

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Bebidas espirituosas do Algarve

Ludovina Rodrigues Galego

Dissertação

Doutoramento em Química

Trabalho efetuado sob orientação do Professor Doutor José Paulo da Silva

Faro 2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Bebidas espirituosas do Algarve

Ludovina Rodrigues Galego

Dissertação

Doutoramento em Química

Trabalho efetuado sob orientação do Professor Doutor José Paulo da Silva

Faro 2015

Bebidas espirituosas do Algarve

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da lista de referências incluída.

(Ludovina Rodrigues Galego)

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educativos ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

“Ser feliz, do ponto de vista da psicologia, não é ter uma vida perfeita, mas saber extrair sabedoria dos erros, alegria das dores, força das decepções, coragem dos fracassos. Ser feliz neste sentido é o requisito básico para a saúde física e intelectual.”

Augusto Cury

Agradecimentos

À Universidade do Algarve pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Paulo da Silva pelo apoio e pelo seu incansável entusiasmo, perfeccionismo e dedicação.

À Eng^a Vera Francisco, Técnica do Laboratório de Enologia, pelo apoio na realização das análises físico-químicas.

À D^a Luísa Silva, Assistente Operacional, pelo auxílio prestado.

A todos os colegas e funcionários pelo apoio incondicional e pela colaboração em múltiplas tarefas relacionadas com as bebidas espirituosas.

Aos produtores de bebidas espirituosas, bem como a todas as entidades públicas e privadas do Algarve e de fora do Algarve, pelas questões levantadas e que tantas vezes foram o motor de arranque para muito do trabalho desenvolvido.

Nestas mais de duas décadas dedicadas ao trabalho com bebidas alcoólicas, principalmente à aguardente de medronho, foram inúmeros os colaboradores institucionais e não institucionais, parceiros, provadores, consultores, clientes do Laboratório de Enologia, com os quais tive o privilégio de contactar e dos quais não irei referir nomes, pois ficariam sempre muitos por referir. Quero no entanto destacar o papel de três colaboradores, que já não se encontram entre nós, e que foram decisivos. O Eng^o António Colaço, de Almodôvar, pela sensibilização dos membros de um Governo, na década de 80, para a problemática do apoio às actividades da serra no sentido de evitar a desertificação. O Eng.^o Brito de Carvalho, que agarrou a ideia do combate à desertificação e criou condições para o desenvolvimento dos primeiros trabalhos. Fui um dos 3 elementos por ele escolhido para constituir o grupo de trabalho do medronho, o GT medronho, que com ele se extinguiu, mas cuja semente ficou e levou a que muitos outros grupos se fossem desenvolvendo, no sentido de atingir os objetivos por ele propostos. Por fim, ao Doutor Giuseppe Versini, do Instituto San Michel All Adigi, Itália, um dos consultores escolhido pelo Eng.^o Brito de Carvalho e restantes membros da Associação *In Loco*, no início dos anos 90. G. Versini, especialista em Química de bebidas alcoólicas e com um elevadíssimo sentido prático, sempre se mostrou disponível para dar resposta às mais variadas questões, mesmo após o período de consultoria (1993-1994). As suas sábias e encorajadoras respostas sempre me motivaram a continuar.

Resumo

A preparação de bebidas espirituosas é uma tradição com séculos no Algarve. Esta atividade tem sido e continua a ser importante para o desenvolvimento social e económico da região. A caracterização dos processos de produção, tanto tradicionais como industriais, bem como das bebidas resultantes, nunca foi feita de um modo sistemático. Neste trabalho são apresentados resultados e conclusões da avaliação dos vários aspetos relacionados com estas bebidas, sempre numa ótica de melhoria dos recursos já existentes e de valorização dos recursos biológicos disponíveis. Foram estudadas as aguardentes de medronho e de figo, preparada e caracterizada a aguardente de batata-doce pela primeira vez, estudados os licores de murta e preparados, também pela primeira vez, licores de romã aromáticos, e caracterizadas ainda algumas castas utilizadas na preparação de vinhos licorosos. Foram desenvolvidos métodos analíticos para identificação e quantificação de poliaminas em aguardentes e compostos voláteis e polifenóis em todas as matrizes. As aguardentes de medronho preparadas por produtores da região apresentam melhoria na qualidade relativamente às da década de 90, com redução de 30 % na acidez e 50 % no teor em acetato de etilo. O cis-3-hexeno-1-ol é um potencial marcador geográfico da aguardente de medronho. Não foram detetadas poliaminas na aguardente de medronho. Aguardente de batata-doce com excelente aceitação ao nível do consumidor foi preparada utilizando batatas assadas a 130 °C. A utilização de aguardentes de frutos na meceração origina licores de romã aromáticos. Estes licores apresentam elevado teor em polifenóis (> 2 g/L) se preparados com a casca do fruto. O álcool e o açúcar dos licores retardam a transformação das antocianinas. Os elagitaninos permanecem estáveis nos licores. A preparação de licores de murta com aguardente origina bebidas com perfil aromático complexo. O teor em polifenóis dos vinhos licorosos do Algarve é inferior a 1 g/L. As uvas da casta Trincadeira apresentam teores em resveratrol relativamente elevados (43,9 µg/g de película desidratada).

Palavras-chave: Aguardentes, Licores, Compostos voláteis, Compostos fenólicos, Poliamidas, GC-MS, ESI-MS, LC-MS.

Abstract

The preparation of spirit drinks is a tradition of centuries in Algarve. This activity has been very important for the social and economic development of the region. The characterization of the production processes both, traditional and industrial, and of the prepared drinks, has never been done in a systematic way. In this work results and conclusions of the evaluation of the several aspects related with these drinks are presented, always envisioning the optimization of the available products and valorization of the biological resources available. *Arbutus* and fig spirits were characterized, sweet potato spirit was prepared and characterized for the first time, myrtle berry liquor was prepared and characterized, aromatic pomegranate liquors were prepared and characterized also for the first time, and some vine varieties used to prepare liquor wines were also studied. Analytical methods were developed for the identification and quantification of polyamines in spirits and volatile compounds and polyphenols in all matrices. The *Arbutus* spirits, prepared by local producers, showed a higher quality when compared with those of the nineties, as the acetic acid and ethyl acetate contents were decreased by 30 % and 50 %, respectively. The *cis*-3-hexeno-1-ol is a potential geographic maker of *Arbutus* spirits. No polyamines were detected in *Arbutus* spirits. A sweet potato spirit showing excellent acceptability at consumer level, was prepared using potatoes baked at 130 °C. The use of fruit spirits in the maceration process leads to aromatic pomegranate liquors. These liquors show high levels of polyphenols (> 2 g/L) if prepared with the fruit peel. Alcohol and sugar delay the anthocyanin transformation. The ellagitannins are stable in all liquors. The preparation of myrtle berry liquors using fruit distillates leads to drinks showing complex aromatic profiles. The polyphenol contents of the studied liquor wines is below 1 g/L. Grapes of variety Trincadeira showed relatively high levels of resveratrol (43,9 µg/g of dehydrated peel).

Keywords: Spirits, Liquors, Volatile compounds, Phenolic compounds, Polyamines, GC-MS, ESI-MS, LC-MS.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xiv
1 - Introdução.....	1
1.1 - Bebidas espirituosas	5
1.1.1 - As aguardentes	5
1.1.2 - Os licores.....	8
1.1.3 - Outras bebidas espirituosas	10
1.2 - Processamento.....	11
1.2.1 - Aguardentes.....	11
1.2.1.1 - A matéria-prima	12
1.2.1.2 - Fermentação alcoólica.....	13
1.2.1.3 - Período entre a fermentação e a destilação	15
1.2.1.4 - Destilação	15
1.2.1.5 - Maturação.....	17
1.2.1.6 - Engarrafamento	17
1.2.2 - Licores	18
1.2.2.1 - Maceração	19
1.2.2.2 - Filtração.....	20
1.2.2.3 - Maturação.....	20
1.2.2.4 - Clarificação	21
1.2.2.5 - Engarrafamento	21
1.3 - Compostos voláteis	22
1.3.1 – Compostos voláteis em aguardentes.....	26
1.3.2 – Compostos voláteis em licores	32
1.3.3 - Identificação de compostos voláteis.....	33
1.4 - Compostos fenólicos nos alimentos	37
1.4.1 - Ácidos fenólicos.....	38
1.4.2 - Flavonóides	39
1.4.2.1 - Principais estruturas	39
1.4.2.2 - Antocianinas.....	41
1.4.2.3 - Outros flavonóides	43
1.4.3 -Taninos	44

1.4.3.1 - Principais estruturas	45
1.4.3.2 - Distribuição de taninos nos alimentos.....	49
1.4.4 - Estilbenos	49
1.4.5 - Polifenóis e o poder antioxidante	50
1.5 - Estruturas supramoleculares na área alimentar	53
2 - Parte experimental.....	58
2.1 - Materiais.....	62
2.2.1 - Preparação de amostras líquidas para análise de compostos fenólicos.....	63
2.2.2 - Preparação de extratos de amostras sólidas para análise de compostos fenólicos	64
2.2.3 - Redução a pó de amostras vegetais sólidas para análises diversas	64
2.3 - Determinação do teor alcoólico.....	64
2.4 – Determinação da acidez total.....	64
2.5 - Determinação de sólidos solúveis	65
2.6 - Determinação da densidade.....	65
2.7 – Determinação do teor em açúcares	65
2.8 – Determinação da humidade	65
2.9 - Doseamento do amido.....	65
2.10 - Determinação da cor.....	66
2.11 - Doseamento do cobre	67
2.12 - Análise de compostos voláteis	67
2.13 - Determinação de fenóis totais	68
2.14 - Determinação do índice de antocianinas totais	69
2.15 - Perfil de antocianinas	69
2.16 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos por LC-MS.....	70
2.17 – Quantificação do resveratrol.....	71
2.18 - Quantificação de aminas biogénicas	72
2.19 – Avaliação sensorial.....	72
2.20 – Análise estatística	73
3 - Discussão.....	74
3.1 - Aguardentes.....	74
3.1.1 - Aguardente de medronho	74
3.1.1.1 - Parâmetros de qualidade	74
3.1.1.2 - Perfil típico dos compostos voláteis da aguardente de medronho do Algarve.	84
3.1.1.3 - Diferenças para outras aguardentes de medronho.....	84
3.1.2 - Aguardente de batata-doce	87
3.1.2.1 - Batatas-doces e o tratamento térmico pré-fermentativo.....	89

3.1.2.2 - Compostos voláteis da batata-doce não processada e processada.....	90
3.1.2.3 - Perfil dos compostos voláteis da aguardente de batata-doce	90
3.1.2.4 - Apreciação sensorial da aguardente	94
3.1.3 - Aguardente de figo	94
3.1.4 – Análise de aminas em aguardentes	100
3.2 - Licores.....	109
3.2.1 - Licor de romã	109
3.2.1.1 - Material vegetal.....	109
3.2.1.2 - Compostos voláteis do sumo de romã.....	112
3.2.1.3 - Identificação dos compostos fenólicos da romã.....	113
3.2.1.4 – Caracterização dos extratos de mesocarpo e membranas carpelares de romã	118
3.2.1.5 - Preparação dos licores de romã.....	119
3.2.1.6 – Compostos voláteis dos licores preparados com aguardente de medronho...	122
3.2.1.7 - Estabilidade das antocianinas.....	125
3.2.2 - Licor de bagas de murta	128
3.2.2.1 - Processo de produção do licor de bagas de murta.....	128
3.2.2.2 - Caracterização das bagas de murta.....	128
3.2.2.3 - Determinação dos compostos fenólicos em macerados e licores.....	129
3.2.2.4 – Compostos voláteis do licor de murta	134
3.3 - Vinhos licorosos do Algarve	137
3.3.1 - Características dos bagos de uva de castas autorizadas na região do Algarve..	137
3.3.2 - Teor em polifenóis totais.....	138
3.3.3 - Caracterização do perfil de antocianinas da casta Castelão	141
3.3.4 - Quantificação do resveratrol	145
4 - Conclusões	148
5 – Bibliografia.....	151

Índice de figuras

Figura 1.1 - Diagrama de produção de aguardente.	11
Figura 1.2 - Fermentador de medronho coberto com plástico, água e areia. Destilaria Lagarto, Monchique, 11 de fevereiro de 2015.	14
Figura 1.3 - Fermentador de medronho em madeira coberto com plástico e água. Destilaria Monte da Lameira, Monchique, 11 de fevereiro de 2015.	14
Figura 1.4 - Fermentadores de medronho, destilaria Zé Marafado, Ameixial, 29 de janeiro de 2015.	14
Figura 1.5 - Fermentadores, destilaria Talurdinha, Silves, 28 de Abril de 2014.	14
Figura 1.6 - Alambique estilo árabe usado em Monchique.	16
Figura 1.7 - Alambique estilo árabe com serpentina para a refrigeração.	16
Figura 1.8 - Destilador por arraste de vapor, destilaria Talurdinha, Silves, 28 de abril de 2014.	16
Figura 1.9 - Diagrama de produção de licores por maceração.	18
Figura 1.10 - Esquema de análise por HS-SPME.	24
Figura 1.11 - Representação esquemática de um espectrómetro de massa.	33
Figura 1.12 – Tabela de iões típicos e espetro de massa do metanol.	34
Figura 1.13 - Espetro de massa do 1-propanol.	35
Figura 1.14 - Estrutura molecular e fragmentos prováveis do 1- propanol por impacto eletrónico.	35
Figura 1.15 – Possíveis fragmentos da molécula de hexanoato de etilo por impacto eletrónico.	35
Figura 1.16 - Molécula de hexanoato de etilo com indicação dos carbonos α , β e γ relativamente ao grupo carbonilo.	36

Figura 1.17 - Rearranjo de McLafferty para a molécula de hexanoato de etilo.	36
Figura 1.18 - Limoneno com indicação dos principais fragmentos e respetivo espetro de massa.	37
Figura 1.19 - Limoneno com indicação de fragmentos e da reação de retro Diels-Alder.	37
Figura 1.20 - Ácidos mais frequentes em matrizes de origem vegetal.	38
Figura 1.21 - Estrutura base dos flavonóides.	39
Figura 1.22 - Glicósidos da quercetina.	41
Figura 1.23 - Transformação do catião flavílio em solução aquosa.	42
Figura 1.24 - Estrutura molecular da hesperidina-7-O-rutinósido.	44
Figura 1.25 - Estrutura do ácido gálico.	45
Figura 1.26 - Estrutura do ácido hexa hidroxidifénico (HHDP).	45
Figura 1.27 - Estrutura do ácido desidro-hexa-hidroxidifénico (DHHDP).	46
Figura 1.28 - Estrutura do ácido elágico.	46
Figura 1.29 - Estrutura do tanino pentagaloilglicose.	46
Figura 1.30 - Estrutura da punicalina.	46
Figura 1.31 - Estrutura da punicalagina.	46
Figura 1.32 - Proantocianinas Tipo B e Tipo A.	47
Figura 1.33 - Proantocianina trimérica do tipo C.	48
Figura 1.34 - Proantocianina com estrutura oligomérica.	48
Figura 1.35 - Trans-resveratrol (A) e cis-resveratrol (B).	49
Figura 1.36 - Mecanismos de actividade antioxidante dos polifenóis.	51

Figura 1.37 - Estrutura e propriedades das ciclodextrinas (A) e dos cucurbiturilos (B). Adaptado de Barooah <i>et al.</i> , 2012 e Kim <i>et al.</i> , 2004.	55
Figura 3.1 - Cromatograma típico da aguardente de medronho (GC-FID), obtido por injeção em natureza (direta).	76
Figura 3.2 - Destilaria do Instituto San Michell All Adige, Trento Itália, 1994.	77
Figura 3.3 - Traço de HS-SPME-GC-FID típico de uma aguardente de medronho.	84
Figura 3.4 - Perfil dos compostos voláteis de batata-doce, cozida, a), assada a 130 °C, b), e assada a 190 °C, c).	90
Figura 3.5 - Resultados da apreciação sensorial da aguardente de batata-doce.	94
Figura 3.6 - Comparação do perfil de voláteis por injeção em natureza de aguardente de figo não processada e de aguardente de figo parcialmente desodorizada com 10 g/L de carvão ativado.	96
Figura 3.7 - Esquema mostrando a estrutura do CB7 e das poliaminas estudadas. A amantadina foi utilizada como padrão interno.	102
Figura 3.8 - Espectro ESI-MS de uma solução aquosa contendo 50 µM de CB7, 2 µM cada poliamina e 1,0 mM de HCl.	103
Figura 3.9 - Intensidade dos sinais de ESI-MS dos complexos de inclusão função da concentração de HCl, em modo “full scan”, para água e mistura etanol-água 50-50.	104
Figura 3.10 - Espectros de fragmentação (MS/MS) dos complexos duplamente carregados das poliaminas estudadas.	105
Figura 3.11 - Valor da razão do sinal da putrescina/sinal do padrão interno função da concentração de putrescina, quando individualmente em solução (◆) e na presença de outras poliamidas com a mesma concentração (◆).	106
Figura 3.12 - Romã “da mata” e romã “Assaria”.	112
Figura 3.13 - Perfil dos compostos voláteis do sumo de romã ao longo do tempo (2, 24 e 72 horas), obtidos por HS-SPME-GC-FID.	113
Figura 3.14 - Espectros de absorção da cianidina-3,5-diglicósido, punicalagina, ácido elágico e ácido gálgico, normalizados à unidade no máximo de absorção da banda de menor energia.	114

Figura 3.15 - Traços de LC-DAD do sumo de romã a 520, 370 e 520 nm. O <i>insert</i> mostra o espectro de absorção obtido a 11,2 minutos.	114
Figura 3.16 - Perfil das antocianinas do sumo de romã obtido por LC-DAD a 520 nm, e correspondentes traços de LC-MS em modo de “single ion” para os valores de m/z das várias antocianinas.	115
Figura 3.17 - Espectros de fragmentação do ião com m/z 611, MS ² (611), A, e MS ³ (611→449), B.	116
Figura 3.18 - Transformação dos polifenóis nos macerados de casca de romã.	119
Figura 3.19 - Perfil dos compostos voláteis de um licor de romã e da aguardente de medronho utilizada na sua preparação, obtidos por HS-SPME-GC-FID.	123
Figura 3.20 - Evolução dos teores em polifenóis totais, a), e antocianinas, b), nos macerados ao longo do tempo, em função da quantidade de bagas.	131
Figura 3.21 - Evolução dos teores em polifenóis totais, a), e antocianinas, b), nos macerados ao longo do tempo, em função do teor alcoólico e em função da quantidade de carvão usada na desodorização.	132
Figura 3.22 - Perfil de antocianinas de dois licores preparados com 120 g/L de bagas de murta, após 5 meses de maturação.	133
Figura 3.23 - Perfil dos voláteis (HS-SPME-GC-FID) de bagas de murta e de um licor de murta, preparado com aguardente de figo concentrada e parcialmente desodorizada, com um ano de maturação.	135
Figura 3.24 - Perfil de antocianinas obtido por HPLC-DAD a 520 nm de um extrato metanólico de películas de uvas da casta Castelão e de um vinho rosé com elas preparado. Os <i>inserts</i> mostram a estrutura molecular das antocianinas identificadas.	143
Figura 3.25 - Espectro de fragmentação do resveratrol no modo negativo. A seta indica o ião fragmentado, [M-H] ⁻ . O <i>insert</i> mostra a estrutura molecular do resveratrol.	146

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Compostos voláteis de aguardentes e licores – álcoois.	28
Tabela 1.2 - Compostos voláteis de aguardentes e licores – ésteres.	29
Tabela 1.3 - Compostos voláteis de aguardentes e licores - aldeídos e ácidos.	30
Tabela 1.4 - Compostos voláteis de aguardentes e licores - norisoprenoides, terpenos e compostos da madeira.	31
Tabela 1.5 - Subclasses dos flavonóides mais vulgares nos alimentos.	40
Tabela 1.6 - Estruturas de estilbenos.	50
Tabela 2.1 - Análises realizadas às aguardentes de medronho, batata-doce, figo e bagaço.	58
Tabela 2.2 - Tratamentos e análises efetuadas à batata-doce.	59
Tabela 2.3 - Análises dos frutos utilizados na produção de licores.	60
Tabela 2.4 - Análises de macerados e licores.	61
Tabela 2.5 - Análises realizadas a uvas e vinhos.	62
Tabela 3.1 - Parâmetros de qualidade da aguardente de medronho (Decreto-Lei 238/2000 de 26 de Setembro).	75
Tabela 3.2 - Resultados dos parâmetros de qualidade de aguardentes de medronho, obtidos no Laboratório de Enologia da Universidade do Algarve, entre 2010 e 2014, e sua comparação com os resultados obtidos por G. Versini para aguardentes de medronho da serra do Caldeirão, preparadas em 1992.	78
Tabela 3.3 – Resultados do teor em compostos mais abundantes em aguardentes de medronho analisadas em 2014 por região de origem.	80
Tabela 3.4 - Resultados da quantificação dos compostos voláteis da aguardente de medronho obtidos por extração com diclorometano e análise por GC-MS.	86
Tabela 3.5 - Resultados dos teores de compostos voláteis das aguardentes de medronho, preparadas com medronho de agricultura biológica, após extração com diclorometano e análise com GC-FID.	87
Tabela 3.6 - Teor em açúcares de batatas-doces da variedade Lira não processadas, cozidas e assadas (g/100 g matéria seca).	89
Tabela 3.7 - Teor dos compostos voláteis mais abundantes na aguardente de batata-doce.	91
Tabela 3.8 - Teor dos compostos voláteis menos abundantes na aguardente de batata-doce e correspondentes limiares de perceção.	92

Tabela 3.9 – Compostos voláteis de aguardentes de figo parcialmente desodorizadas (P Desod) e não desodorizadas (N Desod), em Laboratório e na Indústria.	97
Tabela 3.10 - Doseamento do cobre e da acidez total em diferentes amostras de aguardente de figo não processadas, parcialmente desodorizadas com carvão ativado e parcialmente desodorizadas com carvão ativado e concentradas.	99
Tabela 3.11 - Sinais utilizados na quantificação de poliaminas por ESI-MS/MS.	105
Tabela 3.12 - Curvas de calibração obtidas para cada poliamina em água, numa mistura etanol-água 50:50 e numa aguardente de medronho	107
Tabela 3.13 – Limites de deteção das poliaminas em água, estimados a partir dos sinais obtidos a partir de ensaios em branco.	107
Tabela 3.14 - Características das romãs “Assaria” e “da mata” de dois pomares do concelho de Faro.	110
Tabela 3.15 - Comparação dos parâmetros físicos do fruto e do sumo de romã de outras variedades.	111
Tabela 3.16 - Ião típico e padrão de fragmentação das várias antocianinas identificadas no sumo de romã.	117
Tabela 3.17 - Ião típico e padrão de fragmentação dos principais elagitaninos encontrados no sumo e na casca de romã.	118
Tabela 3.18 - Propriedades dos licores preparados com romãs “Assaria” e romãs “da mata”.	120
Tabela 3.19 - Teores em antocianinas e em elagitaninos no sumo e em macerados e licores preparados com o sumo.	121
Tabela 3.20 - Teor em polifenóis, parâmetros da cor e pH dos licores de romã.	122
Tabela 3.21 - Teor em compostos voláteis de um licor de romã e da aguardente e sumo utilizados na sua preparação.	124
Tabela 3.22 - Teor em antocianinas totais e de cianidina-3,5-diglicósido (Ant B) e cianidina-3-glicósido (Ant E), em mg/L, dos sumos, macerados e licores de romã ao longo do tempo.	127
Tabela 3.23 – Alguns parâmetros físico-químicos das bagas de murta.	129
Tabela 3.24 - Ião típico e padrão de fragmentação das várias antocianinas identificadas nas bagas de murta e nos licores com elas preparados.	133
Tabela 3.25 - Quantificação dos monoterpenos maioritários em licores de bagas de murta recém preparados com aguardente de figo dos produtores Coop-A e MSM.	136
Tabela 3.26 - Características físico-químicas de uvas de diversas castas autorizadas no Algarve.	138

Tabela 3.27 - Polifenóis da película e das grainhas de várias castas, em mg/g de película desidratada e de grainha respetivamente.	139
Tabela 3.28 - Polifenóis totais em diversos vinhos licorosos e não licorosos da região do Algarve.	140
Tabela 3.29 - Ião típico e padrão de fragmentação das várias antocianinas identificadas nas películas de uvas da casta Castelão e nos vinhos com ela preparados.	142
Tabela 3.30 - Teores em antocianinas das películas da casta Castelão e do vinho rosé com elas preparado.	144
Tabela 3.31 - Teores em trans-resveratrol encontrados em películas de uva e vinhos do Algarve.	147

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AGA – Álcool e Géneros Alimentícios, S.A.

a.p. – Álcool Puro

CB[n] – Cucurbiturilos

CDs - Ciclodextrinas

CI – Ionização química (Chemical ionization)

CIE - *Comission International del'Eclairage*

CW/DVB - Carbowax/divinybenzene

CW/TPR - Carbowax/templates resin

DAD – Detetor de matriz de díodos (Diode Array Detector)

ESI-MS – Ionização por electrospray acoplada à espetrometria de massa (Electrospray Ionization – Mass spectrometry)

eV – Eletrão-volt

FID – Detetor de ionização de chama (Flame ionization detector)

GC- Cromatografia Gasosa (Gas Chromatography)

GC-C-IRMS - Cromatografia gasosa com interface de combustão e acoplada a espetrometria de massa de razão isotópica (Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry)

GC-O - Cromatografia gasosa olfatométrica (Gas Chromatography – Olfactometry)

HACCP - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (Hazard Analysis and Critical Control Points)

HHDP – Ácido hexahidroxidifénico

HS - Espaço de cabeça (Head Space)

IABA – Imposto sobre o Álcool e Bebidas Alcoólicas

IE- Impacto eletrónico (Electron Impact)

IGP – Indicação Geográfica Protegida

LC-DAD – Cromatografia líquida acoplada a detetor de matriz de díodos (Liquid Chromatography – Diode Array Detector)

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espetrometria de Massa (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

M^+ - Ião molecular carregado positivamente (radical-catião)

MS – Espetrometria de Massa (Mass Spectrometry)

m/z – Razão massa carga

OIV – International Organization of Vine and Wine

PA – Poliacrilato

PAMAF-IED - Programa para a Modernização Agrícola e Florestal - Investigação, Experimentação e Demonstração

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB - Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno

PDMS/CAR/DVB - Polidimetilsiloxano-carboxeno–divinilbenzeno

SBSE – Extração sorptiva em barra de agitação (Stir Bar Sorptive Extraction)

SPME – Micro extração em fase sólida (Solid Fase Micro Extraction)

SIM – Corrente de ião selecionado (Single Ion Monitoring)

TIC – Corrente total de iões (Total Ion Corrent)

1 - Introdução

Bebidas espirituosas são bebidas alcoólicas destinadas ao consumo humano, possuindo características organoléticas específicas, e teor alcoólico mínimo de 15 % vol. As bebidas espirituosas podem ser preparadas diretamente por destilação de produtos fermentados, por maceração de produtos vegetais ou por simples adição de aromas, agentes adoçantes, produtos agrícolas ou géneros alimentícios a álcool etílico, destilados ou outras bebidas espirituosas de origem agrícola. São ainda consideradas bebidas espirituosas as bebidas preparadas por mistura de uma dada bebida espirituosa com outra(s), alcoólica(s) ou não alcoólica(s) (Regulamento CE 110/2008).

