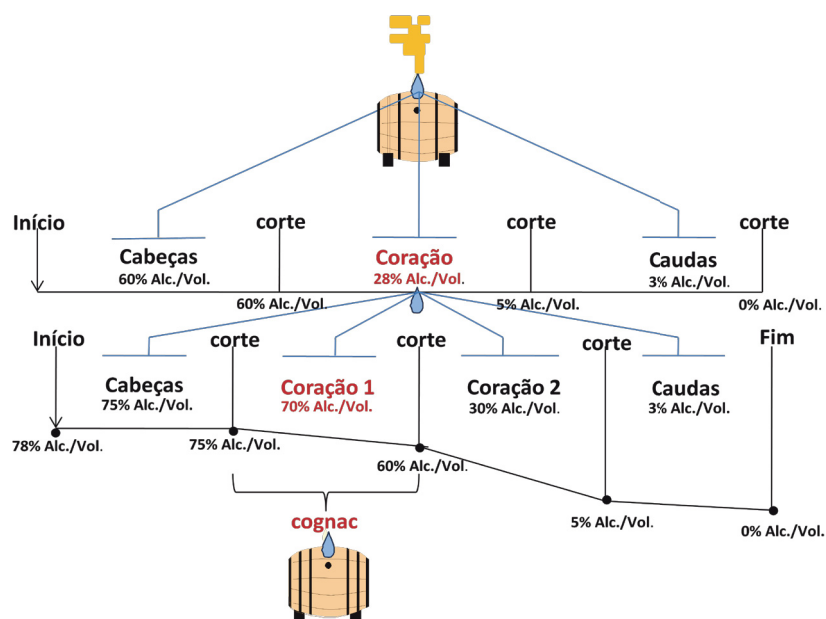
Neste tipo de alambique é realizada uma destilação descontínua ou dupla destilação, que tem como objectivo, conseguir uma aguardente mais pura e sem defeitos e mais concentrada - com maior rendimento em álcool (Cantagrel, 2008).

A destilação descontínua inicia-se com uma primeira destilação do vinho, que origina três fracções distintas de destilado: as cabeças, o coração e as caudas. O objectivo é separar os diferentes componentes do destilado. Ao longo do processo de destilação esta separação é muito importante para, por um lado, assegurar que a fracção do coração apresenta uma baixa concentração em compostos indesejáveis do ponto de vista organoléptico, e por outro, conter uma concentração aceitável de etanol e grande riqueza em compostos aromáticos benéficos (Jurado *et al.*, 2008).

O momento de separação das fracções denomina-se corte e é a operação responsável pela selecção de boas ou más características, que conferem aromas e gostos específicos, determinantes da qualidade da aguardente (Léauté, 1990).

As **cabeças** possuem um título alcoométrico de 60 % v/v e representam entre 2 % e 4 % do volume total do destilado. É a fracção formada pelos compostos mais voláteis, como o acetato de etilo. O **coração**, quando sai do alambique, apresenta um título alcoométrico de 27-30 % v/v e representa 70 % a 80 % do destilado (Cantagrel *et al.*, 1990). Apresenta um ponto de ebulição que varia entre 78,4 °C e 100 °C e é a porção mais importante do destilado, com maior concentração de álcool e menor proporção de compostos indesejáveis em termos organolépticos. As **caudas**, recolhidas no final da destilação, possuem um título alcoométrico entre 0 e 5 % v/v. O seu volume representa 10% a 20% do volume total do destilado. Entre os componentes característicos das caudas destacam-se o furfural e o lactato de etilo (Cantagrel *et al.*, 1990; Léauté, 1990).

A primeira destilação termina quando o alcoómetro marca 0 % v/v de álcool. A fracção do coração sofre então uma segunda destilação, denominada “bonne chauffé” (Léauté, 1990). Desta segunda destilação resultam quatro novas fracções: cabeças, primeiro coração (aguardente), segundo coração e caudas, como se esquematiza na figura 7.



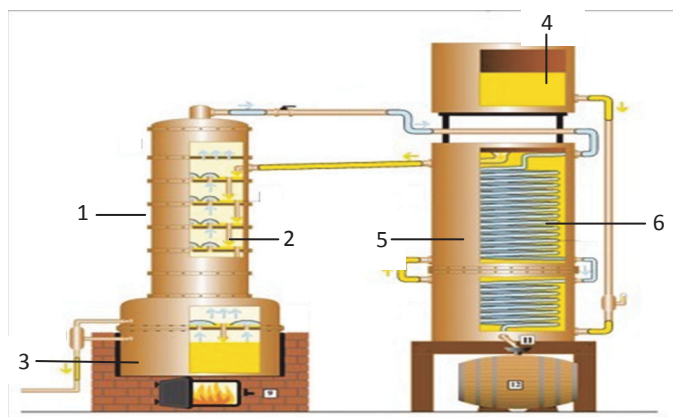
**Figura 7** - Esquema representativo da dupla destilação (adaptado de Léauté, 1990).

Segundo Léauté (1990), é nesta fase da destilação que são mais significativas as reacções entre os componentes do destilado (hidrólises, esterificações, reacções com o cobre, produção de furfural, entre outras) e que se geram os mais delicados aromas.

Concluída a destilação, a aguardente recolhida é colocada em vasilhas de madeira.

### II.3.2 - Destilação em coluna

O sistema contínuo é composto por uma coluna, que contém no interior um conjunto de pratos sobrepostos, onde são separados os diferentes compostos voláteis do vinho. Segundo Garreau (2008), a caldeira da coluna de destilação, o aquece-vinhos e o sistema de refrigeração constituem as partes principais do sistema, ilustradas na figura 8.



**Figura 8** - Constituição da coluna de destilação. 1-coluna, 2-pratos da coluna, 3-caldeira, 4-aquece-vinhos, 5-condensador, 6-serpentina (adaptado do BNIA, 2005).

O vinho a destilar é colocado no aquece-vinhos, onde pode atingir temperaturas da ordem dos 85 °C, e entra na coluna pela parte superior, percorrendo todos os pratos até à base. Na base da coluna existe um depósito onde se acumula o rescaldo - fracção constituída essencialmente por água que não foi destilada (Lafon, 1973). Uma corrente de vapor quente, produzida na caldeira, penetra na parte inferior da coluna, originando a ebulição do vinho. O vapor libertado na ebulição do vinho sobe através da coluna de destilação, atravessando sucessivamente todos os pratos da coluna, e entra em contacto com o vinho, que está a ser introduzido continuamente na coluna. De prato em prato, o vinho vai esgotando as substâncias voláteis, à medida que vai sendo destilado. A parte líquida faz um percurso descendente pela coluna de rectificação, enquanto a parte que permaneceu sob a forma de vapor é conduzida para o condensador, através do qual sai do destilador, já sob a forma de aguardente (Lafon, 1973; Belchior, 1987; Garreau, 2008). Quando o sistema atinge o equilíbrio (temperatura, débito e título alcoométrico do destilado) a aguardente é recolhida e colocada em vasilhas de madeira.

A coluna de destilação tem como principal característica a possibilidade de efectuar uma única destilação em funcionamento contínuo. Segundo vários autores (Lafon, 1973; Garreau, 2008) a destilação contínua apresenta vantagens económicas relativamente ao método “Charentais”, uma vez que permite destilar grandes volumes de vinho num menor espaço de tempo e produzir aguardentes de qualidade constante, embora com menor riqueza aromática (Lafon, 1964). A coluna de destilação tem uma função de rectificação muito superior à do alambique Charentais e permite uma alimentação contínua em vinho e uma saída constante de aguardente (Belchior, 1987; Garreau, 2007).

#### **II.4 - O ENVELHECIMENTO EM MADEIRA**

Pese embora a importância do destilado na qualidade da aguardente vínica, esta não pode ser consumida logo após a destilação, tendo que sofrer um processo de envelhecimento em madeira, mais ou menos prolongado.

O envelhecimento constitui assim outro grande factor determinante da qualidade da aguardente (Belchior, 1987). É da harmonia entre o destilado e o envelhecimento que resultará o tipo e a categoria de aguardente velha. A qualidade da aguardente vínica

envelhecida vai depender basicamente das características da vasilha e das condições de envelhecimento – Figura 9.



**Figura 9** - Envelhecimento de aguardente (adaptado de BNIA, 2005).

O envelhecimento da aguardente em vasilha de madeira proporciona uma efectiva melhoria das características sensoriais, na medida em que promove uma diminuição significativa do título alcoométrico e, assim, da agressividade da bebida, tornando-a mais macia e com um aumento simultâneo da doçura, do aroma e do sabor. Segundo Karvela *et al.* (2008), o envelhecimento em madeira é um processo lento, que transforma o destilado novo numa bebida com características físico-químicas e perfil aromático superiores.

#### **II.4.1 - Factores condicionantes no envelhecimento de aguardentes**

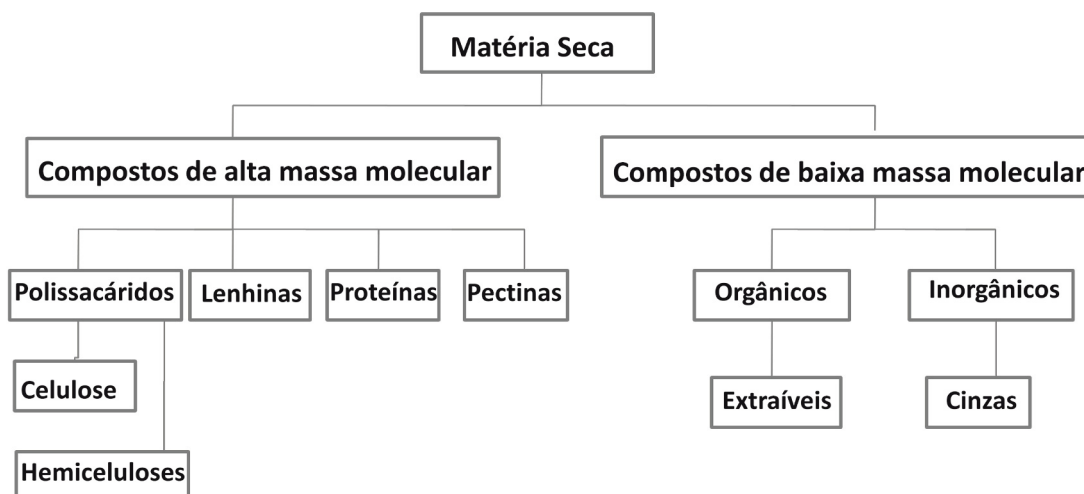
Vários estudos indicam que as características organolépticas dos vinhos (Garde-Cerdan *et al.*, 2006; Frangipane *et al.*, 2007; Ortega-Hera, 2007) e das aguardentes (Belchior *et al.*, 2001; Canas, 2003; Caldeira, 2004; Batista de Aquino *et al.*, 2006; Caldeira *et al.*, 2006b; Casanova, 2007) que contactam com a madeira possuem um carácter distinto relativamente aos produtos enológicos que não estagiam em madeira. Esta distinção resulta da influência das características da madeira e dos fenómenos envolvidos no envelhecimento, sendo estes últimos fortemente condicionados por diversos factores, nomeadamente: a espécie botânica da madeira e a sua origem geográfica, o nível de queima da vasilha, o tempo de envelhecimento (Puech e Mosedale, 1998; Quaresma, 2000; Belchior *et al.*, 2001; Canas, 2003; Patrício *et al.*, 2005; Caldeira *et al.*, 2006; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008), a dimensão e o estado de utilização da vasilha (Belchior *et al.*, 2005; Canas *et al.*, 2008), o meio hidroalcoólico, as operações tecnológicas

realizadas e as condições da cave (Calvo *et al.*, 1992; Puech *et al.*, 1998; Canas *et al.*, 2002).

#### **II.4.1.1 – Vasilha de madeira**

##### **II.4.1.1.1 - Composição química da madeira**

Em termos genéricos, os compostos químicos da madeira dividem-se em dois grandes grupos: compostos de massa molecular elevada, como os polissacáridos (celuloses e hemiceluloses), lenhinas, proteínas e pectinas e, também, compostos de massa molecular baixa. Estes últimos apresentam teores variáveis consoante a espécie botânica da madeira, dividindo-se em compostos orgânicos ou extraíveis, como os compostos fenólicos, e em compostos inorgânicos ou cinzas - Figura 10.



**Figura 10** - Diagrama representativo da composição química da madeira (adaptado de Fengel e Wegener, 1989).

A celulose é o constituinte mais abundante (cerca de 40 %), sendo seguida pelas hemiceluloses e lenhinas, representando cada 25 % do peso seco da madeira, e compostos extraíveis, representando cerca de 10 % do peso seco da madeira. Os compostos potencialmente extraíveis da madeira são sobretudo: glicerol, óleos voláteis (Parazzi *et al.*, 2008), taninos, ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos, cumarinas, lenhanas, fenil cetonas, ésteres fenólicos, fenóis voláteis e açúcares, que podem modificar as características da aguardente (Puech e Moutounet., 1988; Viriot *et al.*, 1993; Canas *et al.*, 2002; Canas, 2003; Patrício *et al.*, 2005; Canas *et al.*, 2006; Caldeira *et al.*, 2006; Parazzi *et al.*, 2008). Tendo em conta o âmbito do trabalho, especial atenção será dada aos

compostos extraíveis da madeira, nomeadamente aos compostos fenólicos e aos aldeídos furânicos.

Dentro dos compostos de massa molecular baixa, assumem particular importância os compostos orgânicos extraíveis, nomeadamente os compostos fenólicos e furânicos, por serem cedidos às aguardentes durante o envelhecimento em madeira e contribuírem para: I) as características físico-químicas (Canas, 2003; Alamo Sanza *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2008); II) as características organolépticas (Canas *et al.*, 2000; Caldeira *et al.*, 2006b; Ortega-Heras *et al.*, 2007); III) a avaliação da sua qualidade e genuidade, actuando como marcadores do envelhecimento em madeira e permitindo assim a sua diferenciação (Canas *et al.*, 2008; Muñoz-Muñoz *et al.*, 2008); IV) a actividade antioxidante e os potenciais efeitos benéficos para a saúde humana (Umar *et al.*, 2005; Al Awwadi *et al.*, 2007; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008a; Schwarz *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um grupo hidroxilo ligado a um anel aromático. Podem ser enquadrados de acordo com a sua estrutura química em duas grandes classes: os flavonóides e não-flavonóides. Na madeira predominam os compostos fenólicos não flavonóides, designadamente os ácidos e os aldeídos fenólicos.

### **Ácidos fenólicos**

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por possuir um anel benzénico, um grupo carboxilo e um ou mais substituintes hidroxilo e/ou metoxilo na molécula. Estes compostos agrupam-se em duas classes: derivados do ácido benzóico, com uma estrutura em  $C_6 - C_1$ ; e derivados do ácido cinâmico, com uma estrutura ( $C_6 - C_3$ ).

Os ácidos gálicos e elágico são os mais importantes compostos de massa molecular baixa das madeiras de carvalho e de castanheiro (Canas *et al.*, 2000).

### **Aldeídos fenólicos**

Os aldeídos fenólicos constituem um grupo de compostos que resultam da degradação das lenhinas, podendo encontrar-se na forma livre ou ligados aos constituintes da parede celular (Mosedale e Puech, 1998). Podem ser classificados segundo dois critérios: i) pelo

número de átomos de carbono, em benzóicos, com estrutura em  $C_6 - C_1$ , e em cinâmicos, com estrutura em  $C_6 - C_3$ ; ii) pelo número de grupos metoxilo, em guaiacilo (monometoxilados) e em siringilo (bimetoxilados) – Quadro II.

**Quadro II** – Classificação dos aldeídos fenólicos da madeira.

Nº Grupos metoxilo	Nº Átomos carbono	
	$C_7$ <i>benzóicos</i>	$C_9$ <i>cinâmicos</i>
1 <i>Guaiacilo</i>	Vanilina	Coniferaldeído
2 <i>Siringilo</i>	Siringaldeído	Sinapaldeído

Os aldeídos cinâmicos e benzóicos referidos no Quadro II, foram identificados por Chen (1970) e por Seikel *et al.* (1971) em madeiras de carvalho e de castanheiro.

### **Taninos**

Os taninos são substâncias polifenólicas constituídas por uma molécula de açúcar, normalmente D-glucose, esterificada com ácido gálgico ou com ácido hexahidroxidifenílico. Estes compostos são facilmente hidrolisáveis, por via enzimática ou em condições ácidas ou básicas, dando origem a ácido gálgico (galhotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos), respectivamente.

Segundo Simón *et al.* (2006), os elagitaninos mais abundantes na madeira de carvalho são os monómeros: castalagina, roburina E, vescalagina e grandinias. Vivas *et al.* (1996) verificaram que as espécies de carvalho apresentam uma concentração de taninos elágicos superior ao castanheiro, o que indica que a concentração destes compostos na madeira varia bastante com a espécie botânica e com a origem geográfica (Simon *et al.*, 1999).



### **Aldeídos furânicos**

Os aldeídos furânicos são compostos heterocíclicos, que contêm um anel furânico (Campos, 1987). Existem em muito baixa concentração na madeira, mas são produzidos em quantidades relativamente abundantes durante o tratamento térmico das vasilhas, em resultado da termodegradação dos açúcares. Deste modo, as hexoses constituintes da celulose, originam o 5-hidroximetilfurfural e o 5-metilfurfural, enquanto as pentoses, constituintes principais das hemiceluloses, originam o furfural (Haluk e Irnoul, 1998).

#### **II.4.1.1.2 - Extracção dos compostos da madeira pela aguardente**

A extracção dos compostos da madeira pela aguardente é um processo condicionado por numerosos factores interdependentes e a sua evolução ao longo do tempo depende essencialmente das condições de envelhecimento (Mosedale e Puech, 1998; Belchior *et al.*, 2001; Canas *et al.*, 2002; Canas, 2003; Caldeira 2004; Caldeira *et al.*, 2006).

O envelhecimento da aguardente em vasilhas de madeira é de extrema importância, já que a madeira é a única fonte de compostos fenólicos da aguardente (Canas, 2003). É durante este processo que ocorrem vários fenómenos de interacção entre o destilado e a madeira, que permitem a evolução e o aumento de complexidade ao longo tempo (Puech *et al.*, 1998; Canas 2003; Caldeira *et al.*, 2006; Canas *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008).

Com efeito, trata-se de um processo complexo, que envolve cinéticas de evaporação/impregnação da aguardente, bem como cinéticas de extracção/difusão dos compostos fenólicos e furânicos da madeira para a aguardente (Kadim e Manheim 1999; Canas *et al.*, 2002; Patrício *et al.*, 2005; Canas *et al.*, 2008).

A extracção é um fenómeno que ocorre na madeira quando impregnada de aguardente, logo a intensidade de extracção dos compostos depende da profundidade de impregnação da aguardente na madeira (Puech e Mosedale, 1998; Canas *et al.*, 2002; Patrício *et al.*, 2005), das características do destilado e das demais condições de extracção (Belchior *et al.*, 2003). Deste processo de transferência resultam aguardentes ricas em compostos que lhes conferem cor, aroma e sabor característicos (Canas, 2003; Caldeira, 2004).

#### **II.4.1.1.3 - Influência da espécie botânica da madeira**

As espécies florestais mais utilizadas em tanoaria são o carvalho e, secundariamente, o castanheiro (Vivas, 1996; Canas, 2003; Caldeira *et al.*, 2006). Relativamente à madeira a utilizar no envelhecimento, Portugal rege-se pela legislação europeia, que especifica a obrigatoriedade da utilização da madeira de carvalho. Segundo Cantagrel (2008) e Garreau (2008), para o Cognac e para o Armagnac, é obrigatório o estágio da aguardente em madeira de carvalho Limousin.

A utilização preferencial da madeira de carvalho em tanoaria é atribuída às suas propriedades físicas, designadamente a impermeabilidade aos líquidos e a ligeira permeabilidade aos gases, promovendo a oxigenação da aguardente durante o processo de envelhecimento (Masson *et al.*, 1996). Por outro lado, a madeira de carvalho apresenta uma composição química que a torna particularmente apta para este fim, por ser rica em compostos orgânicos extraíveis, dando origem a aguardentes envelhecidas com características organolépticas bastante apreciadas.

A madeira de castanheiro, outrora muito utilizada em Portugal, tem revelado uma elevada aptidão para o envelhecimento de aguardentes, por permitir obter aguardentes envelhecidas com elevada qualidade e um menor período de tempo (Canas *et al.*, 1999; Canas *et al.*, 2000; Belchior *et al.*, 2001; Caldeira, 2004).

Vários estudos indicam que existe uma correlação muito significativa entre a composição química da madeira e a da aguardente nela envelhecida (Canas, 2003; Caldeira *et al.*, 2006; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008). Portanto, a espécie botânica da madeira imprime um carácter próprio à aguardente em termos de composição química e qualidade. Belchior *et al.* (2001) e Patrício *et al.* (2005) observaram uma diferenciação significativa das aguardentes relativamente ao teor de polifenóis totais e à intensidade da cor, em função da espécie botânica da madeira usada no envelhecimento.

