

ACIDOS FENÓLICOS, ALDEÍDOS FENÓLICOS E DERIVADOS FURÂNICOS EM APARAS DE MADEIRA DE CARVALHO FRANCÊS E AMERICANO

Maria João CABRITA^{1,3}; Helena ROQUE²; Raquel GARCIA³; Cristina BARROCAS DIAS⁴

RESUMO

O presente trabalho teve como objectivo a caracterização de aparas comerciais de carvalho francês e americano do ponto de vista da sua composição fenólica. Assim os ácidos fenólicos (ácido gálico, siríngico e vanílico) os aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coníferaldeído e sinapaldeído) e os derivados furânicos (furfural, 5-metilfurfural e 5-hidroximetilfurfural) foram quantificados em amostras comerciais de aparas de carvalho francês e americano com diferentes tamanhos e níveis de queima. Os compostos fenólicos foram extraídos directamente das amostras de madeira e também de soluções de vinho sintético, de forma a avaliarmos as diferenças entre tipos de madeira e níveis de queima.

Os resultados mostram que as aparas de carvalho francês em estudo são mais ricas em compostos fenólicos que as de carvalho americano e que em ambos os casos as aparas que não foram sujeitas a queima são as mais pobres nestes compostos.

PALAVRAS CHAVE: compostos fenólicos, aparas de carvalho.

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de aparas de carvalho em enologia é hoje prática corrente, o que torna pertinente o estudo da sua composição. Os compostos fenólicos são um conjunto de compostos com propriedades interessantes nomeadamente, propriedades anti-oxidantes atribuídas a flavonoides e ácidos cinâmicos (McDONALD *et al.*, 1998) o que torna o conhecimento da composição das madeiras usadas em enologia um possível benefício para indústria. Por outro lado, sabemos que a composição das madeiras está intimamente relacionada com a espécie botânica e a sua origem, mas sobretudo com os processos de maturação e de queima que a madeira sofre durante o seu processamento. A forma e o

¹ Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora. Ap 94 7002-554 Évora, Portugal. Email: mjbc@uevora.pt;

² Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Ap 94 7002-554 Évora, Portugal.

³ Aluna do Mestrado de Tecnologia Alimentar da Universidade de Évora

⁴ Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, CLAV Rua Romão Ramalho 59, 700-617 Évora, Portugal, Centro de Química de Évora (CQE), Portugal

tamanho das aparas vão por seu lado condicionar os processos de extracção dos compostos extraíveis da madeira pelo vinho.

O objectivo deste trabalho foi estudar a composição em ácidos fenólicos (ácido gálico, siríntrico e vanílico), aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coníferaldeído e sinapaldeído) e derivados furânicos (furfural, 5-metilfurfural e 5-hidroximetilfurfural) em amostras comerciais de aparas de carvalho francês e americano com diferentes tamanhos e níveis de queima.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material

As aparas de madeira utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas por VDS Enologia (tabela 1).

Tabela 1 – Código das amostras de aparas utilizadas

Aparas de carvalho americano	Aparas de carvalho francês
Classic Oak Chips, untoasted – A1	Classic Oak Chips, untoasted – F1
Toasted Oak Powder – A2	Toasted Oak Powder – F2
Classic Oak Chips, large size, medium toast - A3	Classic Oak Chips, large size, medium toast - F3
Classic Oak Chips, large size, heavy toast – A4	Classic Oak Chips, large size, heavy toast – F4

Um vinho sintético (13,8% etanol, 3,2 g/L ácido tartárico) foi engarrafado com 6g/L de cada uma das aparas em estudo, colocado a 20°C durante um mês e analisado. O ensaio foi efectuado em triplicado.

2.2 – Análise por HPLC

2.2.1. Preparação das amostras

SLE - as aparas de madeira foram moídas para eliminar o efeito tamanho. Efectuou-se uma extracção sólido-líquido (1,5g de cada apara, 10 mL de metanol, 3 horas). Os extractos foram filtrados antes de serem injectados. As extracções foram feitas em triplicado.