Aguardente é o líquido alcoólico obtido exclusivamente por destilação, após fermentação alcoólica de produtos agrícolas que tenham conservado o aroma e o gosto das matérias-primas utilizadas (Regulamento CEE 1567/89; Regulamento CE 110/2008).

Licores são bebidas espirituosas com um teor mínimo em açúcar de 100 g por litro, expresso em açúcar invertido, e um teor alcoólico mínimo de 15 % vol. Os licores são normalmente obtidos pela aromatização de álcool ou destilados de origem agrícola e também por mistura de bebidas espirituosas com outros géneros alimentícios de origem agrícola como frutos, plantas, natas, leite, ovos, mel, vinho ou substâncias preparadas idênticas às naturais e devidamente autorizadas para consumo humano (Regulamento CE 110/2008).

Em 1989 foi publicado o primeiro regulamento comunitário (CEE nº 1567/89) indicando regiões geográficas de produção de bebidas espirituosas com características de qualidade específicas. Portugal recebeu vinte e quatro indicações. Três foram atribuídas a bebidas produzidas tradicionalmente no Algarve, nomeadamente a “medronheira do Algarve”, a “aguardente vínica do Algarve” e a “aguardente bagaceira do Algarve” (anexo II, regulamento (CEE) 1567/89). Na atualização do regulamento sobre bebidas espirituosas de 2008 (CE nº 110/2008) são apresentadas apenas dezanove indicações geográficas para bebidas espirituosas portuguesas. O Algarve, ficou com uma, o “medronho do Algarve”. Esta indicação geográfica, além de dar continuidade à longa ligação histórica que esta bebida tem com a região, confere-lhe uma identidade europeia.

A origem das bebidas espirituosas não é bem conhecida (Dietler, 2006). No Algarve tem sido associada à presença Árabe, povo que introduziu a destilação alcoólica

na Península Ibérica para fins medicinais e para iluminação, entre os séculos VII e XII (Brown, 1996). A matéria-prima para a produção de destilados era preferencialmente a que não tivesse outro aproveitamento na alimentação. O fruto do medronheiro (*Arbutus unedo* L.), arbusto autoctone da região, foi o escolhido para produção de destilados, já que não era muito apreciado para consumo direto. O medronho (fruto) tornou-se assim na principal fonte de açúcar para produção de álcool.

Os Árabes trouxeram o conhecimento dos processos de extração e conservação de compostos de origem vegetal em álcool e também a utilização destes extratos para fins medicinais. Pensa-se que a adição de mel aos extractos se deve ao seu sabor desagradável, quando utilizados para combater problemas de saúde por ingestão. Esta é, também, a interpretação dada em Itália para a adição de mel aos macerados vegetais, que deram origem ao desenvolvimento dos licores a partir do século XIII (Thönges, 1994). Desde então os extratos vegetais alcoólicos, preparados com ou sem adoçantes, foram utilizados com diferentes finalidades, incluindo o convívio social. No entanto o modo de produção manteve-se.

A partir do século XVIII e tal como noutras regiões da Europa, desenvolveram-se as destilarias industriais. No Algarve há registo de destilarias de figo e de alfarroba desta época. Não há registo de destilarias industriais de aguardente de medronho desta altura, provavelmente porque a produção se manteve artesanal. Pensa-se que a produção tenha tido início no Barlavento Algarvio, nomeadamente na zona de Monchique, uma vez que atualmente a produção naquela localidade ainda mantém o sistema de refrigeração com tubo direito, comum aos alambiques de estilo Árabe e diferente dos das outras regiões do Algarve, onde a refrigeração é feita com tubo em serpentina. No Sotavento Algarvio há memória de que a destilaria mais antiga tenha sido construída em meados do século XIX, de acordo com as ruínas ainda presentes na atualidade. Registos de destilarias artesanais de aguardente de medronho são mencionados nas monografias escritas por Ataíde de Oliveira, relativas a várias localidades algarvias a partir da primeira década do século XX. Nas duas décadas seguintes Estanco Louro e José A.G. Gascon também fizeram referência a esta atividade económica nas monografias que escreveram sobre São Brás de Alportel e Monchique, respetivamente (Galego & Almeida, 2007).

Os destilados de figo representam ainda hoje uma importante fonte de rendimento do barrocal algarvio (região entre o mar e a serra, caracterizada por solos calcários) porque constituem um bom processo de valorização dos frutos de fraca qualidade. Este destilado, embora não sendo muito apreciado pela generalidade dos consumidores, teve

produções muito superiores às de medronho. A Cooperativa de Santa Catarina da Fonte do Bispo, em 1970, produziu cerca de 300 000 L de aguardente de figo e 12 000 L de aguardente de medronho. Na mesma época a empresa do Algoz do grupo “Bensaúde” produzia mais de 250 000 L de aguardente de figo por ano (Galego & Almeida, 2007). Estes registos são anteriores à introdução do imposto especial sobre o álcool que afetou todas as bebidas alcoólicas dos países da Comunidade Europeia (Diretiva 92/83/CEE de 19 de outubro de 1992). Nos últimos anos a produção de destilados de figo tem vindo a decair. Em 2003 a Cooperativa de Santa Catarina produziu cerca de 61 000 L de aguardente de figo e a empresa do Algoz fechou em 1978, não obstante a sua utilização na produção de muitos licores regionais, nessa época. Em muito menor quantidade, poucas centenas de litros, são ainda preparadas aguardentes de alfarroba, de bagaço, vónicas, de alperce, de ameixa, de mel, e desde 2009, de batata-doce (Galego, 2013). No final de 2014 foi iniciada a produção de aguardente de framboesa.

Dados oficiais da produção de bebidas espirituosas não são fáceis de obter. Estima-se que a produção de aguardente de medronho no Algarve seja superior a 150 000 L por ano (300 produtores a 500 L cada). A quantidade e a extensão de pomares de medronheiros plantados nas duas últimas décadas, resultado da execução dos projetos PAMAF-IED 4057 (Investigação-Ação sobre Aguardente de Medronho - 1996-1999) e 8005 (Estudo do envelhecimento da aguardente de medronho (1ª fase) - 1997-2000), sugere um grande aumento de produção nos próximos anos. No âmbito destes projetos foram desenvolvidos diferentes estudos, desde a multiplicação do medronheiro até à produção da aguardente e sua maturação em pipas de madeira de carvalho. Os estudos de multiplicação vegetativa do medronheiro continuam a ser desenvolvidos na região pela empresa Corte Velada (Lagos) e têm por objetivo a multiplicação dos arbustos mais produtivos e mais adequados a cada local de produção. No âmbito do projeto PTDC/AGR-FOR/3746/2012- “Melhoramento das plantas e da qualidade dos produtos de *Arbutus unedo* para o sector agro-florestal” (Coimbra), foram obtidos medronheiros por micropropagação a partir de arbustos originários de todo o país. Este projeto também teve como objetivo reproduzir os medronheiros mais produtivos.

Especificamente para a aguardente de medronho foram desenvolvidos outros projetos que contribuíram decisivamente para a sua valorização. No âmbito do Fundo Social Europeu, iniciativa comunitária EQUAL, o projeto RITA (Reinventar a Indústria Tradicional Alimentar do Algarve) 2004/EQUAL/A2/A3/AD/237, desenvolvido entre 2005-2008, apoiou a visita regular de vários grupos de estudantes do Instituto Superior

de Engenharia da Universidade do Algarve a destilarias de medronho artesanais da região, no sentido da implementação do sistema de segurança alimentar (HACCP) e recolha de amostras para controlo de qualidade em laboratório. No âmbito do projeto REDES nº 15065 do PRODER “Rede temática para a valorização dos recursos silvestres do mediterrâneo” (2011-2014), foram apoiadas diversas ações de divulgação, principalmente referentes à qualidade da aguardente de medronho.

Para manter a dinâmica de valorização da aguardente de medronho na região está em curso o projeto Vale de I&D nº 16128, entre a Universidade do Algarve e a empresa Medronhito do Caldeirão, para otimização do processo de destilação da aguardente de medronho em alambiques com diferentes características. As características em estudo são as seguintes: dimensão da cucurbita - entre 100 e 300 L; tipo de cabeça do alambique - cachimbo ou coroa; coluna entre a cucurbita e a cabeça do alambique, presença ou ausência; serpentina de cobre ou de aço inoxidável; dimensão do tanque de refrigeração – entre 500 e 1000 L e aquecimento a gás.

Os licores podem ser produzidos a partir das mais variadas matérias agrícolas comestíveis tornando difícil estimar o volume da sua produção. Tradicionalmente são utilizadas aguardentes como fontes de álcool. Nas últimas décadas a produção de licores regionais tem sido feita recorrendo também ao uso de álcool puro de origem agrícola, fornecido pela entidade oficial AGA (Álcool e Géneros Alimentares S.A.) (Galego & Almeida, 2007). A produção de licores com álcool puro permite a preparação de bebidas sem os compostos indesejáveis das aguardentes, nomeadamente o cobre, os ácidos, os ésteres de elevado peso molecular e os aldeídos. Por outro lado, a utilização de álcool puro origina bebidas com pouco corpo por lhe faltarem os álcoois superiores produzidos durante a fermentação alcoólica (Cortés *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 1996). Além disso o álcool puro gera bebidas menos aromáticas devido à ausência de ésteres de baixo peso molecular, também maioritariamente produzidos durante a fermentação alcoólica, e responsáveis pelos aromas frutados desta classe de bebidas (Bovo *et al.*, 2015; Kłosowski & Czapryński, 2006; Arrizon *et al.*, 2006; Hernández-Gomes *et al.*, 2005; Conner *et al.*, 1998).

O desenvolvimento tecnológico das últimas décadas tem permitido avançar no conhecimento das características das bebidas espirituosas, principalmente as relativas à composição química. Deixou de ser suficiente produzir bebidas em conformidade com os regulamentos e a legislação para o setor para se procurarem produtos de excelência organolética e sempre que possível apresentando a composição química que melhor possa

beneficiar a saúde do consumidor. Trata-se de um caminho exigente, já iniciado no Algarve com a otimização de metodologias de fermentação, de destilação, de correção de defeitos dos destilados e de extração de compostos de substâncias vegetais (Galego, 2013; Galego *et al.*, 2013; Galego *et al.*, 2012, Santo *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012; Galego *et al.*, 2011; Galego & Almeida, 2007, Galego, 1996). Continuar esta dinâmica de caracterização das matérias-primas vegetais pouco aproveitadas, aplicando-as na produção de novas bebidas ou no melhoramento das já existentes, foi o principal objetivo deste trabalho.

1.1 - Bebidas espirituosas

1.1.1 - As aguardentes

As aguardentes são produzidas por destilação, normalmente em alambiques de cobre ou de aço inoxidável contendo cobre, após fermentação alcoólica de produtos vegetais fermentáveis por leveduras endógenas ou adicionadas. A qualidade das aguardentes depende da qualidade das matérias-primas, das condições de fermentação e das condições de destilação. São bastante variados os materiais de origem agrícola utilizados na preparação de destilados. Alguns dos mais comuns são a uva e o bagaço de uva (Bovo *et al.*, 2015; Arrieta-Garay *et al.*, 2014a; Bovo *et al.*, 2014; Tsakiris *et al.*, 2014; Fiches *et al.*, 2014; Fotakis, *et al.*, 2013; Cacho *et al.*, 2012; Bovo *et al.*, 2012; Lukić *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2011; Lukić *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2010; Bovo *et al.*, 2009; Apostolopoulou *et al.*, 2005), a maçã (Antón *et al.*, 2014; Villière *et al.*, 2012; Coldea *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Hang & Woodams, 2010; Rodríguez Madrera *et al.*, 2011; Madrera *et al.*, 2010; Versini *et al.*, 2009), a pera (Arrieta-Garay *et al.*, 2013; Versini *et al.*, 2012; Coldea *et al.*, 2011; García-Llobodanin *et al.*, 2010; García-Llobodanin *et al.*, 2008; García-Llobodanin *et al.*, 2007), o melão (Hernandez-Gomez *et al.*, 2009, Hernandez-Gomez *et al.*, 2008; Hernandez-Gomez *et al.*, 2005; Hernandez-Gomez *et al.*, 2003), a cereja (Nikicévić *et al.*, 2011; Tesevic *et al.*, 2009), a cana-de-açúcar e o melaço de cana-de-açúcar (Borges, *et al.*, 2014; Granato *et al.*, 2014; Riachi *et al.*, 2014; Capobianca *et al.*, 2013; Bortoletto & Alcarde, 2013; Pino *et al.*, 2012; Alcarde *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Scanavini *et al.*, 2010; Penteado & Masini, 2009), os cereais (Chao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2012; Ziołkowska & Jeleń, 2012; Zhang *et al.*, 2011; Jeleń *et al.*, 2010; Fan & Qian, 2006a, Fan & Qian, 2006b), a ameixa

(Balcerek *et al.*, 2013; Pecié *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Coldea *et al.*, 2011), o agave (López-Ramírez *et al.*, 2013; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2013; Salvador *et al.*, 2012; Contreras *et al.*, 2010; Vera-Guzmán *et al.*, 2010), o medronho (Galego *et al.*, 2013; Santo *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2011, Soufleros *et al.*, 2005, Versini *et al.*, 1995a), o figo (Galego *et al.*, 2011; Galego & Almeida, 2007; Ayed *et al.*, 1992), a amora e a groselha preta (González *et al.*, 2011; González *et al.*, 2010), a jabuticaba (Duarte *et al.*, 2011; Asqueri *et al.*, 2009), o kiwi (Arrieta-Garay *et al.*, 2014b; Lopez- Vasquez *et al.*, 2012), o zimbro (Vichi *et al.*, 2005), o mel (Pino & Fajardo, 2011), a laranja (Santos *et al.*, 2013), os resíduos de pó de café cru (Sampaio, *et al.*, 2013), os cereais com batata-doce (Yamamoto *et al.*, 2013; Ohta *et al.*, 1990) e a batata-doce (Galego, 2013).

A experiência adquirida por algumas indústrias pequenas, nomeadamente ao nível do processo de destilação, permitiu o desenvolvimento de grande parte das aguardentes atualmente no mercado. As exigências atuais do mercado impõem o desenvolvimento de produtos novos, mais seguros, com maior qualidade e mesmo com preço mais baixo, razão pela qual têm sido feitos estudos específicos de otimização dos processos de destilação (Arrieta-Garay *et al.*, 2014a; Estaban-Decloux, *et al.*, 2014; Arrieta-Garay *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2013; Sacher *et al.*, 2013; Valderrama *et al.*, 2012a; Valderrama *et al.*, 2012b; Da Porto *et al.*, 2010; Da Porto *et al.*, 2008; Saco *et al.*, 2006), ou dos processos de fermentação (Bovo *et al.*, 2015; Bovo *et al.*, 2014; Bovo *et al.*, 2012; González *et al.*, 2011; Pietruszka *et al.*, 2010; De León-Rodriguez *et al.*, 2008, Arrizon & Gschaedler, 2007; Schehl *et al.*, 2004). Grande parte destes e de outros estudos têm por base técnicas de análise bastante sofisticadas, no sentido de melhorar e controlar as propriedades e características dos destilados (Ohe, *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2011; Ziółkowska & Jelén, 2011; Takahashi & Goto-Yamamoto, 2011; Delgado *et al.*, 2010; García-Martín *et al.*, 2010; Ledauphin *et al.*, 2010; MacNamara *et al.*, 2010; Cardeal & Marriott, 2009; Jurado *et al.*, 2008; Lachenmeier, *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2008; Plutowska & Wardencki, 2008; Poisson & Schieberle, 2008; Flamini, 2005; Ebeler *et al.*, 2000).

Após destilação muitas bebidas são submetidas a um período de estágio. O estágio pode ser realizado em recipientes de aço inoxidável ou em recipientes de vidro, onde não existe contacto com o oxigénio - envelhecimento em ambiente redutor. O estágio pode também ser realizado em recipientes de madeira, onde existe um pequeno, mas continuado contacto com o oxigénio do ar – envelhecimento oxidativo. Durante o processo de envelhecimento em recipientes de madeira as aguardentes adquirem

compostos voláteis e não voláteis provenientes da madeira. Podem também ser formados novos compostos, aromáticos e não aromáticos, quer por interação entre compostos originais da bebida, quer envolvendo compostos da madeira (Bortoletto & Alcarde, 2013; Pecié *et al.*, 2012; Alañón *et al.*, 2010; Ledauphin *et al.*, 2010; Rodríguez Madrera *et al.*, 2010; Schwarz, *et al.*, 2009; Poisson & Schieberle, 2008; Caldeira *et al.*, 2010; Caldeira *et al.*, 2008; Flamini, *et al.* 2007; Caldeira *et al.*, 2006).

As madeiras usadas na maturação de bebidas alcoólicas podem ter diferentes proveniências (Simón *et al.*, 2014a; Caldeira *et al.*, 2010; Rosso *et al.*, 2009). Na Europa utiliza-se principalmente madeira de carvalho (Rodríguez-Solana *et al.*, 2012; Alañón *et al.*, 2010; Poisson & Shieberle, 2008). O processo de maturação em madeira é bastante complexo, dependendo das características da madeira utilizada, nomeadamente da espécie e região geográfica, e também da tecnologia de preparação das pipas, do seu volume e da queima, que compreende diferentes graus de torra (fraco, médio ou forte) (Sanz *et al.*, 2012; Sanz *et al.*, 2011; Caldeira *et al.*, 2006). Embora a madeira de carvalho continue a ser a mais utilizada, têm sido feitos vários estudos reportando madeiras de outras origens, nomeadamente de castanheiro, cerejeira, acácia, amoreira e freixo (Simón *et al.* 2014b; Sanz *et al.*, Sanz *et al.*, 2011; 2012; Caldeira *et al.*, 2010; Rosso *et al.*, 2009; Flamini *et al.*, 2007; Caldeira *et al.*, 2006; Canas *et al.*, 1999). A madeira de castanheiro apresenta normalmente maior teor em polifenóis do que a madeira de carvalho (Sanz *et al.*, 2012; Caldeira *et al.*, 2010; Caldeira *et al.*, 2006, Canas *et al.*, 1999). Por outro lado, a madeira de carvalho é mais rica em compostos voláteis do que a madeira de castanheiro (Rosso *et al.*, 2009). O teor em elagitaninos e galhotaninos provenientes da madeira decresce com o aumento do grau de torra (Sanz *et al.*, 2012). A maturação em madeira enriquece as bebidas em compostos voláteis e não voláteis, mas torna-as mais caras. A qualidade da madeira, a técnica de torra e o tempo de contacto com a bebida são aspetos fundamentais para a qualidade e aceitabilidade da aguardente. Muitos dos aspetos associados à maturação da aguardente de medronho têm sido otimizados empiricamente pelos produtores/consumidores, nomeadamente na região de Monchique. Nesta região mantém-se a tradição de passar a aguardente por recipientes de madeira de castanheiro ou carvalho durante 2 a 3 meses (Galego *et al.*, 2001).

A legislação comunitária impõe a análise de alguns parâmetros essenciais para a avaliação da qualidade das aguardentes. O teor alcoólico mínimo é de 35 % vol. para aguardentes de cereais e de mel. A grande maioria das outras aguardentes tem limite mínimo de 37,5 % vol. As exceções são a aguardente de borras de vinho, cujo valor

mínimo é 38 %, e o *whisky* ou *whiskey*, que é de 40 %. Está também definido um teor mínimo de substâncias voláteis de 200 g por hectolitro de álcool puro (a.p.), maioritariamente relativo a acetato de etilo, 1-propanol, isobutanol ou 2 metil- propanol, isopentanois (2 metil-1-butanol + 3 metil -1-butanol). O teor máximo em metanol é de 1000 g/hl (a.p). Há exceções relativamente ao valor máximo e ao valor mínimo de metanol (Regulamento CE 110/2008). O teor em ácido cianídrico, em aguardentes de frutos com caroço, não pode ser superior a 7 g por hectolitro (a.p.). Cada país pode estabelecer critérios próprios, mais específicos, em conformidade com a legislação comunitária, para melhor caracterizar as suas bebidas. Em Portugal o Decreto-Lei 283/2000 de 26 de setembro estabelece critérios adicionais para a aguardente de medronho. Este Decreto-Lei fixa os teores máximos em acetato de etilo, 1-butanol, 2-butanol, cobre e acidez total. Estabelece ainda os limites máximos e mínimos em acetaldeído ou etanal, metanol, 1-propanol, isobutanol, isopentanóis, somatório dos teores em álcoois superiores e razão isobutanol/1-propanol.

O organismo internacional do vinho (OIV) fixa os métodos e aprova os equipamentos utilizados na maioria das análises de rotina de aguardentes de origem vínica. A última atualização foi feita em 2015 (OIV-BS-INT-00-2015). Na análise das aguardentes de outros frutos são também seguidos os métodos de análise e equipamentos aprovados pelo OIV.

1.1.2 - Os licores

O conceito de licor engloba uma grande diversidade de bebidas. No entanto a maioria dos licores é preparada por maceração de substâncias vegetais em álcool. Nalguns casos a extração de aromas é mais eficaz se após o período de maceração existir uma destilação (Vázquez-Araujo *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 1995). A investigação na área dos licores tem-se centrado na caracterização dos compostos fenólicos e compostos voláteis extraídos durante o processo de maceração. Foram desenvolvidos estudos desta natureza no licor de murta, (Tuberoso *et al.*, 2013; Galego *et al.*, 2011; Tuberoso *et al.*, 2008; Tuberoso *et al.*, 2007; Tuberoso *et al.*, 2006; Montoro *et al.*, 2006a; Montoro *et al.*, 2006b; Alamanni & Cossu, 2004; Vacca *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2002), de nozes verdes (Stampar *et al.*, 2006; Alamprese & Pompei, 2005; Alamprese *et al.*, 2005), de limão e outros frutos cítricos (Shipilliti *et al.*, 2013, Crupi *et al.*, 2007; Poiana, *et al.*, 2006; Andrea *et al.*, 2003), de plantas aromáticas, incluindo o lúpulo (Vázquez-Araujo *et al.*, 2013), de

pétalas de rosa (Shen *et al.*, 2007), de melão (Hernández Gómez *et al.*, 2009), de cereja (Rødtjer *et al.*, 2006), de cacau (Komes *et al.*, 2011), de marmelo (Carbonell- Barrachina *et al.*, 2015) e de romã (Galego *et al.*, 2013). Na preparação de licores de outros produtos agrícolas como ovos, leite ou natas, os principais estudos têm-se centrado nas técnicas de estabilização (Heffernan *et al.*, 2009; Lynch & Mulvihill, 1997) ou de análise do teor alcoólico (Lachenmeier *et al.*, 2005; Cizkova, *et al.*, 2004). Têm sido também realizados estudos no sentido de avaliar a autenticidade dos produtos utilizados na sua preparação (Shipilliti *et al.*, 2013, Yucesoy & Ozen, 2013; Jelén *et al.*, 2010; Sádecká *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2002).