Num outro trabalho observou-se que as aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro e de carvalho português apresentavam maior evolução das características cromáticas - cor mais intensa, menor luminosidade e uma tonalidade topázio mais marcada (Belchior *et al.*, 2001; Canas, 2003). Constatou-se que a madeira de castanheiro é

significativamente mais rica em compostos extraíveis, como a vanilina, o sinapaldeído e os ácidos gálico, sirínico e vanílico, seguida pelas madeiras de carvalho português, de Limousin, de Allier e, por último de carvalho americano (Canas, 2003). Em vários estudos foram comparados os teores de ácidos fenólicos em aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho Limousin e de castanheiro, tendo sido concluído que nas primeiras predomina o ácido elágico seguido pelos ácidos gálico, sirínico e vanílico, enquanto nas aguardentes envelhecidas em castanheiro, o ácido gálico é o composto mais abundante, seguido pelo ácido elágico e, por fim, os ácidos sirínico, vanílico e ferúlico (Goldberg *et al.*, 1999; Duriez *et al.*, 2001; Belchior *et al.*, 2003; Canas, 2003; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008). A diferenciação das aguardentes envelhecidas em diferentes espécies de madeira de carvalho pode basear-se nos ácidos elágico e ferúlico, cujos teores são superiores nas aguardentes envelhecidas em carvalho português, e na escopoletina, que predomina nas aguardentes envelhecidas em carvalho americano. Também a etilvanilina e a acetovanilona actuam como marcadores químicos, permitindo distinguir aguardentes relativamente à madeira onde foram envelhecidas (Silva, 2006; Canas *et al.*, 2008).

Belchior *et al.* (2005) observaram que as aguardentes envelhecidas durante três anos em castanheiro apresentam maiores e mais rápidas extracções dos compostos extraíveis da madeira em comparação com as de carvalho.

Quanto ao perfil sensorial das aguardentes, as madeiras de carvalho português e castanheiro apresentam mais potencialidades no envelhecimento de aguardentes vónicas, por conferirem uma maior intensidade nos aromas “baunilha”, “madeira” e no “corpo”, comparativamente com as madeiras de carvalhos franceses (Limousin e Allier) e americano (Caldeira, 2004).

Importa referir que a influência da espécie botânica pode ser afectada pela variabilidade imprimida pela origem geográfica (Canas *et al.*, 2000; Caldeira, 2004) e, dentro da mesma origem, pela floresta (Mosedale, 1996), pela árvore (Doussot *et al.*, 2000) e pela idade da madeira (Masson *et al.*, 1995).

#### **II.4.1.1.4 - Influência do tratamento térmico da vasilha**

O tratamento térmico da vasilha de madeira compreende duas etapas: a vergatura e a queima das aduelas. Na fase inicial, de vergatura, através da combinação da temperatura e do humedecimento, procura-se aumentar a plasticidade da madeira, de forma a moldar progressivamente as aduelas até atingirem a forma côncava sem que ocorra ruptura. A etapa seguinte constitui a fase da queima, que pode ser ligeira, média ou forte (consoante a intensidade do aquecimento e o tempo da operação). O principal objectivo da queima é promover alterações na estrutura anatómica da madeira e induzir importantes modificações na sua composição química, quer por alteração dos compostos já existentes quer pela formação de novos compostos (Canas, 2003; Canas *et al.*, 2007; Parazzi, 2008).

A maior parte dos compostos extraídos da madeira pela aguardente e a sua concentração resulta da degradação estrutural das macromoléculas da madeira (lenhinas, hemiceluloses e celulose) por via da queima, durante o processo de fabrico da vasilha (Sarni *et al.*, 1991; Puech *et al.*, 1998). A intensidade da queima confere acréscimos à aguardente no que diz respeito aos teores de compostos extraíveis da madeira. Assim, observa-se uma tendência para o aumento dos teores de derivados furânicos, aldeídos fenólicos, ácidos fenólicos, cumarinas e fenóis voláteis (Canas, 2003; Caldeira, 2004). A formação e transformação dos compostos é diferenciada à medida que aumenta a intensidade da queima.

A lenhina, a temperaturas da ordem dos 120 – 125 °C, sofre um processo de descarboxilação e clivagem de certas ligações, originando aldeídos fenólicos, sobretudo cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído). A partir das hemiceluloses forma-se o furfural e da celulose o hidroximetilfurfural (HMF) e o 5-metilfurfural (Sarni *et al.*, 1991; Haluk e Irmoul, 1998; Canas *et al.*, 2002; Canas 2003). Com o aumento da temperatura (150 - 160 °C) dá-se também a clivagem oxidativa dos aldeídos cinâmicos e formam-se aldeídos benzóicos em grande quantidade (vanilina e siringaldeído) e os correspondentes ácidos fenólicos (Sarni *et al.*, 1991; Canas *et al.*, 2002; Canas 2003). A temperaturas da ordem dos 200 °C, os ácidos fenólicos originam fenóis voláteis (Caldeira *et al.*, 2006).

Foi observado o aumento da concentração de ácido elágico na aguardente, resultante da degradação dos elagitaninos por acção da queima mas, em contrapartida, o teor de ácido gálgico diminuí em vasilhas de queima forte (Canas, 2003). Belchior *et al.*, (2001)

constatarem um aumento do extracto seco, da acidez total, da intensidade da cor e dos polifenóis totais das aguardentes à medida que aumentava o nível de queima. Vários trabalhos (Belchior *et al.*, 2001; Canas, 2003) foram realizados sobre a influência da intensidade da queima nas características cromáticas (analíticas e sensoriais) da aguardente. Revelaram que o aumento da intensidade da queima é seguido por um aumento na intensidade da cor, um decréscimo da luminosidade e um aumento das componentes amarela e vermelha que se reflecte numa maior saturação da aguardente.

Quanto às características sensoriais, em termos de aroma e sabor, as aguardentes envelhecidas em vasilhas de queima forte evoluem mais rapidamente, na medida em que a intensidade de determinados aromas (baunilha, caramelo, especiarias, frutos secos, torrado, madeira), bem como do sabor (corpo, untuosidade, aroma de boca e persistência) aumenta substancialmente e, em simultâneo, vai diminuindo a intensidade de aromas depreciativos, como caudas, herbáceo e borracha (Caldeira, 2004).

#### **II.4.1.1.5 - Estado de utilização da vasilha**

O estado de utilização da vasilha (vasilha nova *versus* vasilha usada) durante o processo de envelhecimento da aguardente é um aspecto que também influencia as características químicas e organolépticas das mesmas, pois a madeira nova cede uma quantidade mais elevada de compostos extraíveis à aguardente. Segundo Pérez-Prieto *et al.* (2002) e Canas (2003), o potencial de extracção dos compostos fenólicos da vasilha tende a diminuir após cada utilização. Em vários estudos (Calvo *et al.*, 1992; Piggot *et al.*, 1993) foi observada a evolução da composição química da aguardente em vasilhas novas e usadas, verificando-se uma maior concentração de ácido gálgico e aldeídos fenólicos nas aguardentes envelhecidas em vasilhas novas, e uma diminuição muito significativa de todos os compostos fenólicos extraíveis, excepto os ácidos ferúlico e gálgico, em vasilhas reutilizadas. O mesmo foi constatado em estudos com Armagnacs analisados por Puech *et al.* (1985): 50 % dos compostos fenólicos da madeira eram extraídos pela aguardente em vasilhas novas, enquanto em vasilhas já usadas apenas 35 % destes compostos eram extraídos.

#### **II.4.1.1.6 - Dimensão da vasilha**

Diversos trabalhos (Castellari *et al.*, 2001; Belchior *et al.*, 2005; Patrício *et al.*, 2005; Parazzi *et al.*, 2008) indicam que a dimensão da vasilha condiciona os fenómenos que intervêm no processo de envelhecimento, nomeadamente, a evaporação, a extracção, a oxidação, e consequentemente, as características da aguardente nela envelhecida.

Belchior *et al.* (2005) observaram que aguardentes envelhecidas durante três anos em vasilhas de 250 dm<sup>3</sup>, apresentavam maiores extracto seco e teor de polifenóis totais, e em prova organoléptica, três aromas mais intensos - vanilina, caramelo e adocicado, comparativamente com aguardentes envelhecidas em vasilhas de 650 dm<sup>3</sup>. No referido estudo constatou-se que a extracção dos compostos da madeira é maior e mais rápida em vasilhas de menor volume, conseguindo-se um envelhecimento mais acelerado devido à maior razão superfície/volume (área de madeira disponível por litro de aguardente). Também Miranda *et al.* (2008) observaram que a extracção de taninos é maior em vasilhas de menor dimensão devido à razão superfície/volume. Para uma mesma madeira, em vasilhas menores será de esperar maior extracto seco e um período de envelhecimento da aguardente mais curto (Piggott, 1992). Mas se, por um lado, a extracção de compostos da madeira é maior e mais rápida nas vasilhas pequenas, por outro, as taxas de evaporação de etanol e de água são mais significativas (Miranda *et al.*, 2008) e, portanto, há maiores perdas que, acrescendo ao maior custo da vasilha, tornam o envelhecimento mais dispendioso.

Pérez-Prieto *et al.* (2003) e Belchior *et al.* (2005) concluíram que nas vasilhas de maior dimensão as perdas por evaporação são pequenas, mas em contrapartida a aguardente obtida é menos rica em compostos extraíveis da madeira. Contudo, trata-se de vasilhas mais baratas e com maior potencial de extracção, ou seja, com possibilidade de um maior número de reutilizações (Pérez-Prieto *et al.* 2003; Canas *et al.*, 2008). Assim, na escolha da dimensão da vasilha há que optar por uma solução de compromisso.

## **II.4.1.2 - CONDIÇÕES DE ENVELHECIMENTO**

### **II.4.1.2.1 - Condições da cave**

É conhecido que as condições da cave, nomeadamente a temperatura, a humidade relativa e a circulação de ar são factores ambientais que exercem grande influência no processo de envelhecimento das aguardentes, designadamente nas perdas de volume por evaporação e, conseqüentemente, no título alcoométrico (Parazzi *et al.*, 2008). Por ano, e consoante as condições de envelhecimento, podem ocorrer perdas por evaporação que vão de, 1 -3 % (Parazzi *et al.*, 2008; BNIC, 2005) a 5 -15 % do volume do destilado (Canas *et al.*, 2002). Tais valores variam na dependência da dimensão da vasilha, da espécie botânica da madeira, da temperatura e humidade relativa da cave (Cantagrel *et al.*, 1992; Puech e Mosedale, 1998; Canas *et al.*, 2002; Canas, 2003; Parazzi *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008). Se a humidade relativa da cave for baixa, a evaporação de água é superior à de etanol, aumentando o título alcoométrico da aguardente. Se, pelo contrário, a humidade relativa for elevada, a evaporação da água é reduzida devido à elevada pressão de vapor na superfície da vasilha, tornando-se superior a evaporação do etanol e portanto o título alcoométrico diminui (Singleton, 1995; Mosedale, 1996; Parazzi *et al.*, 2008). Assim, a qualidade da aguardente é influenciada pelas condições de higrometria e temperatura, facto observado por Cantagrel *et al.* (1995), que encontrou aguardentes de Cognac mais macias quando envelhecidas em caves mais húmidas. Independentemente das condições da cave, segundo Moutounet *et al.* (1998) e Miranda *et al.* (2006), as perdas durante o ano dependem da dilatação e contracção da madeira e da evaporação na junção das aduelas, para além da evaporação pelo batoque.

Então as caves mais adequadas para o envelhecimento de aguardentes devem possuir uma temperatura inferior a 20 °C, com uma amplitude térmica inferior a 4 °C/ano, e uma humidade relativa próxima de 90 %, ambiente que permite manter a evaporação em valores aceitáveis (Canas, 2003) e tornar a aguardente mais fina (Cantagrel *et al.*, 1992).

#### **II.4.1.2.2 - Operações tecnológicas realizadas durante o envelhecimento**

Durante o envelhecimento em madeira, as aguardentes são submetidas a diversas operações tecnológicas, como a mudança de vasilha, o atesto, o adelgaçamento e o rebolamento.

A aguardente, após permanecer um a dois anos em vasilha nova deve ser transferida para vasilha já usada, para que os fenómenos de extracção dos compostos da madeira pela aguardente não se tornem excessivos, facto este que pode ser responsável por alguns defeitos, como uma excessiva adstringência, que torna a aguardente desagradável à prova. O processo de **trasfega** proporciona também a ocorrência de fenómenos de oxidação, necessários para um bom envelhecimento (Canas, 2003).

Face ao consumo de aguardente (resultante da evaporação/impregnação na madeira), que leva à diminuição do volume de aguardente na vasilha e também com a finalidade de controlar as oxidações (Belchior-San e Romão, 1985), é conveniente proceder a **atestos**, com uma aguardente branca da mesma idade e se possível proveniente do mesmo vinho (Canas, 2003).

Normalmente ao fim de dois anos, é realizado o **adelgaçamento**, que consiste na adição de água de boa qualidade (com baixo teor de sais minerais, para evitar turvações), com o objectivo de reduzir progressivamente o título alcoométrico da aguardente para valores de comercialização, normalmente compreendidas entre 30 a 48 % v/v (Canas, 2003). Esta operação permite ainda contrabalançar o efeito de concentração provocado pela evaporação da aguardente e afecta a extracção dos constituintes da madeira, que apresentam solubilidades distintas em água e em etanol.

O **rebolamento** é uma prática muito antiga e consiste em rolar as vasilhas na cave durante o período de envelhecimento, de modo a promover a agitação e homogeneização da aguardente existente no seu interior, visando favorecer a extracção dos compostos da madeira (Canas *et al.*, 2004a; Patrício *et al.*, 2005). A agitação é uma operação que também afecta a evolução da aguardente, na medida em que condiciona a extracção, a difusão dos compostos extraíveis da madeira e, portanto, a celeridade do envelhecimento (Canas *et al.*, 2004; Patrício *et al.*, 2005).



#### **II.4.1.2.3 - Influência do tempo de envelhecimento**

O período de envelhecimento é variável, de acordo com a região de produção, podendo ir até 50 anos. Tradicionalmente em Portugal, após um período de envelhecimento mínimo de dois anos, a aguardente passa a designar-se aguardente vínica velha ou aguardente velha (Reg. CE 110/08). Em França, tanto o Cognac como o Armagnac são seleccionados em função do tempo de permanência (estágio) nas vasilhas de madeira, sendo obrigatório um período mínimo de dois anos (Cantagrel e Garreau, 2008).

Deste modo, a aguardente envelhecida é classificada em:

- **VS** - Very Special ou \*\*\* - envelhecida durante dois anos;
- **VSOP** - Very Special Old Pale ou Reserva – envelhecida de dois a cinco anos;
- **XO** - Extra Old – envelhecimento superior a cinco anos.

Diversos estudos (Belchior *et al.*, 2003; Patrício *et al.*, 2005; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008; Parazzi *et al.*, 2008) indicam que o tempo de envelhecimento exerce um efeito extremamente importante na composição e concentração dos compostos fenólicos de massa molecular baixa, influenciando a qualidade final da aguardente. Segundo Karvela *et al.* (2008), diferentes períodos de tempo no envelhecimento de aguardentes em vasilhas de madeira, resultam numa variação expressiva das concentrações de ácidos gálgico e elágico, bem como outros compostos. A extracção dos compostos fenólicos tende a aumentar durante os primeiros quatro anos de envelhecimento (Canas, 2003). Este fenómeno é mais acentuado no primeiro ano, sobretudo no primeiro mês, e tende a estabilizar nos anos seguintes, o que poderá indicar a preponderância da oxidação e /ou um esgotamento da madeira nesses compostos (Puech *et al.*, 1998; Canas, 2003; Patrício *et al.*, 2005; Casanova 2007; Canas *et al.*, 2008; Parazzi *et al.*, 2008). Em condições normais de envelhecimento, relativamente ao extracto seco e ao teor de polifenóis totais, as grandes extracções ocorrem nos dois primeiros meses, para seguidamente evoluírem para enriquecimentos mais suaves (Canas, 2003; Belchior *et al.*, 2005). Através do estudo de cinéticas de extracção, Patrício *et. al.* (2005) constataram que, para o ácido gálgico e para a vanilina, a maior extracção ocorre nas primeiras vinte e quatro horas e que para os restantes compostos, como os ácidos

vanílico, siríngico e elágico, HMF, furfural, 5-metilfurfural, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, a maior extracção corresponde à primeira semana.

Vários trabalhos (Belchior *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2008 e Parazzi *et al.*, 2008) indicam que, durante o envelhecimento de bebidas destiladas ocorre o aumento da acidez volátil, do extracto seco, dos álcoois superiores, dos ésteres, dos aldeídos, do furfural, dos compostos fenólicos e consequentemente, da cor da aguardente. Relativamente às características cromáticas da aguardente, Canas (2003) observou que, em virtude do enriquecimento em compostos extraíveis ao longo do tempo de envelhecimento, as aguardentes tornem-se menos luminosas, mais saturadas e com tendência a evoluir de uma tonalidade palha ou dourado para uma tonalidade topázio, resultante da predominância das componentes amarela - vermelha com reflexos esverdeados, com se observa na Figura 11.



**Figura 11** - Evolução da cor da aguardente ao longo do tempo de envelhecimento (adaptado do BNIC, 2005).

As outras características organolépticas da aguardente - aroma, sabor e apreciação geral - acompanham esta evolução (Canas, 2003; Caldeira 2004; Patrício *et al.*, 2005).

#### **II.4.1.3 - Influência do título alcoométrico do destilado**

Como tem vindo a ser referido, inúmeras transformações químicas encontram-se associadas ao processo de envelhecimento da aguardente. A composição do meio hidroalcoólico (proporção de etanol/água) do destilado tem revelado um efeito muito significativo e influente sobre as cinéticas de extracção dos vários compostos da madeira (Canas, 2003; Caldeira, 2004; Patrício *et al.*, 2005; Karvela *et al.*, 2008), na solubilidade e na concentração dos constituintes do destilado (Canas, 2003) e detém grande importância

na evolução da composição química e nas características organolépticas da aguardente. Por outro lado, a aguardente apresenta cinéticas de impregnação/evaporação que parecem ser determinadas pela taxa de impregnação, inicialmente dependente do seu teor em água e depois condicionada pela sua composição não volátil (Canas *et al.*, 2002).

Durante o envelhecimento, o aumento do teor de extracto seco na aguardente ocorre devido, em parte, à hidroalcoólise da lenhina, com formação de compostos aromáticos como a vanilina, o siringaldeído, o coniferaldeído e o sinapaldeído (Piggott, 1992; Conner, 2003). Segundo Karvela *et al.*, (2008), maiores concentrações de etanol no meio contribuem para uma hidrólise mais rápida dos elagitaninos, que se reflecte em maiores concentrações dos ácidos gálico e elágico na aguardente.

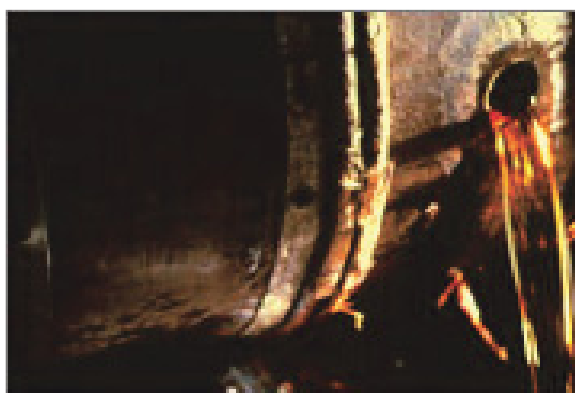
#### **II.4.1.4 – Influência do oxigénio**

Como a madeira é porosa, no interior da vasilha é criado um meio oxidativo, que é um dos principais aspectos deste tipo de envelhecimento. Com efeito o oxigénio tem um papel relevante na maioria das alterações ocorridas na aguardente durante o envelhecimento.

Durante o envelhecimento, uma das reacções químicas mais importantes e que altera os componentes do destilado é a oxidação. Provas da oxidação ocorridas são a formação de acetaldeído e ácido acético a partir do etanol (Miranda *et al.*, 2008). O etanol e o ácido acético conduzem à formação de acetato de etilo e, conseqüentemente, os teores de álcoois superiores mantêm-se praticamente estáveis. O aroma final da aguardente deve-se à oxidação de aldeídos a ácidos e às reacções entre ácidos e álcoois, formando os ésteres (Parazzi *et al.*, 2008).

Segundo Puech e Goffinet (1987), em vasilhas novas, na primeira fase do envelhecimento predomina a extracção dos constituintes fenólicos da madeira, enquanto numa segunda fase é a oxidação o fenómeno preponderante. Belchior e San-Romão (1982) concluíram que a extracção envolve, já em si, reacções de oxidação. As reacções químicas que envolvem os compostos do destilado, e as que, após a extracção, envolvem os compostos da madeira são essencialmente as de formação de acetais, de ésteres e as reacções do etanol com os constituintes derivados da lenhina da madeira (Guymon e Crowell, 1972).

As propriedades dos compostos fenólicos, em particular a sua fácil oxidabilidade, justificam claramente o seu envolvimento em múltiplas reacções durante o envelhecimento. De acordo com Piggott (1993) e Conner (2003), durante o envelhecimento ocorrem alterações na lenhina decorrentes de oxidações e hidroalcoólise. A cor da aguardente ao longo do período de envelhecimento sofre alteração, devido, não só à extracção de compostos, principalmente taninos, mas também às reacções de oxidação, que segundo Singleton (1995), são as principais responsáveis pelo progressivo escurecimento ou intensificação da cor amarelo/topázio em bebidas em envelhecimento em madeira, como se ilustra na Figura 12.