SS-LLE – as amostras de vinho sintético foram extraídas por extracção líquida-líquida em suporte sólido, usando terra de diatomáceas como suporte (NAVE *et al.*, 2007). Foram feitos cartuchos de 4 g de terra de diatomáceas, nos quais foram adsorvidos 6 mL de amostra. Os compostos fenólicos foram eluídos com sob vácuo com 10 mL acetato de etilo. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas

num evaporador rotativo ($T = 30^{\circ}\text{C}$). O resíduo obtido foi redissolvido em 1 mL de solução metanol/água (1:1) e filtrado através de um filtro de 0,45 μm antes de serem analisados por HPLC-DAD. As amostras foram preparadas em triplicado.

2.2.2. Condições cromatográficas

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizou-se um cromatógrafo de fase líquida da Hewlett Packard série 1050 equipado com um loop de 20 μl , uma bomba quaternária e um detector de fotodíodos (DAD) da HP série 1100.

A coluna utilizada para a separação dos compostos fenólicos foi uma RP Superpher® 100, C18 (250 mm \times 4,6 mm i.d., 5 μm) (Merck, Alemanha) com précoluna do mesmo material. Os eluentes utilizados foram: solvente A - água/ácido acético (98:2 v/v) e solvente B água/metanol/ácido acético (68:30:2 v/v), com um fluxo de 1 mL/min, de acordo com o seguinte gradiente para o solvente A: de 95% a 70% (12 min); de 70% a 45% (15 min); de 45% a 23% (6 min); isocrático durante 9 minutos; de 23% a 5% (5 min); de 5% a 0% (3 min); isocrático durante 5 minutos. A detecção dos compostos foi feita a 280, 254 e 320 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com soluções padrão e quantificados utilizando rectas de calibração. Os parâmetros de calibração estão na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de calibração

Composto	TR \pm DP (min)	λ (nm)	equação	r^2
Ácido gálico	6,45 \pm 0,01	280	y= 20,914x-19,951	0,999
Furfural	14,20 \pm 0,27	280	y= 151,19x-27,452	0,999
Ácido vanílico	25,29 \pm 0,21	254	y= 28,333x-1,493	0,999
5-metilfurfural	28,16 \pm 1,31	280	y= 61,76x-7,0062	1
Ácido siringico+ vanilina	31,05 \pm 1,51	280	y= 32,313x-3,5718	0,999
Seringaldeído	38,17 \pm 0,21	320	y= 29,108x-0,8375	0,999
Coniferaldeído	47,97 \pm 0,39	320	y= 49,119x-2,9552	0,999
Sinapaldeído	51,14 \pm 0,39	320	y= 35,772x-4,9892	0,999
Ácido elágico	69,34 \pm 1,81	254	y= 175,54x-251,73	0,998

2.3. Análise estatística

Foi efectuada uma análise de variância com teste de comparação de médias de Tukey, a 95% de confiança, usando o SPSS 13.0.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 3 e 4 apresentam-se os resultados obtidos para as amostras das diferentes aparas de carvalho em estudo. Da sua observação ressalta que o total de compostos fenólicos é maior nas aparas de carvalho francês do que nas aparas de carvalho americano, e em ambos os casos as aparas não sujeitas a queima são claramente mais pobres nestes compostos fenólicos.

De entre os ácidos fenólicos o ácido gálico e o ácido elágico são muito abundantes. O ácido gálico apresenta o valor mais elevado nas aparas sujeitas a tosta média, o que pode significar que a temperaturas mais elevadas ele é degradado, chegando a apresentar valores inferiores aos das aparas não sujeitas a queima (GIMENEZ-MARTINEZ *et al.*, 1996). O ácido elágico provém da degradação dos elagitaninos durante o tratamento térmico e da hidrólise dos elagitaninos durante o processo de maturação da madeira (PUECH *et al.*, 1989), o que ajuda a explicar os elevados teores encontrados nas aparas não sujeitas a queima. As aparas de carvalho francês são mais ricas que as de carvalho americano em ácido elágico.

A presença de aldeídos furânicos está relacionada com a termodegradação dos açúcares. Os nossos resultados mostram que as aparas de carvalho francês são mais ricas que as de carvalho americano em aldeídos furânicos. Nas madeiras não sujeitas a queima os teores de furfural, 5-metilfurfural (NABETA *et al.*, 1986) e 5-hidroximetilfurfural (MASSON *et al.*, 2000) são geralmente baixos. O nível de queima afecta o teor destes compostos, verificando-se que o teor em furfural aumenta com a intensidade da tosta e o 5-hidroximetilfurfural apresenta o valor mais elevado no nível de tosta médio, quer nas aparas de carvalho francês quer nas de carvalho americano.