A maceração de substâncias vegetais em álcool permite a extração de variados compostos voláteis e não voláteis. Terminado o período de maceração segue-se a separação das substâncias sólidas e a adição de agente adoçante. Após a adição do agente adoçante tem início o período de maturação. A maturação pode decorrer em recipiente fechado inerte, como o vidro ou em aço inoxidável, *maturação redutora*, ou pode ser feita em madeira, *maturação oxidativa*, pouco frequente em licores. De salientar que o licor de maior projeção da região do Algarve, o “Brandymel” (atualmente – “Licor Dom Cristina”), passa por um período de maturação de 3 meses em recipiente de madeira de carvalho (Galego & Almeida, 2007). Muitos dos compostos obtidos na maceração e/ou na maturação em madeira são compostos fenólicos e apresentam elevado poder antioxidante (Carbonell- Barrachina *et al.*, 2015, Santos *et al.*, 2014, Galego *et al.*, 2012). Como o poder antioxidante tem sido associado a benefícios para a saúde (Nayak *et al.*, 2015; Tan & Lim 2015; Krishnaiah *et al.*, 2011), têm sido desenvolvidos estudos no sentido de demonstrar os potenciais benefícios destas bebidas. Contudo esta temática associada a bebidas alcoólicas é muito polémica (Pouwels & Kostkiewicz, 2009; Gaziano & Manson, 1996). Se por um lado é reconhecido que a ingestão de uma pequena quantidade diária destas bebidas pode ter efeitos positivos na saúde humana em adultos (O’keef *et al.*, 2014, Poli *et al.*, 2013; Grønbaek, 2004), por outro, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas causa graves problemas, quer ao nível da saúde, quer sociais (Geil *et al.*, 2014; Mohaptra *et al.*, 2010; Zakhari & Li, 2007). O consumo moderado de bebidas alcoólicas é algo difícil de definir e variável de país para país. De acordo com Chiva-Blanch e colaboradores (2013), a interpretação do Instituto Nacional de Abuso do Álcool e Alcoolismo dos Estados Unidos é a que reúne maior consenso. De acordo com este Instituto é considerado consumo moderado de álcool até 56 g por dia ou 196 g por semana para homens, e até 42 g por dia ou 92 g por semana para as mulheres.

1.1.3 - Outras bebidas espirituosas

Os vinhos licorosos são outro grupo de bebidas espirituosas com história no Algarve. Vinhos licorosos são vinhos cuja fermentação alcoólica é interrompida pela adição de um destilado, pertencendo por isso à classe dos vinhos fortificados. Os vinhos licorosos tintos com indicação geográfica «Algarve» só podem ser preparados a partir das castas Alfrocheiro, Alicante Bouschet, Aragonz, Baga, Bastardo, Cabernet-Sauvignon, Castelão, Merlot, Monvedro, Moreto, Moscatel-Galego-Tinto, Negra-Mole, Pau-Ferro, Pexem, Pinot-Noir, Syrah, Tinta-Caiada, Tinta-Carvalha, Touriga-Franca, Touriga-Nacional e Trincadeira (Portaria 217/2004 de 16 de agosto) e apresentar um teor alcoólico mínimo de 19 % vol. No caso dos vinhos brancos licorosos, a preparação deve envolver pelo menos 85 % de uvas da casta Síria ou 75 % da casta Moscatel-Graúdo, sendo o título alcoólico mínimo de 15,5 % vol.

Todos os vinhos licorosos são sujeitos a período de maturação relativamente longo em madeira, 8 anos para o Moscatel doce e 10 anos para o Algardoce. Esta maturação pode ser feita na mesma pipa, maturação estática, ou seguindo um processo dinâmico, nomeadamente o designado por «solera». A maturação dos vinhos licorosos brancos deve ser feita pelo método «solera» (Portaria nº 364/2001).

No processo de maturação pelo método «solera» os vinhos são colocados em pipas de madeira sobrepostas umas sobre as outras. As pipas que ficam mais próximas do solo são designadas por «soleras» e as outras por «criadeiras». Periodicamente, frações de vinho são retiradas das «criadeiras» mais jovens para as «criadeiras» mais velhas até chegarem às «soleras». Somente 1/3 do vinho da «solera» é retirado para engarrafar. Aos 2/3 que permanecem junta-se 1/3 da «criadeira» imediatamente superior e assim sucessivamente até à «criadeira» mais elevada, onde será armazenado 1/3 de vinho novo (Berlangua *et al.*, 2004).

Este método permite que um vinho mais jovem adquira as características de vinho «solera» em menor número de anos. No entanto o número de anos de envelhecimento indicado nos rótulos corresponde ao intervalo de tempo que tem início quando o vinho entra na «criadeira» mais jovem (Schwarz, *et al.*, 2011; Guerrero *et al.*, 2011).

O gin é uma bebida espirituosa não doce produzida a partir de destilados sem aromas. A preparação de destilados neutros envolve a desodorização e retificação do destilado de origem agrícola de partida, no sentido de remover todos os compostos voláteis produzidos no processo de fermentação, exceto o etanol, tal como acontece na

produção de *vodkas*. O carvão ativado é o material geralmente utilizado no processo de desodorização (Hu *et al.*, 2010). Segue-se um período de maceração com bagas de zimbro para aromatização do álcool, de acordo com a definição de gin (Regulamento CE 110/2008; Piggott & Holm, 1983). A introdução de mais aromas, por posterior maceração de outros produtos origina gins de maior complexidade aromática e tem sido preocupação dos produtores. O gin de tangerina é uma bebida espirituosa nova lançada no Algarve em 2014 e preparada por maceração inicial de bagas de zimbro em de álcool puro, seguido de um segundo período de maceração com tangerina.

1.2 - Processamento

1.2.1 - Aguardentes

A preparação de aguardente envolve a seleção da matéria-prima contendo açúcares fermentáveis, seguida de dois passos fundamentais, a fermentação e a destilação. A figura 1.1 apresenta um diagrama do processo de produção de aguardente.



Figura 1.1 - Diagrama de produção de aguardente.

1.2.1.1 - A matéria-prima

As aguardentes de frutos são produzidas em praticamente todas as regiões do mundo. Podem ser utilizados diversos frutos ou mosto de frutos, de acordo com a sua disponibilidade em cada estação do ano e país (Balcerek *et al.*, 2013; Sancher *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Os frutos devem ser colhidos no estado de maturação adequado e chegar ao local de fermentação inteiros. É importante que não apresentem resíduos de pesticidas ou outros compostos tóxicos que possam inibir a fermentação e/ou causar problemas de saúde. Dependendo das características do fruto, o mosto pode ser preparado utilizando frutos inteiros, como é o caso do medronho (Santo *et al.*, 2012), frutos esmagados, como é o caso do kiwi (Arrieta-Garay *et al.*, 2014b, López-Vázquez, *et al.*, 2012), da maçã (Rodríguez Madrera *et al.*, 2013), da pera (Versini *et al.*, 2012), da amora preta e da groselha preta (González *et al.*, 2010). Pode também ser utilizada a polpa do fruto, como são os casos da aguardente de ameixa (Balcerek *et al.*, 2013), de melão (Hernández-Gómez, *et al.*, 2003) e de jabuticaba (Duarte *et al.*, 2011). Pode ainda ser utilizado apenas o sumo, como é o caso da aguardente de laranja (Santos *et al.*, 2013), e nalguns casos a de melão (Hernández-Gómez, *et al.*, 2003). O denominador comum das diferentes matrizes é a presença de sólidos solúveis contendo açúcares fermentáveis, principalmente frutose e glicose.

A produção de aguardentes de cereais ou de outros produtos amiláceos também é relativamente comum, embora neste caso seja necessário um processo prévio de sacarificação ou hidrólise do amido, antes da fermentação. Na produção de *whisky* a hidrólise do amido inclui um processo de maltagem de cereais, semelhante ao utilizado na produção de cerveja (Vriesekoop *et al.*, 2010). O malte de cevada é o mais comum. O cereal é colocado a germinar até desenvolver as enzimas que catalisam a hidrólise do amido (Lyons, 1999). A germinação é interrompida por aquecimento. Nesta fase dá-se a principal diferença entre o malte para a produção de cerveja e o malte para a produção do *whisky*. O malte para a produção de cerveja é progressiva e faseadamente aquecido até à ebulição, de forma a inativar os microrganismos e também as enzimas. Na produção do *whisky* o aquecimento não atinge a ebulição e é feito de forma a manter ativas as enzimas que continuam a hidrolisar o amido durante o processo de fermentação (Vriesekoop *et al.*, 2010).

Um processo semelhante é utilizado para produzir uma bebida típica Japonesa, o *shochu*, que usa puré de batata-doce, cevada ou outras matérias amiláceas (Yamamoto

et al., 2013; Ohta *et al.* 1990), e um fermento preparado a partir de arroz *koji*, leveduras de *shochu* e água (Ohta *et al.* 1990). O amido da batata-doce apresenta resistência à α -amilase e à glucoamilase, conferindo-lhe baixa conversão enzimática para açúcares fermentáveis (Shariffa *et al.*, 2009). Os grânulos de amido da batata-doce variam da forma poligonal à redonda ou oval e com diâmetros entre 2 e 25 μm (Moorthy, 2002; Chen *et al.*, 2004). As propriedades do amido de batata-doce estão dependentes da dimensão dos grânulos (Chen *et al.*, 2004) e do modo como a amilose e a amilopectina estão associadas (Zavareze & Dias, 2011).

De acordo com Lee e colaboradores (2011) as indústrias alimentar e a farmacêutica dão preferência à sacarificação do amido por processos físicos, nomeadamente por utilização de humidade, calor, pressão ou radiação.

1.2.1.2 - Fermentação alcoólica

De uma forma simples a fermentação alcoólica é a transformação, em anaerobiose, dos açúcares fermentáveis em etanol e dióxido de carbono, efetuada, principalmente, por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Tsakiris, *et al.*, 2014; Zamora, 2009; Jackson, 2008). Ou seja, é uma forma de libertação de energia do metabolismo em que tanto o substrato (dador de eletrões inicial) como o produto (aceitador de eletrões), são compostos orgânicos (Jackson, 2008).

A fermentação alcoólica é a etapa mais importante do processo de preparação de bebidas alcoólicas, tanto das bebidas fermentadas (cervejas ou vinhos) como das fermento – destiladas (aguardentes). A fermentação alcoólica no processo de produção de cerveja e de vinho tem sido alvo de estudos bastante pormenorizados (He *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2014; Fugelsenag & Edwards, 2007; Ribéreau-Gayn *et al.*, 2006). Fermentações visando a preparação de outras bebidas seguem procedimentos semelhantes, sendo por vezes necessário adaptações, quer relativamente ao volume de fermentado, quer à dimensão dos produtos utilizados, nomeadamente se podem ou não ser utilizados inteiros, fracionados ou apenas o sumo dos frutos (Figuras 1.2-1.5). A higiene da sala de fermentação, dos recipientes e de todos os intervenientes é fundamental para evitar contaminações. Os fermentadores devem permanecer bem fechados durante o processo de fermentação de modo a evitar o contacto da massa em fermentação com o oxigénio do ar (Da Porta, 2002), assegurando ao mesmo tempo uma boa libertação do dióxido de carbono que se vai formando. Na preparação de alguns mostos de fruta são adicionadas

enzimas pécicas para melhorar a extração dos compostos do sumo (Zhang, *et al.*, 2011). Em mostos pobres em açúcares é permitido, em alguns casos a adição de soluções de sacarose (Santos *et al.*, 2013).



Figura 1.2 - Fermentador de medronho coberto com plástico, água e areia. Destilaria Lagarto, Monchique, 11 de fevereiro de 2015.



Figura 1.3 - Fermentador de medronho em madeira coberto com plástico e água. Destilaria Monte da Lameira, Monchique, 11 de fevereiro de 2015.



Figura 1.4 - Fermentadores de medronho, destilaria Zé Marafado, Ameixial, 29 de janeiro de 2015.



Figura 1.5 - Fermentadores, destilaria Talurdinha, Silves, 28 de Abril de 2014.

Para evitar a proliferação de bactérias é por vezes aconselhável ajustar o pH para valores próximos de 3 (Bovo *et al.*, 2012; Garcia-Llobodanin *et al.*, Hernandez-Gómez *et al.*, 2008; Versini *et al.*, 1995). O uso de leveduras selecionadas tem sido aconselhado para obtenção de destilados de melhor qualidade (Bovo *et al.*, 2014). Esta área está relativamente pouco estudada, nomeadamente a identificação dos microrganismos mais

adequados a cada substrato, às condições ambientais e às características do produto que se pretende obter (Bobo *et al.*, 2015). A fermentação deve decorrer no menor tempo possível, dependendo do produto a fermentar e das condições ambientais. Não deve ultrapassar 15 dias. As fermentações artesanais de medronho no Algarve decorrem durante mais tempo (3 a 4 meses), porque são feitas a temperatura não controlada e durante o período mais frio do ano. A fermentação do medronho ocorre normalmente entre novembro e janeiro, na zona de serra, região onde as temperaturas podem atingir valores negativos (Santo *et al.*, 2012).

1.2.1.3 - Período entre a fermentação e a destilação

O período que decorre entre o final da fermentação e a destilação deve ser o mais breve possível. O teor em álcoois superiores não depende deste intervalo de tempo; no entanto o teor em ésteres pode diminuir significativamente para períodos de espera longos (meses) (Tsakiris, *et al.*, 2014).

1.2.1.4 - Destilação

A destilação é o processo de concentração do álcool formado na fermentação. A destilação pode ser feita em contínuo ou descontínuo (por lotes - quantidade de massa que pode ser destilada de cada vez). Se o produto fermentado for líquido pode seguir-se o processo contínuo; se contiver sólidos, a destilação terá sempre que ser feita em modo descontínuo e de acordo com a capacidade do alambique. Durante a destilação os compostos voláteis existentes no fermentado vão ser concentrados. Deve obter-se o máximo teor em etanol e outros compostos que possam contribuir positivamente para o aroma do destilado. Ao mesmo tempo devem ser criadas condições para obter o mínimo de compostos que possam contribuir para aromas desagradáveis (Tsakiris *et al.*, 2014). Neste sentido é normalmente rejeitado um volume cerca de 5 % do destilado inicial, a “cabeça”, por conter elevado teor em acetato de etilo e cobre, este último se o destilador for de cobre (Figura 1.1). No mesmo sentido, cerca de 10 % do destilado final, a “cauda” ou “frouxo”, deve ser separado por apresentar acidez mais elevada e teores em ésteres de alto peso molecular também mais elevados. A “cauda” pode ser aproveitada para adicionar à destilação seguinte melhorando assim o rendimento alcoólico da destilação. A parte central, o “coração”, é o destilado possuindo elevada qualidade para consumo direto ou para o processo de maturação (Fig. 1.1). No Algarve, o alambique mais utilizado

para a destilação é o de estilo árabe, composto por um pote em forma de abóbora, um capacete, e um tubo para refrigeração (Figura 1.6). Este sistema é típico da zona de Monchique. Noutras localidades o processo é semelhante, mas a refrigeração é feita usando uma serpentina (Figura 1.7). A partir de meados do século XX generalizaram-se os destiladores por arraste de vapor na produção industrial, quer para sistemas de produção por lotes, quer para sistemas em contínuo (Galego & Almeida, 2007). A figura 1.8 mostra uma destilaria recente do Algarve com um sistema de destilação por arraste de vapor. O aquecimento em ambos os casos, é feito com lenha de azinheira, oliveira, eucalipto, medronheiro ou de outra origem, excluindo lenha de resinosas.

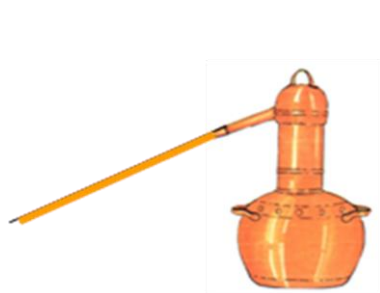


Figura 1.6 - Alambique estilo árabe usado em Monchique.

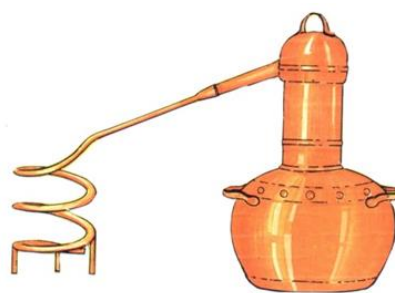


Figura 1.7 - Alambique estilo árabe com serpentina para a refrigeração.



Figura 1.8 - Destilador por arraste de vapor, destilaria Talurdinha, Silves, 28 de abril de 2014.

Nos países do Norte da Europa os sistemas de destilação têm evoluído no sentido da dupla destilação e da utilização de colunas de múltiplos pratos. Esta evolução pretende dar resposta ao baixo teor em açúcares dos frutos produzidos nestas regiões que originam aguardentes com teores em álcool considerados muito baixos (20 – 23 % vol.) por destilação simples (Balcerek *et al.*, 2013; Rodríguez Madrera *et al.* 2013). Os frutos produzidos na região do Algarve apresentam elevados teores em açúcares podendo a destilação simples originar destilados com teores alcoólicos bastante superiores a 50 % vol.

1.2.1.5 - Maturação

A maturação das aguardentes de frutos, como já foi referido, pode fazer-se em recipientes de madeira de carvalho ou de castanheiro, de preferência sujeitas a torra ligeira. O tempo de permanência na madeira, a dimensão da pipa e o número de vezes que já foi utilizada, vão determinar as características dos destilados. A madeira sujeita a torras fortes origina aguardentes com aromas a madeira muito pronunciados, que mascaram por vezes o aroma frutado proveniente da fermentação. Num estudo realizado há alguns anos com aguardente de medronho verificou-se que nesta aguardente, submetida a um período de maturação de 6 meses, em pipas de madeira de carvalho novas, com 50 L de capacidade e sujeitas a torra média, apenas o aroma da madeira foi perceptível (Galego *et al.*, 2001). A maturação em tanques de aço inoxidável com adição de aparas de madeira sujeitas a torra já foi seguida por alguns produtores. As aguardentes víquicas e bagaceiras são normalmente submetidas a um processo de maturação em recipientes de madeira. Grande parte destas aguardentes são depois utilizadas na preparação de vinhos licorosos, que são normalmente submetidos a um período de maturação de alguns anos também em recipientes de madeira.

1.2.1.6 - Engarraamento

As bebidas espirituosas só podem ser comercializadas depois de engarrafadas, rotuladas e seladas com o selo fornecido pelas entidades aduaneiras, para controlo dos impostos. Na produção tradicional o enchimento é pouco mecanizado. No entanto é obrigatório o utilização de instrumentos de medida certificados para garantir o volume correto. O volume, tal como o teor alcoólico determinado a 20 °C, têm que estar visíveis nos rótulos das garrafas. No caso do teor alcoólico o erro não pode ultrapassar 0,3 % vol.

(Regulamento CE 1169/2011; Decreto-Lei nº 560/99 de 18 de dezembro). Qualquer não conformidade obriga o produtor a pagar severas coimas.

Em 2015 o imposto sobre o álcool e bebidas alcoólicas, IABA, foi fixado em 1289,27 € por hectolitro de álcool puro. Os produtores com produção anual inferior a 1000 L de álcool puro podem beneficiar de uma redução de 50 % neste imposto.

1.2.2 - Licores

Licores são bebidas que não apresentam uma técnica bem definida de preparação. Na maior parte dos casos são preparados por maceração (Gutiérrez *et al.*, 1995) de substâncias de origem vegetal em destilados ou em álcool puro fornecido pela entidade oficial, em Portugal o AGA. A figura 1.9 mostra de forma esquemática o processo de produção de licores.

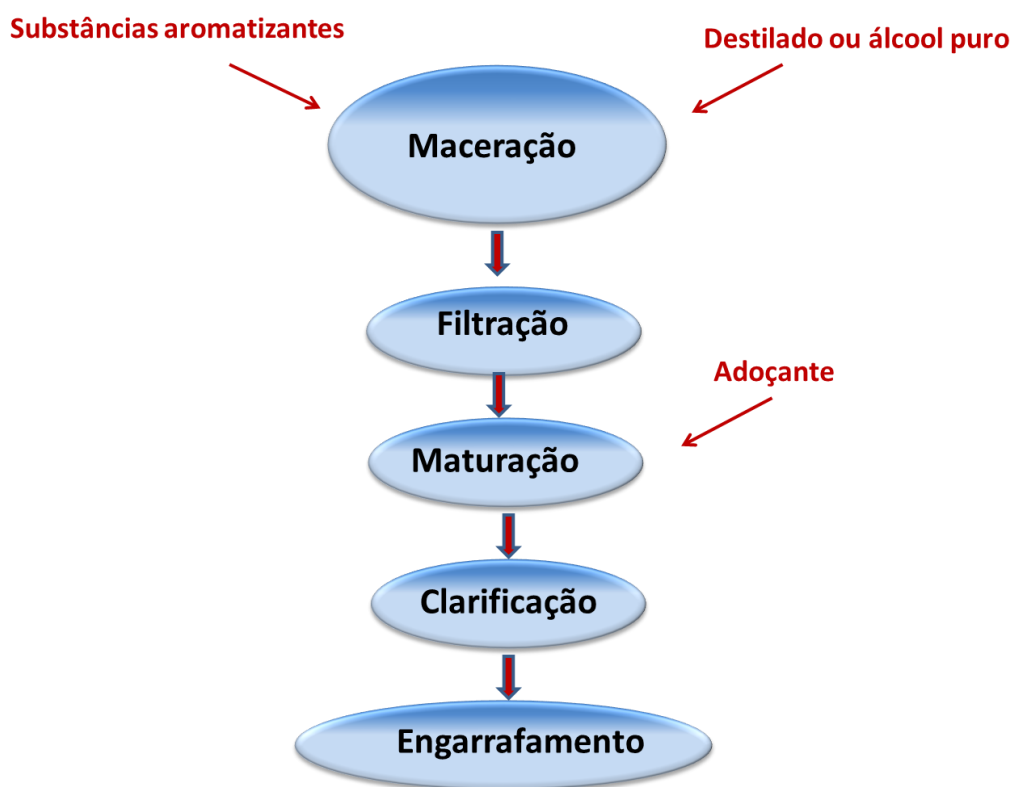


Figura 1.9 - Diagrama de produção de licores por maceração.

As substâncias aromatizantes utilizadas na produção dos licores são diversas, mas quase sempre de origem vegetal. As partes das plantas utilizadas são também variadas e devem ser sempre recolhidas nas melhores condições e de acordo com o licor pretendido.

Um dos licores típicos das regiões mediterrânicas, preparado seguindo um processo de maceração, é o licor de bagas de murta (Tuberoso *et al.*, 2013; Galego *et al.*, 2011; Barboni, *et al.*, 2010; Tuberoso *et al.*, 2008; Tuberoso *et al.*, 2007; Tuberoso *et al.*, 2006; Montoro *et al.*, 2006a; Montoro *et al.*, 2006b; Alamanni & Cossu, 2004; Vacca *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2002). Neste caso são utilizadas bagas maduras inteiras por apresentarem teores mais elevados em antocianinas (Galego *et al.*, 2011; Tuberoso *et al.*, 2008, Tuberoso *et al.*, 2007) e em compostos aromáticos, principalmente limoneno e eucaliptol (Galego *et al.*, 2011; Tuberoso *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2002). No caso do licor de nozes, por exemplo, é utilizado o endocarpo antes do endurecimento (Jakopic *et al.*, 2007; Alamprese *et al.*, 2005; Alamprese & Pompei, 2005) por apresentar um teor mais elevado em compostos fenólicos e vitaminas (Stampar *et al.*, 2006). Na preparação do licor de rosas, as pétalas de rosa são colhidas quando apresentam a cor mais intensa, mas são utilizadas após desidratação (Shen *et al.*, 2007). Na produção do licor de limão “Limoncello”, tal como noutros licores de citrinos, é apenas utilizada a parte externa da casca (o flavedo) fresca (Schipilliti, *et al.*, 2013; Cupri *et al.*, 2007; Andrea *et al.*, 2003). Na produção do licor de banana é utilizado o encorcarpo (Teixeira *et al.*, 2005), no de acerola, o mesocarpo (Penha *et al.*, 2001), ou seja, a parte comestível dos frutos (polpa).

1.2.2.1 - Maceração

A maceração é essencialmente um processo de extração de compostos voláteis e não voláteis da matriz aromatizante do licor, pela aguardente ou pela solução alcoólica utilizada.