**Figura 12** - Aguardente envelhecida em vasilha de madeira (adaptado do BNIC, 2005).

## **II.5 - AGUARDENTE E SAÚDE**

O paradoxo francês, tal como já referimos, despoletou numerosos estudos com o objectivo de compreender porque é que o vinho tinto, quando tomado em quantidades moderadas, contribuía para a saúde humana, nomeadamente na prevenção das doenças cardio-vasculares, aumentando a qualidade e o tempo de vida.

Tal como o vinho, também, os frutos, os vegetais e o azeite, característicos da dieta mediterrânica, têm em comum o facto de serem alimentos ricos em compostos antioxidantes e os estudos mais recentes sobre a prevenção de algumas doenças, confirmam que existem substâncias verdadeiramente cardio-protectoras na alimentação mediterrânica, sendo os antioxidantes as mais relevantes. Nos últimos anos tem sido prestada uma atenção considerável ao vinho e seus derivados como fonte de polifenóis.

Segundo Karvela *et al.* (2008), a actividade antiradicalar está directamente correlacionada com a concentração total de polifenóis dos vinhos e destilados de origem vinícola. Neste contexto, alguns estudos (Umar *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2004; Canas *et al.*, 2008) comprovaram a existência, nas aguardentes vínicas envelhecidas, de vários polifenóis com actividade antioxidante, assim como de uma correlação positiva entre o teor de polifenóis totais e esta actividade. De entre as aguardentes vínicas estudadas, o Armagnac é a que apresenta maior riqueza em polifenóis e, como consequência, maior actividade antioxidante (Goldberg *et al.*, 1999; Al Awwadi *et al.*, 2007).

Deste modo, as bebidas espirituosas envelhecidas podem constituir um meio adicional de fornecer antioxidantes na dieta alimentar, exercendo um efeito protector contra o stresse oxidativo, e portanto com resultados benéficos para a saúde humana.

#### **II.5.1 - Actividade antioxidante e stresse oxidativo**

O fornecimento, através da dieta, de compostos com propriedades antioxidantes é essencial para a manutenção do equilíbrio redox celular, devido à formação contínua de oxidantes durante os processos metabólicos. Durante o metabolismo aeróbio podem formar-se diversas espécies reactivas de oxigénio (ERO), algumas das quais são radicais resultantes de várias reacções de oxidação-redução (Borguini, 2006). Quando existe um desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes e os sistemas de defesa antioxidante a favor das primeiras, existe **stresse oxidativo**, e as moléculas biológicas como as proteínas, os lípidos e o ADN são negativamente afectadas, originando lesões celulares (Halliwell, 1999). A condição de stresse oxidativo contribui fortemente para o envelhecimento celular, acelerando o desenvolvimento de várias patologias, tais como doenças cardiovasculares, cancro, doenças neurodegenerativas, diabetes e declínio do sistema imunitário (Roussel, 2002). No entanto, numerosos factores de origem exógena também afectam os mecanismos de protecção antioxidante, levando ao stresse oxidativo. São exemplo as drogas, a poluição, a subnutrição, os erros alimentares, o álcool o fumo e as radiações (Figura 13).

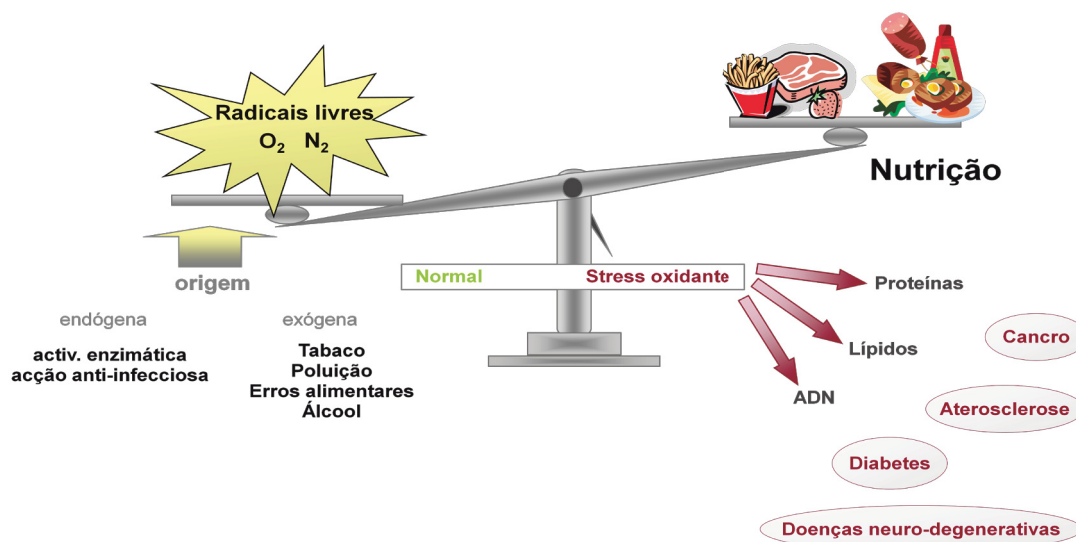


Figura 13 – Situação de stress oxidativo (adaptado de Roussel, 2002).

Existem várias definições para o termo antioxidante mas, a mais utilizada e que cobre todos os substratos oxidáveis como lípidos, proteínas, ADN e glícidos, é a sugerida por Halliwell (1999). Segundo este autor, um **antioxidante** pode ser definido como uma substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração que o substrato oxidável. Outra definição é a de antioxidante usado na preservação dos alimentos: uma substância, que em pequena quantidade, é capaz de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, como as gorduras (Becker *et al.*, 2004). De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), antioxidantes são substâncias usadas para preservar os alimentos, por retardarem a deterioração por rancidez ou descoloração associada a processos oxidativos.

Existem vários mecanismos de acção antioxidante. Nos organismos aeróbios, a eliminação das espécies reactivas de oxigénio pode ser efectuada através de múltiplas linhas de defesa antioxidante que existem nos espaços intra e extracelulares. Estas defesas incluem enzimas, proteínas extracelulares e pequenas moléculas como a vitamina E, o  $\beta$ -caroteno, o ubiquinol, o ácido ascórbico (vitamina C), que podem ser veiculadas pela alimentação.

O vinho constitui uma importante fonte de produtos naturais bioactivos e o seu papel potencial na prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo tem sido atribuído ao seu conteúdo em compostos fenólicos, principalmente flavonóides e ácidos fenólicos

(Paixão *et al.*, 2007; Cataneo *et al.*, 2008; Gollucke *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2009). Na condição de stresse oxidativo será útil reforçar as defesas antioxidantes endógenas com antioxidantes provenientes de fonte exógena, através de uma dieta saudável, composta por alimentos e bebidas ricos nestes compostos (Figura 14).

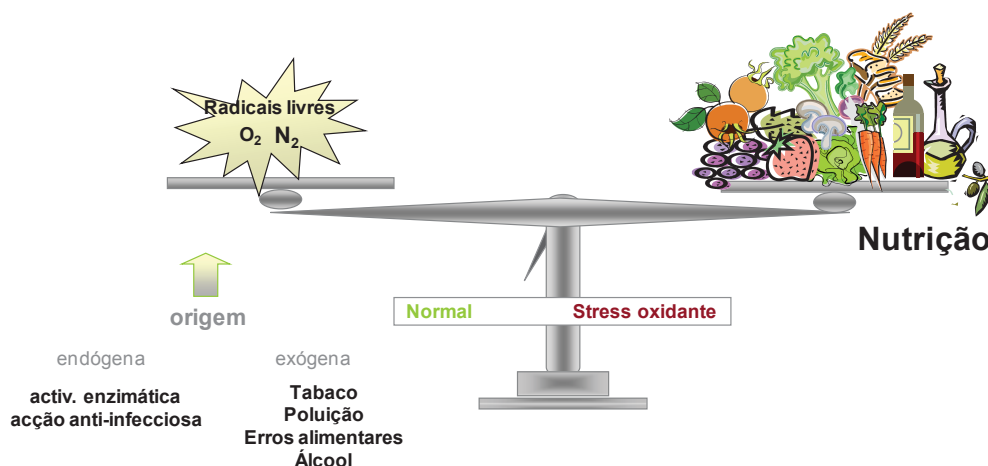


Figura 14 - Situação de equilíbrio (adaptado de Roussel, 2002).

### II.5.2 - Propriedades dos compostos extraíveis da aguardente

Aos ácidos e aldeídos fenólicos presentes na aguardente vínica, em virtude das suas múltiplas actividades biológicas, são atribuídas diversas propriedades farmacológicas, nomeadamente: antioxidante, antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, anti-trombótica e anti-cancerosa (Scalbert *et al.*, 2000; Lattanzio, 2003; Okuda, 2005; Al Awwadi *et al.*, 2007; Terra *et al.*, 2007). A actividade antioxidante dos compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de oxidação-redução, como a inibição da peroxidação lipídica e de lesões oxidativas do ADN, desempenhando assim um papel importante na combinação e neutralização de radicais livres (Degáspari *et al.*, 2004; Saura-Calixto *et al.*, 2006; Vekiari, 2008).

Dentro do grupo de compostos extraídos pela aguardente, foi observada uma elevada correlação entre a actividade antioxidante e os teores de ácidos gálico, elágico e vanílico (Goldberg *et al.*, 1999; Priyadarsini *et al.*, 2002; Sroka e Cisowski, 2003; Umar *et al.*, 2005; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2009). Zafrila *et al.* (2001), observaram que o ácido elágico promove uma elevada captação de radicais livres hidróxido e

peróxido, sendo portanto eficaz contra o stress oxidativo, e comparável a antioxidantes de referência, como as vitaminas C e E (Hassoun *et al.*, 1997). Também Priyadarsini *et al.* (2002) constataram que o ácido elágico inibe a peroxidação dos lípidos de forma significativa.

Os polifenóis são, quantitativamente, os principais antioxidantes da dieta, no entanto, os seus efeitos biológicos, dependem também da sua biodisponibilidade (Manach *et al.*, 2004). Duriez *et al.* (2001) e Umar *et al.* (2004) indicam que o facto dos compostos fenólicos presentes na aguardente se encontram na forma solúvel, contribui para o aumento da sua biodisponibilidade, sendo mais facilmente absorvidos - o que pode ajudar a prevenir ou controlar os efeitos adversos duma sobrecarga oxidativa.

Foi observado por Koga *et al.* (1998), que os compostos furânicos (HMF e furfural) das bebidas destiladas apresentam actividades antioxidantes e anticarcinogénicas. Contudo, posteriormente, Goldberg *et al.* (1999) não detectaram correlação entre a actividade antioxidante de aguardentes, whiskies e outros destilados e os teores destes derivados furânicos.

### **II.5.3 - Actividade antioxidante da aguardente e os efeitos benéficos para a saúde**

O consumo moderado de vinho tinto tem sido reconhecido como factor positivo na redução da mortalidade, associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares. A fracção não alcoólica do vinho, constituída pelos compostos fenólicos é a principal responsável por esta protecção efectiva (Belleville, 2002).

Vários estudos demonstram a capacidade do álcool para aumentar a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL), que reduzem a coagulação do sangue e inibem a agregação plaquetária, e diminuir as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), responsáveis pelo colesterol (Goldberg *et al.*, 1999; De Lang, 2007; Schroder, 2006). Neste âmbito, alguns estudos indicam que a actividade antioxidante da aguardente pode ter efeitos benéficos na saúde. Duriez *et al.* (2001), num estudo *in vivo*, verificaram que após a ingestão de Cognac, a concentração de ácidos fenólicos, e de ácido elágico em particular, aumentou no plasma sanguíneo, e consequentemente, a capacidade antioxidante aumentou. Umar *et al.* (2003), analisaram o efeito do Armagnac administrado a ratos sobre a trombose



arteriovenosa, e observaram uma diminuição da agregação plaquetária, e por sua vez, uma diminuição da ocorrência de trombozes. Para suporte dos resultados obtidos, Umar *et al.* (2005), compararam os efeitos do consumo de pequenas quantidades de Armagnac e de vodka em humanos e detectaram uma diminuição mais significativa da agregação plaquetária durante e após o consumo de Armagnac, comparativamente com o consumo de vodka. Estes estudos indicam que, não é só o factor etanol que tem um efeito benéfico e protector relativamente à agregação plaquetária e à trombose, mas que existe um sinergismo com os compostos fenólicos, em especial o ácido elágico.

#### **II.5.4 - Factores condicionantes da actividade antioxidante da aguardente**

Atendendo a que a actividade antioxidante está estreitamente relacionada com o teor de compostos fenólicos, é pois expectável que a actividade antioxidante da aguardente seja condicionada pelos factores que determinam a composição fenólica, designadamente: a espécie botânica da madeira, o nível de queima da vasilha e o tempo de envelhecimento.

Na perspectiva nutracêutica, Casanova (2007) e Canas *et al.* (2008) verificaram, com aguardentes de ensaio, que o índice de polifenóis totais contribui de forma altamente significativa para a distinção entre aguardentes e apresenta uma correlação muito significativa com a sua actividade antioxidante. Segundo Casanova (2007), a aguardente envelhecida em madeira de castanheiro apresenta uma concentração superior de ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, com uma actividade antioxidante mais elevada que a envelhecida em madeira de carvalho Limousin, destacando-se um efeito altamente significativo para a espécie botânica.

Por sua vez, o nível de queima da vasilha não parece condicionar fortemente a actividade antioxidante em aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro, enquanto para aguardentes envelhecidas em carvalho Limousin esta influência é altamente significativa, com maior poder antioxidante associado à queima média (Canas *et al.*, 2008).

O teor de polifenóis totais permite distinguir as aguardentes em função do tempo de envelhecimento, notando-se uma tendência para o enriquecimento gradual em ácidos fenólicos, com uma correlação altamente significativa com a actividade antioxidante das aguardentes, como é o caso dos ácidos gálico e elágico (Alonso *et al.*, 2004; Canas *et al.*,

2008). A actividade antioxidante de aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho Limousin atinge o seu potencial máximo ao fim de quatro anos (Canas *et al.*, 2008). Umar *et al.* (2003) compararam extractos de Armagnac, com cinco, dez e quinze anos, e verificaram que os dois primeiros eram semelhantes na sua composição e apresentavam maior actividade antioxidante que o de quinze anos. O mesmo foi observado por Alonso *et al.* (2004) em aguardentes de Xerez, concluindo que os compostos envolvidos na actividade antioxidante de aguardentes com dez anos, não são os mesmos das aguardentes mais jovens (com quatro e cinco anos), sugerindo que poderá existir intervenção dos complexos formados entre os compostos fenólicos. Schwarz *et al.* (2009) verificaram que em aguardentes comerciais, a concentração de polifenóis e a actividade antioxidante tendem a aumentar com o tempo de envelhecimento.

#### **II.5.5 - Efeitos adversos associados ao consumo de aguardente**

A aguardente vínica envelhecida em madeira, pode ser considerada como um “tónico”, devido aos seus potenciais efeitos benéficos na saúde humana, mas por outro lado, pode ser considerada um “tóxico” devido ao seu elevado título alcoométrico. De facto, foi revelado por vários estudos, o efeito protector do consumo moderado de álcool relativamente a várias doenças cardiovasculares, associado ao aumento de HDL e ao favorecimento da absorção, a nível do intestino, dos compostos fenólicos com actividade antioxidante. No entanto, não é de descurar os trabalhos relativos aos efeitos adversos do consumo de álcool, que evidenciam a forte relação entre a quantidade de álcool ingerido e o aumento da mortalidade, devido principalmente a doenças de fígado e doenças cardiovasculares (Ferreira, 2008).

Schroder *et al.* (2006) realizaram um estudo epidemiológico, em que constataram que um maior consumo de álcool se encontra associado a elevados níveis de oxidação das LDL no plasma da população estudada. Também Addolorato *et al.* (2008) investigaram a influência do consumo de aguardente em humanos saudáveis, observando a diminuição dos níveis de energia (ATP) do plasma sanguíneo diminuíram e, consequentemente, do estado antioxidante. Neste sentido é importante referir que os efeitos dos compostos fenólicos no organismo são mais eficazes quando associados a um consumo regular, pois a

sua acção desenvolve-se ao longo do tempo, conferindo maior protecção do que no caso do consumo de grandes quantidades de forma irregular.

### **III - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **III.1 - MATERIAIS**

##### **III.1.1 - Aguardentes**

Foram utilizadas 37 aguardentes vínicas envelhecidas comerciais, seleccionadas de modo aleatório, das quais 21 aguardentes são portuguesas, provenientes de dez regiões diferentes, 12 aguardentes são francesas, oriundas de duas regiões, e 4 são aguardentes portuguesas preparadas:

- |                                  |                           |
|----------------------------------|---------------------------|
| - Região dos Vinhos Verdes (VV); | - Região das Beiras (BR); |
| - Região do Douro (D);           | - Região do Ribatejo (R); |
| - Região da Bairrada (B);        | - Região de Cognac (C);   |
| - Região da Estremadura (E);     | - Região de Armagnac (A). |
| - Região da Lourinhã (L);        |                           |
| - Região do Alentejo (AL);       |                           |
| - Preparadas (P).                |                           |

As características das aguardentes encontram-se descritas no Quadro III. Da informação constante do rótulo é apenas omitida a marca, pelo facto de se tratar de produtos comerciais, cuja identidade não pode ser revelada.

É de salientar que em aguardentes comerciais torna-se difícil o conhecimento de todas as condições de envelhecimento (tipo de madeira, queima, dimensão da vasilha, estado de utilização, entre outras). Esta situação resulta, essencialmente, do facto de se tratar de aguardentes de lote (mistura de aguardentes de vasilhas de diferentes madeiras, com diferentes níveis de queima e/ou de diferentes idades) e das empresas produtoras, na sua grande maioria, não possuírem um sistema de rastreabilidade adequado. Este aspecto assume considerável importância, na medida em que não permite uma análise dos resultados tão detalhada e sustentada como seria desejável.

**Quadro III.** - Identificação e características das aguardentes comerciais.

Aguardente	Região	TAV (% v/v)	Tempo de envelhecimento
1	VV	38	XO
2	B	38	VSOP
3	B	40	VSOP
4	E	40	VSOP
5	C	40	VS
6	C	40	VS
7	B	40	XO
8	B	40	XO
9	B	37,5	XO
10	R	38	XO
11	P	40	—
12	A	40	XO
13	A	40	XO
14	A	40	VSOP
15	A	40	XO
16	C	40	VSOP
17	C	40	VSOP
18	C	40	VS
19	C	40	XO
20	C	40	XO
21	C	40	XO
22	VV	40	XO
23	VV	39	XO
24	VV	40	XO
25	VV	42	—
26	L	41	XO
27	L	40	XO
28	E	39	XO
29	AL	39	XO
30	D	40	XO
31	P	40	—
32	P	36	—
33	P	36	—
34	E	38,5	—
35	AL	39	XO
36	E	42	XO
37	BR	41	VSOP

TAV - Título alcoométrico volúmico; VS ou \*\*\* – 2 anos de envelhecimento;  
VSOP – 2 a 5 anos de envelhecimento; XO - > 5 anos de envelhecimento.

### **III.2 - MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **III.2.1 - Determinação do índice de polifenóis totais**

A aguardente absorve preferencialmente radiação ultravioleta, com um máximo a 280 – 282 nm, associada à presença de núcleos benzénicos, característicos dos compostos fenólicos. O índice de polifenóis totais (Ipt) das aguardentes foi determinado com base no valor da absorvência a 280 nm (Ribéreau-Gayon, 1970).

Os resultados foram expressos em  $\text{g/dm}^3$  de ácido gálgico, com base numa curva de calibração (Anexo A), determinada por regressão linear simples, estabelecida a partir de um padrão de ácido gálgico (*Fluka*, Switzerland).

#### **III.2.2 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta resolução – HPLC**

O método cromatográfico utilizado na análise de aguardentes para a separação e quantificação de ácidos fenólicos (gálgico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico), aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) e aldeídos furânicos (furfural, 5-hidroximetilfurfural e 5-metilfurfural) foi o desenvolvido e validado por Canas *et al.* (2003). É um método de grande sensibilidade, que apresenta boa linearidade, alta precisão e permite uma boa separação e quantificação dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos das aguardentes vínicas envelhecidas, sem requerer preparação prévia da amostra.

Utilizou-se um equipamento de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) Lachrom Merck Hitachi (Darmstadt, Alemanha), constituído por: bomba quaternária L-7000; forno para colunas L-7350; detector de UV – Vis L-7400; injector automático L-7250, com sistema de termostatização. O controlo, aquisição e tratamento de dados cromatográficos foi efectuado através do software HSM D-7000 (*Merck*).

##### **III.2.2.1 - Amostras**

Às aguardentes foram apenas adicionadas de um padrão interno - 4-hidroxibenzaldeído ( $20 \text{ mg/dm}^3$ ), filtradas em filtro de seringa Titan  $0,45 \mu\text{m}$  (Scientific Resouces Ltd, Gloucester, Inglaterra) e analisadas por injeção directa.

### III.2.2.2 - Padrões e solventes

Foram utilizados padrões de ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido ferúlico, siringaldeído, sinapaldeído, vanilina, coniferaldeído, 5-hidroximetilfurfural, furfural, 5-metil-furfural e 4-hidroxibenzaldeído sem purificação adicional, cujas características são apresentadas no Quadro IV.