As aparas de carvalho não sujeitas a tosta apresentam teores baixos de aldeídos fenólicos, o que está de acordo com resultados já publicados (MARCO *et al.*, 1994, CANAS, 2003). O processo de queima a que as aparas são sujeitas origina um aumento do teor destes compostos, mas os aldeídos fenólicos também podem ser termodegradados em ácidos fenólicos e fenóis voláteis (CHATONNET, 1995) o que pode explicar as flutuações encontradas, nas nossas amostras. Alguns autores referem que os aldeídos fenólicos apresentam teores máximos nos níveis médios de queima (CHATONNET *et al.*, 1989) enquanto outros autores afirmam que o seu teor aumenta com o nível de queima (ARTAJONA, 1991).

Table 3 – Compostos fenólicos (mg/100g) das aparas de Carvalho Americano

Composto	A1	A2	A3	A4
Ácido gálico	35,91 ^a ± 4,16	48,83 ^b ± 2,05	107,04 ^c ± 6,27	54,10 ^{b*} ± 3,34
Ácido vanílico	2,51 ^a ± 0,83	10,01 ^c ± 1,89	7,61 ^b ± 0,33	11,03 ^c ± 1,59
Ácido siringico+ vanilina	6,96 ^a ± 3,08	52,28 ^b ± 2,04	47,82 ^b ± 11,21	62,84 ^c ± 3,41
Ácido elágico	90,66 ^b ± 15,94	17,51 ^{a*} ± 2,98	172,38 ^d ±12,85	126,83 ^c ± 3,90
5-OH-metilfurfural ^(*)	0,53 ^a ± 0,18	6,20 ^c ± 1,34	13,16 ^d ± 2,55	6,09 ^c ± 0,25
5-metil-furfural	1,13 ^a ± 0,36	1,84 ^a ± 0,10	2,60 ^b ± 0,43	7,35 ^c ± 0,42
Furfural	1,13 ^a ± 0,08	7,87 ^{bc} ± 0,77	12,23 ^c ± 4,12	25,58 ^d ± 1,07
Seringaldeído	4,21 ^a ± 0,36	65,61 ^c ± 2,33	18,97 ^{b*} ± 0,97	65,79 ^{c*} ± 3,67
coniferaldeído	1,31 ^a ± 0,27	69,87 ^c ± 1,94	29,77 ^{b*} ± 1,15	95,32 ^d ± 5,39
sinapaldeído	3,26 ^a ± 1,01	188,84 ^c ± 5,50	35,26 ^{b*} ± 1,14	194,54 ^c ± 10,95
Total	147,62	568,85	446,84	647,46

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

(*) quantificado como 5-metil-furfural

Table 4 – Compostos fenólicos (mg/100g) das aparas de Carvalho Francês

Composto	F1	F2	F3	F4
Ácido gálico	69,68 ^b ± 2,19	62,02 ^b ± 13,06	195,96 ^c ± 2,48	19,16 ^a ± 1,50
Ácido vanílico	4,97 ^a ± 0,60	10,62 ^b ± 1,91	6,72 ^a ± 2,06	15,24 ^c ± 1,02
Ácido siringico+ vanilina	12,64 ^a ± 0,85	68,02 ^{bc} ± 11,65	69,98 ^b ± 3,31	76,26 ^c ± 3,14
Ácido elágico	126,16 ^a ± 10,06	145,83 ^a ± 19,90	212,52 ^c ± 4,85	319,67 ^d ±20,67
5-OH-metilfurfural ^(*)	4,79 ^a ± 0,51	7,75 ^b ± 2,01	23,10 ^d ± 1,10	8,41 ^b ± 0,71
5-metil-furfural	1,95 ^a ± 0,23	8,30 ^b ± 2,20	16,06 ^c ± 1,01	10,39 ^b ± 2,21
Furfural	3,82 ^a ± 0,40	8,69 ^b ± 1,04	25,95 ^c ± 1,55	32,30 ^d ± 0,49
Seringaldeído	4,77 ^a ± 0,43	81,85 ^d ± 15,79	36,30 ^b ± 0,46	209,96 ^e ± 4,14
coniferaldeído	0,93 ^a ± 0,11	80,27 ^c ± 10,69	85,03 ^c ± 2,04	42,19 ^b ± 4,03
sinapaldeído	2,03 ^a ± 0,18	222,03 ^d ±27,74	148,19 ^b ± 3,22	179,48 ^c ± 5,40
Total	231,75	695,37	819,77	913,06