O período e condições de maceração determinam as características finais dos licores. Nos licores de baga de murta o teor mais elevado em antocianinas atinge-se após 7 dias de maceração em recipientes escuros e com soluções contendo cerca de 70 % vol. de álcool (Galego *et al.*, 2011; Tuberoso *et al.*, 2007). Na prática são seguidos períodos bastante mais alargados, podendo ser de 40 ou mais dias (Tuberoso *et al.*, 2013; Snoussi *et al.*, 2012; Tuberoso *et al.*, 2008; Montoro *et al.*, 2006a). Na produção do licor de murta típico da ilha da Sardenha, são utilizadas soluções com teor alcoólico mais baixo, mas sempre superior a 40 % vol., e a maceração é feita durante 15 ou mais dias (Vacca *et al.*, 2003). Na preparação do licor de pétalas de rosa, verificou-se, que as melhores características cromáticas são obtidas utilizando pétalas de rosa desidratadas, na proporção de 1:10 (m/m), uma aguardente com teor em álcool entre 30 e 35 % vol.,

acidificada com 0,6 a 0,8 %, de ácido cítrico, e por um período de 24 h (Shen *et al.*, 2007). Períodos de maceração entre 2 e 7 dias com soluções hidro alcoólicas a 95 % vol. têm sido utilizados na preparação de licor de limão (Andrea, *et al.*, 2003). Na produção do licor de nozes verdes, o endocarpo é cortado em frações, que são depois colocadas numa solução de etanol, na proporção de 1/3 de nozes para 2/3 de solução com 40 % de etanol, durante 3 semanas (Stampar *et al.*, 2006). Um procedimento alternativo consiste em macerar as frações de nozes, em solução alcoólica, com cerca de 60 % vol., na proporção de 1:2, durante 4 meses e em agitação (Alamprese & Pompei, 2005). Na preparação do licor de banana, verificou-se que 16 dias de maceração, com soluções hidro alcoólicas entre 70 e 95 % vol., é o período de tempo adequado. Antes da maceração, a banana sem casca (epicarpo + mesocarpo), é submersa numa solução, com 4 % de ácido cítrico e 1 % de ácido ascórbico, durante 5 minutos, sendo posteriormente triturada e sujeita a um tratamento térmico de 2 minutos a 94 °C (Teixeira *et al.* 2005). A produção de licor de acerola, é feita por maceração da polpa do fruto (mesocarpo) durante 15 dias em álcool de milho (Penha *et al.*, 2001). O licor de romã, se feito apenas com o sumo na proporção de 1:1 (V/V), não necessita de período de maceração. Quando preparado com os arilos inteiros (em proporção semelhante) deve ter um período de maceração de 3 dias, sempre em recipiente escuro, e num destilado contendo 70 % vol., de álcool, a fim de se obter o teor máximo em antocianinas (Galego *et al.*, 2013). No licor de marmelo verificou-se que um período de maceração de 3 meses, utilizando marmelos com casca e numa solução com 60 % de etanol, em proporções iguais de marmelo e de solução alcoólica, apresenta o teor em polifenóis e em poder antioxidante mais elevados (Carbonell-Barrachina *et al.* 2015).

1.2.2.2 - Filtração

A filtração tem por objetivo a remoção da parte sólida dos macerados. Deve ser feita antes da adição de açúcar (Fig. 1.9). A separação pode ser feita por filtração simples (Shen *et al.*, 2007) ou por ultrafiltração, esta última mais adequada quando se utiliza polpa de frutos (Penha *et al.*, 2001).

1.2.2.3 - Maturação

A maturação é o período durante o qual a bebida vai adquirir o equilíbrio, interligando os aromas que extraiu, durante o processo de maceração, com o adoçante.

O período de maturação inicia-se aquando da adição do agente adoçante (Fig 1.9). Os adoçantes mais utilizados são soluções de açúcar e/ou mel (Galego & Almeida, 2007, Alamprese *et al.*, 2005; Tuberoso *et al.*, 2007; Andrea *et al.*, 2003; Vacca *et al.*, 2003). A adição de agentes adoçantes é efetuada de forma a produzir licores com teores alcoólicos próximos de 20 % vol. (Galego *et al.*, 2013, Galego *et al.*, 2011, Penha *et al.*, 2001) e teores em açúcares, expressos em açúcares invertidos, superiores a 100 g/L (Regulamento CE 110/2008). Os licores italianos apresentam, em geral, teores alcoólicos mais elevados, normalmente próximos dos 30 % vol. (Crupi, *et al.*, 2007; Alamprese & Pompei, 2005; Andrea, *et al.* 2003). Neste caso o período de maturação pode variar de 3 meses a mais de 1 ano (Galego & Almeida, 2007; Alamprese *et al.*, 2005).

1.2.2.4 - Clarificação

Terminado o período de maturação muitas bebidas apresentam impurezas, quer na forma de depósito quer em suspensão, sendo por isso necessário remover estas impurezas, isto é, clarificar a bebida, para que possa ser comercializada “limpa e brilhante”.

Além dos processos de filtração, podem ser utilizados aditivos enológicos. Tradicionalmente a clarificação de alguns vinhos e licores era feita com clara de ovo batida em neve. Atualmente ainda há quem siga este processo, embora, com claras de ovo pasteurizadas. A utilização de bentonites, argila natural que contem grupos de catiões permutáveis de cálcio, sódio, magnésio e potássio, é bastante comum. Um dos casos mais importantes é a clarificação de bebidas contendo aguardente e mel, que constituem normalmente misturas bastante difíceis de clarificar. A clarificação destas bebidas foi testada com diversos produtos enológicos. Embora vários produtos tenham clarificado estas bebidas, a mistura de sílica com gelatina a 25 %, apresentou o depósito mais baixo e manteve o aroma original da bebida (Monteiro *et al.*, 2009). Oito anos depois a bebida manteve-se sem depósito.

1.2.2.5 - Engarrafamento

O engarrafamento de licores segue procedimentos semelhantes aos referidos para o engarrafamento das aguardentes.

1.3 - Compostos voláteis

O aroma de um dado alimento está associado à percepção de compostos voláteis (odorantes) por ele libertados. A primeira sensação do aroma é sentida via orthonasal após inalação e interação dos odorantes com os recetores olfativos localizados no nariz. Uma vez na boca, os odorantes podem ainda atingir os recetores olfativos do nariz, mas por via retronasal (Bojanowski & Hummel, 2012; Barham *et al.*, 2010; Genovese *et al.*, 2009; Ruijschop *et al.*, 2009). “Flavor” é um conceito da análise sensorial que engloba o aroma e também o gosto. O flavor de um alimento está normalmente associado à presença de centenas de compostos (Jelén, 2006). Embora vários compostos possam estar relacionados com o aroma dos alimentos, a investigação tem-se centrado no poder aromático originado pelos compostos voláteis (Lukić *et al.*, 2012; Jelén, 2012). A determinação dos compostos voláteis ou perfil dos compostos voláteis nas bebidas alcoólicas é por isso fundamental para a avaliação da qualidade do produto (Lukić *et al.*, 2012; Pino & Fajardo, 2011; Plutowska & Wardencki, 2008). O poder odorante dos compostos voláteis é bastante diverso e depende da concentração e do limiar de percepção de cada composto (Villière, *et al.*, 2012; Plutowska & Wardencki, 2008). É frequente quantidades vestigiais de compostos voláteis, da ordem de ng/L (Jelén *et al.*, 2012; Plutowska & Wardencki, 2008), serem determinantes nas propriedades sensoriais das bebidas (Plutowska & Wardencki, 2008). Na área alimentar são conhecidos cerca de 12 000 compostos voláteis, mas estima-se que apenas uma pequena percentagem (aproximadamente 5 %) tenham importância para o aroma típico de cada produto (Villière *et al.*, 2012; Grosch, 2001). O número de compostos voláteis identificados em cada produto depende também das técnicas de separação/identificação utilizadas (Jelén *et al.*, 2012). O estudo dos voláteis é normalmente realizado por cromatografia gasosa (GC) associada a deteção por espectrometria de massa (MS) (Coldea *et al.*, 2011; López-Vázquez *et al.*, 2010; Dragone *et al.*, 2009; Versini *et al.*, 2009; Cortés *et al.*, 2005; Flamini, 2005). São análises de alguma complexidade uma vez que os teores individuais dos compostos voláteis podem variar entre ng/L e g/L (Jelén *et al.*, 2012; MacNamara *et al.*, 2010; Plutowska & Wardencki, 2008). Os compostos das aguardentes que apresentam concentrações mais elevadas, como o acetato de etilo ou o metanol, podem ser analisados diretamente na matriz da aguardente (Antón *et al.*, 2014; Ziółkowska & Jeleń, 2012). No entanto são vários os compostos que apresentam baixos teores e contribuem para o aroma das aguardentes. Para analisar estes compostos são necessários processos mais

complexos, envolvendo normalmente extração e/ou concentração. Até aos anos 90 os (Ebeler *et al.*, 2000) principais processos de análise de compostos voláteis em bebidas alcoólicas consistiam na destilação e na extração líquido/líquido (LLE). São técnicas morosas e difíceis de automatizar. Ambos os processos podem alterar o perfil original dos compostos voláteis, quer pela temperatura/pressão ou pela seletividade do solvente de extração (Plutowska & Wardencki, 2008). A extração líquido/líquido, seguida ou não de concentração, é bastante referenciada sendo também diversos os solventes usados. As composições mais utilizadas são éter/hexano 1:1 V/V (Soufleros *et al.*, 2004; Silva & Malcata, 1998), pentano/diclorometano 2:1 V/V (Versini *et al.*, 1995a; Antón *et al.*, 2014, Martín-del-Campo *et al.*, 2011), éter dietílico/pentano 1:1 V/V (Gao *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2011), éter dietílico/pentano 30:70 V/V (Ledauphin *et al.*, 2010), éter dietílico/pentano 2:1 V/V (Zhu *et al.*, 2007) e diclorometano (Wang *et al.*, 2015; Martín-del-Campo *et al.*, 2011; Apostolopoulou *et al.* 2005; Ledauphin *et al.*, 2004). São ainda utilizadas misturas com éter dietílico/água 1:1 V/V, seguidas de extração com pentano/éter dietílico, em 5 proporções diferentes começando em 0 % e até 50 % de éter dietílico, no sentido de separar os compostos por ordem crescente de polaridade (Poisson & Schieberle, 2008), ou éter dietílico seguido de pentano/água 1:1 V/V (Fan & Qian, 2006a). Mais recentemente surgiram técnicas consideradas “amigas do ambiente”, as conhecidas por absorção/adsorção. Estas técnicas consistem basicamente na extração dos analitos de uma dada matriz pela absorção ou adsorção na superfície de uma fase polimérica, que pode ou não entrar em contacto com o líquido que constitui a bebida. As matrizes mais comuns no mercado (Supelco) são normalmente de polidimetilsiloxano (PDMS), um revestimento polimérico puro e homogéneo, semelhante ao revestimento SE-30 ou OV-101 das colunas de cromatografia gasosa (GC). Trata-se de um revestimento líquido de alta viscosidade. O poliacrilato (PA) é outro revestimento que se apresenta sólido e que se torna líquido à temperatura de dessorção. Outros revestimentos disponíveis são fases poliméricas de múltiplos componentes. Assim estão disponíveis no mercado o polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB), o carbowax/divinylbenzene (CW/DVB), o carbowax/resina (CW/TPR) e o polidimetilsiloxano-carboxeno-divinilbenzeno (PDMS/CAR/DVB).

Esta extração segue um processo de equilíbrio controlado pelo coeficiente de partição dos analitos entre a fase polimérica e a matriz da amostra. As principais técnicas são a microextração em fase sólida (SPME) e a extração em barra sorptiva de agitação (SBSE). A SPME consiste numa fibra de sílica fundida revestida pela fase polimérica. A

fibra coloca-se num suporte com forma de seringa, podendo ser introduzida diretamente na amostra ou no espaço de cabeça (HS) de um *vial*, de acordo com a figura 1.10 (Vera-Guzmán *et al.*, 2010; Maggi *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2000). O SBSE consiste numa barra de agitação revestida também por um filme polimérico de polidimetilsiloxano, que é colocada diretamente na amostra e sob agitação (Delgado *et al.*, 2010; MacNamara *et al.*, 2009). A principal diferença entre os dois processos reside no facto de o SBSE necessitar de desorção térmica acoplada ao injetor para libertação dos analitos enquanto que no SPME os analitos, absorvidos/adsorvidos na fibra podem ser colocados diretamente no injetor e submetidos à separação cromatográfica (Almeida *et al.*, 2009). As técnicas de SPME e de SBSE apresentam limitações, principalmente as relativas ao efeito matriz, tanto da amostra, como da fibra, que podem originar seletividade.

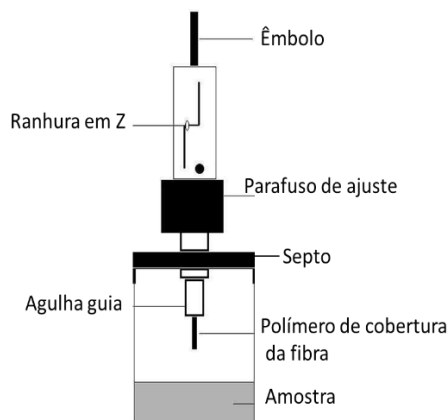


Figura 1.10 – Esquema de análise por HS-SPME - adaptado de Galipo *et al.*, 1999.

A extração e concentração usando fibras para SPME tem tido aplicação generalizada na análise de diversas bebidas espirituosas. É normalmente necessário diluir as amostras no sentido de obter um teor em álcool inferior a 20 % vol., de modo a evitar a saturação das fibras pelo etanol (Cheng *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011; García-Martín *et al.*, 2010; Ziółkowska & Kaczmarek, 2010; Ledauphin *et al.*, 2010; Cardeal & Marriott, 2009; Plutowska & Wardencki, 2009; Plutowska & Wardencki, 2008b; Jurado *et al.*, 2007; Câmara *et al.*, 2007; Demyttenaere *et al.*, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2000). O processo de SBSE tem também sido utilizado por alguns autores (Fan *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2010).

Sistemas de purga e armadilha já foram também utilizados com sucesso na análise de compostos voláteis de destilados. Este sistema de introdução de amostra apresenta três etapas. Na primeira os voláteis contidos num *vial* são forçados a passar por um tubo

contendo uma matriz adsorvente, constituída por diferentes fases, ordenadas por ordem crescente de polaridade. Por exemplo fenilmetilpolisiloxano apolar, seguido de 2,6-difenil-p-fenilenóxido (*Tenax Carboxeno* ou *Tenax*) e finalmente uma substância mais polar como o carvão ativado. As amostras são mantidas sobre pressão e a baixa temperatura para não degradar os compostos. Na fase seguinte um fluxo de gás inerte remove a humidade da amostra. Por fim os analitos são termicamente desorvidos e transferidos para a coluna cromatográfica (Schulz, *et al.*, 2007).

Sistemas multidimensionais de separação na análise de compostos voláteis são uma área emergente. Neste tipo de análise a amostra é submetida sequencialmente a diferentes processos de eluição/separação. Na chamada cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (GC – GC, *Heartcut Two-dimensional Gas Chromatography*) a amostra entra numa coluna capilar cromatográfica com uma determinada fase e de seguida passa para outra coluna de fase diferente, em geral de menor comprimento, ficando sujeita a um segundo processo de eluição/separação (Pedroso, *et al.*, 2009). Sistemas bidimensionais de colunas cromatográficas ligadas por sistema modelador (GC X GC - *Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography*) também são utilizados na análise de destilados. Esta técnica consiste na utilização de duas colunas cromatográficas de fases diferentes ligadas a um sistema modelador que volta a injetar na segunda coluna bandas de compostos já separados na primeira. A entrada da segunda coluna, que pode estar à temperatura ambiente, recebe o efluente da primeira, ficando os compostos retidos por períodos de tempo fixos (módulo de alguns segundos), com comando controlado por fonte de alimentação. Terminado cada período modular a interface é aquecida e os compostos são separados (Tranchida, *et al.*, 2013; Pedroso, *et al.*, 2009).

As técnicas descritas podem permitir maior ou menor eficiência na análise de compostos voláteis, mas não dão indicação sobre o maior ou menor poder odorante na bebida, razão pela qual se continua a recorrer à apreciação sensorial por painéis de provadores treinados ou não treinados, dependendo dos objetivos. Para melhor avaliar o poder odorante das bebidas têm sido desenvolvidos sistemas mistos, isto é, instrumentais e humanos, a chamada cromatografia gasosa olfatométrica (GC-O). Este tipo de análise consiste num conjunto de procedimentos que utilizam simultaneamente detetores cromatográficos e seres humanos como detetores na determinação do poder odorante dos compostos voláteis. Esta técnica é baseada na avaliação sensorial do eluente de uma coluna cromatográfica, que após a separação, permite avaliar a intensidade de cada

composto separadamente (Villière, *et al.*, 2012; Plutowska & Wardencki, 2008). Em geral é utilizada uma divisão do eluente (fase móvel vinda do cromatógrafo), sendo uma parte direcionada para um espectrómetro de massa, que permite identificar os compostos, e a outra parte para um sistema olfatométrico, para medir a intensidade e duração do odor.

1.3.1 – Compostos voláteis em aguardentes

São centenas os compostos voláteis já identificados em aguardentes obtidas a partir de produtos de origem vegetal. As aguardentes são basicamente uma mistura de água e etanol (Tsakiris *et al.*, 2014; Rodríguez Madrera *et al.*, 2011; Rodrigues Madrera & Valles, 2007), contendo uma pequena fração de outros compostos genericamente designados por congêneres (Masino & Montevecchi, 2009; Esteban-Decloux *et al.*, 2014; Jeleń *et al.*, 2010). Alguns destes compostos têm origem na matérias-prima e são designados por aromas primários ou varietais. Os aromas varietais com maior poder odorante são essencialmente os compostos terpênicos, sesquiterpênicos e norisoprenoides (Cacho *et al.*, 2013; Cacho *et al.*, 2012; Lukić *et al.*, 2012; Versini *et al.*, 2012; Hernández-Gómez *et al.*, 2005; Ledauphin *et al.*, 2004). Os álcoois 2-feniletanol e o 1-hexanol também podem ter origem varietal (López-Vázquez *et al.*, 2010; Alonso González *et al.*, 2010).

Durante a fermentação são fornados compostos aromáticos, típicos deste processo, e conhecidos por aromas secundários. Os aromas secundários são principalmente álcoois, ésteres, aldeídos e ácidos de baixo peso molecular. O composto 1-hexanol, também pode ser considerado um aroma secundário, se tiver origem na degradação enzimática de ácidos insaturados do tipo C18 por lipoxigenases. Desta transformação enzimática resultam aldeídos do tipo C6, que por sua vez podem ser reduzidos pelas leveduras a álcoois com o mesmo número de carbonos (López-Vázquez *et al.*, 2010).

No processo de destilação podem ainda formar-se compostos aromáticos resultantes da transformação térmica das pentoses, como por exemplo o furfural (López-Vázquez *et al.*, 2012; González *et al.*, 2010; Apostolopoulou *et al.*, 2005). As aguardentes podem ainda conter compostos aromáticos formados durante o processo de maturação, principalmente se esta for feita em barricas de madeira previamente sujeitas a tratamento térmico. São os designados por aromas de maturação ou terciários (Tsakiris *et al.*, 2014, Caldeira *et al.*, 2008) .

Excluindo o etanol, os compostos voláteis mais abundantes das aguardentes encontram-se em concentrações da ordem de mg/L. A identificação destes compostos é feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A quantificação faz-se normalmente por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), recorrendo a padrões internos como 4-metil-2-pentanol. A quantificação é feita por injeção direta da aguardente (em natureza). Nestas condições quantificam-se os álcoois metanol, 1-propanol, 2-metilo-1-propanol ou isobutanol, isopentanois (2-metilo-1-butanol + 3-metilo-1-butanol), 1-butanol e 2-butanol, o acetato de etilo e o acetaldeído (Rodríguez Madrera *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, 2013; Arrieta-Garay *et al.*, 2013; Versini *et al.*, 2012; González *et al.*, 2011; Da Porto *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010; Ledauphin *et al.*, 2010; Rodríguez Madrera *et al.*, 2010; Versini *et al.*, 2009; Güell & López 2008; Apostolopoulou *et al.*, 2005; Hernández-Gómez *et al.*, 2005; Schehl *et al.*, 2005; Ledauphin *et al.*, 2004; Da Porto *et al.*, 2003; Da Porto, 2002).

A maior parte dos compostos voláteis estão presentes nas aguardentes em concentrações da ordem de µg/L. Os mais comuns são o acetato de isoamilo, acetato de hexilo, 1-hexanol, cis-3-hexeno-1-ol, feniletilálcool ou 2-feniletanol, benzaldeído, furfural, β-damascenona, linalool, geraniol, α-terpineol, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo, tetradecanoato de etilo, hexadecanoato de etilo, linolenato de etilo, linoleato de etilo, ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido decanóico. Outros compostos que possam ser encontrados são mais específicos de cada aguardente. A aguardente de medronho, por exemplo, apresenta como compostos típicos os vitispiranos (Versini *et al.*, 1995a).

Os compostos voláteis das aguardentes são normalmente detetados pelo olfato humano e estão na origem do aroma. No entanto os limiares de perceção são muito diferentes, conferindo a cada composto um poder odorante também muito diferente (Tabelas 1.1 a 1.4). Além disso o aroma da aguardente não é o somatório do efeito individual dos seus componentes. A maioria dos estudos sobre limiares de perceção de compostos voláteis são realizados com soluções aquosas ou em soluções com teores alcoólicos de 10 a 12 % vol. de álcool. Há, no entanto, alguns trabalhos publicados utilizando soluções com 35 % de álcool vol. (Pino *et al.*, 2012) ou com 46 % vol. (Gao *et al.*, 2014), teor mais próximo do das aguardentes. Estes estudos indicam que os limiares de perceção dos álcoois são bastante superiores ao da maioria dos outros compostos, sugerindo que a contribuição dos alcoóis para o aroma das aguardentes é relativamente baixa (Tabela 1.1). O 3-metil-1-butanol, o álcool superior mais abundante, apresenta um

limiar de percepção de 179 mg/L (38,9 g/hl a.p.), enquanto os ésteres (Tabela 1.2) mais aromáticos, como o hexanoato de etilo ou o octanoato de etilo, apresentam 0,055 mg/L (0,012 g/hl a.p.) e 0,011 mg/L (0,0028 g/hl a.p.), respetivamente (Gao *et al.*, 2014). Com poder odorante muito superior surgem os norisoprenoides (Tabela 1.4), compostos derivados da degradação dos carotenóides (Mendes-Pinto, 2009), como a β -damascenona. Este composto apresenta um limiar de percepção de 0,12 μ g/L ($2,6 \times 10^{-5}$ g/hl a.p.) (Gao *et al.*, 2014), isto é, cerca de 100 vezes inferior ao dos ésteres mais aromáticos e 1,5 milhões de vezes inferior ao do álcool superior mais abundante. Estes resultados demonstram a complexidade aromática das bebidas espirituosas e indicam também que a quantificação dos compostos mais abundantes apresenta limitações relativamente à avaliação do aroma de bebidas espirituosas.

Tabela 1.1 - Compostos voláteis de aguardentes e licores – álcoois.

Número	Nome	Fórmula	Limiar de percepção (g/hL a.p.)
1	Metanol	CH ₃ OH	477 ^a
2	Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	24900 ^b
3	1-propanol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	593 ^a
4	Isobutanol	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ OH	6,15 ^c
5	1-butanol	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂ OH	0,59 ^c
6	2-butanol	CH ₃ CH(OH)CH ₂ CH ₃	0,71 ^b
7	Isopentanol	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ OH	39 ^c
8	1-Hexanol	CH ₃ (CH ₂) ₅ OH	5,7 ^a
9	Cis-3-hexeno-1-ol	C ₂ H ₅ CH=CHCH ₂ CH ₂ OH	0,4 ^d
10	Fenil etil álcool	C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ OH	6,28 ^c

^aMoreno *et al.*, 2005; ^b Etanol em água (349,994 mg/L), Pino *et al.*, 2012; ^c Gao *et al.*, 2014; ^dGuth *et al.*, 1997

A maturação em madeira também pode introduzir compostos voláteis em baixas concentrações. Um exemplo é o furfural originado pela torra das madeiras.

Tabela 1.2 - Compostos voláteis de aguardentes e licores – ésteres.

Número	Nome	Fórmula	Limiar de percepção (g/hL a.p.)
11	Acetato de etilo	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	7,087 ^c
12	Lactato de etilo	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	27826 ^c
13	Buatanoato de etilo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	17,72 ^c
14	Acetato de isoamilo	$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	0,020 ^c
15	Succinato dietil	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	142 ^e
16	Acetato hexilo	$\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	-
17	Hexanoato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOC}_2\text{H}_5$	0,012 ^c
18	Octanoato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOC}_2\text{H}_5$	0,003 ^c
19	Acetato de fenilo etilo	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	0,198 ^c
20	Decanoato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOC}_2\text{H}_5$	0,243 ^c
21	Dodecanoato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOC}_2\text{H}_5$	-
22	Tetradecanoato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOC}_2\text{H}_5$	-
23	Hexadecanoato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOC}_2\text{H}_5$	-
24	Linolenato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOC}_2\text{H}_5$	-
25	Linoleato de etilo	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOC}_2\text{H}_5$	-

^cGao *et al.*, 2014; ^eFerreira *et al.*, 2000

Tabela 1.3 - Compostos voláteis de aguardentes e licores - aldeídos e ácidos.

Número	Nome	Fórmula	Limiar de percepção (g/hL a.p.)
26	Acetaldeído	CH_3CHO	7 ^a
27	Furfural	$\text{OC}_4\text{H}_3\text{CHO}$	9,56 ^c
28	Benzaldeído	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$	0,91 ^c
29	Ácido acético	CH_3COOH	34,78 ^c
30	Ácido butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	0,07 ^a
31	Ácido isobutírico	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}_2\text{H}$	0,014 ^a
32	Ácido isovalérico	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH}$	0,228 ^c
33	Ácido benzóico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	0,714 ^f
34	Ácido hexanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	0,548 ^c
35	Ácido octanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	0,006 ^a
36	Ácido decanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	0,011 ^a

^aMoreno *et al.*, 2005; ^cGao *et al.*, 2014; ^fCampo *et al.*, 2006

A vanilina, o eugenol e o guaiacol são outros compostos voláteis, encontrados nas bebidas alcoólicas, com origem na maturação em madeira. Se a madeira for de carvalho as lactonas típicas do carvalho, nomeadamente a cis e trans- β -metil- γ -octalactona, podem também estar presentes. Outros compostos aromáticos ainda relacionados com a madeira são o ácido 4-hidroxi-3-metilbenzóico e o ácido 3,5-dimetil-4-hidroxibenzóico (Rodríguez Madrera *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Ledauphin *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2009, Caldeira *et al.*, 2008) (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 - Compostos voláteis de aguardentes e licores - norisoprenoides, terpenos e compostos da madeira.