Todos os solventes, “HPLC gradient grade” Merck (Darmstadt, Alemanha), foram preparados diariamente.

Quadro IV – Padrões utilizados.

Composto	Pureza (%)	Marca
Ácido elágico dihidratado ( <i>ac.elg</i> )	>98	Fluka
Ácido gálico monohidratado ( <i>ac.gal</i> )	>99	Fluka
Ácido vanílico ( <i>ac.van</i> )	>97	Fluka
Ácido sirínico ( <i>ac.sg</i> )	“purum”	Fluka
Ácido ferúlico ( <i>ac.fer</i> )	>99	Fluka
5-hidroximetilfurfural ( <i>HMF</i> )	97	Fluka
5-metil-furfural ( <i>5mfurf</i> )	>97	Fluka
Furfural ( <i>furf</i> )	>99	Fluka
Siringaldeído ( <i>sgald</i> )	98	Aldrich
Coniferaldeído ( <i>cfald</i> )	98	Aldrich
Sinapaldeído ( <i>snald</i> )	98	Aldrich
4-hidroxibenzaldeído	98	Aldrich

### III.2.2.3 - Condições cromatográficas

As aguardentes foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas:

Coluna Purospher Star RP-18 (Merck), 250 mm x 4 mm (5 µm); temperatura da coluna – 40 °C; débito – 1 cm<sup>3</sup>/min; volume de injeção – 20 µl; detecção – 280 nm e 320 nm; Solvente A – água/ácido fórmico (98:2 v/v); Solvente B – metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v); Programa de eluição:

Tempo (min)	% A	% B
0	100	0
3	100	0
25	60	40
43	40	60
55	40	60
60	20	80
65	20	80
85	100	0

### III.2.2.4 - Identificação dos picos cromatográficos

A identificação dos ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos foi efectuada por comparação dos seus tempos de retenção com os de padrões externos, bem como pelos seus espectros UV-Vis. A pureza cromatográfica dos picos e os espectros UV-Vis (200-400 nm) foram obtidos num sistema cromatográfico *Waters*, equipado com um detector de díodos *Waters 996*, nas mesmas condições cromatográficas, e controlado pelo software *Millenium 2010* (*Waters*, *Milford*, E.U.A.).

### III.2.3 - Determinação da actividade antioxidante

O método do DPPH<sup>•</sup> (2,2'-di-fenil-1-picrilhidrazil) tem sido o mais utilizado pela comunidade científica para a determinação da actividade antioxidante dos vinhos e aguardentes (Da Porto *et al.*, 2000), por se tratar de um método de fácil controlo, simples e rápido e o DPPH<sup>•</sup> ser um dos poucos radicais orgânicos estáveis disponíveis no comércio (Niederlander *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2009).

O DPPH<sup>•</sup> é um radical estável, que apresenta um máximo de absorvência a 517 nm. É sensível à luz, oxigénio, pH e ao tipo de solvente usado (Ozcelik *et al.*, 2003). Na presença de dadores de electrões ou de átomos de hidrogénio, como é o caso dos compostos fenólicos, o radical DPPH<sup>•</sup> é reduzido, isto é, dá-se o emparelhamento de electrões, e é originado DPPH-H (Figura 15).

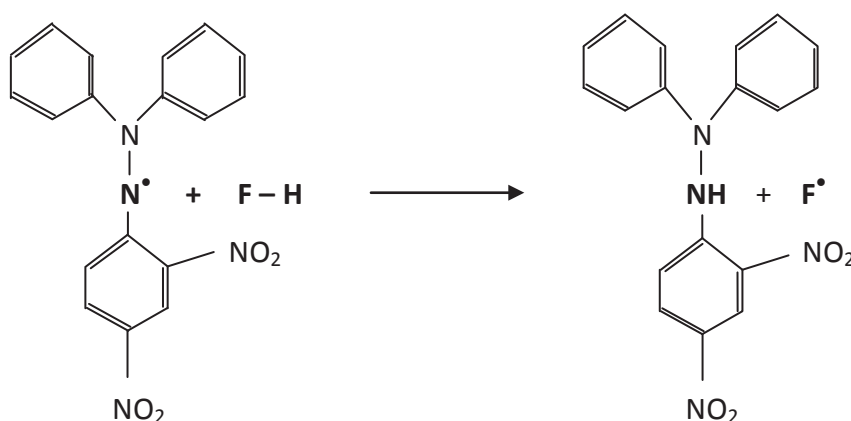


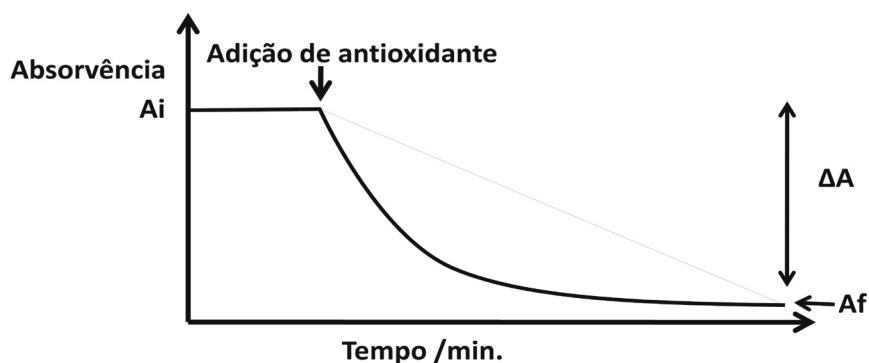
Figura 15 – Reacção do DPPH<sup>•</sup> com uma molécula antioxidante F – H.

Com a formação de DPPH-H, uma hidrazina incolor, ocorre um decréscimo de absorvência (Cano *et al.*, 2002), pelo que o grau de descoloração de uma solução de DPPH<sup>•</sup> (de roxo para amarelo), após a adição de um antioxidante (F-H), constitui uma medida do poder



redutor deste composto e, consequentemente, uma forma de avaliar a sua actividade antioxidante (Yue-king *et al.*, 2006).

O registo espectrofotométrico que se obtém a quando da aplicação deste método encontra-se representado esquematicamente na Figura 16.



**Figura 16** - Esquema representativo do registo espectrofotométrico obtido, ao longo do tempo, num ensaio de captação de DPPH<sup>•</sup>. A<sub>i</sub> – Absorvência inicial; A<sub>f</sub> – Absorvência final.

Através do valor de  $\Delta A$ , obtido após estabilização da reacção, e aplicando a lei de Beer, é possível calcular a percentagem de inibição de DPPH<sup>•</sup> pelo antioxidante adicionado (Shrerer *et al.*, 2009).

No presente trabalho, a determinação da actividade antioxidante das aguardentes foi baseada no método do DPPH<sup>•</sup> adaptado por Casanova (2007) para aguardentes de ensaio. Tratando-se agora de aguardentes comerciais, menos ricas em polifenóis totais, surgiu a necessidade de otimizar o referido método, de forma a não aumentar excessivamente o tempo de reacção. Na optimização do método foram testadas três concentrações de DPPH<sup>•</sup> ( $8,5 \times 10^{-5}$  M;  $6,5 \times 10^{-5}$  M;  $4,0 \times 10^{-5}$  M) e três volumes de amostra de aguardente (10  $\mu$ l; 20  $\mu$ l; 100  $\mu$ l). Face aos resultados obtidos (ver IV.1), seleccionou-se uma concentração de DPPH<sup>•</sup> de  $4,0 \times 10^{-5}$  M e 100  $\mu$ l de aguardente.

Então, no método optimizado, numa célula de quartzo com tampa, adicionou-se 3 cm<sup>3</sup> de solução metanólica a  $4,0 \times 10^{-5}$  M de DPPH<sup>•</sup> e 100  $\mu$ l de metanol (controlo) para determinação de A<sub>inicial</sub>. Seguidamente, numa célula de quartzo, foram adicionados 3 cm<sup>3</sup> de solução metanólica a  $4,0 \times 10^{-5}$  M de DPPH<sup>•</sup> e 100  $\mu$ l de aguardente. As células foram

agitadas e colocadas no espectrofotómetro. Todas as determinações, foram efectuadas num espectrofotómetro *Varian Cary 100 Bio*, utilizando células de quartzo de 1 cm de percurso óptico. Procedeu-se à leitura de absorvência a 515 nm, em contínuo, durante 60 minutos. A leitura de absorvência aos 60 minutos corresponde ao tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio da reacção, ou seja, o equilíbrio entre as espécies oxidadas (antioxidantes) e reduzida (DPPH<sup>•</sup>) na solução, o qual se traduz no registo espectrofotométrico pelo valor de A<sub>final</sub>. A percentagem de inibição do DPPH<sup>•</sup>, que corresponde à actividade antioxidante, foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição DPPH}^{\bullet} = (A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}} / A_{\text{inicial}}) \times 100$$

Os resultados foram expressos em Mm Trolox (*Aldrich*, Steinheim, Germany), através de curvas de calibração efectuadas com um padrão comercial deste ácido.

### **III.3 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS**

Atendendo ao tipo de aguardentes utilizadas e à informação disponível sobre as condições de envelhecimento, o tratamento estatístico dos resultados consistiu em diversos tipos de análises:

#### **III.3.1 – Média e Desvio - Padrão**

Para todos os parâmetros analisados - índice de polifenóis totais, concentração de compostos de massa molecular baixa e actividade antioxidante – procedeu-se à determinação da média e desvio-padrão dentro de cada região, recorrendo ao programa Microsoft Excel.

#### **III.3.2 - Correlação Linear**

Foi realizada a análise de correlação, recorrendo ao programa Microsoft Excel, para o estudo da relação entre:

- A composição fenólica (Ipt) e a actividade antioxidante das aguardentes comerciais;
- A concentração de cada composto de massa molecular baixa (HPLC) e a % de inibição de DPPH<sup>•</sup> das aguardentes comerciais.

#### **III.3.3 - Regressão Linear – Análise de variância**

O estudo das curvas de calibração de ácido gálico, utilizadas para expressão do Ipt, das curvas de calibração dos compostos de massa molecular baixa e das curvas de calibração de Trolox foi efectuado por regressão linear, em Excel. A decomposição das respectivas análises de variância, visando a determinação dos erros puro e de ajustamento – “Lack-of-fit” - foi efectuada manualmente.

#### **III.3.4 - Análise Multivariada**

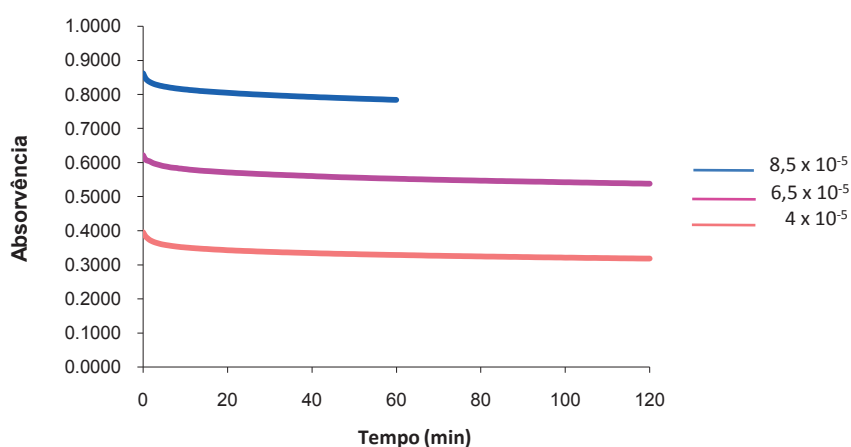
A análise multivariada implicou a utilização de um sistema de programas *NTSYS pc vs 2.10q*, desenvolvido por Rohlf em 1993 (Exeter software, New York, E.U.A.). Como método de ordenação, para a representação gráfica dos objectos - Aguardentes (OTUs) - no espaço definido pelas variáveis analisadas (Ipt, compostos de massa molecular baixa e % de inibição de DPPH<sup>•</sup>), seleccionou-se o PCA – *Principal Components Analysis*. Trata-se de uma vertente da análise em componentes principais, na qual se pretende obter uma imagem da

distribuição dos pontos representativos dos OTUs no espaço a  $n$  dimensões ( $n$  representa o número de variáveis), reduzindo o número de dimensões iniciais. Os OTUs são projectados num novo sistema de eixos ortogonais, resultante de uma combinação linear das características utilizadas, devidamente ponderadas (Curvelo-Garcia, 1987).

#### IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

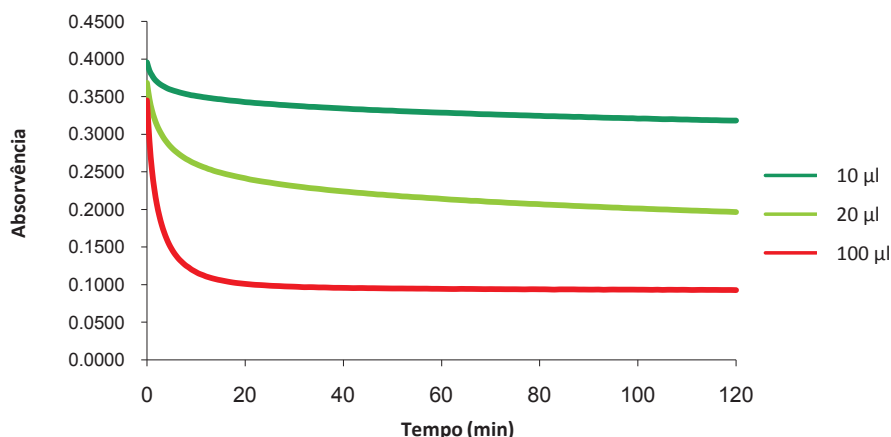
##### IV.1 – OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DPPH<sup>•</sup> PARA DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AGUARDENTES VÍNICAS COMERCIAIS

O método do DPPH<sup>•</sup> foi otimizado com o objectivo de quantificar a actividade antioxidante das aguardentes vínicas comerciais no menor tempo de análise possível. Com uma mesma aguardente de comércio, cujo índice de polifenóis totais era conhecido, foram testadas as três concentrações de DPPH<sup>•</sup> ( $8,5 \times 10^{-5}$ ;  $6,5 \times 10^{-5}$ ;  $4,0 \times 10^{-5}$  M) para 10 µl de aguardente. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 17.



**Figura 17** - Cinéticas de inibição de DPPH<sup>•</sup> nas diferentes concentrações ( $8,5 \times 10^{-5}$ ;  $6,5 \times 10^{-5}$ ;  $4,0 \times 10^{-5}$  M) para 10 µl de aguardente.

Das concentrações de DPPH<sup>•</sup> estudadas a de  $4,0 \times 10^{-5}$  M foi a que permitiu alcançar o equilíbrio da reacção mais rapidamente. Contudo, o tempo de análise era de 120 minutos, o que é considerado excessivo. Portanto, na fase seguinte, recorrendo à concentração de  $4,0 \times 10^{-5}$  M, foi avaliado o efeito do volume de aguardente (10 µl, 20 µl e 100 µl) no tempo de análise. Os resultados obtidos constam da Figura 18.



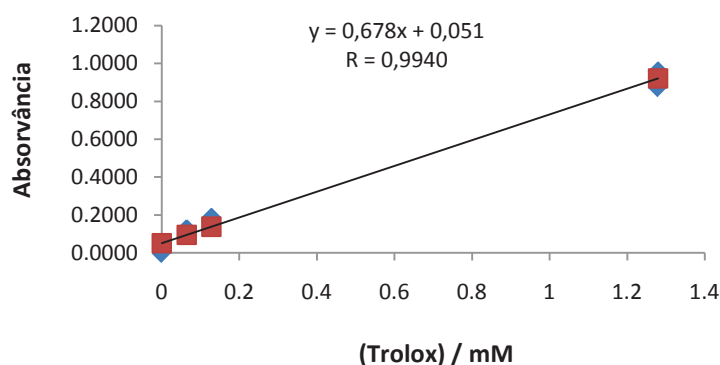
**Figura 18** - Cinéticas de inibição do DPPH• com concentração de  $4,0 \times 10^{-5}$  em diferentes volumes de aguardente (10 µl, 20 µl e 100 µl).

Da análise destes resultados foi possível concluir que, com a concentração  $4,0 \times 10^{-5}$  (DPPH•) e 100 µl de aguardente o estado de equilíbrio da reacção era alcançado em 60 minutos, valor de tempo idêntico ao do método original (Casanova, 2007).

Como se constata pela análise da Figura 18, a alteração das condições do método originou um aumento considerável da percentagem de inibição das aguardentes, devido à utilização de uma menor concentração de DPPH ( $4,0 \times 10^{-5}$  M de DPPH•) e um maior volume de amostra (100 µl de aguardente), relativamente às condições utilizadas em aguardentes de ensaio ( $8,5 \times 10^{-5}$  M de DPPH• e 10 µl de aguardente), o que significa que a percentagem de inibição era sobrestimada.

Para ser possível comparar a percentagem de inibição do DPPH• obtida nas aguardentes comerciais com a percentagem de inibição do método original para as aguardentes de ensaio (Casanova, 2007), foi necessário efectuar curvas de calibração, em que se utilizou como padrão o Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), de elevado poder antioxidante, com concentrações compreendidas entre os 0,064 mM e 1,28 mM (Arnous *et al.*, 2002), nas diferentes condições:

1 -  $\text{DPPH}^{\bullet} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$  e 100  $\mu\text{l}$  de trolox (correspondentes às condições do método aplicado às aguardentes comerciais) – Figura 19/Quadro V.

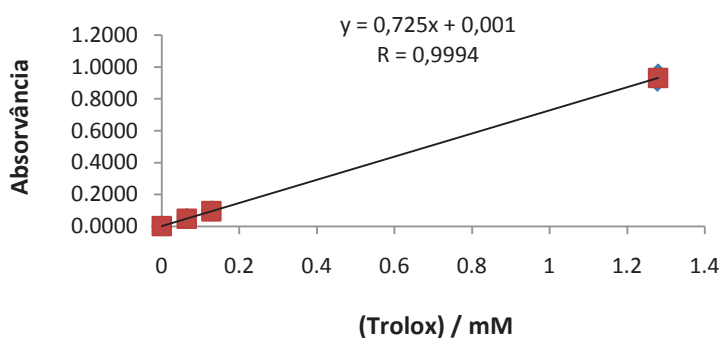


**Figura 19** – Representação da curva de calibração de trolox para expressão da concentração de  $\text{DPPH}^{\bullet}$  ( $4,0 \times 10^{-5}$ ) e 100  $\mu\text{l}$ .

**Quadro V** - Análise de variância da regressão correspondente à curva de calibração  $y = 0,678x + 0,051$ .

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabel.	Significância
Regressão	1,0284153	1	1,0284153	500,05107	18,63	**
Residual	0,0123397	6	0,0020566			
Erro puro	0,0035890	4	0,0008973			
Erro ajustamento	0,0087507	2	0,0043753			ns
Variação total	1,04075501	7	1,0304719	4,8763555	26,28	

2 -  $\text{DPPH}^{\bullet} = 8,5 \times 10^{-5} \text{ M}$  e 100  $\mu\text{l}$  de trolox – Figura 20/Quadro IV.

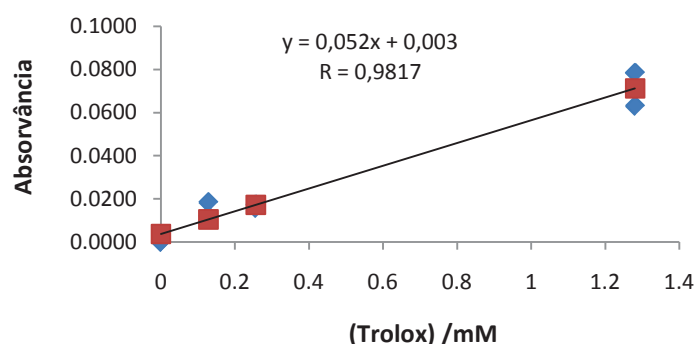


**Figura 20** – Representação da curva de calibração de trolox para a concentração de  $\text{DPPH}^{\bullet}$  ( $8,5 \times 10^{-5}$ ) e 100  $\mu\text{l}$ .

**Quadro VI** - Análise de variância da regressão correspondente à curva de calibração  $y = 0,0725x + 0,001$ .

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabel.	Significância
Regressão	1,1774135	1	1,7741348	5375,7463	18,63	**
Residual	0,0013390	6	0,0002231			
Erro puro	0,0013298	4	0,0003324			
Erro ajustamento	0,0000092	2	4,61182E-0			
Variação total	1,1787525	7	1,1776366	0,013872	26,28	ns

3 - DPPH<sup>\*</sup> =  $8,5 \times 10^{-5}$  M e 10 µl de trolox (correspondentes às condições do método aplicado às aguardentes de ensaio) – Figura 21/Quadro VII.



**Figura 21** - Representação da curva de calibração de trolox para a concentração de DPPH<sup>\*</sup> ( $8,5 \times 10^{-5}$ ) e 10 µl.