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

(*) quantificado como 5-metil-furfural

Tabela 5 – Compostos fenólicos (mg/L) na solução modelo com aparas de Carvalho Americano.

Composto	A1	A2	A3	A4
Ácido gálico	1.68 ^a ± 0.76	1.10 ^a ± 0.11	1.53 ^{a*} ± 0.93	1.18 ^a ± 0.24
Ácido vanílico	0.12 ^a ± 0.08	0.33 ^{a*} ± 0.03	0.20 ^a ± 0.09	0.33 ^{a*} ± 0.49
Ácido siringico+ vanilina	0.36 ^a ± 0.04	1.64 ^b ± 0.27	0.67 ^a ± 0.06	1.57 ^{b*} ± 0.16
Ácido elágico	nd	0.37 ^a ± 0.06	nd	0.32 ^{a*} ± 0.11
5-OH-metil-furfural ^(*)	0.05 ^a ± 0.01	0.25 ^b ± 0.02	0.16 ^{b*} ± 0.04	0.22 ^{b*} ± 0.01
Seringaldeído	0.19 ^a ± 0.08	2.69 ^b ± 0.43	0.65 ^a ± 0.19	2.23 ^{b*} ± 0.15
coniferaldeído	0.09 ^a ± 0.02	2.10 ^b ± 0.35	0.61 ^{a*} ± 0.23	2.06 ^{b*} ± 0.16
sinapaldeído	0.19 ^a ± 0.08	5.24 ^{b*} ± 0.96	0.74 ^{a*} ± 0.37	4.14 ^b ± 0.87
total	2,68	13,72	4,56	12,05

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

(*) quantificado como 5-metil-furfural

Tabela 6 – Compostos fenólicos (mg/L) na solução modelo com aparas de Carvalho Francês

Composto	F1	F2	F3	F4
Ácido gálico	1.49 ^a ± 0.35	1.57 ^a ± 0.35	3.63 ^b ± 0.26	0.50 ^a ± 0.87
Ácido vanílico	0.19 ^a ± 0.08	0.58 ^c ± 0.05	0.29 ^{ab} ± 0.02	0.38 ^{abc} ± 0.04
Ácido siringico+ vanilina	0.41 ^a ± 0.08	1.84 ^b ± 0.13	0.99 ^a ± 0.18	2.32 ^b ± 0.13
Ácido elágico	nd	0.36 ^a ± 0.01	nd	0.72 ^b ± 0.08
5-OH-metil-furfural ^(*)	0.05 ^a ± 0.00	0.23 ^b ± 0.01	0.44 ^c ± 0.04	0.31 ^b ± 0.01
Seringaldeído	0.18 ^a ± 0.01	3.19 ^b ± 0.06	1.19 ^a ± 0.13	5.77 ^c ± 0.67
coniferaldeído	0.08 ^a ± 0.01	2.76 ^b ± 0.06	2.62 ^{bc} ± 0.18	1.17 ^d ± 0.21
sinapaldeído	0.16 ^a ± 0.06	7.06 ^{bd} ± 0.29	4.04 ^c ± 0.22	4.49 ^{bc} ± 0.76
total	2,56	17,77	13,20	15,66

Letras diferentes na linha significam diferenças significativas a $p < 0,05$. * significa diferenças significativas na comparação de médias entre aparas americanas e francesas para o mesmo composto ($p < 0,05$)