Número	Nome	Estrutura	Limiar de percepção (g/hL a.p.)
37	β -damascenona		0,00003 ^c
38	β -ionona		0,00006 ^e
39	Vitispirano		-
40	Limoneno		0,034 ⁱ
41	α pineno		5 ⁱ
42	Mirtenol		14 ⁱ
43	α -terpineol		0,179 ^e
44	Linalool		0,018 ^e
45	Eucaliptol		0,00078 ^h
46	β -Cariofileno		0,064 ^j
47	Guaiacol		0,0095 ^e
48	Vanilina		0,0001 ^g
49	β metil- γ -octalactona		0,658 ^f
50	Eugenol		0,000004 ^a

^aMoreno *et al.*, 2005 ^cGao *et al.*, 2014 ^eFerreira *et al.*, 2000 ^fCampo *et al.*, 2006: (mg/kg em água) ⁱSeideneck & Schieberle, 2011 (mg/kg em água) ^jCui *et al.*, 2010; ^hHerve *et al.*, 2003.

O ácido acético é o ácido volátil mais abundante. A sua determinação é feita pelo doseamento da acidez volátil, que exige uma destilação seguida de titulação. Uma vez que a acidez das aguardentes provém essencialmente deste ácido, a determinação da acidez total faz-se normalmente por titulação sem destilação. Este é também o procedimento exigido pela Legislação Portuguesa para a aguardente de medronho (Decreto-Lei 283 de 26 de Setembro de 2000). Outros ácidos voláteis incluem os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico (Wang *et al.*, 2015; Sampaio *et al.*, 2013; Da Porto *et al.*, 2011; Ledauphin *et al.*, 2006), butírico, isobutírico, isovalérico, dodecanóico (Soufleros *et al.*, 2005), benzóico (Câmara *et al.*, 2007), láctico e succínico (Rodríguez Madrera *et al.*, 2010).

1.3.2 – Compostos voláteis em licores

Quando os licores são preparados com álcool retificado, os voláteis têm apenas origem na matriz vegetal utilizada na maceração. Caso sejam preparados com aguardentes, além dos da matriz vegetal, possuem ainda os provenientes da aguardente utilizada (Galego *et al.*, 2013; Galego *et al.*, 2011). Os voláteis de licores de citrinos e de bagas de murta têm sido objeto de estudos bastante detalhados. Os compostos predominantes são os terpenos α -pineno, limoneno, 1,8-cineol e eucaliptol, e, em menores quantidades, os sesquiterpenos cariofileno e β -bisaboleno (Schipilliti *et al.*, 2013; Galego *et al.*, 2011; Crupi *et al.*, 2007; Tuberoso *et al.*, 2010; Andrea *et al.*, 2003). Os licores de murta apresentam ainda ésteres etílicos de ácidos gordos, nomeadamente palmitato de etilo, linoleato de etilo, linolenato de etilo e estearato de etilo.

A análise dos compostos voláteis dos licores não pode ser feita por injeção direta devido à presença de vários compostos não voláteis, nomeadamente de açúcares e polifenóis. A análise dos compostos voláteis dos licores faz-se após extração líquido/líquido ou por análise do espaço de cabeça (HS) do licor utilizando fibras, SPME, (HS-GC ou HS-SPME-GC), com deteção por FID ou MS. A extração líquido/líquido tem sido feita com misturas 1:1 de éter dietílico/hexano (Tuberoso *et al.*, 2006) ou apenas com hexano (Andrea *et al.*, 2003). A extração com fibras (SPME) é feita por inserção deste material no espaço de cabeça de um vial fechado e contendo um volume fixo de amostra (Schipilliti *et al.*, 2013; Galego *et al.*, 2013; Galego *et al.*, 2011; Crupi *et al.*, 2007).

1.3.3 - Identificação de compostos voláteis

A técnica utilizada na identificação dos compostos voláteis é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Esta técnica alia a alta seletividade e eficiência da separação cromatográfica com colunas capilares com a informação da distribuição das massas dos fragmentos de uma dada molécula, produzida por impacto eletrónico (EI), o espectro de massa.

Os analitos são vaporizados no injetor, separados na coluna cromatográfica e chegam ao detetor onde são fragmentados/ionizados no vácuo. O processo de ionização normalmente utilizado é o impacto eletrónico, com energia de ionização padrão de 70 eV. As moléculas do analito recebem a energia da colisão e podem perder um eletrão, dando origem a um radical-catião molecular (M^+). O ião molecular produzido fica normalmente com excesso de energia e sofre uma série de processos de fragmentação na fase gasosa dando origem a vários fragmentos carregados e não carregados. Os fragmentos carregados são acelerados através de um conjunto de lentes que precedem o separador magnético onde são seleccionados os iões positivos com uma dada razão massa/carga (m/z). Após a separação, os iões, entram no detetor onde é feita a amplificação por forma a gerar um sinal proporcional ao número de iões detetados (Figura 1.11).

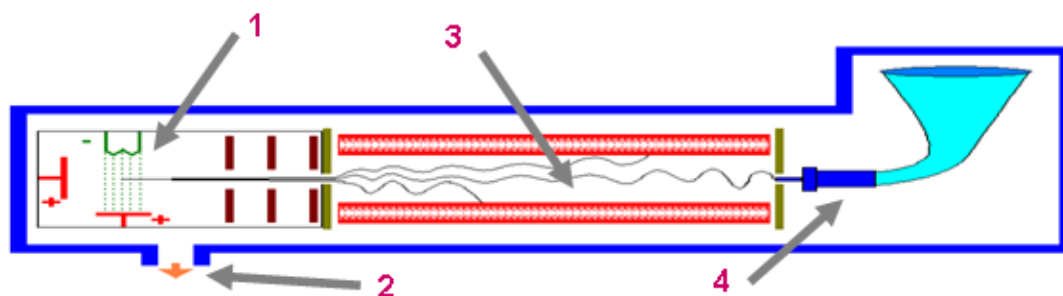


Figura 1.11 - Representação esquemática de um espectrómetro de massa (1 – Câmara de ionização; 2 – Válvula de saída de vácuo; 3 – Separador magnético; 4 – Detetor) - <http://www.kimica.pro.br/4-material-suporte.htm> (30/12/2014).

Os fragmentos gerados são característicos de cada analito, sendo o fragmento mais intenso designado por ião pico base ou simplesmente pico base, correspondendo 100 % de abundância relativa (Dickschat, 2014). A massa e a intensidade relativa dos fragmentos dependem da estrutura da molécula e podem ser apresentados sob a forma de tabela ou graficamente conforme figura (1.12) relativa ao metanol.

Iões	m/z
CH ₃ OH ⁺	32 (ião molecular)
H ₂ C=OH ⁺	31 (pico base)
HC≡O ⁺	29
H ₃ C ⁺	15

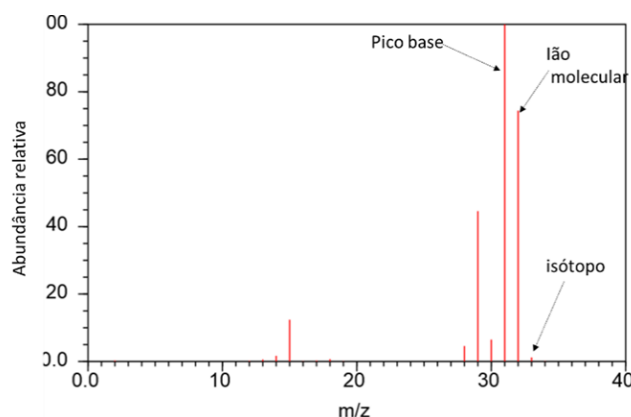


Figura 1.12- Tabela de iões típicos e espectro de massa do metanol - adaptado de <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=67-56-1> (30/12/2014).

Por se tratar de produtos naturais a abundância isotópica encontra-se refletida no espectro de massa. Para o caso do carbono 13 (C^{13}) há 1,08 %, por exemplo (Rouessac & Rouessac, 2000).

Sendo a mesma energia de ionização utilizada na maior parte dos equipamentos, estão disponíveis bibliotecas de espectros que permitem a elucidação e/ou identificação da estrutura de muitos compostos, razão pela qual se tornou a técnica de espectrometria de massa mais usada (Levsen *et al.*, 2007; Gabelica & De Pauw, 2005). Esta técnica está limitada a compostos que vaporizam e são estáveis na fase gasosa e a baixa pressão ($\sim 10^{-3}$ Pa). A outra limitação é a energia interna que a molécula recebe por impacto eletrônico, que pode, para alguns compostos, originar fragmentação extensa e a ausência do ião molecular, informação importante. Esta técnica pode aplicar-se a moléculas de baixo a médio peso molecular (~ 500 Da) e com baixa a média polaridade (Cappiello *et al.*, 2011; Flamini & Traldi, 2010).

A ionização química (CI) é uma técnica alternativa, não usada neste trabalho, e que constitui um processo de ionização para compostos voláteis onde as moléculas do analito são ionizadas indiretamente por reação com um gás reagente (metano, isobutano ou amónia) a pressões da ordem de 10^{-1} Pa. É uma técnica mais suave que o EI e por isso origina menos fragmentos e maior abundância de iões moleculares (Kind & Fiehn 2010; Flamini & Traldi, 2010).

A interpretação dos espectros de massa baseia-se no conhecimento do valor de m/z do ião molecular, no valor de m/z do pico base, na distribuição isotópica, nas ligações

passíveis de fragmentação e/ou nos processos de fragmentação ou rearranjos esperados (Gross, 2004).

Os álcoois superiores são os maiores subprodutos das fermentações alcoólicas (Sampaio *et al.*, 2013; González *et al.*, 2011; Hernández-Gómez *et al.*, 2003) e os seus espectros de massa apresentam, em muitos casos, o íon com m/z 31, comum ao metanol (Jelén *et al.*, 2010) e também ao 1-propanol (Figura 1.13). O pico base forma-se por clivagem da ligação ao carbono que contém o grupo hidroxilo (Figura 1.14).

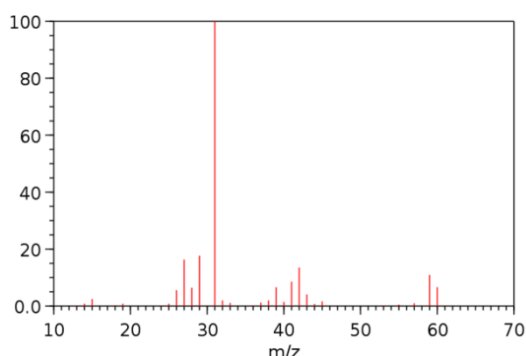


Figura 1.13 -. Espectro de massa do 1-propanol <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=67-56-1> (30/12/2014).

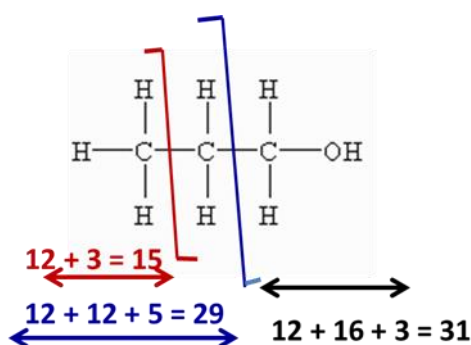
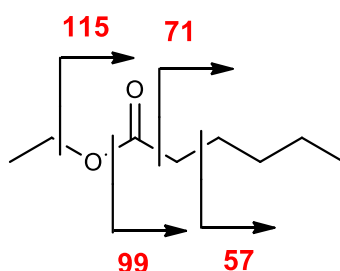


Figura 1.14 - Estrutura molecular e fragmentos prováveis do 1- propanol por impacto eletrónico.

Uma análise equivalente para os ésteres etílicos, compostos característicos das aguardentes, revela vários fragmentos possíveis (Figura 1.15) mas a presença de um sinal a m/z 88, o pico base que caracteriza este grupo de compostos (Cheng, *et al.*, 2014; Jelén *et al.*, 2010; Nobrega, 2003), não se forma por simples clivagem.



$$(8 \times 12) + (16 \times 1) + (2 \times 16) = 144$$

Figura 1.15 - Possíveis fragmentos da molécula de hexanoato de etilo por impacto eletrónico.

O pico base dos ésteres pode ser explicado pelo rearranjo de McLafferty (Figura 1.16). Estes compostos apresentam uma dupla ligação e um átomo de hidrogénio em

posição γ relativamente ao grupo carbonilo (Figura 1.17), as condições necessárias para ocorrer o referido rearranjo (YunFeng & YuanJiang, 2014; Jelén *et al.*, 2010).

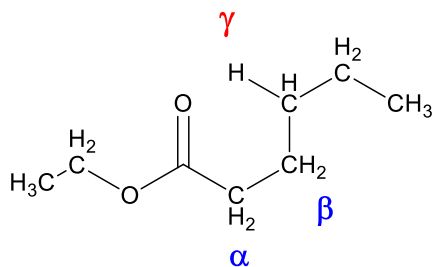


Figura 1.16 – Molécula de hexanoato de etilo com indicação dos carbonos α , β e γ relativamente ao grupo carbonilo.

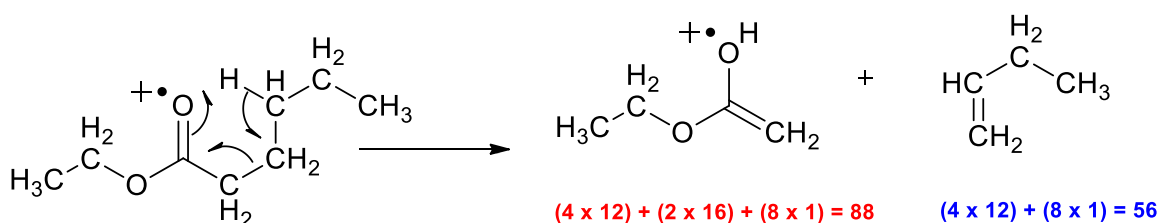


Figura 1.17 - Rearranjo de McLafferty para a molécula de hexanoato de etilo.

Os aromas varietais mais vulgares nas aguardentes e nos licores são normalmente os monoterpenos ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$) e os sesquiterpenos ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) (Arrieta-Garay, *et al.*, 2013; Biernacka & Wardencki, 2012; Cacho *et al.*, 2013; Rodríguez Madrera, *et al.*, 2013; Schipilliti *et al.*, 2013; Vázquez-Araújo *et al.*, 2013; Cacho *et al.*, 2012; López-Vázquez *et al.*, 2012; Pino *et al.*, 2012; Versini *et al.*, 2012; Galego *et al.*, 2011). Muitos monoterpenos são isómeros geométricos, de posição ou óticos e apresentam fragmentos semelhantes (Borsdorf *et al.*, 2005). Mesmo recorrendo à intensidade relativa dos picos subsistem muitas dúvidas na sua identificação, sobretudo quando não há amostras autênticas disponíveis. O pico base de grande parte dos monoterpenos ocorre a $m/z = 93$. O limoneno é uma exceção, pois a sua molécula, embora apresente fragmentos típicos dos outros monoterpenos, tem como pico base $m/z = 68$ (Figura 1.17). Neste caso é a reação de retro Diels-Alder (Castilho, *et al.*, 2008; Harri *et al.*, 1979) que explica as diferenças (Figura 1.18).

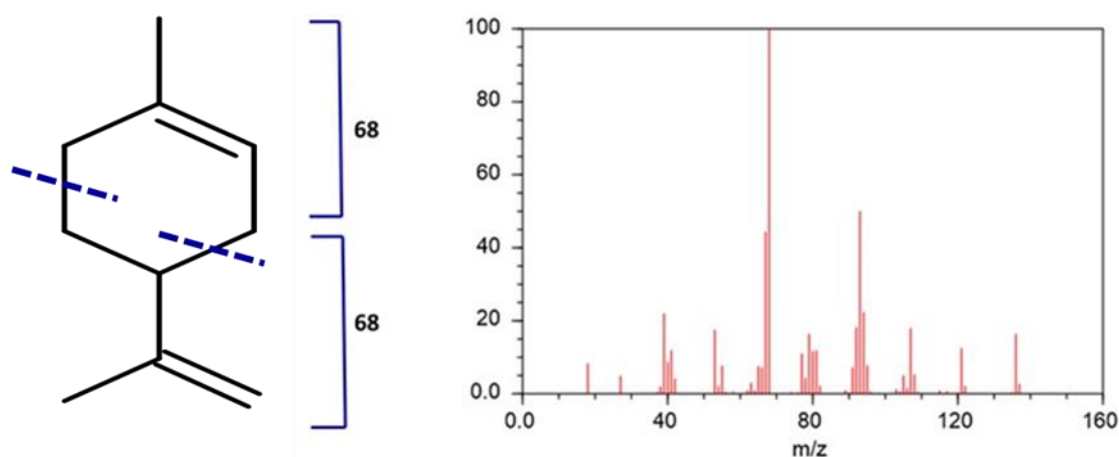


Figura 1.18 - Limoneno com indicação dos principais fragmentos e respetivo espetro de massa - (<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=67-56-1> - 30/12/2014).

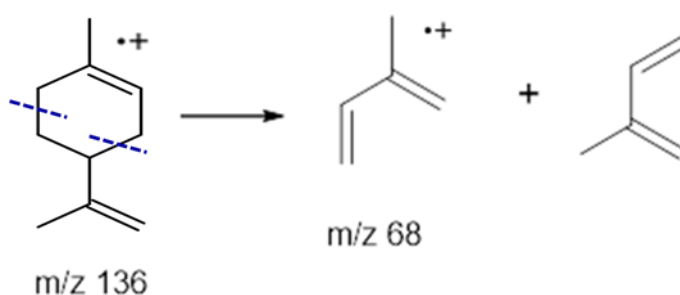


Figura 1.19 - Limoneno com indicação de fragmentos e da reação de retro Diels-Alder.

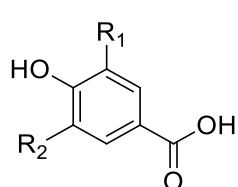
1.4 - Compostos fenólicos nos alimentos

Nas últimas duas décadas os compostos fenólicos ganharam particular importância, após a observação de que as populações consumidoras de alimentos com teores mais elevados destes compostos apresentavam menor risco de contrair algumas doenças, nomeadamente coronárias e cancerígenas (McKay *et al.*, 2015, Khan *et al.*, 2014; Mohamed, 2014). A exploração desta constatação levou a que o estudo destes compostos se generalizasse às mais diversas áreas das ciências biológicas, químicas e bioquímicas, farmacêuticas, alimentares e agrárias. O tema é por isso muito vasto. É feita uma breve abordagem dos compostos polifenólicos mais frequentes nos alimentos, com particular ênfase sobre os compostos da romã.

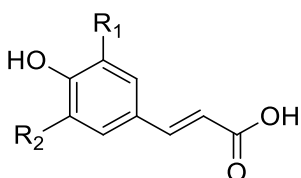
1.4.1 - Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos mais vulgares nos frutos e vegetais são os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Na forma livre os ácidos fenólicos encontram-se em concentrações muito baixas. Em mirtilos, Ayaz e colaboradores (2005) verificaram que o teor de ácidos fenólicos livres é 6,2 % do total de ácidos fenólicos (livres, glicosados, com ligação a ésters ou a outros compostos fenólicos). Estes ácidos podem representar até um terço da dieta em compostos fenólicos (Robbins, 2003).

As estruturas dos ácidos fenólicos mais vulgares em alimentos estão representadas na figura 1.19 (Ignat *et al.*, 2011; Huber & Rupasinghe, 2009; Natell *et al.*, 1999).



$R_1 = R_2 = H$	Ácido 4-hidroxibenzóico
$R_1 = OH \quad R_2 = H$	Ácido protocatecuico
$R_1 = OCH_3 \quad R_2 = H$	Ácido vanílico
$R_1 = R_2 = OCH_3$	Ácido sirínico



$R_1 = R_2 = H$	Ácido p-cumárico
$R_1 = OH \quad R_2 = H$	Ácido cafeico
$R_1 = OCH_3 \quad R_2 = H$	Ácido ferúlico
$R_1 = R_2 = OCH_3$	Ácido sinápico

Figura 1.20 - Ácidos mais frequentes em matrizes de origem vegetal.

A ligação dupla externa ao anel nos ácidos hidroxicinâmicos faz aumentar a ressonância e por isso permite uma maior estabilização radicalar, conferindo a estes compostos um poder antioxidante superior ao dos ácidos hidroxibenzóicos (Natella *et al.*, 1999). Os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se universalmente distribuídos nos produtos de origem vegetal enquanto os ácidos hidroxibenzóicos são característicos de algumas famílias como as Cucurbitaceas (Kubola & Siriamornpun, 2011), as Punicaceas (Fischer *et al.*, 2011) e as Lameaceas (Hossain, *et al.*, 2010).

1.4.2 - Flavonóides

Os flavonóides foram descobertos em 1930 por Szent-György, que extraiu um composto que designou por citrina (posteriormente verificou-se ser uma mistura de flavonas, hesperidina e eriodictiol glicósidos (Scarborough, 1945)) da casca do limão e observou que este extrato tinha a capacidade de regular a permeabilidade dos vasos capilares em humanos. Foi designado por vitamina P, tendo-se verificando mais tarde também não se tratar de uma vitamina (Tapas *et al.*, 2008).

1.4.2.1 - Principais estruturas

Os flavonóides constituem a maior classe de compostos fenólicos das matrizes vegetais. Os flavonóides não glicosados apresentam peso molecular relativamente baixo, 270 a 402 Da, (Lin & Harnly, 2007) e são formados por dois anéis benzénicos ligados por uma ponte de três átomos de carbono, 2, 3 e 4, de acordo com figura 1.21 (Xia *et al.*, 2010; Nassiri-Asi & Hosseinzadeh, 2009).

Os átomos de carbono nos anéis C e A são numerados de 2 a 8 e os do anel B de 2' a 6'. As diferentes subclasses de flavonóides apresentam diferenças no Anel C. Substituições nos diferentes carbonos dos anéis A e C dão origem a diferentes flavonóides da mesma subclasse (Tabela 1.5) (Ignat *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2009; Terrier *et al.*, 2009; Viskupičová *et al.*, 2008). A importância desta classe de polifenóis é de tal ordem que muitos autores consideram os compostos fenólicos divididos em compostos flavonóides e compostos não flavonóides (Crozier *et al.*, 2009; Cheynier, 2005). Pelas suas propriedades potencialmente benéficas para a saúde os compostos flavonóides têm igualmente sido sujeitos a vários estudos de toxicidade, que se têm revelado baixa (Tapas *et al.*, 2008).

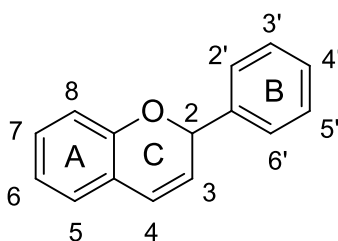
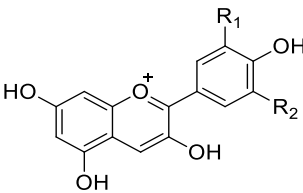
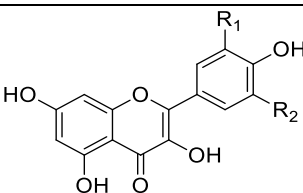
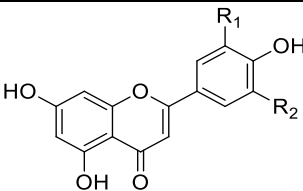
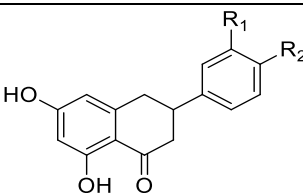
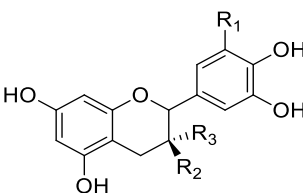
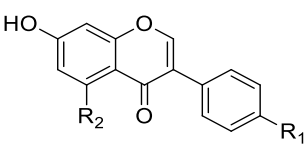


Figura 1.21 - Estrutura base dos flavonóides.

Tabela 1.5 - Subclasses dos flavonóides mais vulgares nos alimentos.