**Quadro VII** - Análise de variância da regressão correspondente à curva de calibração  $y = 0,052x + 0,003$ .

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabel.	Significância
Regressão	0,0057033	1	0,00570325	159,78084	18,63	**
Residual	0,0002142	6	3,56942E-05			
Erro puro	0,0001405	4	3,51263E-05			
Erro ajustamento	0,0000737	2	3,68302E-05			
Variação total	0,0059174	7	0,005738948	1,0485087	26,28	ns

Então, o cálculo da percentagem de inibição do DPPH<sup>\*</sup> (Anexo A) pelas aguardentes comerciais envolveu os seguintes passos:

- Determinação da actividade antioxidante, expressa em mM de Trolox ( $y_1$ ), nas condições efectivamente utilizadas ( $4 \times 10^{-5}$  M e 100 µl):

$$y_1 = 0,678 x_1 + 0,051$$

em que  $x_1 = (A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}) / A_{\text{inicial}}$



- Determinação da percentagem de inibição do DPPH<sup>•</sup> ( $x_2$ ) correspondente à concentração de  $8,5 \times 10^{-5}$  M e 100  $\mu$ l:

$$x_2 = (y_1 - 0,001) / 0,725$$

- Determinação da percentagem de inibição correspondente à concentração de  $8,5 \times 10^{-5}$  M e 10  $\mu$ l, recorrendo à utilização do factor de conversão (0,07) entre as curvas de equações:

$$y_2 = 0,725 x_2 + 0,001$$

$$y_3 = 0,052 x_3 + 0,003$$

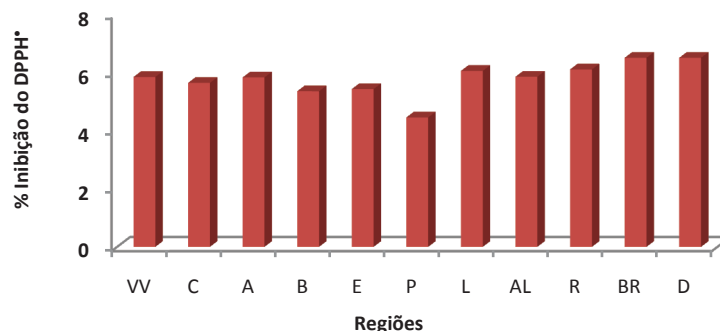
Portanto, a percentagem de inibição do DPPH<sup>•</sup> pelas aguardentes comerciais foi obtida por: ( $x_2$ ) \* 0,07.

Os resultados obtidos estão estruturados de modo a correlacionar a actividade antioxidante das aguardentes comerciais com o teor de polifenóis totais (expresso pelo Índice de polifenóis totais) e com a concentração de compostos de massa molecular baixa. Por último, é efectuada uma análise multidimensional, de modo a avaliar o efeito global dos parâmetros analisados nas 37 aguardentes comerciais em estudo.

## **IV.2 – ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AGUARDENTES**

### **IV.2.1 - Actividade antioxidante determinada através do método do DPPH<sup>•</sup>**

Nas aguardentes analisadas, a actividade antioxidante apresenta valores compreendidos entre 2,5 e 6,5 % (Anexo A). Na Figura 22 constam os valores médios da actividade antioxidante das aguardentes estudadas, por região. Pela análise dos resultados obtidos é possível observar que as aguardentes com maior actividade antioxidante são provenientes das regiões: da Beira e do Douro, ambas com um valor de 6,5 %; da Lourinhã, com valores compreendidos entre 5,9 e 6,2%; do Ribatejo com um valor de 6,2 %; de Armagnac, com valores entre 5,6 e 5,9 %; dos vinhos verdes, com valores compreendidos entre 5,3 e 5,9 %.



**Figura 22** - Valores médios da actividade antioxiante das aguardentes das diversas regiões (VV - vinhos verdes; C – Cognac; A – Armagnac; B – Bairrada; E – Estremadura; P – Preparada; L – Lourinhã; AL – Alentejo; R – Ribatejo; BR – Beiras; D - Douro).

Os resultados demonstram uma reduzida actividade antioxiante nas aguardentes comerciais, quando comparadas com aguardentes de ensaio (sem diluição), que apresentam valores de actividade antioxiante compreendidos entre 26,4 e 94,4 % (Casanova, 2007). Os resultados obtidos podem ser justificados, por um lado, pelas condições de envelhecimento a que as aguardentes foram sujeitas:

- Espécie botânica da madeira utilizada;
- Nível de queima de madeira (Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008a);
- Tempo de envelhecimento (Alonso *et al.*, 2004; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008), resultante do progressivo esgotamento da madeira em compostos extraíveis e da modificação da capacidade de extracção do destilado, na medida em que quanto maior é o enriquecimento do destilado em compostos extraíveis, menor tende a ser o gradiente de concentração entre a madeira e o destilado e, portanto, menor a extracção;
- Estado de utilização da vasilha, que poderá explicar a reduzida actividade antioxiante observada nas aguardentes comerciais, uma vez que o envelhecimento é normalmente realizado em vasilhas já usadas (com um potencial de extracção em compostos extraíveis já muito reduzido), devido sobretudo a razões de ordem económica;
- Diluição ao longo do envelhecimento, por adição de água para baixar o título alcoométrico volúmico. É de salientar que, ao longo do período de envelhecimento, os adelgaçamentos realizados nas aguardentes provocam também a diminuição da concentração de compostos fenólicos, repercutindo-se na actividade antioxiante.

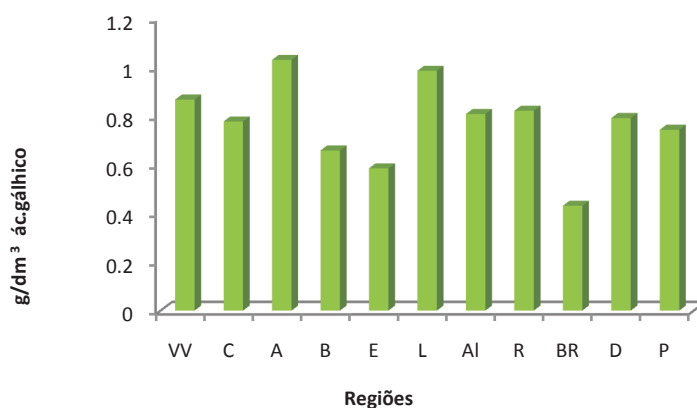
- Diluição efectuada no final do envelhecimento, por lotagem de aguardentes com diferentes idades, que provoca diminuição da concentração de compostos extraíveis na aguardente devido à introdução de aguardentes mais jovens (Schwarz *et al.*, 2009);
- Diferentes cinéticas de extracção/oxidação dos diferentes compostos extraíveis da madeira, que são potenciais antioxidantes;
- Ocorrência de oxidações no decorrer do envelhecimento, que poderão ter como consequência a oxidação de grande parte dos compostos fenólicos, diminuindo substancialmente as suas propriedades antioxidantes (Da Porto *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2009).

Para além destes aspectos, característicos do envelhecimento natural, poderá existir influência de factores exógenos, nomeadamente a adição de diversas substâncias (extractos de madeira, vanilina, caramelo, entre outras) que podem afectar a actividade antioxidante (Schwarz *et al.*, 2009).

#### IV.3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AGUARDENTES

##### IV.3.1 - Teor de polifenóis totais

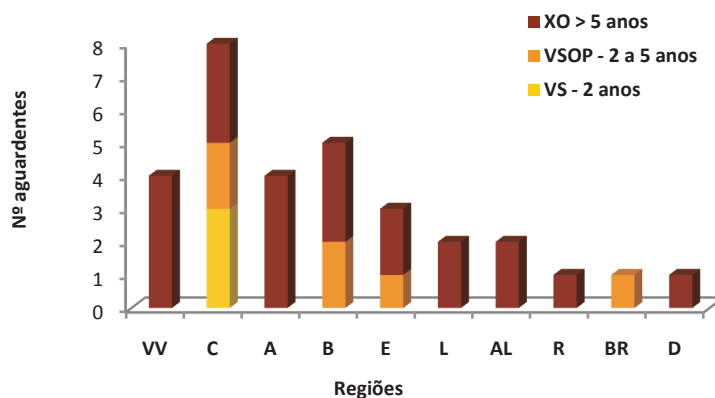
Nas aguardentes analisadas o teor de polifenóis totais varia entre 0,42 a 1,29 g/dm<sup>3</sup> de ácido gálglico (Anexo C.2). Na Figura 23, apresentam-se os valores médios do teor de polifenóis totais obtidos para as aguardentes, por região.



**Figura 23** –Valores médios do índice de polifenóis totais das aguardentes das diversas regiões (VV - vinhos verdes; C – Cognac; A – Armagnac; B – Bairrada; E – Estremadura; P – Preparada; L – Lourinhã; Al – Alentejo; R – Ribatejo; BR – Beiras; D - Douro).

Observa-se que as aguardentes que apresentam teores mais elevados em polifenóis totais pertencem às regiões de: Armagnac, com valores compreendidos entre 0,78 e 1,29 (g ácido gálico/dm<sup>3</sup>); Lourinhã, com valores entre 0,98 a 0,99; Vinhos Verdes, com valores compreendidos entre 0,44 e 1,51; Alentejo, com valores compreendidos entre 0,75 e 0,86; Douro com valor de 0,797. Estas aguardentes expressam uma riqueza considerável em polifenóis totais. Tal característica é menos acentuada nas aguardentes das regiões da Estremadura, com teores em polifenóis totais compreendidos entre 0,41 e 0,73, na região de Cognac com valores entre 0,63 e 1,03 e na região da Bairrada com valores de 0,43 a 0,90 (g ácido gálico/L). Esta variabilidade nos teores de compostos fenólicos entre as aguardentes das diversas regiões pode ser devida à influência de factores como: o tipo de madeira, o nível de queima, o estado de utilização da vasilha (nova ou usada) e o título alcoométrico da aguardente durante o envelhecimento (Puech *et al.*, 1985; Da Porto *et al.*, 2000; Canas, 2003; Casanova, 2007; Karvela *et al.*, 2008).

Por outro lado, os resultados obtidos parecem indicar que existe um enriquecimento gradual em polifenóis nas aguardentes com a idade, isto é, o índice de polifenóis totais evolui num sentido positivo à medida que aumenta o tempo de envelhecimento em madeira (Figura 24).



**Figura 24 – A** - Tempo de envelhecimento das aguardentes das diversas regiões (VV - vinhos verdes; C – Cognac; A – Armagnac; B – Bairrada; E – Estremadura; P – Preparada; L – Lourinhã; AL – Alentejo; R – Ribatejo; BR – Beiras; D - Douro);

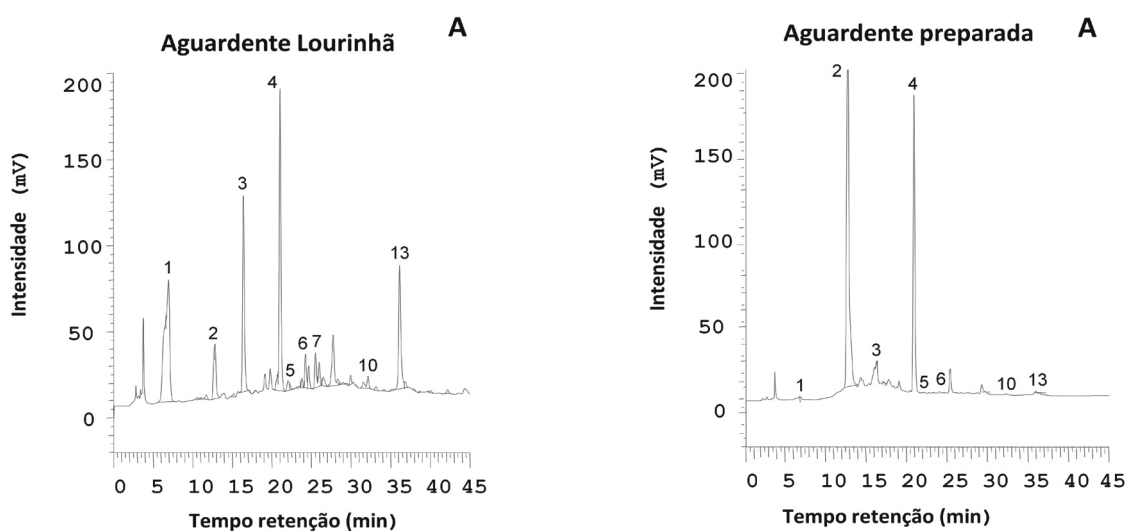
É possível constatar que às regiões em que as aguardentes apresentam maior teor de polifenóis totais corresponde um maior tempo de envelhecimento (XO). Este facto foi também observado noutros estudos, envolvendo Armagnacs (Goldberg *et al.*, 1999),

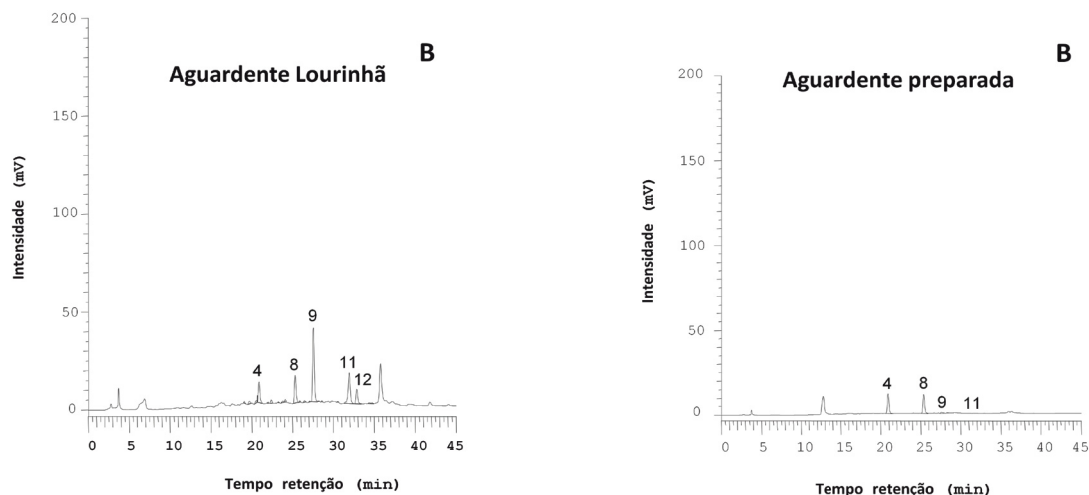
Cognacs (Da Porto *et al.*, 2000), aguardentes Lourinhã (Canas *et al.*, 2008a) e aguardentes comerciais (Schwarz *et al.*, 2009).

Relativamente às aguardentes preparadas, apesar de não serem envelhecidas em madeira de modo tradicional, possuem uma quantidade razoável de polifenóis totais, com teores compreendidos entre 0,42 e 1,28. Esta particularidade poderá ser justificada pela combinação de dois factores: a colocação de aparas de madeira na aguardente, durante algum tempo, promovendo alterações significativas na composição fenólica (Karvela *et al.* 2008) e a adição de extractos de baunilha e/ou caramelo, que actuam como interferentes no doseamento destes compostos, provocando o seu aumento (Da Porto *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2009).

#### IV.3.2 - Compostos de massa molecular baixa

Os cromatogramas resultantes da análise dos compostos de massa molecular baixa das várias aguardentes são apresentados na figura 25.

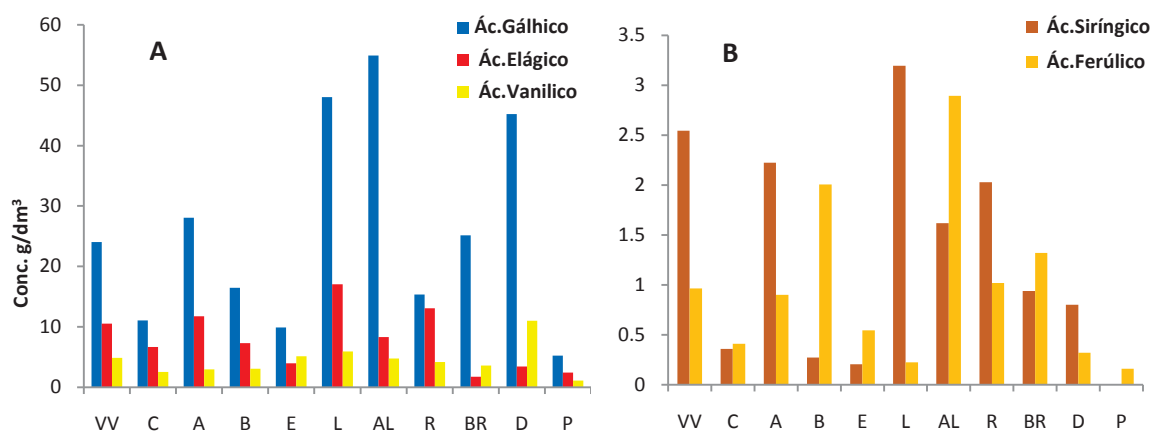




**Figura 25** – Cromatogramas a 280 nm (A) e 320 nm (B) dos compostos de massa molecular baixa: 1 – ac. gal; 2 – HMF; 3 – Furf; 4 – 4hbenz; 5 – ac. van; 6 – 5mfurf; 7 – ac. sg; 8 – vanil; 9 – sgald; 10 – ac.ferul; 11 – cfald; 12 – snald; 13 – ac. elag.

#### IV.3.2.1 - Ácidos fenólicos

Nas aguardentes estudadas, os ácidos fenólicos predominantes são: ácido gálgico, com teores compreendidos entre 5,24 e 54,89 mg/dm<sup>3</sup>, seguido pelo ácido elágico, com teores de 1,73 a 17,0 mg/dm<sup>3</sup> e o ácido vanílico, com um teor máximo de 5,11 e um valor mínimo de 1,09 mg/dm<sup>3</sup> – Figura 26.A. Os ácidos sirínico e ferúlico estão presentes em concentrações menores, com teores compreendidos entre 0,20 e 3,19 mg/dm<sup>3</sup> e entre 0,16 e 2,89 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente - Figura 26.B. Os ácidos fenólicos indicados estão presentes em todas as aguardentes comerciais, com excepção do ácido sirínico, que não se encontra nas aguardentes preparadas.



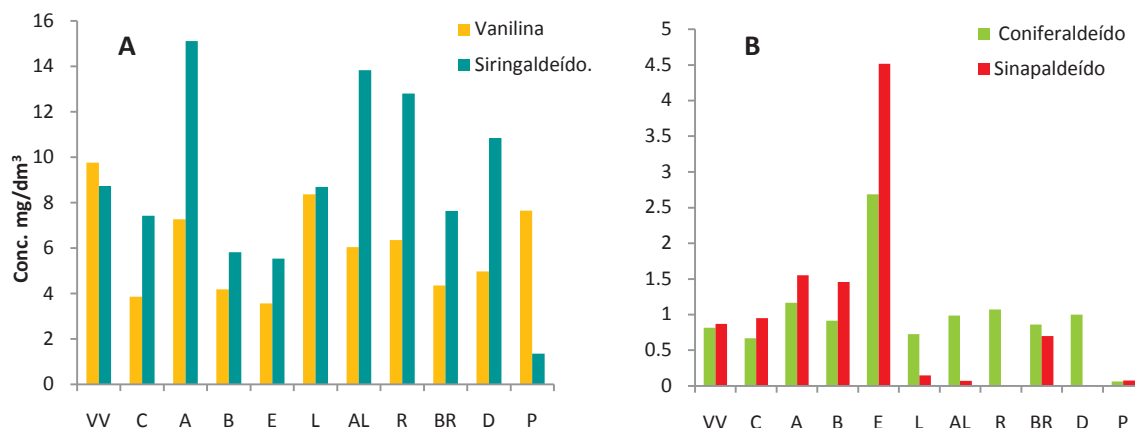
**Figura 26** – A - Concentração média dos ácidos gálgico, elágico e vanílico; B - Concentração média dos ácidos sirínico e ferúlico nas aguardentes das diversas regiões (VV - vinhos verdes; C – Cognac; A – Armagnac; B – Bairrada; E – Estremadura; P – Preparada; L – Lourinhã; AL – Alentejo; R – Ribatejo; BR – Beiras; D - Douro).

É interessante verificar que, ao contrário do que era esperado, os teores de ácido gálico são superiores aos teores de ácido elágico. Estes resultados contradizem o que foi observado noutros trabalhos, em que se constatou ser o ácido elágico como o principal composto das aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho (Belchior *et al.*, 2003; Canas *et al.*, 2004a; Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008a). Esta diferença poderá ser justificada pela variabilidade das concentrações dos compostos extraíveis e, em particular, dos compostos fenólicos constituintes da madeira, que depende da espécie botânica, da sua origem geográfica, do tipo de floresta e da sua gestão silvícola. Há, ainda, que ter em conta a variabilidade específica de cada árvore e da sua idade (Monties, 1992; Chatonnet, 1995; Masson *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1996; Canas, 2003). Por outro lado, sabe-se que a concentração de ácido gálico vai aumentando com o tempo de envelhecimento (Viriot *et al.*, 1993; Canas, 2003).

Relativamente ao ácido vanílico, verifica-se a sua presença em todas as aguardentes, sendo um bom indicador das aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho. Os ácidos siríngico e ferúlico estão, também, presentes em todas as aguardentes. Os teores destes compostos aumentam com o tempo de envelhecimento (Canas, 2003; Casanova 2007), o que está de acordo com os teores mais elevados observados nas aguardentes da região da Lourinhã, Vinhos Verdes, Alentejo e Armagnacs, pois são as mais envelhecidas (Figura 26).