(*) quantificado como 5-metil-furfural

Nas tabelas 5 e 6 apresentam-se os valores obtidos para os diferentes compostos fenólicos doseados nas diferentes amostras de vinhos sintético. As soluções modelo contendo aparas de carvalho francês apresentam um total de compostos fenólicos mais elevado do que as soluções modelo contendo aparas de carvalho americano. Em ambos os casos os teores de compostos fenólicos extraídos das aparas para as soluções modelo aumentam com o nível de tosta, de acordo com os resultados anteriormente apresentados. O ensaio realizado com as aparas de carvalho americano tosta média apresenta os valores mais baixos, não considerando os ensaios realizados com as aparas não sujeitas a tosta. Os teores elevados de compostos fenólicos obtidos no ensaio com as aparas A2 e F2 estão provavelmente relacionados com a dimensão das mesmas, uma vez que eram as únicas que se apresentavam na forma de pó.

O resultado mais saliente são os baixos teores de ácido elágico encontrados nas soluções modelo

4 – CONCLUSÕES

As aparas de carvalho francês apresentam-se genericamente mais ricas em compostos fenólicos do que as aparas de carvalho americano, salientando-se os teores elevados de ácido elágico que as primeiras apresentam. De entre as amostras estudadas as aparas mais pobres são as que não foram sujeitas a queima apresentando porém teores consideravelmente elevados de ácido gálico e de ácido elágico.

Embora de forma genérica se possa afirmar que o aumento do nível de queima favorece a formação de ácidos e aldeídos fenólicos e de derivados furânicos, para alguns compostos é notório que quando o nível de queima aumenta o seu teor diminui, o que pode estar relacionado com processos de termodegradação.

Os resultados obtidos com o ensaio efectuado com as soluções modelo são consistentes, com os resultados obtidos para as aparas salientando-se o facto de que as amostras em pó A2 e F2 potenciarem a extracção dos compostos pela solução modelo. Estes resultados demonstram a importância de se conhecerem melhor a cinética de extracção dos compostos existentes nas madeiras de carvalho na forma de aparas, utilizadas em enologia.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTAJONA,J, 1991. Caracterisation del roble según su origen y grado de tostado, mediante la utilizacion de GC y HPLC. *Viticultura/Enologia Profesional*, **14**, 61-72.

- CANAS, S., 2003. Estudo dos compostos extraíveis de madeira (Carvalho e Castanheiro) e dos processos de extracção na perspectiva do envelhecimento em Enologia. 303 p. Tese de Doutouramento em Engenharia Agro-Industrial, UTL-ISA, Lisboa
- CHATONET, P., BOIDRON, J.N., PONS, M., 1989. Incidence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique. 2. partie: Évolution de certains composés en fonction de l'intensité de brûlage. *Conn. Vigne Vin*, **23**, 223- 250.
- CHATONNET P., 1995. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fût de chêne. 268 p. Thèse Doctorat. UFR Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II, Bordéus.
- GIMENEZ-MARTINEZ R., GARCIA DE LA SERRANA H.L., VILLALON MIR M., GRANADOS J.Q., MARTINEZ M.C.L., 1996. Influence of wood heat treatment, temperature and maceration time on vanillin, syringaldehyde, and gallic acid contents in oak wood and wine spirit mixtures. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**, 441-446.
- MARCO J., ARTAJONA J., LARRECHI M.S., RIUS F.X., 1994. Relationship between geographical origin and chemical composition of wood for oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 192-200
- MASSON E., BAUMES R., MOUTOUNET M., PUECH J.-L., 2000. The effect of kiln-drying on the levels of ellagitannins and volatile compounds of European oak (*Quercus petraea* Liebl.) stave wood. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**, 201-214
- McDONALD MS, HUGHES M, BURNS J, LEAN MEJ, MATTHEWS D, CROZIER A. 1998, Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem* 46:368–375
- NABETA K., YONEKUBO J., MIYAKE M., 1986. Analysis of volatile constituents of european and japanese oaks. *Mokuzai Gakkaishi*, **32**, 921-927.
- NAVE, F.; CABRITA, M.J.; COSTA C. 2007, The Use of Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction in the Analysis of Polyphenols in Wine. *Journal of Chromatogr. A*, 1169 23–30
- PUECH J.-L., ROBERT A., MOUTTET B., 1989. Evolution of oak wood lignin subjected to flash hydrolysis. *Holzforschung*, **43**, 235-238.