Subclasse	Estrutura geral	Grupos substituintes	Nome
Antocianidinas		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$	Cianidina
		$R_1 = R_2 = \text{H}$	Pelargonidina
		$R_1 = R_2 = \text{OH}$	Delfinidina
		$R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}$	Petunidina
		$R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{H}$	Peonidina
		$R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3$	Malvidina
Flavonóis		$R_1 = R_2 = \text{H}$	Canferol
		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$	Quercetina
		$R_1 = \text{OH e } R_2 = \text{OH}$	Miricetina
		$R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}$	Isoramnetina
Flavonas		$R_1 = R_2 = \text{H}$	Apigenina
		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$	Luteolina
		$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$	Tricina
Flavanonas		$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$	Naringina
		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$	Hesperidina
		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OH}$	Eriodictiol
Flavanóis		$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH e } R_3 = \text{H}$	Catequina
		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$	Galocatequina
		$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{H e } R_3 = \text{OH}$	Epicatequina
		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$	Epigalocatequina
Isoflavonas		$R_1 = R_2 = \text{OH}$	Genisteina
		$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$	Daidzeina

Os flavonóides estão presentes nas matrizes vegetais na forma de glicósidos, isto é, estruturas compostas pelo flavonóide e um glícido, normalmente mono ou dissacarídeo como a glicose, ramnose, galactose, arabinose, xilose ou apiose. Na figura 1.22 está representada a estrutura molecular da quercitrina e da rutina, glicósidos da quercetina. Esses glicósidos formam-se principalmente por ligação de resíduos de D-glicose na

posição 3 e mais raramente na posição 7 dos flavonóides. A catequina e epicatequina são exceções pois podem ser encontradas na forma monomérica, dimérica, trimérica, oligomérica ou polimérica (mais de 6 unidades monoméricas) (Haslam, 2007) sem ligação a glicósidos. Os compostos formados pela união de monómeros designam-se por proantocianidinas. As proantocianinas ou taninos condensados são os responsáveis pela adstringência de vários frutos ou alimentos derivados de frutos (Ignat *et al.*, 2011; D'Achivo *et al.*, 2007; Erdman *et al.*, 2005). As proantocianinas dividem-se ainda em dois grupos: as procianinas derivadas de catequina e epicatequina e as prodelfininas, derivadas das galocatequinas e epigallocatequinas (Tabela 1.5). Os nomes procianidina e prodelfinidina estão ligados ao facto destes compostos originarem respetivamente cianidina e delfinidina por hidrólise ácida.

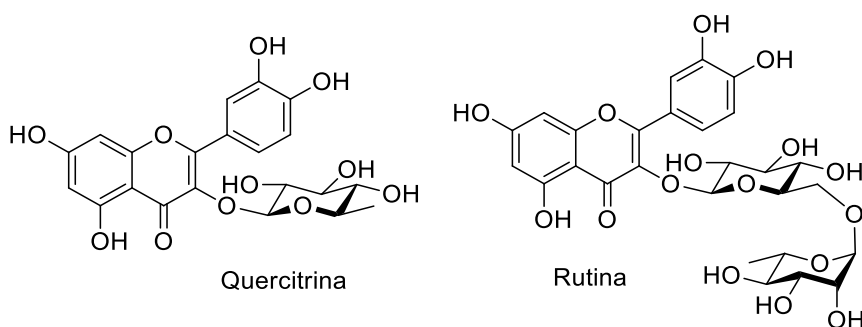


Figura 1.22 - Glicósidos da quercetina.

1.4.2.2 - Antocianinas

São a subclasse de flavonóides mais estudada. Entre 1998 e 2000 foram encontradas 50 novas antocianinas (Harborne & Williams, 2001), mas todas baseadas nos seis cromóforos de antocianidinas mais comuns: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delfinidina. As ligações conjugadas da estrutura das antocianidinas origina absorção de radiação na região visível do espectro electromagnético (entre 510-540 nm), constituindo a base da cor vermelha, azul e púrpura de frutos e vegetais como uvas, mirtilos, morangos, framboesas, amoras, groselhas, cerejas, romãs, ameixas, beringelas e batatas-doces. Estes flavonóides também apresentam absorvância significativa entre 270 e 280 nm (Zafra-Stone *et al.*, 2007). Todas as antocianinas mencionadas fazem parte da dieta diária e a indústria usa-os para produzir sumos, bebidas refrescantes, bebidas alcoólicas, geleias, gelatinas, entre outros produtos alimentares (D'Archivio *et al.*, 2007; Naczki & Shahidi, 2006). Os glicósidos das três antocianidinas

não metiladas (cianidina, delphinidina e pelargonidina) são os mais abundantes na natureza. Na parte edível das plantas 50 % das antocianinas são cianidinas e 12 % são pelargonidina, peonidina e delphinidina. A petunidina e a malvidina têm uma distribuição de 7 % cada na natureza, relativamente ao total de antocianinas (Kong *et al.*, 2003).

A carga positiva das antocianinas faz com que estes flavonóides sejam bons doadores de hidrogénio, sendo por isso antioxidantes mais potentes que outros flavonóides (Kong *et al.*, 2003). Em água, a pH entre 1 e 3, o catião flavílio é a espécie dominante, sendo responsável pela cor vermelha. À medida que o pH vai aumentando o catião flavílio forma as bases quinóides de cor violeta e o hemiacetal, incolor (Figura 1.23). A pH superior a 9 as bases quinóides ionizam formando um composto de cor azul-escuro. A pH 12-13 o hemiacetal origina as chalconas que têm cor amarela (Malien-Aubert *et al.*, 2001). A trans-chalcona pode formar-se a partir da cis-chalcona por fotoisomerização (Pina *et al.*, 2012).

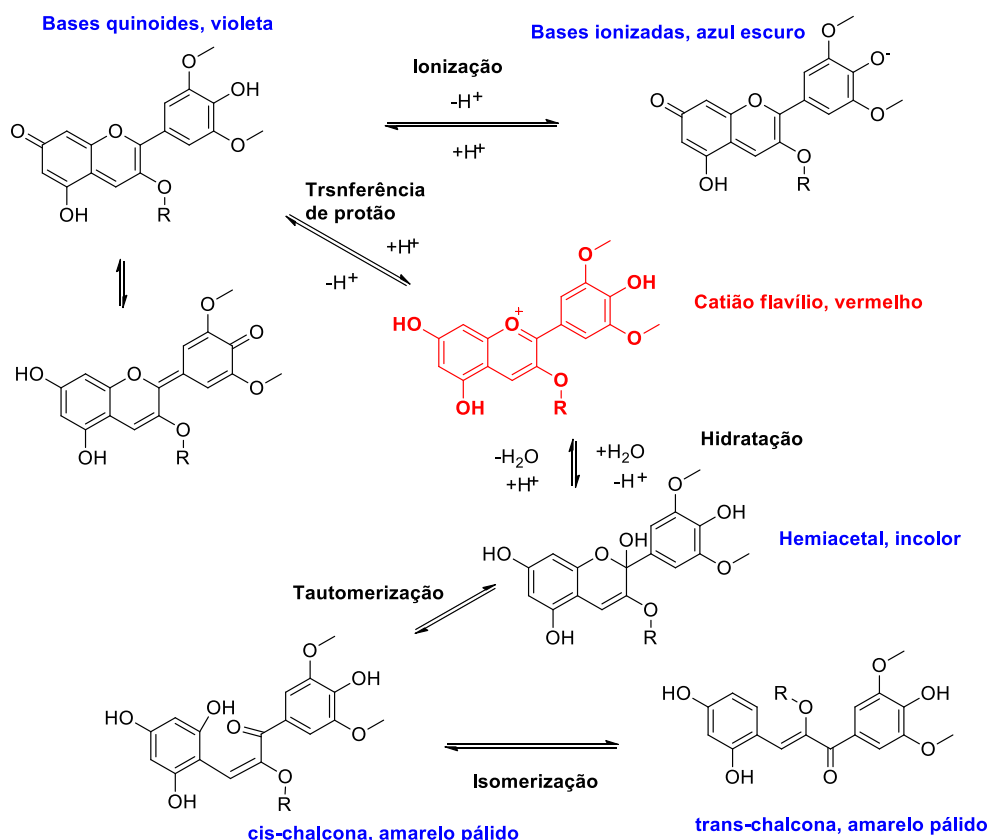


Figura 1.23 - Transformação do catião flavílio em solução aquosa. Foi utilizada a estrutura da malvidina como exemplo. Esquema baseado nas referências (Pina *et al.*, 2012; Malien-Aubert *et al.*, 2001; Pina, 2000).

A estabilização das antocianinas tem sido objeto de muitos estudos no sentido da sua utilização como corantes naturais para alimentos ou para produtos farmacêuticos (Douglass & Baker, 2008). A interação com outros pigmentos, processo conhecido por co-pigmentação, é um fator de estabilização, nomeadamente em vinhos (Schwarz *et al.*, 2005; Salas *et al.*, 2004; Eiro & Heinonen, 2002). Este processo está também presente em condições naturais como por exemplo nos vacúolos das plantas, onde o pH é 7 e a cor intensa azul ou vermelha é atribuída à formação de complexos entre as antocianinas e outros flavonóides, fenóis ou iões metálicos como Al^{3+} ou Mg^{2+} (Douglas *et al.*, 1994). Os outros pigmentos que formam ligações não covalentes com as antocianinas podem contribuir para estabilizar a sua cor, nomeadamente em meios insuficientemente ácidos (Davies & Mazza, 1993). Esta associação protege da hidrólise ficando assim reduzida a perda de cor. Dependendo da origem e dos co-pigmentos, a interação desloca a absorção para maiores comprimentos de onda (efeito batocrómico) e faz aumentar a intensidade de absorção (efeito hiperocrómico) (Gonzálves-Manzano *et al.*, 2008; Macz-Pop, *et al.*, 2006).

1.4.2.3 - Outros flavonóides

Os flavonóis são os compostos fenólicos mais universalmente distribuídos nos alimentos, sendo a quercetina a mais representativa, na forma O-glicosada na posição 3 (D'Archivio *et al.*, 2007; Escarpa & Gonzales, 2001a). Estes flavonóides podem ser encontrados nas cebolas (mais de 1,2 g/kg de produto fresco), no alho-porro e nos brócolos. O chá e o vinho tinto também contêm teores superiores a 45 e 30 mg/L respetivamente. A formação destes compostos é estimulada pela luz e, portanto, para a mesma espécie, varia com a localização geográfica, a exposição ao sol, e a estação do ano (D'Archivio *et al.*, 2007).

As flavanonas estão presentes em concentrações apreciáveis nos citrinos. Kelebek e colaboradores (2008) encontraram valores médios de flavanonas em sumo de laranja de 181 mg/L para a variedade Moro e de 151 mg/L para a variedade Sanguinello. Também no sumo de laranja foram determinadas concentrações entre 200 e 600 ng/L de hesperidina. A laranja completa apresenta, no entanto, 5 vezes mais flavanonas do que o sumo porque o albedo (parte branca) e as membranas de separação dos gomos têm teores elevados em flavanonas (6024 µg/g de massa seca de hesperidina em laranjas da cultivar Scalbert Valencia) (Goulas & Mangararis, 2012). As principais agliconas (estruturas sem

glícido) são a hesperidina e a naringenina (Crozier *et al.*, 2009; Erdman *et al.*, 2005). São moléculas não planares com um centro quiral em C₂. A flavanona mais comum é a hesperidina-7-O-rutinósido (Figura 1.24) (Crozier *et al.*, 2009). As flavanonas encontram-se também no tomate e na aveia (Lee *et al.*, 2013).

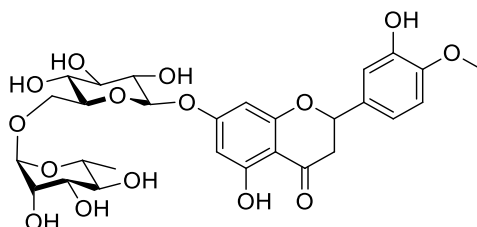


Figura 1.24 - Estrutura molecular da hesperidina-7-O-rutinósido.

As catequinas são os flavanóis mais vulgares (Crozier *et al.*, 2009). Encontram-se nos alperces (250 mg/kg de fruta fresca), nas cerejas (250 mg/kg), no chá verde (mais de 800 mg/L), no chocolate (600 mg/L) e no vinho (300 mg/L) (D'Archivio *et al.*, 2007). As proantocianidinas são mais difíceis de quantificar porque podem apresentar diferentes graus de polimerização. Na cidra, por exemplo, estão presentes polímeros de 4 e até de 11 monómeros (Guyot *et al.*, 2001).

As chalconas possuem coloração amarela e não apresentam o anel C (Figura 1.21). Têm atividade biológica (Dornas *et al.*, 2007) e podem resultar da variação de pH das antocianidinas, de acordo com o descrito para o catião flavílio (Figura 1.23).

As auronas podem ser definidas como cetonas α - β insaturadas. Estes compostos apresentam atividade biológica (Dornas *et al.*, 2007). São dos flavonóides menos reportados em alimentos.

1.4.3 -Taninos

Estes polifenóis apresentam massas moleculares que variam entre 0,5 e 3 kDa (Bhardway *et al.*, 2003). Apresentam diversos efeitos biológicos. São potentes sequestradores de metais, agentes de precipitação de proteínas e antioxidantes. A diversidade de estruturas associada à grande variedade de matrizes biológicas onde são possíveis de se encontrar torna difícil desenvolver um modelo que preveja o seu efeito (Ignat *et al.*, 2011). São quimicamente muito reativos, formam pontes de hidrogénio intra e intermoleculares. Uma mole de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas (Monteiro *et al.*, 2005). A designação tanino refere-se à capacidade que estes compostos

têm de interagir, reagir ou precipitar proteínas. Os taninos podem ser agrupados em quatro classes: hidrolisáveis, condensados (mais vulgares nos alimentos), florotaninos (encontrados nas algas marinhas castanhas), e os taninos complexos que formam estruturas que contêm elementos de diferentes grupos de taninos e outras macromoléculas (Serrano *et al.*, 2009).

1.4.3.1 - Principais estruturas

Os taninos hidrolisáveis libertam taninos elágicos ou taninos gállicos por hidrólise ácida, básica ou enzimática. O centro de uma molécula de tanino hidrolisável é normalmente constituído por um açúcar (geralmente D-glicose) ou um poliol, e um número variável de moléculas de ácidos fenólicos, nomeadamente de ácido gállico (Figura 1.25), de ácido hexa-hidroxidifénico (HHDP) (Figura 1.26) e seus derivados, como o ácido desidro-hexa-hidroxidifénico (DHHDP) (Figura 1.27). Os taninos que estão ligados com ácido gállico por ligações éster formam galhotaninos, como por exemplo a pentagaloliglicose (Figura 1.29). Os derivados dos ácidos hexa-hidroxidifénicos e desidro-hexa-hidroxidifénicos originam os taninos elágicos ou elagitaninos (Figuras 1.29 e 1.30) porque o ácido hexa-hidroxidifénico lactoniza de forma espontânea em solução aquosa, originando ácido elágico (Figura 1.29) (Silva, 2010, Khanbabaee & Ree, 2001).

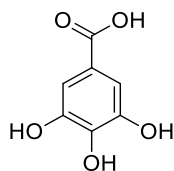


Figura 1.25 - Estrutura do ácido gállico.

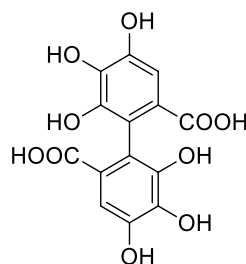


Figura 1.26 - Estrutura do ácido hexa-hidroxidifénico (HHDP).

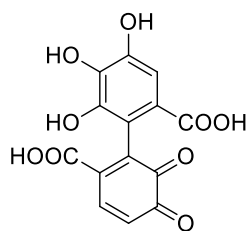


Figura 1.27 - Estrutura do ácido desidro-hexa-hidroxidifênico (DHHDP).

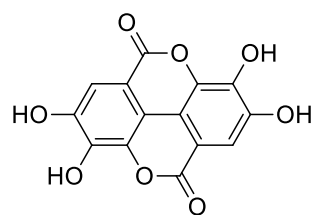


Figura 1.28 - Estrutura do ácido elágico.

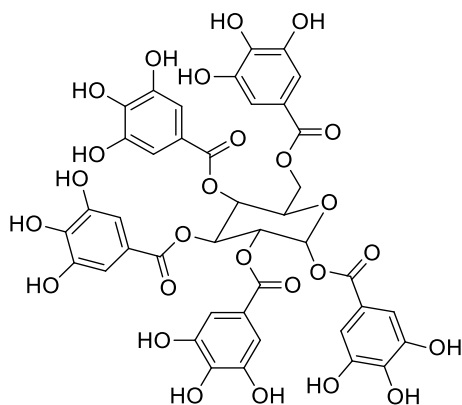


Figura 1.29 - Estrutura do tanino pentagaloilglicose.

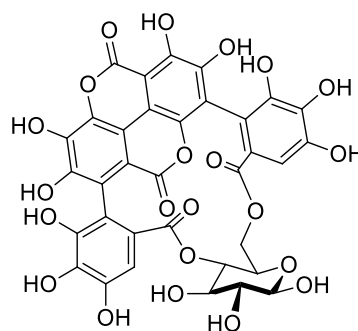


Figura 1.30 - Estrutura da punicalina.

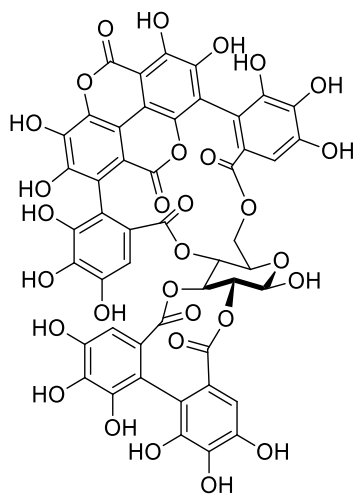


Figura 1.31 - Estrutura da punicalagina.

As proantocianinas são taninos condensados e classificam-se de acordo com as ligações entre as unidades monoméricas. Se as ligações entre estas unidades ocorrerem entre os carbonos C₄-C₆ ou C₄-C₈ designam-se por proantocianinas tipo B, enquanto que se forem entre C₂-O-C₇ ou C₂-O-C₅, além das C₄-C₆ ou C₄-C₈ designam-se por proantocianinas tipo A, (Figura 1.32). As proantocianinas do tipo A são menos frequentes nos alimentos e por isso menos estudadas (Cheynier, 2005).

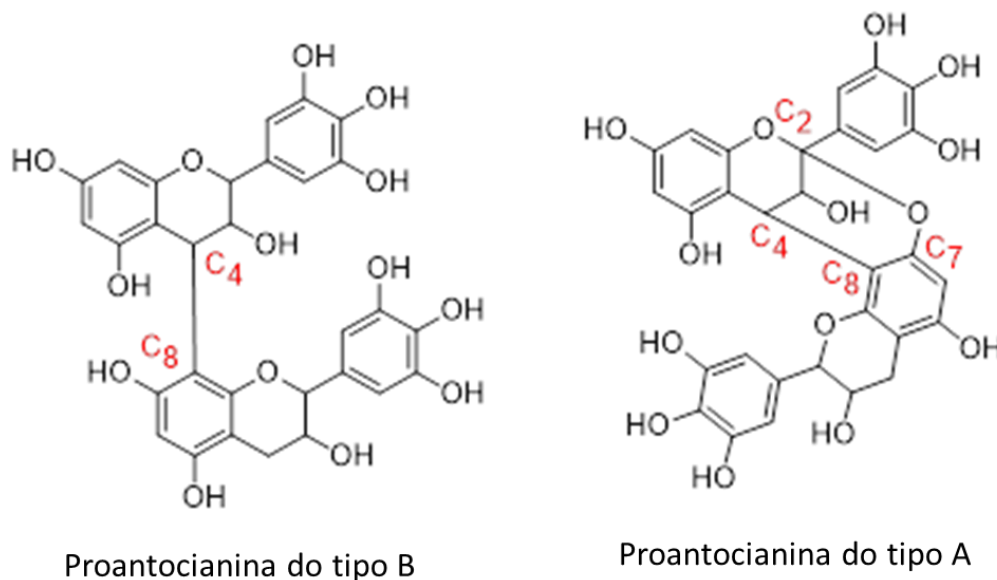


Figura 1.32 - Proantocianinas Tipo B e Tipo A.

À semelhança da classificação mencionada para as proantocianinas diméricas em tipo A e tipo B, e dependendo da ligação das unidades flavanólicas, as proantocianinas triméricas também podem ser classificadas de acordo com as suas ligações. Se a estrutura possui ligações C₄-C₆ ou C₄-C₈ designa-se por proantocianinas tipo C, (Figura 1.33); se as ligações se efetuarem entre C₂-O-C₇ ou C₂-O-C₅, além das C₄-C₆ ou C₄-C₈, designa-se por proantocianinas tipo D.

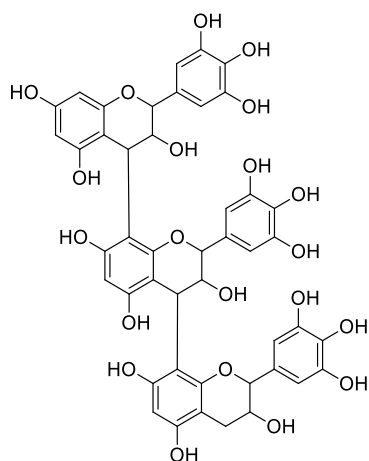


Figura 1.33 - Proantocianina trimérica do tipo C.

Oligômeros e polímeros de proantocianinas podem resultar da condensação de várias unidades de flavanóides com ligações em geral do tipo C₄-C₆ ou C₄-C₈, como mostra o exemplo representado pela figura 1.34.

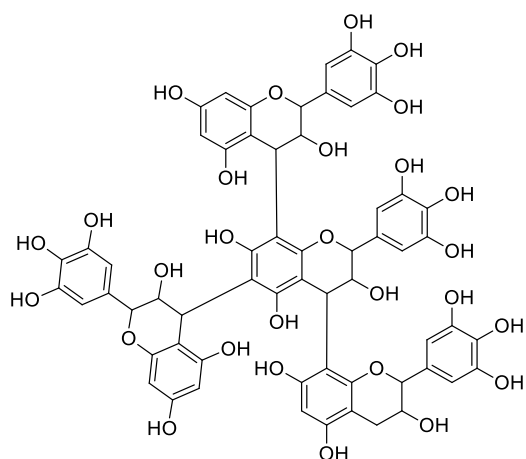


Figura 1.34 - Proantocianina com estrutura oligomérica.

Os taninos condensados de grandes dimensões apresentam menor solubilidade em água (Escarpa & Gonçalves, 2001a). Nas uvas os taninos mais comuns são as procianidinas (Sun *et al.*, 2001), o mesmo acontecendo na maioria das outras frutas (Ignat *et al.*, 2011). Ainda nas uvas os flavanóis mais abundantes são as catequinas e as epicatequinas (flavan-3-ols) (Antoniolli *et al.*, 2015).

1.4.3.2 - Distribuição de taninos nos alimentos

Os taninos condensados e as proantocianinas, encontram-se principalmente nas películas dos frutos e na cobertura das sementes. Alguns legumes, nozes e cereais também os apresentam, mas em menores quantidades (Serrano *et al.*, 2009). Os taninos hidrolisáveis podem encontra-se na forma de galhotaninos e de elagitaninos. Os galhotaninos estão presentes principalmente na parte lenhosa e herbácea das plantas dicotiledóneas. Os elagitaninos encontram-se em muitos frutos, particularmente nas películas das bagas e nos derivados feitos com esses frutos como compotas, sumos ou geleias. As nozes, amêndoas, amendoins, castanha de caju, romã (fruto e sumo), maçãs vermelhas, peras verdes ou castanhas, uvas brancas ou pretas, vinhos envelhecidos em madeira de carvalho, kiwis ou ameixas azuis são igualmente fontes de elagitaninos (Serrano *et al.*, 2009).

1.4.4 - Estilbenos

Os estilbenos são uma subclasse de compostos fenólicos não flavonóides presentes nas uvas ($0,41 \pm 0,29$ mg/kg) e consequentemente nos vinhos ($0,10 \pm 0,08$ mg/L) (Gómez-Alonso *et al.*, 2007). Formam-se como resposta ao *stress*, nomeadamente por ataques microbianos e por radiação UV (Gresele *et al.*, 2011; Buiarelli *et al.*, 2007). Devido ao seu potencial antioxidante, anti-carcinogénico e anti-mutagénico, têm um importante papel para a saúde (Buiarelli *et al.*, 2007; Guebailia *et al.*, 2006). O estilbeno mais estudado é o resveratrol (Figura 1.35).

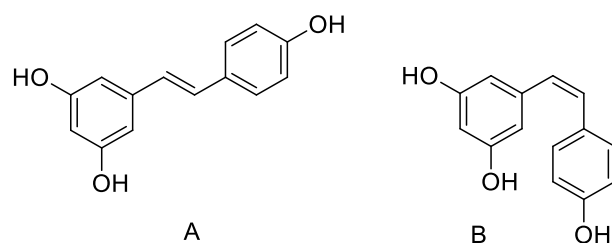
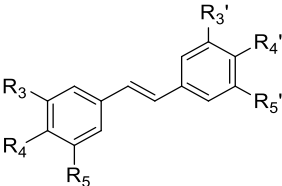


Figura 1.35 - Trans-resveratrol (A) e cis-resveratrol (B).

O resveratrol foi classificado inicialmente como uma fitoalexina, isto é, um composto tóxico produzido pelas plantas, em resposta a infeções ou outros fatores de

stress como privação de nutrientes (Gresele, *et al.*, 2011). O resveratrol também se encontra na forma polimérica como por exemplo o viniferin. Na tabela 1.6 estão representados outros estilbenos reportados em matrizes vegetais (Jerkovic *et al.*, 2010; Guebailia *et al.*, 2006).

Tabela 1.6 - Estruturas de estilbenos.