#### **IV.3.2.2 - Aldeídos fenólicos**

Nas aguardentes estudadas observa-se (Figura 27) que existe uma superioridade quantitativa dos aldeídos benzóicos (vanilina e siringaldeído) relativamente aos aldeídos cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído). A nível dos benzóicos predomina o siringaldeído, à excepção das aguardentes preparadas, com teores entre 1,35 e 15,01 mg/dm<sup>3</sup> relativamente à vanilina, com teores variáveis entre 3,57 e 9,8 mg/dm<sup>3</sup>. Dos aldeídos cinâmicos, o sinapaldeído é quantitativamente mais importante nas aguardentes das regiões dos Vinhos Verdes, Cognac, Armagnac, Bairrada e Estremadura, com teores compreendidos entre 0,07 e 4,51 mg/dm<sup>3</sup>, enquanto, que nas restantes regiões o coniferaldeído é o composto predominante, com teores de 0,07 a 2,68 mg/dm<sup>3</sup>.



**Figura 27** – **A** - Concentrações médias de vanilina e siringaldeído; **B** - Concentrações médias de coniferaldeído e sinapaldeído nas aguardentes comerciais das diversas regiões (VV - vinhos verdes; C – Cognac; A – Armagnac; B – Bairrada; E – Estremadura; P – Preparada; L – Lourinhã; AL – Alentejo; R – Ribatejo; BR – Beiras; D - Douro).

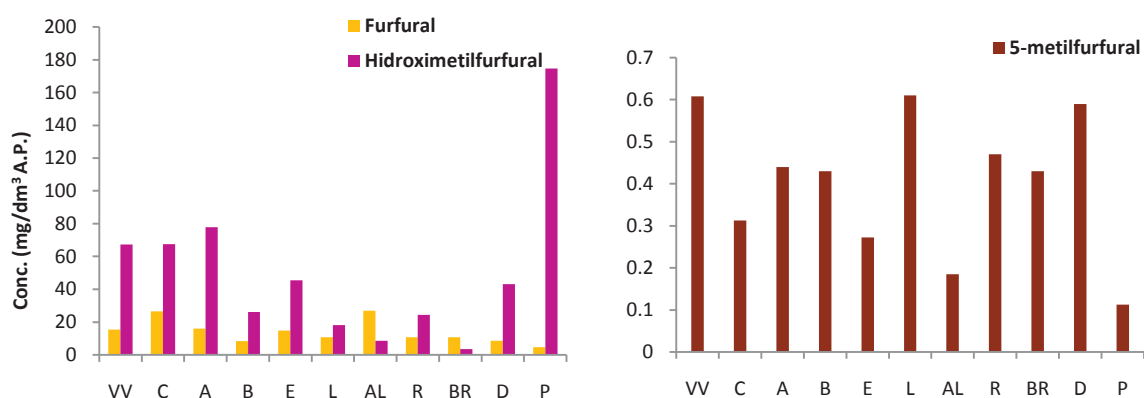
Estes resultados parecem estar relacionados com o tempo de envelhecimento das aguardentes, pois são consistentes com os resultados obtidos em aguardentes francesas (Calvo *et al.*, 1992), em Armagnacs (Puech *et al.*, 1985) Cognacs (Da Porto *et al.*, 2000), e aguardentes Lourinhã (Canas *et al.*, 2001), que revelaram um crescimento contínuo das concentrações de vanilina e siringaldeído durante o envelhecimento, enquanto as concentrações de coniferaldeído e sinapaldeído tendem a estabilizar a partir do segundo ano de envelhecimento. A evolução observada pode ser explicada pela ocorrência de fenómenos de oxidação durante o período de envelhecimento, que podem reflectir-se numa importante oxidação dos aldeídos cinâmicos em benzóicos e o progressivo decréscimo da extracção dos primeiros da madeira para a aguardente (Belchior e San-Romão, 1982; Puech *et al.*, 1985; Calvo *et al.*, 1992; Canas *et al.*, 2004b). Portanto, após o primeiro ano de envelhecimento, o fenómeno de oxidação sobrepõe-se ao fenómeno de extracção (Puech *et al.*, 1985), provocando um deslocamento do equilíbrio no sentido dos aldeídos benzóicos (Canas *et al.*, 2001).

A presença abundante de siringaldeído nas aguardentes parece ser um indicador de que estas envelhecem em madeira (Canas e Belchior, 2007). Nas aguardentes da região dos Vinhos Verdes, o facto da proporção de vanilina ser superior à de siringaldeído, pode ser indicadora de adição de vanilina comercial (Canas e Belchior, 2007). No caso das aguardentes preparadas, o desequilíbrio da razão vanilina/siringaldeído (Canas e Belchior, 2007) evidencia nitidamente a aplicação de vanilina.



#### IV.3.2.3 - Aldeídos furânicos

Nas aguardentes estudadas observa-se, pelos resultados constantes na Figura 28, que os compostos furânicos analisados – furfural, HMF e o 5-metilfurfural estão presentes em todas elas. De entre os aldeídos furânicos, é evidente que o hidroximetilfurfural (HMF), com teores compreendidos entre 3,54 e 174,6 mg/dm<sup>3</sup>, e o furfural, com teores de 4,71 a 26,91 mg/dm<sup>3</sup>, são os compostos mais abundantes nestas aguardentes comparativamente ao 5-metilfurfural, que apresenta um teor mínimo de 0,11 mg/dm<sup>3</sup> e um teor máximo de 0,61 mg/dm<sup>3</sup>.



**Figura 28 – A** - Concentrações médias de furfural e hidroximetilfurfural; **B** - Concentrações médias de 5-metilfurfural nas aguardentes comerciais de diversas regiões (VV - vinhos verdes; C – Cognac; A – Armagnac; B – Bairrada; E – Estremadura; P – Preparada; L – Lourinhã; AL – Alentejo; R – Ribatejo; BR – Beiras; D - Douro).

O furfural é um aldeído furânico muitas vezes utilizado como indicador da genuidade do envelhecimento em madeira das aguardentes, pois relativamente aos outros aldeídos é o único que já existe no destilado, mas que também resulta do tratamento térmico da madeira (Canas, 2003). Assim, seria espectável a superioridade do teor de furfural relativamente aos outros derivados furânicos, tal como se verifica nas aguardentes do Alentejo e da região das Beiras (Figura 28-A). No entanto, é interessante verificar que tal não acontece nas aguardentes da maioria das regiões. Este facto pode ser justificado pela adição de caramelo comercial na preparação das aguardentes, com a finalidade de ajustar a cor e promover um aumento do doce e da macieza, muito do agrado dos consumidores (Belchior *et al.*, 2004), tendo como consequência o aumento substancial dos teores de HMF e, de uma forma mais ligeira, dos teores de 5-metilfurfural (Vilallon Mir *et al.*, 1992; Quesada-Granados *et al.* 1996; Da Porto *et al.*, 2000). Este aspecto evidencia-se claramente

nas aguardentes preparadas, que apresentam um teor máximo e um teor mínimo de HMF, compreendidos entre 40,93 mg/dm<sup>3</sup> e 380,92 mg/dm<sup>3</sup>.

#### **IV.4 - Correlações entre a actividade antioxidante e a composição química das aguardentes**

##### **IV.4.1 - Actividade antioxidante e teor de polifenóis totais**

Nas aguardentes analisadas, verifica-se a existência de uma correlação não significativa ( $r = 0,157$ ) entre o teor de polifenóis totais e a actividade antioxidante. Estes resultados divergem dos obtidos em Cognacs (Da Porto *et al.*, 2000), em aguardentes de Xerez (Alonso *et al.*, 2004), em aguardentes de ensaio (Canas *et al.*, 2008a) e em aguardentes comerciais (Schwarz *et al.*, 2009), que indicam uma correlação altamente significativa entre as duas variáveis. Tal facto poderá resultar da existência de compostos não fenólicos nas aguardentes (Schwarz *et al.*, 2009) que estão a ser quantificados no lpt, por actuarem como interferentes. Significa que, para além das demais condições de envelhecimento, que interferem com as propriedades antioxidantes das aguardentes, poderá haver a acção de potenciais interferentes não fenólicos - alguns ácidos orgânicos, o etanol e o caramelo comercial (Ricardo da Silva *et al.*, 1987), originando resultados não coerentes e por vezes contraditórios como ocorre neste estudo.

##### **IV.4.2 - Actividade antioxidante e compostos de massa molecular baixa**

###### **IV.4.2.1 - Ácidos fenólicos**

O comportamento dos ácidos fenólicos e a sua correlação com a actividade antioxidante das aguardentes comerciais analisadas pode ser observado através dos resultados apresentados no Quadro VIII (Anexo D).

**Quadro VIII** - Correlação entre os ácidos fenólicos e a actividade antioxidante das aguardentes

	<b>gal</b>	<b>van</b>	<b>sg</b>	<b>fer</b>	<b>elag</b>
<b>Efeito</b>	<b>**</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>**</b>
<b>AA</b>	0,423	0,111	0,289	0,046	0,430

AA – actividade antioxidante; gal - ácido gálico; van – ácido vanílico; sg – ácido sirínico; fer – ácido ferúlico; elag – ácido elágico; correlação muito significativa (\*\*P=99%); ns - correlação não significativa.

A actividade antioxidante das aguardentes evidenciou uma correlação não significativa com os ácidos vanílico, sirínico e ferúlico. A correlação não significativa do ácido ferúlico e do ácido sirínico com a actividade antioxidante poderá ser justificada pelo decréscimo destes compostos a partir do terceiro ano de envelhecimento, dado que as aguardentes comerciais analisadas têm, na sua grande maioria, mais de três anos de envelhecimento (Figura 24).

Pelo contrário, os ácidos melhor correlacionados com esta propriedade são o ácido elágico e o ácido gálico. Estes resultados são consistentes com os obtidos em Cognacs (Da Porto *et al.*, 2000), em aguardentes de Xerez (Alonso *et al.*, 2004) e em aguardentes de ensaio (Canas *et al.*, 2008a), que indicam que os ácidos gálico e elágico são compostos que contribuem e determinam o perfil antioxidante destas bebidas espirituosas. Assim, o facto da actividade antioxidante dos Armagnacs, das aguardentes da região da Lourinhã e da região dos Vinhos Verdes ser superior à das aguardentes das outras regiões, poderá explicar-se pela maior riqueza em ácido gálico e elágico (Figura 25).

#### IV.4.2.2 - Aldeídos fenólicos

Nas aguardentes estudadas, a vanilina foi o único aldeído furânico a apresentar uma correlação muito significativa com a actividade antioxidante (Quadro IX).

Quadro IX - Correlação entre os aldeídos fenólicos e a actividade antioxidante das aguardentes

	vanil	sgald	cfald	snald
<b>Efeito</b>	<b>**</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>
<b>AA</b>	0,315	0,252	0,215	0,121

AA – actividade antioxidante; vanil – vanilina; sgald – seringaldeído; cfald – coniferaldeído; snald – sinapaldeído; correlação muito significativa (\*\*P=99%); ns - correlação não significativa.

Portanto, os resultados indicam que a vanilina possui propriedades antioxidantes que contribuem para a actividade antioxidante das aguardentes estudadas. No entanto, não é de descurar que nas aguardentes comerciais se recorre à adição de vanilina comercial, com o objectivo de alterar as suas características organolépticas, o que poderá influenciar estes resultados.

Os resultados obtidos para o siringaldeído e o sinapaldeído são coerentes com os de Alonso *et al.* (2004) em aguardentes de Xerez. Por outro lado, se ocorrerem excessivas reacções de oxidação ao longo do tempo de envelhecimento, o poder antioxidante destes compostos pode sofrer diminuição.

#### IV.4.2.3 - Aldeídos Furânicos

O HMF apresenta uma correlação negativa muito significativa com a actividade antioxidante nas aguardentes analisadas, o que indica que a actividade antioxidante evolui em sentido inverso, isto é, diminui na presença deste composto (Quadro X).

**Quadro X** - Correlação entre os aldeídos furânicos e a actividade antioxidante das aguardentes

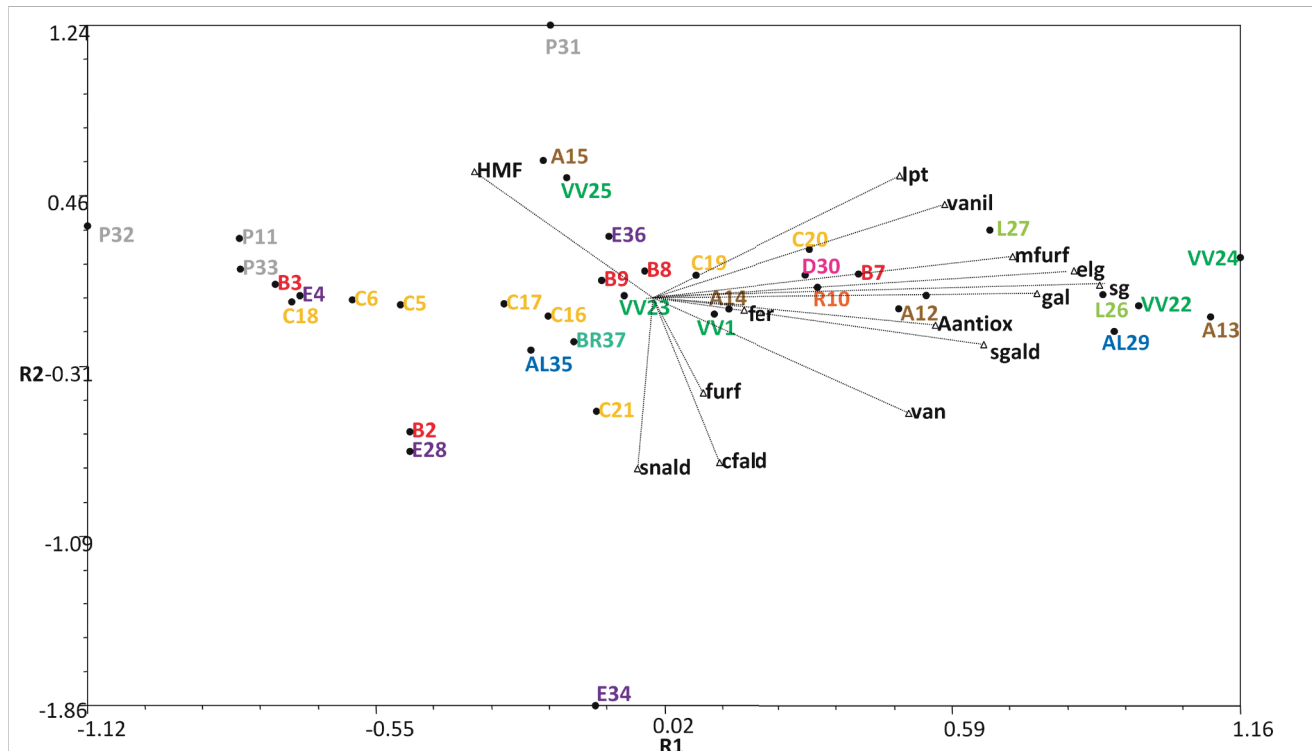
	HMF	Furf	5mfurf
<b>Efeito</b>	<b>**</b>	<b>ns</b>	<b>**</b>
<b>AA</b>	- 0,296	0,063	0,412

AA – actividade antioxidante; HMF – hidroximetilfurfural; Furf – furfural; 5mfurf – 5-metilfurfural; correlação muito significativa (\*\*P=99%); ns - diferença não significativa.

Contudo, é possível constatar que o 5-metilfurfural exhibe um comportamento distinto, sendo o aldeído furânico que apresenta uma correlação altamente significativa com a actividade antioxidante. Observa-se assim, uma diferença de comportamentos relativamente a estes aldeídos furânicos com a actividade antioxidante, que poderá ser explicada pela influência de uma prática comum na preparação de aguardentes comerciais que é a adição de caramelo. Segundo Pons *et al.* (1991), o caramelo comercial constitui uma fonte de aldeídos furânicos, tendo como principal composto o HMF. Neste contexto, é interessante salientar, que a influência positiva do caramelo sobre o 5-metilfurfural e consequentemente, na actividade antioxidante, sobrepõem-se aos efeitos negativos que esta adição de caramelo exerce no HMF e na consequente diminuição da actividade antioxidante. Assim, a actividade antioxidante das aguardentes comerciais é influenciada pela presença de caramelo, correlacionando-se de forma diferente consoante o aldeído furânico. Relativamente ao furfural, os resultados indicam uma correlação não significativa com a actividade antioxidante, facto também observado em Cognacs por Da Porto *et al.* (2000).

#### IV.5 – ANÁLISE GLOBAL DOS RESULTADOS

Considerando os parâmetros analisados, foi realizada uma análise em componentes principais, para avaliar globalmente a sua influência no comportamento das aguardentes comerciais das diversas regiões (Figura 29).



**Figura 29** - Projecção das aguardentes, da percentagem de inibição do DPPH\*, do índice de polifenóis totais e dos compostos de massa molecular baixa no espaço definido pelas 1ª e 2ª componentes principais ( **lpt** - índice de polifenóis totais; **Aantiox** – actividade antioxidante; **vanil** - vanilina; **mfurf** – 5 -metilfurfural; **elg** - ácido elágico; **gal** - ácido gálico; **sgald** - siringaldeído; **van** - ácido vanílico; **furf** - furfural; **cfald** - coniferaldeído; **snald** - sinapaldeído; **VV** -vinhos verdes; **A** - Armagnac; **C** - Cognac; **B** - Bairrada; **E** - Estremadura; **L** - Lourinhã; **AL** - Alentejo; **BR** - Beira; **D** – Douro; **P** – preparadas).

A primeira componente principal, explicando 31 % da variância total, permite separar as aguardentes analisadas em função da sua riqueza em: polifenóis totais e, dentro destes, pelo teor em compostos de massa molecular baixa (ácidos fenólicos, sobretudo ácidos elágico, gálico e sirínico, bem como vanilina e siringaldeído), e também riqueza em 5-metilfurfural. As aguardentes que apresentam maiores teores dos referidos compostos são também as que possuem maior actividade antioxidante, localizando-se no troço positivo desta componente: as aguardentes da Lourinhã, duas aguardentes dos Vinhos Verdes, uma do Alentejo e dois Armagnacs. É interessante constatar o posicionamento das aguardentes portuguesas mencionadas relativamente aos Armagnacs, que são reconhecidos pela sua qualidade, nomeadamente nutracêutica.

Complementarmente, no troço negativo da primeira componente principal, situam-se as aguardentes que apresentam menor riqueza em polifenóis totais e nos compostos extraíveis referidos. Deste grupo de aguardentes fazem parte, ao contrário do que seria de esperar, seis dos oito Cognacs analisados. Este facto poderá ser atribuído à elevada percentagem de Cognacs com menor idade (VS) relativamente outras regiões – Figura 24.

Com efeito, existe evidência de que aguardentes com dois anos de envelhecimento possuem menor riqueza em compostos extraíveis da madeira (Canas, 2003) e, por isso, menor actividade antioxidante (Casanova, 2007; Canas *et al.*, 2008). Situação semelhante é observada para a região da Beira.

Através da segunda componente principal, que explica 18 % da variância total, é possível separar as aguardentes em função dos teores de HMF, furfural, coniferaldeído e sinapaldeído. O HMF encontra-se associado ao troço positivo desta componente, enquanto os dois aldeídos fenólicos e o outro aldeído furânico se associam ao troço negativo. É de destacar a estreita relação entre o teor de HMF, provavelmente veiculado pelo caramelo, e o posicionamento das aguardentes preparadas analisadas. Os teores mais elevados de sinapaldeído, coniferaldeído e furfural permitem diferenciar as aguardentes C21, B2, E28, AL35 e BR37.

A análise multidimensional permite confirmar o observado na análise de correlações entre a actividade antioxidante, o teor de polifenóis totais e os compostos extraíveis da madeira. Importa ainda referir que a elevada variabilidade da composição química das aguardentes comerciais, associada aos factores de envelhecimento, poderá explicar a baixa percentagem de variância total (49%) explicada pelas duas primeiras componentes principais.

## **V - CONCLUSÕES**

Nas condições experimentais em que o presente trabalho foi realizado, é possível concluir que:

- A menor actividade antioxidante apresentada pelas aguardentes comerciais estudadas (6,5 %) relativamente às aguardentes de ensaio analisadas em trabalhos recentes (94,4 %), é atribuída às condições de envelhecimento e, mais concretamente, a procedimentos tecnológicos realizados durante o período de envelhecimento, com destaque para os adelgaçamentos e para a lotagem, que contribuem para a menor concentração de compostos extraíveis das aguardentes e, em consequência, para a diminuição das suas propriedades antioxidantes.
- As aguardentes comerciais portuguesas e francesas analisadas apresentam um perfil antioxidante reduzido, apesar de possuírem uma concentração abundante em compostos fenólicos. Este facto resulta da existência de uma correlação não significativa entre o teor de polifenóis totais e a percentagem de inibição de DPPH<sup>•</sup> nestas aguardentes, que poderá ser justificada pela acção interferente de compostos não fenólicos.
- No respeitante aos compostos fenólicos de massa molecular baixa analisados, os que apresentam correlação significativa com a actividade antioxidante das aguardentes são os ácidos gálico e elágico (presentes em maiores quantidades) e a vanilina (com menor concentração do que o siringaldeído). Portanto, a capacidade antioxidante de cada composto fenólico é, em grande parte, condicionada pela sua estrutura química, o que significa que os compostos presentes em maiores quantidades, não são os que necessariamente se correlacionam melhor com a actividade antioxidante da aguardente.
- Relativamente aos compostos furânicos, o HMF e o 5-metlfurfural apresentam uma correlação significativa com a actividade antioxidante das aguardentes estudadas, embora em sentidos divergentes – negativa para o HMF e positiva para o 5-metlfurfural. Os teores destes compostos, sobretudo de HMF, resultam parcialmente da adição de caramelo às aguardentes vónicas, cuja finalidade é o ajustamento da cor e a promoção do aumento do doce e da macieza, muito do agrado dos consumidores.