Estrutura geral	Grupos substituintes						Nome
	R3	R4	R5	R'3	R'4	R'5	
	H	H	H	OH	H	OH	Pinosilvina
	OH	H	OH	OH	OH	H	Piceatanol
	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	Trans pterostilbeno
	OH	H	OH	H	OCH ₃	OH	Rapontienina
	OH	H	OH	OC	OH	H	Isorapontienina
	H ₃						
	Glicósido	H	OH	H	OH	H	Trans-piceida
	Glicósido	H	OH	OH	OH	H	Astringina

As principais fontes de estilbenos são as uvas (cis e trans-resveratrol, trans-pterostilbeno; rapontienina, trans-piceide) mas também se encontram no ruibarbo (rapontienina, trans-piceide) e algumas espécies de pinheiros (*Pinus strobus* – Pinosilvina; *Picea abies* – Piceatanol e Astringina).

1.4.5 - Polifenóis e o poder antioxidante

Compostos fenólicos são compostos contendo o fenol como estrutura base. São por isso aromáticos, possuindo pelo menos um anel benzénico ligado a um ou mais grupos hidroxilo (Robbins, 2003; Bravo, 1998). A ligação de fenóis simples (C₆) forma os polifenóis, que constituem um grupo estruturalmente muito diversificado e onde se incluem ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico (C₆-C₁) e do ácido cinâmico (C₆-C₃)), cumarinas, isocumarinas e cromonas (C₆-C₃), naftoquinonas (C₆-C₂), benzofenonas, xantonas (C₆-C₁-C₆), estilbenos, antraquinonas (C₆-C₂-C₆), flavonóides (flavanonas, flavonóis, antocianidinas, chalconas, flavanóis, auronas, flavonas e isoflavonas) (C₆-C₃-C₆), lenhinas (C₆-C₃)_n, lignanas (C₆-C₃-C₃-C₆)), biflavonóides, biflavanos (C₆-C₃-C₆)₂, taninos condensados ou proantocianinas (C₆-C₃-C₆)_n e taninos hidrolisáveis (C₆-C₁)_n

(Garcia-Salas, *et al.* 2010; Nacz & Shahidi, 2006; Nacz & Shahidi, 2004; Hollman, 2001).

Segundo Leopoldini e colaboradores (2011) os polifenóis podem ser considerados antioxidantes primários e nestas condições podem desativar os radicais livres principalmente por 3 mecanismos. Num primeiro mecanismo essa inativação é feita transferindo um átomo de hidrogénio do polifenol (antioxidante) para o radical ocorrendo uma rotura homolítica da ligação O-H, figura (1.35). Um segundo mecanismo consiste apenas na transferência de um eletrão do composto fenólico para o radical livre. O terceiro mecanismo antioxidante dos polifenóis está relacionado com a sua capacidade de sequestrar iões dos metais de transição, formando complexos estáveis.

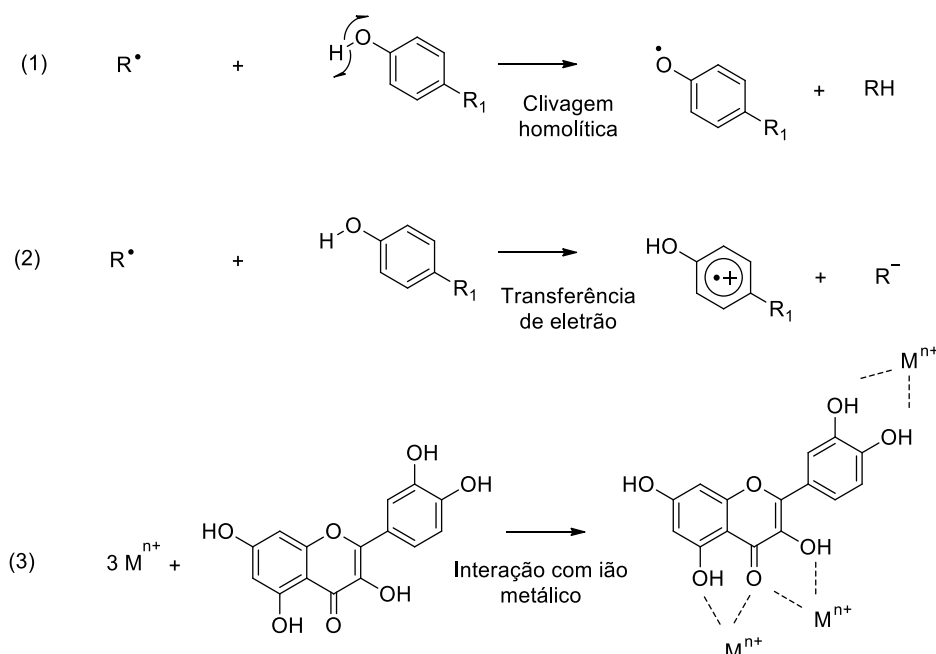


Figura 1.36 - Mecanismos de actividade antioxidante dos polifenóis (Leopoldini *et al.*, 2011).

Essa capacidade depende do número de grupos hidroxilo e da conjugação nos diferentes compostos, propriedades que contribuem para que possam funcionar como sequestradores de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da peroxidação lipídica (Escarapa & Gonzalez, 2001b; Shahidi *et al.*, 1992). São estas características que conferem propriedades antioxidantes aos alimentos de que fazem parte (Ignat *et al.*, 2011).

Estas substâncias fitoquímicas, largamente distribuídas no reino vegetal, são referidas como resultantes de metabolitos secundários ou intermédios do metabolismo primário da fotossíntese (Ogah *et al.*, 2014; Cavalcanti *et al.*, 2011; Crozier *et al.*, 2010;

Crozier *et al.*, 2009; Proestos & Komaities, 2008; Robbins, 2003; Sellappan *et al.*, 2002; Escarpa & Gonzalez, 2001a; Bravo, 1998). Alguns destes compostos também são gerados pelas plantas como resposta a agressões do meio ambiente, como predadores, agentes patogénicos ou radiação ultravioleta (Harnly *et al.*, 2007; Naczki & Shahidi, 2004; Harborne & Williams, 2000; Drynan *et al.* 2010), estando por isso envolvidos na defesa das plantas contra agentes externos (Yu *et al.*, 1999).

As várias famílias de polifenóis não se encontram distribuídas do mesmo modo na natureza. Os ácidos fenólicos, bem como os compostos flavonóides, estão universalmente distribuídos em alimentos de origem vegetal (Escarpa & González 2001a). No entanto, os estilbenos e os taninos encontram-se a em alimentos específicos (D'Archivio *et al.*, 2007; Escarpa & González; 2001a; Scalbert & Williamsom, 2000) como as uvas e o vinho.

Embora muitos autores não considerem os polifenóis como nutrientes, eles fazem parte da dieta humana, particularmente da dieta mediterrânica, e são determinantes da qualidade de alimentos de origem ou derivados, afetando a sua aparência, gosto, aroma, possuindo ainda a já referida ação potencialmente benéfica para a saúde (Nicolletti *et al.*, 2007, Harnly *et al.*, 2007; Cheynier, 2005; Cai, *et al.*, 2004, Tomás-Barbeán & Espín, 2001a; Simón *et al.* 1992). Vários estudos epidemiológicos indicam que uma dieta rica em vegetais está relacionada com a redução de doenças coronárias (Huber *et al.*, 2009; Harnly, 2007) ou de outras patologias (Ignat *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2010; Crozier *et al.*, 2009; Cos *et al.*, 2008; Robbins, 2003; Hollman, 2001; Clifford, 2000; Wang *et al.*, 1997). O caso do vinho, particularmente o vinho tinto, tem sido o mais mediático (Goldberg & Soleas, 2011; Nishizula, *et al.*, 2011; Klatsky, 2010; Belleville, 2002). A associação feita entre a baixa taxa de incidência de doenças coronárias em França com o consumo de vinho neste país deu origem ao chamado “Paradoxo Francês”. De facto, Renault e De Lorgeril publicaram em 1992 resultados indicando uma baixa taxa de doenças coronárias na população francesa comparativamente com outras populações do norte da Europa e da América, com hábitos de vida semelhantes, nomeadamente com dietas ricas em gorduras, hábitos tabágicos e pouco exercício físico (Leopoldini, 2011; Tapas *et al.*, 2008; Lange, 2006). A explicação para este facto foi encontrada no moderado consumo de vinho tinto, rico em compostos fenólicos, que os franceses diariamente ingerem (Tapas *et al.*, 2008; Frankel *et al.*, 1993). Os estudos relativos à associação entre estes compostos e a saúde generalizaram-se (Davis *et al.* 2011; Huang *et al.* 2010; Komes *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010; Cos *et al.*, 2008; Fresco *et al.* 2006; Hollman, 2001). Estudos da biodisponibilidade

destes compostos (Borges *et al.*, 2010; Buendía *et al.*, 2010; Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010; Llorach *et al.*, 2008; Aaby *et al.*, 2007; Surveswaran *et al.*, 2007; Nacz & Shahidi, 2006; Tomás-Barberán *et al.*, 2001a; Tomás-Barberán *et al.*, 2001b; Clifford, 2000), bem como a sua nutrição e utilização na alimentação (Servili *et al.*, 2011; Cerezo *et al.*, 2010; Troszyńska *et al.*, 2010; Amarowicz *et al.*, 2009; Budić-Leto, 2008; Lorgil & Salen, 2008; D'Archivio *et al.*, 2007; Cheynier, 2005; Esparca & Gonzalez, 2001a; Escarpa & Gonzalez, 2001b; Simón *et al.*, 1992), estão generalizados na literatura. Paralelamente têm sido publicados numerosos trabalhos sobre processos de extração e de quantificação destes compostos (Jerkovic, *et al.*, 2010; Serçe, *et al.*, 2010; Mandalari, *et al.*, 2010; Mousavinejad, *et al.*, 2009; Luthria *et al.*, 2006; Paragiannopoulos *et al.*, 2004; Tomás-Barberán *et al.*, 2001a; Silva, *et al.*, 2000; Häkkinen *et al.*, 1998).

A indústria alimentar, limitada pela potencial toxicidade dos corantes sintéticos, tem procurado nos compostos fenólicos naturais novas fontes de ultrapassar a aplicação de compostos sintéticos, o que vem revolucionado a produção de alimentos funcionais com base nos potenciais benefícios dos mesmos para a saúde (Valls *et al.*, 2009; Bleve *et al.*, 2008). As principais fontes de compostos fenólicos são as frutas, os vegetais e as bebidas como o chá ou o vinho tinto (D'Archivio *et al.*, 2007).

1.5 - Estruturas supramoleculares na área alimentar

As interações não covalentes e o reconhecimento molecular são conceitos conhecidos desde os finais do século XIX, quando Villiers e Hebd descobriram as ciclodextrinas e respetivos complexos de inclusão (1891), Werner introduziu o conceito de química de coordenação (1893), Fisher o conceito de chave-fechadura (1894) e Ehrlich a interação substrato-recetor (1906) (Baytekin *et al.*, 2006). No entanto, a área da química supramolecular, só se desenvolveu quando Jean-Marie Lehn introduziu o conceito de “supramolécula”. A química supramolecular, ou “química para além da molécula”, estuda as interações intermoleculares, que levam à formação de agregados moleculares com arquiteturas complexas (Lehn, 2007). Foi o desenvolvimento desta área, que esteve na origem da atribuição do prémio Nobel da Química aos investigadores J-M Lehn, D. J. Cram e C. J. Pedersen (Jin *et al.*, 2013), em 1987. É uma área multidisciplinar que aborda as interações não covalentes com o objetivo de determinar propriedades ou funcionalidades de agrupamentos de moléculas, que possam apresentar aplicações práticas em diversas áreas do conhecimento (Brockgreitens & Abblas, 2015;

Ramamurthy *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2013; Uhlenheuer *et al.*, 2010; Araki & Toma, 2002). A formação das supramoléculas pode envolver interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogénio ou combinação destas interações que conduzam à união de duas ou mais moléculas (Lehn, 1978).

As aplicações das interações supramoleculares incluem, o reconhecimento molecular, ligações seletivas, encapsulamento, permuta iónica, desenvolvimento de recetores e de sensores, estratégias de administração de fármacos, catálise, bio-mimética, dispositivos eletrónicos e/ou mecânicos à nano escala (Pastor *et al.*, 2008).

A partir do estabelecimento das bases da química supramolecular, a interação – hospedeiro-hóspede (*host-guest*) despertou muita atenção no meio científico e industrial, sendo atualmente um tema de investigação de topo, nomeadamente em síntese orgânica e inorgânica, para aplicação em diversas áreas do conhecimento (Zhang & Zhao, 2013; Pastor & Martínez-Viviente, 2008). Porém, a natureza fraca destas interações, torna difícil prever as estruturas supramoleculares estáveis (Qi *et al.*, 2015).

Do conjunto de supramoléculas conhecidas, analisaremos neste trabalho dois tipos, que apresentam estrutura macrocíclica, as ciclodextrinas e os cucurbiturilos, figura 1.37 (Ahmed *et al.*, 2015; Barooah *et al.*, 2012; Chernikova *et al.*, 2012), pelas suas aplicações diretas na área alimentar ou indiretas na análise de compostos em alimentos.

As ciclodextrinas (CDs) foram isoladas pela primeira vez por Villiers em 1891 (Leemhuis *et al.*, 2010; Venturini *et al.*, 2008). Estes oligossacáridos cíclicos resultam da degradação enzimática do amido, originado por bactérias (Oliveira *et al.*, 2009). As ciclodextrinas nativas são uma família de oligossacáridos cíclicos compostos por unidades de α -D-glucopiranos, nomeadamente 6, 7, ou 8 unidades, e designadas por α CD, β CD e γ CD, respetivamente. As unidades glicosídicas estão unidas por ligações α -1-4 (Prochowicz, *et al.*, 2016, Chung *et al.*, 1990). A sua estrutura tridimensional é troncocónica e apresenta uma cavidade central, de acordo com a figura 1.37 (A). Os grupos hidroxilo exteriores conferem-lhes características hidrofílicas e a cavidade interior tem um caráter hidrofóbico e apolar, permitindo a encapsulação de uma grande variedade de moléculas hidrofóbicas por formação de complexos de inclusão (Mura, 2015). As ciclodextrinas foram aceites como aditivo alimentar pela Comunidade Europeia em 2008 (β -ciclodextrina (E 459) - Diretiva 2008/84/CE). Estão reportadas aplicações em embalagens alimentares ativas, podendo estar na origem de mudança visível de cor como resultado, por exemplo, de uma variação de pH ou de temperatura (Brockgreitens &

Abblas, 2015). Outras aplicações já estudadas são o aumento do tempo de vida das antocianinas em sumo de frutos, durante a pasteurização ou durante o período de armazenamento (Lapshova *et al.*, 2015) e o encapsulamento de ingredientes lipofílicos, para estabilizar o aroma, vitaminas, cores ou gorduras insaturadas (Szent & Szeythi, 2004). Como técnica de análise, no maior ingrediente alimentar, a água, foi aplicado na quantificação de quantidades reduzidas de cobre (Yilmaz & Soylak, 2014). São ainda utilizadas como fase estacionária de colunas de HPLC para separação de moléculas quirais (Venturini *et al.*, 2008).

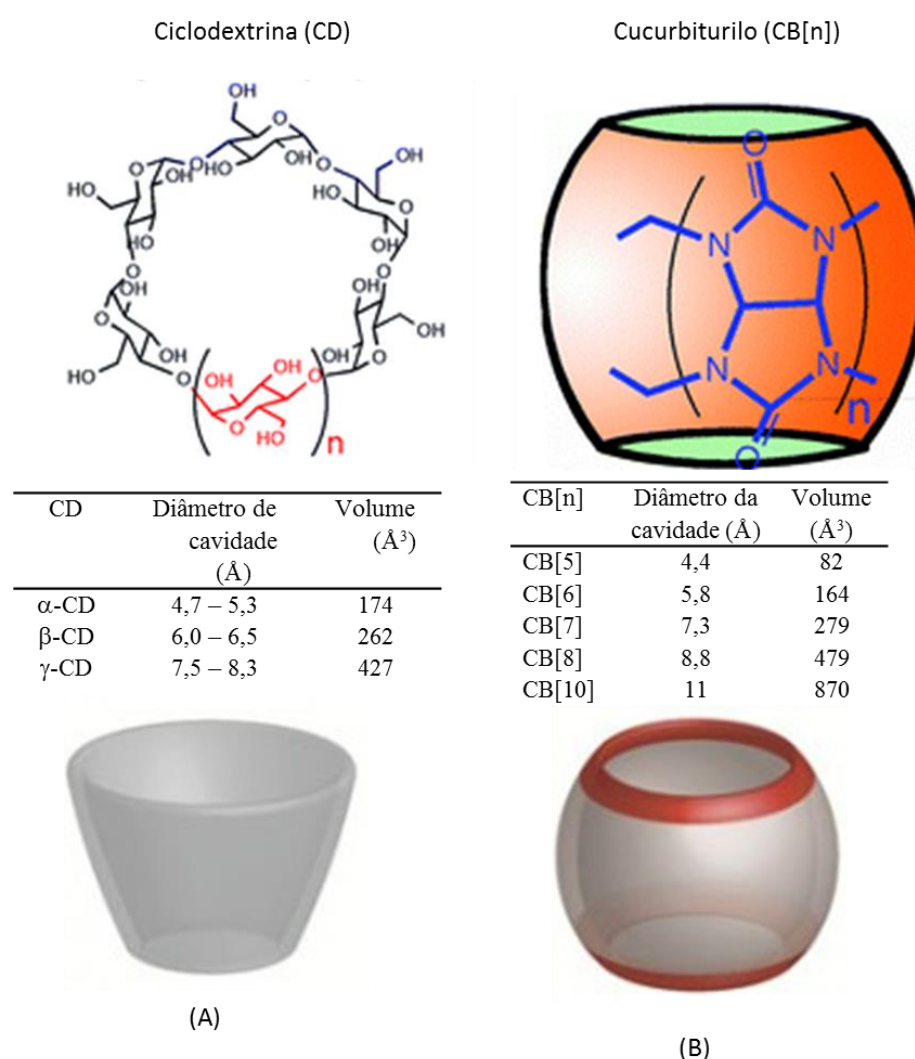


Figura 1.37 – Estrutura e propriedades das ciclodextrinas (A) e dos cucurbiturilos (B). Adaptado de Barooah *et al.*, 2012 e Kim *et al.*, 2004.

Os cucurbiturilos, CB[n], são outra família de macrociclos apresentando maior simetria que as ciclodextrinas, figura 1.37 (B) (González-Álvarez *et al.*, 2014; Chernikova *et al.*, 2012) e forma de abóbora (origem do nome). Apresentam dois portais

simétricos, constituídos por grupos carbonilo altamente polarizáveis e uma cavidade hidrofóbica (Ahmed *et al.*, 2015; Barrow *et al.*, 2015; Basílio *et al.*, 2015; Rowland *et al.*, 2015; Basílio & Pina, 2014). São obtidos por condensação de grupos glicoluril com formaldeído em meio ácido (Assaf *et al.*, 2015; Malhis *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). O número de unidades de glicolurilo ($n = 5-8$ e 10 CB[n]) determina o diâmetro da cavidade sem afetar a altura da molécula (aproximadamente $9,1 \text{ \AA}$) (Rowland *et al.*, 2015). O diâmetro da cavidade interna varia de $4,4 \text{ \AA}$, para os CB[5], até $12,6 \text{ \AA}$ para os CB[10], o diâmetro dos portais varia de $2,4 \text{ \AA}$ para os CB[5], até 11 \AA para os CB[10] e o volume da cavidade interna varia de 82 \AA^3 para os CB[5], até 870 \AA^3 para os CB [10] (Masson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2006). A solubilidade em água é relativamente baixa, apresentando, para os CB[5] e CB[7] valores entre 20 e 30 mM, para os CB[6] $0,018 \text{ mM}$, menor do que $0,01 \text{ mM}$ para o CB[8] e menor que $0,05 \text{ mM}$ para o CB[10] (Masson *et al.*, 2012). A solubilidade aumenta em todos os casos se for usada água acidificada ou na presença de sais (Masson *et al.*, 2012). Os CB[n] foram reportados pela primeira vez por Behrend e colaboradores em 1905 (Barrow *et al.*, 2015; Chernikova *et al.*, 2012; Demets, 2007; Kim *et al.*, 2006), mas a tecnologia da época não permitiu a caracterização exata e a estrutura só foi elucidada pelo grupo de Mock nos anos 80 (Cao *et al.*, 2014; Chernikova *et al.*, 2012; Demets, 2007; Kim *et al.*, 2006; Lagona *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2005). Estes compostos podem acomodar mais do que um hóspede dentro de cavidade, nomeadamente o CB[8], permitindo a formação de complexos de inclusão com mais do que uma molécula (moléculas que podem ser iguais ou diferentes) (Barrow *et al.*, 2015; Ramamurthy *et al.*, 2015; Ghale & Nau, 2014). Embora estes compostos apresentem baixa toxicidade, verificada em estudos de administração de fármacos (Oun *et al.*, 2014), a sua utilização na área alimentar, tem sido muito pouco explorada (Oun *et al.*, 2014). Estudos de complexação de antocianinas com CB[n], realizados por Basílio e colaboradores (2015), permitiram verificar que, se fossem escolhidas as dimensões adequadas de cavidade ou seja, o tipo de CB[n], havia formação de complexos de inclusão com as antocianinas, melhorando a cor e aumentando o seu poder antioxidante, o que poderá, no futuro, contribuir para grandes avanços na estabilidade cromáticas de muitos alimentos e bebidas. Os cucurbiturilos também foram aplicados com sucesso na avaliação de baixas quantidades de aminas em água envolvendo sensores óticos (Montes-Navajas *et al.*, 2009).

A investigação destes compostos tem sido feita preferencialmente por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (Malhis *et al.*, 2015; Gago *et*

al., 2014; Pastor & Martínez-Viviente, 2008; Lagona *et al.*, 2005). No entanto os métodos de espectrometria de massa têm também sido bastante utilizados (Mendes *et al.*, 2015; Da Silva, *et al.*, 2014; Pêssego *et al.*, 2013; Lemaury *et al.*, 2013).

Enquanto as ciclodextrinas formam complexos de inclusão apenas por efeito hidrofóbico, os cucurbiturilos interagem através dos portais com moléculas possuindo carga positiva ou parcialmente positiva e também com a cavidade por efeito hidrofóbico. Estas propriedades permitem obter constantes de complexação entre CB[n] e poliaminas, por exemplo, superiores a 10^7 M^{-1} (Da Silva *et al.*, 2014) enquanto que para as ciclodextrinas as constantes de complexação são da ordem de 10^3 M^{-1} . É com cucurbiturilos a interação não covalente mais forte que se conhece até hoje, estando reportados valores de constantes de complexação da ordem de 10^{17} M^{-1} (Cao *et al.*, 2014).

2 - Parte experimental

Foram bastante variadas as análises desenvolvidas ao longo deste trabalho e bastante diferentes os métodos analíticos utilizados. As análises e respectivas metodologias seguidas estão resumidas nas tabelas 2.1 a 2.5. A tabela 2.1 é referente às aguardentes de medronho, batata-doce e figo.

Tabela 2.1 - Análises realizadas às aguardentes de medronho, batata-doce, figo e bagaço.

Aguardentes	Medronho Objetivos: controlo de parâmetros da legislação; pesquisa de marcadores regionais	Teor alcoólico	Densitometria
		Acidez total	Titulação
		Compostos voláteis	GC GC-MS HS-SPME-GC HS-SPME-GC-MS Extratos GC e GC-MS
		Cobre	UV-Vis
		Extratos em diclorometano e mistura éter/ pentano (1:1)	GC e CG-MS
		Pesquisa de poliaminas biogénicas	ESI-MS
	Batata-doce Objetivos: aproveitamento de excedentes de batata-doce; otimização de processos de produção	Teor Alcoólico	Densitometria
		Acidez total	Titulação
		Compostos voláteis	GC GC-MS HS-SPME-GC HS-SPME-GC-MS Extratos GC e GC-MS
		Cobre	UV-Vis
		Apreciação sensorial	Provadores/consumidores
	Figo Objetivo: melhoria da qualidade de produto existente	Compostos voláteis	GC GC-MS
		Acidez total	Titulação
		Grau alcoólico	Densitometria
		Cobre	Absorção atómica
		Pesquisa de poliaminas biogénicas	ESI-MS
	Bagaço	Pesquisa de poliaminas biogénicas	ESI-MS

Na tabela 2.2 são apresentados os tratamentos e as análises efetuadas à batata-doce. A tabela 2.3 apresenta as análises dos frutos utilizados na preparação dos licores de romã e de murta. Na tabela 2.4 estão indicadas as análises referentes a macerados e licores. Finalmente, a tabela 2.5 apresenta as análises e as metodologias seguidas para a caracterização de uvas e vinhos.

Tabela 2.2 – Tratamentos e análises efetuadas à batata-doce.

Batata-doce Objetivo: conhecer o teor em açúcares para otimizar o pré-tratamento e a fermentação	Sem tratamento	Humidade	Secagem por infravermelho
		Amido	Inversão / titulação
		Açúcares totais e redutores, NP1420 de 1987	Técnica de Luff-Schoorl
		Glicose	Método enzimático
		Frutose	Método enzimático
	Cozida	Açúcares totais e redutores, NP1420 de 1987	Técnica de Luff-Schoorl
		Glicose	Método enzimático
		Frutose	Método enzimático
		Compostos voláteis	GC e GC-MS
	Assada a 130 °C	Açúcares totais e redutores, NP1420 de 1987	Técnica de Luff-Schoorl
		Glicose	Método enzimático
		Frutose	Método enzimático
		Compostos voláteis	GC e GC-MS
	Assada a 190 °C	Açúcares totais e redutores, NP1420 de 1987	Técnica de Luff-Schoorl
		Glicose	Método enzimático
		Frutose	Método enzimático
		Compostos voláteis	GC e GC-MS

Tabela 2.3 – Análises dos frutos utilizados na produção de licores.