- A actividade antioxidante encontra-se positivamente correlacionada com o tempo de envelhecimento das aguardentes vínicas.
- As aguardentes portuguesas são idênticas às aguardentes comerciais francesas (Cognac e Armagnac), de referência mundial, tanto em termos de composição química como de qualidade nutracêutica.



## VI - Referências bibliográficas

- Addolorato G., Leggio L., Ojetti V., Capristo E., Gasbarrini G., Gasbarrini A. (2008). Effects of short-term moderate alcohol administration on oxidative stress and nutritional status in healthy males. *Appetite*, 50, 50-56.
- Al Awwadi A.N., Borrot-Bouttefroy A., Umar A., Saucier C., Segur M., Garreu C., Canal M., Glories Y., Moore N. (2007). Effect of Armagnac fraction on human platelet aggregation in vitro and on rat arteriovenous shunt thrombosis in vivo probably not related only to polyphenols. *Thrombosis Research*, 119, 407-413.
- Alamo Sanza M., Domínguez I.N., Cárcel L.M.C., Gracia L.N. (2004). Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Anal. Chim. Acta*, 513, 229-237.
- Alonso M.A., Castro R., Rodríguez C.M., Guillén A.D., Barroso G.C. (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International*, 37, 715-721.
- Alonso M.Á., Guillén A.D., Barroso G.C., Puertas B., García A. (2002). Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation With Polyphenolic Content. *J. Agr. Food Chem.*, 50, 5832-5836.
- Arnous A., Hakris D.P., Kefalas P. (2002). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5736-5762.
- Batista de Aquino W.F., Rodrigues S., Ferreira do Nascimento R., Casimiro S.R.A. (2006). Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. *Food Chem.*, 98, 569-574.
- Becker E.M., Nissen L.R., Skibsted L.M. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research Technology*, V 29, 561-571.
- Belchior A.P., (1987). Aguardentes Velhas II – O vinho. *O Escanção*, 5, 22.
- Belchior A.P., (1987). Aguardentes Velhas III – Destilação. *O Escanção*, 7, 21.
- Belchior A.P., Almeida G.T., Mateus M., Canas S. (2003). Ensaio laboratorial sobre a cinética de extracção de compostos de baixa massa molecular da madeira pela aguardente. *Ciência Téc. Vitiv.*, 18 (1), 29-41.
- Belchior A.P., Mateus A.M., Soares A.M. (2005). Comparação do Envelhecimento de Aguardente Lourinhã em Vasilhas de Madeira de Castanheiro e de Carvalho e em dois volumes. *Ciência Téc. Vitiv.*, 20, 91-103.
- Belchior A.P., Mateus M., Canas S., Caldeira I. (2004). Prova de consumidor versus prova técnica de aguardentes velhas. *Ciência Téc. Vitiv.*, 19 (2), 77-87.
- Belchior A.P., San-Romão V. (1982). Influence de l’oxygène et de la lumière sur l’évolution de la composition phénolique des eaux-de-vie vieilles en bois de chêne. *Bull. Liasion Groupe Polyphenols*, 11, 598-604.
- Belchior A.P., Caldeira I., Costa S., Tralhão G., Ferrão A.M., Carvalho E. (2001). Evolução das características físico-químicas e organolépticas de aguardentes *Lourinhã* ao longo de cinco anos de envelhecimento em madeira de carvalho e de castanheiro. *Ciênc. Téc. Vitiv.*, 16, 81-94.
- Belleville J. (2002). The French Paradox: Possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition*: 18:173, 173-177.

- Bertrand A. (2008). Les eux-de-vie traditionnelles d'origine viticole. *Deuxième symposium international*. Bordeaux 25-27 Juin 2007. Editions TEC&DOC, Paris.
- Borguini R.G. (2006). Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de saúde Pública, São Paulo.
- Caldeira I. (2004). O aroma de aguardentes vínicas envelhecidas em madeira. Importância da tecnologia de tanoaria. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial, ISA, UTL, Lisboa, pp 238.
- Caldeira I., Belchior A.P., Clímaco M.C., Bruno de Sousa R. (2002). Aroma profile of Portuguese brandies aged in chesnut and oak woods. *Analytica Chimica Acta*, 458, 55-62.
- Caldeira I., Clímaco M.C., Bruno de Sousa R., Belchior A.P. (2006a). Volatile composition of oak and chesnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *J. Food Engineering*, 76, 202-211.
- Caldeira I., Mateus A.M., Belchior A.P. (2006b). Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrels. *Analytica Chimica Acta*, 563, 264-273.
- Calvo A., Caumeil M., Pineau J. (1992). Extraction des polyphénols et des aldéhydes aromatiques pendant le vieillissement du Cognac, en fonction du titre alcoolique et du "degree d'épuisement" des fûts. In: *Élaboration et connaissance des spiritueux*, 562-566.
- Campos L. S. (1987). Guia dos compostos orgânicos e bioquímicos. Coleção Universidades. 507 pp. Europress, Editores e Distribuidores de Publicações, Lda., Odivelas.
- Canas S., (2003). Estudo dos Compostos Extraíveis de Madeira (Carvalho e castanheiro) e dos processos de Extração na Perspectiva do Envelhecimento em Enologia. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial, ISA, UTL, Lisboa, pp 302.
- Canas S., (2008). Impacto da queima da vasilha de madeira na qualidade de aguardentes Lourinhã envelhecidas. *Revista da Associação Portuguesa de Enologia*, Nº 51/52, 25-29.
- Canas S., Belchior A. P., Falcão A., Gonçalves J. A., Spranger M. I., Bruno de Sousa R. (2007). Effect of heat treatment on the thermal and chemical modifications of oak and chestnut wood used in brandy ageing. *Ciência. Tec. Vitiv.*, 22 (1), 5-14.
- Canas S., Belchior A.P. (2007). Avaliação da genuidade das aguardentes vínicas envelhecidas. Contributo dos aldeídos furânicos e fenólicos. In: 7º Simpósio de vitivinicultura do Alentejo, vol. (2), 93-99.
- Canas S., Belchior A.P., Ana M. Mateus, Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2002). Cinéticas de impregnação/evaporação e transferência de compostos fenólicos da madeira para a aguardente em modelo experimental. *Ciência e Tec. Vitiv.*, 15 (1), 1-14.
- Canas S., Belchior A.P., Caldeira I., Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2000). La couler et son évolution dans les eux-de-vie *Lourinhã* pendant les trois premières années du vieillissement. *Ciência e Tec. Vitiv.*, 15 (1), 1-14.
- Canas S., Belchior A.P., Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2006). Influence of heat treatment (moistening and temperature) on the thermal and chemical modifications of oak and chesnut wood during barrel cooperage. *J. Int. Sciences Vigne Vin* (no prelo).

- Canas S., Belchior A.P., Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2003). High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.*, 26, 496-502.
- Canas S., Belchior A.P., Spranger M.I., Bruno-de-Sousa R. (2004a). Extração e difusão dos compostos de massa molecular baixa da madeira ao longo do primeiro ano de envelhecimento de uma aguardente Lourinhã. In: *Actas do 6º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, Vol. 2, 121-128.
- Canas S., Casanova V., Belchior A.P. (2008a). Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *J. of Food Compos. and Analy.*, 21, 626-633.
- Canas S., H. Quaresma, Belchior A.P., Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2001). Evolução dos aldeídos fenólicos nos quatro primeiros anos de envelhecimento de aguardentes Lourinhã em madeiras de carvalho. In: 5º Simpósio de vitivinicultura do Alentejo, vol. (2), 127-132.
- Canas S., H. Quaresma, Belchior A.P., Spranger M.I., Bruno de Sousa R. (2004b). Evaluation of wine brandies authenticity by the relationships between benzoic and cinnamic aldehydes and between furanic aldehydes. *Ciência e Tec. Vitiv.*, 19 (1), 13-27.
- Canas S., Leandro M. C., Spranger M. I., Belchior A. P. (1999). Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (*Castanea sativa* L.) and corresponding aged brandies. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (12), 5023-5030.
- Canas S., Silva V., Belchior A.P. (2008b). Marcadores químicos da madeira em aguardentes vínicas envelhecidas. *Ciência Téc. Vitiv.*, 23 (1), 45-52.
- Canas S., Vaz M., Belchior A. P. (2008c). Influence de la dimension du fût dans les cinétiques d'extraction/oxydation des composés phénoliques du bois pour les eaux-de-vie Lourinhã. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*, 143-146, Bertrand A. (Ed.), Lavoisier Tec&Doc, Paris.
- Cano A., Hernández-Ruiz J., García-Cánovas F., Acosta M., Arnao M.B. (2002). An End-point Method of Estimation of the Total Antioxidant Activity in Plant Material. *Phytochemical Analysis*, 9, 196-202.
- Cantagrel R. (2008). La qualité et le renom du Cognac dans le monde, sa place dans L'histoire,. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*. 15-36. Bertrand, A. (ed.), Lavoisier – TEC & DOC, Paris.
- Cantagrel R., Mazerolles G., Vidal J.P. Galy B., Boulesteix J.M., Lanblanque O., Gaschet J. (1992). Évolution analytique et organoleptique des eaux-de-vie de Cognac ou cours du vieillissement. Incidence des techniques de tonnellerie. In: *Elaboration et connaissance des spiritueux*. TEC & DOC-Lavoisier, Paris, 567- 572.
- Casanova V. (2007). Actividade Antioxidante de Aguardentes Lourinhã. Influência das Características da Vasilha de Madeira e do Tempo de Envelhecimento. Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agronómica. ISA, UTL, Lisboa.
- Casanova V. (2008). Actividade antioxidante de aguardentes Lourinhã. Revista da Associação Portuguesa de Enologia, Nº 51/52, 32-33.
- Castellari M., Piermattei B., Arfelli G., Amati A. (2001). Influence of aging conditions on the quality of red sangiovese wine. *J. Agr. Food Chem.*, 49, 3672-3676.
- Cataneo B.C., Caliar V., Gonzaga V.L., Kuskoski M.E., Fett R. (2008). Actividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agro-industrial da produção de vinho. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n. 1, 93-102.

- Chatonnet P. (1995). Influence des procédés de tonellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élèves en fûts de chêne. Thèse doctorat de L'Université de Bordeaux II. Institut d'Oenologie.
- Chen C.L. (1970). Constituents of *Quercus alba*. *Phytochem.*, 9, 1149.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzonov D., Tubaro A., Menichini F. (2009). The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chem.*, 112, 587-594.
- Curvelo Garcia A.S., Lima S., Spranger-Garcia M.I., Coelho D. (1987). Caracterização analítica de vinhos rosadas por aplicação das técnicas de taxonomia numérica. *Ciência Tec.Vitic.*, 6, 67-78.
- Da Porto C., Calligaris S., Celotti Emilio, Nicoli M.C. (2000). Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by DPPH<sup>•</sup> Test. *J. agric. Food Chem.*, 48, 4241-4245.
- De Lange D.W. (2007). From red wine to polyphenols and back: A journey through the History of the French Paradox. *Thrombosis Research*, 119, 403-406.
- Degáspari H. C., Nina W., (2004). Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, V. 5, n. 1, 33-40.
- Doussot F., Pardon P., Dedier J., De Jeso B. (2000). Species and geographic origin influence on cooperage oak extractable content (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl.). *Analisis*, 28, 960-965.
- Duriez P., Cren C., Luc G., Fruchart J.C., Rolando C.H., Teissier E. (2001). Ingestion of Cognac significantly increases plasma phenolic and ellagic acid concentrations and plasma antioxidant capacity in humans. In: *Proceedings of 26<sup>th</sup> World Congress of OIV – Section Wine and Health*.
- Fengel D. e Wegener G. (1989). *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. 612 pp. Walter de Gruyter (Ed.), Berlin.
- Ferrari G., Lablanquie O., Pineda C., Lurton Luc (2008). Identification de nouveaux composés odorants dans les eaux-de-vie nouvelles de Cognac. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*. 125-127. Bertrand, A. (ed.), Lavoisier – TEC & DOC, Paris.
- Ferrari G., Lanblanquie O., Cantagrel R., Ledauphin J., Payot T., Fournier N., Guichard E. (2004). Determination of Key odorant compounds in freshly distilled Cognac using GC/O, GC/MS and sensory evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5670-5676.
- Ferreira M.P. (2008). Alcohol Consumption by aging adults in the United States. *Health Benefectis and Detriments*.
- Frangipane M.T., De Santis D., Ceccarelli A. (2007). Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chem.*, 103, 46-54.
- Garde-Cerdán T., Ancín-Azpilicueta C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Food Science and Thecnology*, 17, 438-447.
- Garreau C. (2008). L'Armagnac,. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticola*. 39-60. Bertrand, A. (ed.), Lavoisier – TEC & DOC, Paris.
- Goldberg D.M., Hoffman B., Yang J., Soleas G.J. (1999). Phenolic Constituents, Furans, and Total Antioxidant Status of Distilled Spirits. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3978-3985.

- Golluke A.P.B., Catharino R.R., Souza J.C., Eberlin M.N., Tavares D.Q. (2009). Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage. *Food Chem.*, 112, 868-873.
- Grade-Cerdán T., Lorenzo C., Carot J.M., Jabalayas J-M., Esteve M.D., Salinas M.R. (2008). Statistical differentiation of wines of different geographic origin and aged in barrel according to some volatile components and ethylphenols. *Food Chem.*, 111, 1025-1031.
- Guymon J. F., Crowell E. A. (1972). GC-separated brandy components derived from French and American oaks. *Am. J. Enol. Vit.*, 23, 114-120.
- Halliwell B. (1999). Antioxidant Defense Mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad. Res.*, V (33), 261-272.
- Haluk J.-P.; Irnoul M. (1998). The fixed polymer constituents in cooperage oak: cellulose, hemicelluloses and lignin. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, 4, 43-82.
- Jurado M.S., Puertas B., Cantos E., Guillén D. A. (2008). In de l' anhydride sulfureux et de la lie sur la qualité du Brandy distillé à la chaudière,. In: Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole. 79-87. Bertrand, A. (ed.), Lavoisier – TEC & DOC, Paris.
- Kadim D., Mannheim C.H. (1999). Kinetics of phenolic extraction during aging of model wine solution and white wine in oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 33-39.
- Karvela E., Dimitris P. Makris, Kefalas P., Moutounet M. (2008). Extraction of phenolics in liquid model matrices containing oak chips: Kinetics, liquid chromatography-mass spectroscopy characterisation and association with in vitro antiradical activity. *Food Chem.*, 110, 263-272.
- Koga T., Moro K., Matsudo T. (1998). Antioxidative behaviors of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2(or 5)-methyl-3(2H)-furanone against lipid peroxidation. *J. Agr. Food Chem.*, 46, 946-951.
- Lafon J., Couillaud P., Gaybellile F. (1973). Le Cognac. 285 pp. Éditions J.B. Bailliére, Paris.
- Lafon R., Lafon J., Couillaud P. (1964). Le Cognac – Sa distillation. J.-B. Bailliére et Fils, Paris, P.226.
- Léauté R. (1990). Distillation in alembic. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41 (1), 90-103.
- Leclair E., Cantagrel R., Maignial L., Snakkers G., Ferrari G. (1999). Essai de caractérisation aromatique d'eaux-de-vie nouvelles de cognac. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 33, 133-142.
- Ledauphin J., Basset B., Cohen S., Payot T., Barillier D. (2006). Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac: Carbonyl and sulphur compounds. *J. of Food Comp. and Analysis.*, 19, 28-40.
- Maier T., Schieber A., Kammerer R.D., Carle R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.*, 112, 551-559.
- Masson G., Moutounet M., Puech J.-L., (1995). Ellagitannin content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. *Am. J. Enol. Vit.*, 46, 262-268.
- Masson G., Puech J.-L., Moutounet M. (1996). Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bull. OIV*, 785-786, 634-657.

- Masson G., Puech J.-L., Moutounet M. (1996). Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bulletin de L'O.I.V.* 635-657.
- Miranda M.B., Horri J., Alcarde A.R. (2006). Estudo do efeito da irradiação gama (cobalto 60) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.26, n.4, 772-778.
- Miranda M.B., Martins N.G.S., Belluco A.E.S., Horri J., Alcarde A.R. (2008). Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28 (Supl.), 84-89.
- Monties B. (1992). Composition chimique des bois de chêne: composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. *Vigne et vin publ. Intern.*, 59-72.
- Mosedale J. R. (1996). Variation of the flavour and extractives of European oak wood from two French forests. *J. Sci. Food Agric.*, 70, 273-287.
- Mosedale J.R., Puech J.L. (1998). *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 95.
- Moutounet M., Mazauric J.P., Saint-Pierre B., Hanocq J.F., (1998). Gaseous exchange in wines stored in barrels. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, 4, 115-129.
- Muñoz-Muñoz A.C., Grenier A.C., Gutiérrez-Pulido H., Cervantes-Martínez J. (2008). Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of agin markers in tequila. *J. of Chromatography A*, 1213, 218-223.
- Niderlander G.A.H., Van Beek A.T., Bartasiute A., Koleva I.I. (2009). Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J. of Chromatography A*, 1210, 121-134.
- NiKanen, I. (1998). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96.
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannis in medicinal plants. *Phytochemistry*, 55, 3508-3516.
- Ortega-Heras M., González San-José M., González-Huerta C. (2007). Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chem.*, 103, 1434-1448.
- Paixão N., Perestrelo R., Marques C.J., Câmara S.J. (2007), 105, 204-214. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.*, 105, 204-214.
- Parazzi C., Arthur C.M., Lopes J.J.C., Borges M.T.M.R. (2008). Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28 (1), 193-199.
- Patricio I. (2005). A agitação da aguardente e a sua repercussão nas cinéticas de extracção/oxidação de compostos de massa molecular baixa da madeira. 85 p. Trabalho de estágio curricular. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Patrício I., Canas S., Belchior A.P., (2005). Effect of brandies' agitation on the kinetics of extraction/oxidation and diffusion of wood extractable compounds in experimental model. *Ciência. Tec. Vitiv.*, 20, 1-15.



- Payan E., Heras E., Mercader Mercè, Loblet M., Mireia T. **(2008)**. Étude des propriétés aromatiques du Brandy et du Cognac. In: Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole. 131-136. Bertrand, A. (ed.), Lavoisier – TEC & DOC, Paris.
- Pérez-Prieto L.J., López-Roca J.M., Martínez-Cutillas A., Minguez F.P., Gómez-Plaza E. **(2002)**. Maturing wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3272-3276.
- Pérez-Prieto L.J., López-Roca J.M., Martínez-Cutillas A., Minguez F.P., Gómez-Plaza E. **(2003)**. Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5444-5449.
- Piggot J.R., Conner J. M., Clayne J., Peterson A. **(1992)**. The influence of non-volatile constituents on the extraction of ethyl esters from brandies. *J. Sci. Food Agric.*, 59, 477-482.
- Piggot J.R., Conner J. M., Peterson A., Clayne J. **(1993)**. Effects on scotch whisky composition and flavor of maturation in oak casks with varying histories. *Int. J. Food Sci. Tecn.*, 28, 303-318.
- Plouvier L. **(2008)**. Histoire de la distillerie artisanale,. In: Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticola. 3-10. Bertrand, A. (ed.), Lavoisier – TEC & DOC, Paris.
- Pons I., Garrault C., Jeaubert J.N., Morel J. **(1991)**. Analyses of aromatic caramel. *Food Chem.*, 39, 311-320.
- Priyadarsini K.I., Khopde S.M., Kumar S.S., Mohan H. **(2002)**. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J. Agr.Food Chem.*, 50, 2200-2206.
- Puech J.-L., Goffinet B. **(1987)**. Adjustments of nonlinear models for lignin and its degradation products during the aging of Armagnac. *Journal of Food Science*, 52, 1280-1282 & 1301.
- Puech J.-L., Jouret C., Goffinet B. **(1985)**. Évolution des composés phénoliques du bois de chêne au cours du vieillissement de l'armagnac. *Sci. Alim*, 5, 379-392.
- Puech J.-L., Mosedale J.R. **(1998)**. Wood maturation of distilled beverages. *Food Science and Thecnology*, 9, 95-101.
- Puech J.-L., Moutounet M. **(1988)**. Liquid chromatographic determination of scopoletin in hydroalcoholic extract of oak wood and in matured distilled alcoholic beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 512-514.
- Quesada-Granados, Q.J., Mir, V.M., G<sup>a</sup> Serrana, L.H Martínez L.C.M. **(1996)**. The influence of added caramelo on furanic aldehyde content of matured brandies. *Food Chem.*, 56, 415-419.
- Quaresma H. **(2000)**. Evolução da composição fenólica de aguardentes Lourinhã ao longo dos quatro primeiros anos de envelhecimento. Trabalho de fim de curso. Escola Superior Agrária de Santarém, 1-57.
- Ribéreau-Gayon P. **(1970)**. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chim. Anl.*, 52, 627-631.
- Ricardo-da-Silva J.M., Spranger-Garcia M.I., Curvelo-Garcia A.S. **(1987)**. Contribuição para o estudo dos métodos de detreminação dos polifenóis toatais em vinhos tintos. *Ciênc. Téc. Vitiv.* 6 (1), 29-44.
- Roussel A.M. **(2002)**. Micronutrients et polyphenols antioxydants: une nouvelle voie de prévention nutritionnelle. In: *Congrès National de médecine et santé au travail*.

- Sarni F., Moutonet M., Puech J.-L. (1991). Composés phenolics extractibles de copeaux de bois de chêne. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*, 231-239, Bertrand, A. (ED.), Lavoisier – TEC & DOC, Paris.
- Saura-Calixto F., Goñi I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem.*, 94, 442-447.
- Saura-Calixto F., Serrano J., Goñi I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.*, 191, 492-401.
- Scalbert A., Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of nutrition*, 130, 2073s-2085s.
- Scherer R., Godoy T.H. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.*, 112, 654-658.
- Schroder H., Marrugat J., Fito M., Weinbrenner T., Covas M.I. (2006). Alcohol consumption is directly associated with circulating oxidized low-density lipoprotein. *Free Rad. Biol. Med.*,
- Schwarz M., Rodríguez M.C., Martínez C., Bosquet V., Guillén D., Barroso C.G. (2009). Atioxidant activity of Brandy de Jerez and other aged distillates, and correlation with their polyphenolic content. *Food Chem.*, 116, 29-33.
- Seikel M.K., Hostettler F.D., Niemann G.J. (1971). Phenolics from *Quercus Rubra* Wood. *Phytochem*, 10, 2249-2251.
- Shahidi F. (2008). Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Food Science and Thecnology*, 1-12.
- Silva V.A. (2006). Validação do método cromatográfico HPLC para análise de acetovanilona e de etilvanilina em aguardentes envelhecidas. Relatório de estágio curricular de Tecnologia e Segurança Alimentar. FCT, UNL, Lisboa.
- Simon B. F., Conde E., Cadahia E., Garcia-Vallejo M. C. (1997). Les composés phénoliques de faible poids moléculaire dans les bois de chêne espagnol, français et américain. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, 2, 1-11.
- Simon B.F., Cadahia E., Conde E., Garcia-Vallejo M.C. (1996). Low molecular weight phenolic compounds in spanish oak woods. *J.Agr.Food Chem.*, 44, 1507-1511.
- Simón B.F., Cadahia E., Conde E., Garcia-Vallejo M.C. (1999). Evolution of phenolic compounds of spanish oak wood during natural seasening. First results. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1687-1964.
- Singleton V.L. (1995). Maturation of wines and spirits: comparisons, facts and hypotheses. *Am. J. Enol. Vit.*, 46 (1), 98-115.
- Soobrattee A.M., Neergheen S.V., Luximon-Rama A., Aruoma I.O., Bahorun T. (2005). Phenolics as a potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Fundamental and Molecular Mechanism and Muatgenics*, 579, 200-213.
- Sroka Z., Cisowski W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 753-758.
- Terra X., Valls J., Vitrac X., Mérrillon J. M., Ardèvol L., Arola A., Bladé C., Fernandez-Larrea J., Pujadas G., Salvadó J., Blay M. (2007). Grape-seed procyanidins act as na antiinflammatory agents



in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by innibiting NFkB signaling pathway. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 4357-4365.

- Umar A., Depont F., Jacquet A., Lignot S., Segur M., Boisseau M., Bégaud B., Moore N. **(2005)**. Effects of Armagnac or vodka on platelet aggregation in healthy volunteers: a randomized controlled clinical trial. *Thrombosis Research*, 115, 31-37.
- Umar A., Depont F., Jacquet A., Lignot S., Segur M.C., Boisseau M., Bégaud B., Moore N. **(2005)**. Effects of Armagnac or vodka on platelet aggregation in heathy volunteers: a randomized controlled clinical trial. *Thrombosis research*, 115, 31-37.
- Umar A., Guerin V., Renard M., Boisseau M., Garreau C., Begaud B., Molimard M., Moore N. **(2003)**. Effects of Armagnac extracts on human platelet function in vitro and on rat arteriovenous shunt thrombosis in vivo. *Thrombosis research*, 110, 135-140.
- Vekiari A.S., Gordon H.M., García-Macías P., Labrinea H. **(2008)**. Extraction and determination of ellagic acid content in chesnut bark and fruit. *Food Chem.*, 110, 1007-1011.
- Villalón Mir, Quesada Granados J., López G<sup>a</sup> De La Serrana H., López Martinez M.C. **(1992)**. High performance liquid chromatography determination of furanic compounds in commercial brandies and caramels. *J. Liquid Chromat.*, 15, 513-524.
- Viriot C., Scalbert A., Lapierre C., Moutounet M. **(1993)**. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agr. Food Chem.*, 41, 1872-1879.
- Vision J.A., Su X., Zubik L., Bose P. **(2001)**. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agr. Food Chem.*, 41, 1872-1879.
- Vivas N., Gloies Y., Bourgeois G., Vitry C. **(1996)**. Les ellagitannins de bois de Coeur de différents espèces de chênes (*Quercus* sp.) et de châtaignier (*Castanea sativa* Mill.): Dosage dans les vins rouges élevés en barriques. *J. Agr. Foog Chem.*, 41, 1872-1879.

## **ANEXOS**

## Anexo A

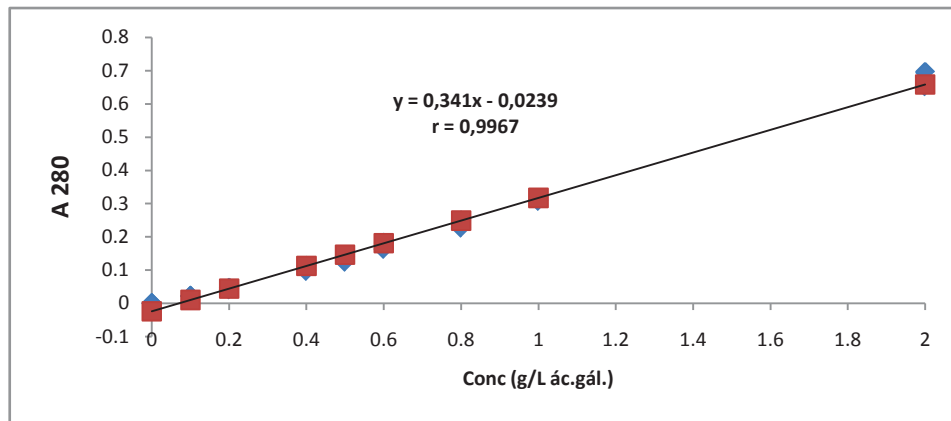
### A.1 – Actividade antioxidante das aguardentes analisadas (% de inibição DPPH<sup>\*</sup>)

Aguardente	A i	Af (60 min)	AA=X	DPPH=4 x 10 <sup>-5</sup> 100µl Y = 0,678x + 0,051	DPPH=8,5 x 10 <sup>-5</sup> 100µl Y = 0,725x + 0,001	DPPH=8,5 x 10 <sup>-5</sup> 10µl X = (y-0,001/0,725) * 0,07	% Inibição
1-VV	0,4245	0,0738	0,826148	0,611128622	0,84155672	0,05890897	5,9
2-B	0,3880	0,0512	0,868041	0,639531959	0,880733736	0,061651362	6,2
3-B	0,4160	0,2482	0,403365	0,324481731	0,446181698	0,031232719	3,1
4-E	0,4606	0,2283	0,504342	0,392943986	0,540612395	0,037842868	3,8
5-C	0,4600	0,0962	0,79087	0,587209565	0,808564918	0,056599544	5,7
6-C	0,4310	0,1924	0,553596	0,426338283	0,586673494	0,041067145	4,1
7-B	0,4240	0,0379	0,910613	0,668395755	0,920545869	0,064438211	6,4
8-B	0,4548	0,0780	0,828496	0,612720317	0,843752161	0,059062651	5,9
9-B	0,4465	0,0723	0,838074	0,61921411	0,852709117	0,059689638	6,0
10-R	0,4090	0,0558	0,86357	0,636500244	0,876552061	0,061358644	6,1
11-P	0,4616	0,2749	0,404463	0,325225737	0,447207913	0,031304554	3,1
12-A	0,4567	0,0789	0,827239	0,611867966	0,842576505	0,058980355	5,9
13-A	0,4500	0,0771	0,828667	0,612836	0,843911724	0,059073821	5,9
14-A	0,4520	0,0796	0,823894	0,6096	0,839448276	0,058761379	5,9
15-A	0,4422	0,0943	0,786748	0,584415197	0,804710616	0,056329743	5,6
16-C	0,4450	0,0719	0,838427	0,619453483	0,853039287	0,05971275	6,0
17-C	0,4080	0,0361	0,91152	0,669010294	0,921393509	0,064497546	6,4
18-C	0,4306	0,1679	0,610079	0,464633535	0,63949453	0,044764617	4,5
19-C	0,3810	0,0414	0,891339	0,655327559	0,902520771	0,063176454	6,3
20-C	0,4520	0,0869	0,807743	0,59865	0,824344828	0,057704138	5,8
21-C	0,4258	0,0444	0,895726	0,65830202	0,906623475	0,063463643	6,3
22-VV	0,4645	0,0947	0,796125	0,590772659	0,813479529	0,056943567	5,7
23-VV	0,4175	0,0725	0,826347	0,611263473	0,841742721	0,058921991	5,9
24-VV	0,4190	0,0432	0,896897	0,65909642	0,9077192	0,063540344	6,4
25-VV	0,4645	0,1200	0,741658	0,553843918	0,762543335	0,053378033	5,3
26-L	0,4520	0,0772	0,829204	0,6132	0,844413793	0,059108966	5,9
27-L	0,4112	0,0492	0,88035	0,647877432	0,892244734	0,062457131	6,2
28-E	0,4243	0,0395	0,906905	0,665881923	0,917078515	0,064195496	6,4
29-AI	0,4470	0,0764	0,829083	0,613118121	0,844300856	0,05910106	5,9
30-DR	0,4083	0,0389	0,904727	0,664404849	0,915041172	0,064052882	6,5
31-P	0,4103	0,0641	0,843773	0,623077992	0,858038609	0,060062703	6,0
32-P	0,4680	0,3206	0,314957	0,264541026	0,363504863	0,02544534	2,5
33-P	0,4330	0,0522	0,879446	0,647264203	0,891398901	0,062397923	6,2
34-E	0,4480	0,1037	0,768527	0,572061161	0,787670567	0,05513694	5,5
35-AI	0,4520	0,0816	0,819469	0,6066	0,835310345	0,058471724	5,8
36-E	0,4690	0,0758	0,83838	0,619421322	0,852994927	0,059709645	6,0
37-BR	0,4302	0,0365	0,915156	0,671475593	0,924793921	0,064735574	6,5

Ag – aguardente; Ai – absorvência inicial; Af – absorvência final; AA – actividade antioxidante.

## Anexo C

### C.1. Curva de calibração do ácido gálico para expressão do índice de polifenóis totais e análise de variância da regressão



**Figura C.1.** – Curva de calibração do ácido gálico para expressão do índice de polifenóis totais.

**Quadro C.1** - Análise de variância da regressão correspondente à curva de calibração do ácido gálico.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabel.	Significância
Regressão	1,5020133	1	1,50213	-143,434165	10,58	**
Residual	-0,1675487	16	-0,010472			
Erro puro	0,001520075	9	0,000169			
Erro ajustamento	-0,1690688	7	-0,024153			
Variação total	1,33446455	17	1,491541	-143,002274	6,88	ns

**Quadro C.2 – Valores do índice de polifenóis totais das aguardentes comerciais (g/dm<sup>3</sup> de ácido gálico).**

Aguardentes	Ipt
1 - VV	0,439
2 - B	0,431
3 - B	0,678
4 - E	0,487
5 - C	0,661
6 - C	0,785
7 - B	0,898
8 - B	0,553
9 - B	0,823
10 - R	0,665
11 - P	0,959
12 - A	1,084
13 - A	0,783
14 - A	1,289
15 - A	0,688
16 - C	0,637
17 - C	0,685
18 - C	1,011
19 - C	1,037
20 - C	0,701
21 - C	1,151
22 - VV	0,565
23 - VV	1,025
24 - VV	1,148
25 - VV	0,991
26 - L	0,997
27 - L	0,700
28 - E	0,864
29 - AL	0,797
30 - DR	1,284
31 - P	0,598
32 - P	0,420
33 - P	0,785
34 - E	0,414
35 - AL	0,749
36 - E	0,733
37 - BR	0,432

VV -vinhos verdes; A - Armagnac; C - Cognac; B - Bairrada; E - Estremadura; L - Lourinhã; AL - Alentejo; BR - Beira; P – preparadas.

## Anexo D

### Concentração dos compostos de massa molecular baixa nas aguardentes analisadas (mg/dm<sup>3</sup> álcool puro).

<b>VV</b>	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
N1	2,66	12,65	6,29	5,72	0,82	1,93	5,85	9,69	0,56	0,65	0	6,47
N22	23,3	18,25	22,23	5,83	0,75	3,85	12,41	22,86	1,58	0,24	3,94	12,56
N23	28,31	21,1	15,77	2,32	0,27	0,9	5,78	10,88	0,91	0,09	0,37	8,55
N24	65,71	7,8	23,23	4,68	0,61	5,3	13,45	0,13	1,39	1,77	0,03	22,15
N25	0,18	276,67	9,35	5,87	0,59	0,75	11,32	0,21	0,38	1,34	0	2,95
Média X	<b>24,032</b>	<b>67,294</b>	<b>15,374</b>	<b>4,884</b>	<b>0,608</b>	<b>2,546</b>	<b>9,762</b>	<b>8,754</b>	<b>0,964</b>	<b>0,818</b>	<b>0,868</b>	<b>10,536</b>

<b>C</b>	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
N5	4,73	66,64	23,07	1,8	0,12	0	3,2	5,78	0,17	0,87	0	5,59
N6	1,56	113,95	31,32	3,01	0,32	0	1,96	4,09	0,13	0,97	0	3,14
N16	7,69	43,39	27,04	4,16	0,22	0,4	5,57	10,44	0,28	0,06	0	5,19
N17	12,88	35,77	21,58	1,36	0,34	0	2,58	5,71	0,59	0,09	1,05	7,5
N18	2,56	55,31	23,19	1,3	0,1	0	2,07	4,04	0,25	0	1,59	3,41
N19	17,12	93,63	27,93	3,49	0,71	0,25	3,53	6,32	0,68	0,18	1,32	9,27
N20	27,1	82,46	29,2	2,79	0,45	2,14	7,24	13,23	0,36	0,12	0,02	10,64
N21	15,11	49,18	28,83	2,54	0,24	0,08	4,77	9,78	0,81	3,06	3,63	8,75
Média X	<b>11,093</b>	<b>67,541</b>	<b>26,52</b>	<b>2,556</b>	<b>0,3125</b>	<b>0,35875</b>	<b>3,865</b>	<b>7,42375</b>	<b>0,40875</b>	<b>0,66875</b>	<b>0,95125</b>	<b>6,68625</b>

<b>A</b>	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
N12	22,14	64,8	18,69	3,53	0,43	2,99	10,26	20,96	0,59	0,17	4,68	9,92
N13	45,01	11,78	17,96	4,34	0,65	4,52	10,15	22,67	1,48	2,85	0,96	16,2
N14	23,93	19,51	14,65	2,61	0,35	1,39	5,23	11,31	1,04	1,57	0,57	11,99
N15	21,29	215,7	12,58	1,43	0,33	0	3,41	5,51	0,49	0,07	0	8,97
Média X	<b>28,0925</b>	<b>77,9475</b>	<b>15,97</b>	<b>2,9775</b>	<b>0,44</b>	<b>2,225</b>	<b>7,2625</b>	<b>15,1125</b>	<b>0,9</b>	<b>1,165</b>	<b>1,5525</b>	<b>11,77</b>

<b>B</b>	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
N2	5,63	18,08	13,46	2,06	0,25	0	2,51	3,91	0,71	2,57	5,64	4,63
N3	0	73,23	7,65	3,9	0,09	0	3	4,1	4,01	0,51	0	2,04
N7	31,25	22,54	9,11	4,75	0,73	1,37	4,46	8,49	2,42	0,64	0,07	11,48
N8	31,14	12,03	4,62	1,82	0,6	0	3,71	6,29	1,4	0,35	1,54	9,24
N9	14,2	5,23	6,63	2,9	0,48	0	7,23	6,29	1,5	0,51	0,03	9,23
Média X	<b>16,444</b>	<b>26,222</b>	<b>8,294</b>	<b>3,086</b>	<b>0,43</b>	<b>0,274</b>	<b>4,182</b>	<b>5,816</b>	<b>2,008</b>	<b>0,916</b>	<b>1,456</b>	<b>7,324</b>

<b>E</b>	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
N4	0,37	65,51	11,02	4,44	0,33	0	1,92	2,45	0,46	0,09	0,01	2,8
N28	15,26	55,43	11,8	2,63	0,04	0	3,29	0,68	0,32	4,31	6,64	2,92
N34	15,49	32,32	31,51	12,24	0,14	0	3,6	9,53	0,17	6,33	11,27	2,92
N36	8,5	28,82	4,93	1,14	0,58	0,82	5,47	9,49	1,23	0,02	0,14	7,33

Média X	9,905	45,52	14,815	5,1125	0,2725	0,205	3,57	5,5375	0,545	2,6875	4,515	3,9925
---------	-------	-------	--------	--------	--------	-------	------	--------	-------	--------	-------	--------

P	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
	N11	0	143,1	12,35	2,09	0,2	0	3,7	4,77	0,24	0,01	2,39
	N31	20,15	380,92	3,29	1,13	0,2	0	24,33	0,04	0,13	0	3,19
	N32	0,73	133,44	1,68	1,01	0,03	0	0,1	0,41	0,13	0	1,73
	N33	0,11	40,93	1,52	0,14	0,02	0	2,46	0,19	0,14	0	2,37
	Média X	5,2475	174,597	4,71	1,0925	0,1125	0	7,6475	1,3525	0,16	0,0775	2,42

L	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
	N26	51,93	6,24	12,52	6,04	0,56	3,48	7,82	17,23	0,24	1,32	16,08
	N27	44,16	30,04	9,11	5,77	0,66	2,91	8,92	0,14	0,21	0,13	18,02
Média X	48,045	18,14	10,815	5,905	0,61	3,195	8,37	8,685	0,225	0,725	0,15	17,05

AL	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
	N29	66,82	13,98	16,71	6,41	0,31	3,24	9,77	22,47	0,56	1,81	14,93
	N35	42,97	3,22	37,12	3,17	0,06	0	2,32	5,18	5,23	0,16	1,73
	Média X	54,895	8,6	26,915	4,79	0,185	1,62	6,045	13,825	2,895	0,985	8,33

R	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
	N10	15,35	24,32	10,81	4,17	0,47	2,03	6,35	12,8	1,02	1,07	13,06

BR	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
	N37	25,18	3,54	10,68	3,59	0,43	0,94	4,35	7,64	1,32	0,86	1,73

D	<i>ac. gal</i>	<i>HMF</i>	<i>furf</i>	<i>ac. van</i>	<i>5mfurf</i>	<i>ac. sg</i>	<i>vanil</i>	<i>sgald</i>	<i>ac. fer</i>	<i>cfald</i>	<i>snald</i>	<i>ac. elg</i>
	N 30	45,2	43,06	8,63	3,42	0,59	0,8	4,97	10,85	0,32	1	11,03

## Anexo B

### C.1 - Correlação entre parâmetros analíticos das aguardentes comerciais analisadas

	Ipt	gal	HMF	furf	van	5mfurf	sg	vanil	sgald	fer	cfald	snald	elg	Aantiox
Ipt	1													
gal	0,351	1												
HMF	0,490	-0,313	1											
furf	0,115	0,041	-0,166	1										
van	-0,009	0,313	-0,252	0,211	1									
5mfurf	0,311	0,371	-0,230	-0,181	0,359	1								
sg	0,403	0,588	-0,337	0,041	0,434	0,568	1							
vanil	0,600	0,398	0,374	-0,151	0,211	0,343	0,539	1						
sgald	0,170	0,331	-0,415	0,205	0,380	0,397	0,614	0,239	1					
fer	-0,071	0,419	-0,252	-0,056	0,106	0,230	0,033	-0,010	0,044	1				
cfald	-0,171	0,112	-0,160	0,193	0,515	-0,124	0,051	-0,027	0,075	-0,050	1			
snald	-0,190	-0,101	-0,141	0,329	0,391	-0,215	-0,103	-0,105	0,102	-0,128	0,715	1		
elg	0,511	0,614	-0,338	0,094	0,226	0,544	0,770	0,373	0,431	-0,077	0,019	-0,132	1	
Aantiox	0,157	0,423	-0,296	0,063	0,111	0,412	0,293	0,315	0,252	0,046	0,215	0,121	0,430	1

**Ipt** – índice de polifenóis totais; **gal** – ácido gálico; **HMF** – hidroxiacetilfurfural; **furf** – furfural; **van** – ácido vanílico; **5mfurf** – 5-metilfurfural; **sg** – ácido síngico; **vanil** – vanilina; **sgald** – siringaldeído; **fer** – ácido ferúlico; **cfald** – coniferaldeído; **snald** – sinapaldeído; **elg** – ácido elágico; **Aantiox** – actividade antioxidante.