Frutos utilizados na produção de licores	Romã	Fruto completo	Massa	Balança analítica
			Diâmetro equatorial	Craveira
		Arilos	Massa	Balança analítica
		Sumo	° Brix	Refratômetro
			pH	Potenciômetro
			Cor	Colorímetro
			Polifenóis totais	Folin-Ciocalteau UV-Vis
			Compostos voláteis	HS-SPME-GC e HS-SPME-GC- MS
			Antocianinas	UV-Vis, LC – DAD 520 nm e LC-MS
			Elagitaninos	UV-Vis, LC - DAD – 230, 280 e 390 nm e LC-MS
		Mesocarpo (parte esponjosa amarela) e membranas carpelares. Redução da dimensão em fresco e após desidratação.	Extratos aquosos	LC - DAD – 230, 280 e 390 nm
			Extratos com 18 % vol. etanol	LC - DAD – 230, 280 e 390 nm
			Extratos com 35 % vol. etanol	LC - DAD – 230, 280 e 390 nm
			Extratos com 70 % vol. etanol	LC - DAD – 230, 280 e 390 nm
	Murta	Fruto	Massa	Balança analítica
			Diâmetro equatorial	Craveira
			°Brix	Refratômetro
			pH	Potenciômetro
		Película	Polifenóis totais	Folin-Ciocalteau UV-Vis

Tabela 2.4 – Análises de macerados e licores.

Licores	Romã	Macerados	Antocianinas	LC e LC-MS
			Elagitaninos	LC e LC-MS
		Licores	Acidez	Titulação
			Polifenóis totais	Folin-Ciocalteau UV-Vis
			Cor	Colorimetria
			pH	Potenciometria
			Açúcares totais –NP 2223 1988	Técnica de Luff-Schoorl
			Teor alcoólico	Destilação - Densitometria
			Compostos voláteis	HS-SPME-GC e HS-SPME-GC-MS
			Antocianinas	LC-DAD 520 nm e LC-MS (AutoMS e ESI-MS)
			Elagitaninos	LC-DAD 280 e 270 nm e LC-MS (AutoMS)
	Murta	Macerado	Polifenóis totais	Folin-Ciocalteau UV-Vis
			Antocianinas totais	Descoloração UV-Vis
			Antocianinas	LC – DAD -520 nm e LC-MS
			Resveratrol	LC-DAD 288 e 306 nm e LC-MS
		Licor	Açúcares totais –NP 2223 1988	Técnica de Luff-Schoorl
			Grau alcoólico	Destilação - Densitometria
			Compostos voláteis	HS-SPME-GC e HS-SPME-GC-MS
			Antocianinas	LC – DAD 520 nm e LC-MS

Tabela 2.5 – Análises realizadas a uvas e vinhos.

Vinho Objetivo*: estudar as características do vinho Algar seco preparado com uvas da casta Síría e envelhecido de forma dinâmica	Uvas (Castas) Objetivo: conhecer as características das castas autorizadas e produzidas no Algarve	Castelão Touriga Nacional Aragonês Tincadeira Syrah Cabernet Sauvignon Síría	Massa Diâmetro equatorial °Brix Densidade	Balança Craveira Refratómetro Densímetro
		Castelão Touriga Nacional Síría	Polifenóis totais	UV-Vis
		Extratos metanólicos de películas: Castelão Trincadeira Syrah Cabernet Touriga Aragonez	Resveratrol	LC- DAD a 288 e 306 nm e LC-MS
	Licorosos: Algar seco Muska doce Terras do Infante		Polifenóis totais	UV-Vis
	Tintos: Lagoa 2007 Terras da Luz 2010 Tapada da Torre 2010 Marquês dos Vales Selecta 2009		Polifenóis totais	UV-Vis
			Resveratrol	LC – DAD 288 e 306 nm e LC-MS
	Rosé: Vales Selecta 2010	Castelão	Polifenóis totais	UV-Vis
			Antocianinas	LC –DAD 550 nm e LC-MS
	Branco: Vales Selecta 2010	Castelão	Polifenóis totais	UV-Vis

*Incompleto

2.1 - Materiais

As bagas de murta foram colhidas no concelho de Faro, as romãs nos concelhos de Faro, Tavira, Loulé e Silves, as batatas-doces na zona de Indicação Geográfica Protegida de Aljezur. As aguardentes de medronho são originárias dos distritos de Faro, Beja e Coimbra e as aguardentes de figo dos concelhos de São Brás de Alportel, Tavira e

de Silves. Como água mineral potável foi utilizada água do Fastio. As leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* – Fervens, foram adquiridas à firma DAL CIN, London, Enghand. O acetonitrilo, ácido tânico, ácido clorídrico, cloreto de sódio, cobre, etanol, metanol, metil-2-butanol, 4-metil-2-pentanol, benzaldeído, sacarose e tans-resveratrol, são da Merck, Darmstadt, Germany; o 3-metil-1-butanol, amido, carbonato de cálcio, éter dietílico, sulfato de cobre (II) penta hidratado, hidróxido de sódio e ácido sulfúrico da Panreac, Madrid, Espanha; o etanal, acetato de etilo, 2-metil-1-propanol, 5-metil-2-furaldeído, hexanoato de etilo, 1-nonanol, ácido gálico, geraniol, limoneno, 1,8-cineol, mirtenol, trans-cariofileno e malvidina-3-O-glicósido da Fluka, New Ulm, Switzerland; o linalol, decanoato de etilo e dodecanoato de etilo da Janssen, Geel, Bergium; o butirato de etilo, octanoato de etilo, furfural e ácido nítrico da Riedel-de Haën, Zeelze, Germany; o 2-feniletanol, 2-metil benzofurano, tetradecanoato de etilo, tartarato de sódio e potássio e punicalagina; da Aldrich, Steinheim, Germany; o cis-3-hexeno-1-ol, trans-3-hexeno-1-ol, 1-hexanol, 2-nonanol, linalol, α -pineno, γ -terpineol, octanoato de metilo e maltol da Acros, New Jersey, United States; o tiosulfato de sódio da Carlo Erba, Rodano, Milano; o iodeto de potássio e ácido cítrico da Chem-Lab, Zedelgem, Belgium; o ácido cafeico, putrescina, cadaverina, espermidina, histamina, espermina, amantadina e cucurbit[7]urilo da Sigma, Steinheim, Germany; o bissulfito de sódio da BDH, Birkenhead, England; e o ácido ortofosfórico da Fisher, Loughborough, England.

2.2.1 - Preparação de amostras líquidas para análise de compostos fenólicos

Os sumos, macerados e licores foram submetidos a centrifugação durante 5 min a 10 000 rpm e 4 °C, usando uma centrífuga Sigma 3 k 20 Laborsentrifugem com rotor winkelrotor 6 x 85 ml (Osterode am Harz, Alemanha), antes de analisados. As amostras depois de centrifugadas foram analisadas diretamente ou após diluição duas vezes, cinco vezes ou dez vezes, dependendo do teor em polifenóis. Sempre que não foi possível fazer as análises de imediato as amostras foram guardadas a -20 °C.

2.2.2 - Preparação de extratos de amostras sólidas para análise de compostos fenólicos

Para extração de compostos fenólicos a partir de amostras sólidas foram utilizados 10,0 g de material vegetal que foram posteriormente homogeneizados em 50 ml de metanol, etanol ou água ultrapura, com o auxílio de um *Ultra-Turrax* T 25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanha). Após a homogeneização a mistura permaneceu 1 h em repouso, ao abrigo da luz, sendo posteriormente filtrada com filtro *Whatman* nº 1 e com o auxílio de um funil de *Büchner*, de um *kitassato* e de uma bomba de vácuo *Buchi* (Labortechnik, Suíça). Os extratos foram analisados de imediato ou conservados a – 20 °C.

2.2.3 - Redução a pó de amostras vegetais sólidas para análises diversas

As amostras foram inicialmente moídas em picadora comum, seguindo-se então uma secagem a 70 °C durante pelo menos 3 h, em forno elétrico com convecção forçada FIMOR (Pádua Itália). Após a secagem procedeu-se a moagem em moinho ultra centrífugo RETSCH (Haan, Alemanha) para obtenção do pó.

2.3 - Determinação do teor alcoólico

A avaliação do teor alcoólico dos licores e das aguardentes envelhecidas foi feita após destilação, usando um destilador enológico Dujardin-Salleron (Arcueil, França), em provetas alcoométricas e com alcoómetros e termómetros calibrados DENIS (Arnouville, França). O teor alcoólico das aguardentes não envelhecidas foi feito de forma semelhante, mas sem destilação prévia (NP 2143 de 1987). Quando a temperatura da medição não foi exatamente 20 °C, procedeu-se à correção para este valor seguindo o “Guide Pratique D’Alcoométrie” (Poitiers, França).

2.4 – Determinação da acidez total

A acidez total foi medida por titulação, seguindo um método potenciométrico no caso dos licores e um método colorimétrico (NP 2139 de 1987) no caso das aguardentes. No método potenciométrico foram usados um medidor pH Crison (Meter GLP 21, Barcelona, Espanha) e um potenciómetro automático (665 Dosimat e 686 Titroprocessor – Metrohm – Greifensee, Switzerland) (Jacobson, 2006; NP-2139, 1987; Regulamento CEE 2676/90).

2.5 - Determinação de sólidos solúveis

A determinação dos sólidos solúveis em solução aquosa e em sumos de frutos foi feita pela avaliação do grau Brix com refratômetro de bancada Abbe (OPTECH, Munich, Alemanha).

2.6 - Determinação da densidade

A densidade das soluções foi determinada com densímetro digital (Mettler Toledo DP-110M KEM, Greifensee, Suíça), fazendo passar o líquido diretamente no tubo de medição, após calibração com água destilada.

2.7 – Determinação do teor em açúcares

A preparação das amostras sólidas para determinação do teor em açúcares foi feita seguindo a NP 783 de 1985. Os açúcares totais e redutores foram determinados de acordo com a NP 1420 de 1987. Em amostras líquidas os açúcares totais e redutores foram determinados seguindo a NP 2223 de 1988.

A frutose e a glicose foram determinadas pelo método enzimático usando o Kit analítico da NZYTech AK00041 do lote 09121 da firma NZYTech, Lda (Lisboa, Portugal), com preparação das soluções de acordo com a indicação do fornecedor, e leitura em espectrofotómetro UV-vis GBC CINTRA 101 (Dandenong, Austrália) a 340 nm.

2.8 – Determinação da humidade

A humidade foi determinada usando 5,00 g de material vegetal previamente triturado e seco a 100 °C em secador de infravermelhos (Mettler LP 16) com balança (Mettler PM 100), ambos da Mettler Toledo (Zurich, Suíça).

2.9 - Doseamento do amido

O doseamento do amido foi feito utilizando amostras de 2 g (com precisão de 0,0001 g) de pó desidratado. As amostras foram colocadas em frascos *Duran* de 500 ml. A cada amostra foram adicionados 200 ml de água destilada e 1 ml de NaOH a 10 % (m/V). Estas amostras foram posteriormente autoclavadas (Uniclave 88 AJC Cacém, Portugal) a 121 °C durante 1 h. Após arrefecimento foram adicionados 10 ml de HCl

tendo-se seguidamente procedido a nova autoclavagem a 121 °C por mais 30 min. Atingida a temperatura ambiente foi feita a neutralização com uma solução de NaOH a 40 % (m/V). Seguiu-se a adição 5 ml de uma solução de sulfato de cobre, solução de *Fehling A* (34,635 g de sulfato de cobre penta hidratado em 1000 ml de água destilada), 5 ml de uma solução de tartarato duplo de sódio e potássio com hidróxido de sódio, solução *Fehling B* (173 g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de *Rochelle*) e 125 g de NaOH), num balão volumétrico de 1000 ml com água destilada. A mistura foi transferida para um balão de 500 ml. O volume foi ajustado com água destilada tendo-se procedido de seguida à homogeneização da mistura. Após a sedimentação a amostra foi filtrada. O filtrado foi então colocado em bureta de 25 ml para posterior titulação das soluções de *Fehling*. Em *erlenmeyer* de 250 ml colocam-se 10 ml de cada uma das soluções de *Fehling*, A e B, algumas esferas de vidro e 40 ml de água destilada. Esta solução foi levada à ebulição e feita a titulação gota a gota, usando a solução contida na bureta, até a perda total da cor. Neste ponto, perda total de cor, foi adicionada uma gota de solução de azul-de-metileno (1 % m/V) e a titulação continuada até à descoloração do indicador, ficando um resíduo vermelho. Procedimento semelhante foi seguido para uma solução padrão de glicose para determinação do título da solução de *Fehling* (Carvalho *et al.*, 2006).

2.10 - Determinação da cor

A cor dos sumos, macerados e licores foi determinada usando um colorímetro Dr Languet D65/10 Neurtek (Gipuzkoa, Espanha). O aparelho foi previamente calibrado com um padrão de referência branco ($X = 84,60$, $Y = 89,46$ e $Z = 93,85$) e um padrão de referência preto ($X = 4,12$, $Y = 4,38$ e $Z = 4,71$). Os três parâmetros X, Y e Z, representam as três cores primárias (vermelho, verde e azul). A cor foi determinada seguindo o método $L^* a^* b^*$ ou CIELAB estabelecido pela *Commission International del'Eclairage*, onde a coordenada L^* , luminosidade, varia entre 0 (preto) e 100 (branco), a^* e b^* são as coordenadas cromáticas. As coordenadas a^* e b^* são coordenadas cromáticas. Valores positivos da coordenada a^* indicam vermelho e valores negativos indicam verde. Valores positivos da coordenada b^* indicam tonalidade amarela e os negativos tonalidade azul. Cada amostra de 5 ml foi avaliada numa célula padrão com 5 cm de diâmetro (Dafny-Yalin *et al.*, 2010).

2.11 - Doseamento do cobre

Para o doseamento do cobre foi utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica GBC Avanta (Dandenong, Austrália). A calibração foi feita utilizando cinco padrões de cobre em solução alcoólica a 50 % vol. contendo 5 % de HNO_3 e preparados usando uma solução padrão de referência de cobre de 1000 mg/L. As amostras foram preparadas por adição de 250 μL de HNO_3 a 5 % a 5 ml de aguardente (NP 2442 de 1998). Nos casos em que o teor em cobre da amostra excedeu o do padrão de concentração mais elevada foram preparadas novas soluções padrão de forma a obter teores em cobre no intervalo dos padrões usados. Após 10 leituras de amostra foi repetida a leitura do padrão de concentração média (6,000 mg/L).

Nas análises de rotina a determinação do cobre foi feita de acordo com a NP 2441 de 1988, utilizando uma solução mãe de cobre para preparar um conjunto de 6 soluções padrão com concentrações entre 0,1 e 6,0 mg/L. A análise foi feita utilizando um espectrofotômetro UV-vis GBC CINTRA 101 (Dandenong, Austrália) a 546 nm.

2.12 - Análise de compostos voláteis

A quantificação dos compostos voláteis mais abundantes nas aguardentes foi feita por injeção direta em cromatógrafo de fase gasosa (PerkinElmer Clarus 400) equipado com um detetor FID (Waltham, USA) e colunas capilares de polietileno glicol (BP 20M de 30 m x 0,32 mm I.D. x 1,0 μm com espessura de filme; SGE, Australia ou ZB WAX de 30 m X 0,25 mm x 0,25 μm , Zebron Phenomenex, USA) (NP 3263, 1990). O programa de temperatura utilizado foi o seguinte: início a 40 °C, durante 5 min, seguido de aumento a 5°/min até 210 °C, onde permanece por mais 5 min. O gás arrastador foi o hélio, a um fluxo constante de 2 ml min⁻¹. O injetor permaneceu a 250 °C e o detetor a 270 °C. O volume injetado foi 1 μL com *split* de 30:1. A quantificação foi feita utilizando 4-metil-2-pentanol como padrão interno. Por cada 5 ml de amostra foram adicionados 500 μL de padrão interno (4,026 g 500 mL⁻¹).

A identificação de compostos voláteis foi feita em cromatógrafo de fase gasosa Hewlett Packard 5890 Series II equipado com detetor seletivo de massa Hewlett Packard serie 5971 (E.I. 70 eV) e com coluna capilar (AT-WAX MS com 30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme (GRACE, USA) ou ZB-5MS de 25 m, 0,25 mm diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de filme, Zebron Phenomenex, USA). O programa de temperaturas teve início a 50 °C, durante 5 min, tendo depois a

temperatura subido até 240 °C, a 10 °C por min e onde permaneceu mais 10 min. A temperatura do injetor foi de 240 °C no modo *split* 30:1. Os compostos existentes em menor quantidade foram extraídos no espaço de cabeça de uma *vial* usando uma fibra de micro extração em fase sólida (HS-SPME) e por extração líquido-líquido.

A HS-SPME foi feita em *vials* de 20 ml contendo 1 g de NaCl e um magneto de 1,5 cm. Nos licores a extração foi feita com 5 ml de água ultrapura (MilliQ, Millipore, Molsheim, França) e 5 ml de bebida; nas aguardentes com 2,5 ml de bebida e 7,5 ml de água ultrapura. A extração foi feita a 20 °C \pm 2 °C, durante 20 min ou 45 min, com agitação a 900 r.p.m. Foi utilizada fibra bipolar manual divinilbenzeno-carboxenopolidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) com 50/30 mm de espessura de filme e 1 cm de comprimento. Foram também utilizadas fibras de poliacrilato (PA), de polidimetilsiloxano (PDMS) de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB) com o mesmo comprimento (Supelco Bellefonte, PA, USA).

Extração líquido-líquido com diclorometano - foram usados 30 ml de bebida com teor alcoólico inferior a 50 % vol., 2 ml de diclorometano e 200 μ l de padrão interno 4-metil-2-pentanol (104 mg em 100 ml de diclorometano), em erlenmeyer de 50 ml, contendo 1 magneto e 1 g de NaCl. A extração decorreu em agitação, em recipiente contendo gelo e durante 2 h. A amostra foi depois colocada no congelador durante 30 min após o qual foi separada em ampola de decantação cônica (Apostolopoulou *et al.*, 2005). A extração de compostos voláteis de substâncias sólidas foi feita de forma semelhante usando 30 g de amostra e 4 ml de diclorometano.

A extração líquido-líquido com éter-pentano foi feita em tubo de ensaio 40 cm x 2 cm. Foram adicionados 2 g de NaCl, 25 ml de bebida espirituosa, 4 ml da mistura éter dietílico-pentano (1:1) (V/V) e 400 μ l de padrão interno (145 mg de 2 octanol em 100 ml de solução hidro-alcoólica 50 % vol.). A mistura foi agitada durante 3 minutos em agitador *vortex*, e separada com ajuda de uma ampola de decantação cônica. O extrato foi concentrado em fluxo de azoto.

2.13 - Determinação de fenóis totais

A determinação dos fenóis totais foi realizada seguindo o método de *Folin-Ciocalteu* e usando o ácido gálico como padrão. A absorvância foi medida a 765 nm num espectrofotómetro Cintra 101 UV-Vis (Dandenong, Austrália). As amostras, em geral, tiveram que ser diluídas de 1:5, 1:10 ou 1:20 (V/V).

2.14 - Determinação do índice de antocianinas totais

O índice de antocianinas totais foi determinado seguindo o método da descoloração com ácido sulfuroso, proposto por Ribéreau-Gayon e Stonestreet, em 1965.

2.15 - Perfil de antocianinas

A análise do perfil das antocianinas em sumos, extratos de plantas, macerados, licores e vinhos foi efetuada por HPLC. Dois procedimentos foram seguidos. O primeiro, desenvolvido para análise das antocianinas das bagas de murta, foi feito recorrendo a um cromatógrafo LKB *Bromma* 2152 LC, com integrador LKB *Bromma* 2221 e detetor UV-Vis LKB *Bromma* 2151 (Bromma, Suécia). A fase móvel consistiu num gradiente de duas soluções. Uma solução A, solução aquosa com ácido fosfórico a 0,1 %, e uma solução B, constituída por uma mistura de acetonitrilo e água numa proporção 2:3 e ácido ortofosfórico a 0,1 %. O gradiente foi o seguinte: 0 - 15 minutos, gradiente de 0 a 20 % de B; 15-25 minutos composição de B constante e igual a 20 %; 25 -70 min gradiente até 70 % de B; 70-75 minutos composição de B constante e igual a 70 % de B; 75-85 minutos, gradiente até 100 % de B; 85-100 minutos, composição constante e igual a 100 % de B. O comprimento de onda utilizado para a deteção foi 520 nm. Neste equipamento foi feita uma adaptação para aquisição de dados automática que, após conversão para o programa *Cromulan*, permitiu obter os cromatogramas em computador. A coluna usada foi do tipo C18 de fase reversa da marca *Chrompac*, com diâmetro de partícula 5 µm, comprimento 250 mm e 4,6 mm de diâmetro interno (Varian Cambrigeshire, US) com pré-coluna da mesma fase, estabilizada a 20 ± 2 °C. Foram injetados 20 µl por amostra.

As antocianinas foram também analisadas num HPLC *Agilent Technologies* 1200 com detetor de matriz de díodos (Diode Array Detector, DAD). O sistema está equipado com uma bomba quaternária, desgaseificador de solventes, auto analisador com temperatura controlada e estabilizador da temperatura da coluna. A fase móvel consistiu num gradiente de dois solventes, acetonitrilo, A, e água, B, ambos com 2,5 % de ácido fórmico. O gradiente começou com 5 % de A, seguido de um aumento até 30 % em 25 minutos. De 25 a 30 minutos A aumentou até 100 %, tendo permanecido depois com esta composição durante 4 minutos. Finalmente recuperou as condições iniciais (5 % de A e 95 % de B) num minuto e estabilizou a composição do sistema eluente durante mais cinco minutos antes da corrida seguinte. O comprimento de onda usado para a deteção foi 520 nm. A coluna usada foi uma coluna polimérica PRP-1, da marca Hamilton, tipo C18, de

15 cm de comprimento, diâmetro de 2,1 mm, 5 µm de diâmetro média de partícula, estabilizada 25 °C. Foram injetados 10 µl por amostra. A quantificação das antocianinas foi feita utilizando a malvidina-3-O-glicósido como padrão.

2.16 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos por LC-MS

A identificação das antocianinas foi feita por utilização do sistema Agilent acima descrito, nas condições acima descritas, acoplado a um espectrômetro de massa Bruker Daltonics HCT *ultra*. O analisador deste equipamento de espectrometria de massa é um quadruplo “ion trap”, capaz de realizar MSⁿ, com n = 11, e por isso bastante poderoso para elucidação estrutural. Para as antocianinas, as principais condições de análise do espectrômetro de massa foram as seguintes: pressão de nebulização: 50 psi; fluxo do gás de secagem: 12 L/minuto; temperatura do gás de secagem: 350 °C; potencial do capilar: - 4000 V (polaridade positiva); *trap drive*: 55; *capillary exit*: 183 V; *skimmer*: 60 V. Para identificação foi escolhido o modo AutoMS que permite fazer fragmentação dos íons mais abundantes à medida que os compostos vão saindo da coluna cromatográfica. Neste modo obtém-se o valor de m/z dos diferentes compostos e também o seu espectro de fragmentação. Nalguns casos foram feitas fragmentações de ordem superior por injeção direta (infusão) da amostra no espectrômetro de massa (ESI-MS). A identificação foi feita com base nos valores de m/z dos vários compostos e nos seus espectros de fragmentação, por comparação com espectros e resultados publicados.

A identificação e quantificação de outros polifenóis foi feita com o equipamento acima descrito e seguindo os procedimentos descritos, nomeadamente HPLC, espectrômetro de massa e coluna cromatográfica. A fase móvel e o gradiente foram diferentes dos utilizados para as antocianinas. A fase móvel consistiu num gradiente de dois solventes, metanol, A, e água, B, ambos com 0,1 % de ácido fórmico. O gradiente começou com 5% de A seguido de um aumento até 50 % em 23 minutos. De 23 a 30 minutos A aumentou até 100 %, tendo permanecido depois com esta composição durante 4 minutos. Finalmente recuperou as condições iniciais (5 % de A e 95 % de B) num minuto e estabilizou a composição dos sistemas eluente durante mais cinco minutos antes da corrida seguinte. O comprimento de onda usado para deteção dos derivados de ácido elágico e ácido galágico foi 370 nm. Os outros polifenóis foram seguidos a 280 nm. As principais condições de análise do espectrômetro de massa foram as seguintes: pressão de

nebulização: 50 psi; fluxo do gás de secagem: 10 L/minuto; temperatura do gás de secagem: 350 °C; potencial do capilar: 4000 V (polaridade negativa); *trap drive*: 67,5; *capillary exit*: - 233 V; *skimmer*: - 39 V. Tal como para as antocianinas, para se obter os espectros de fragmentação foi escolhido o modo AutoMS. A quantificação dos derivados de ácido galágico e ácido elágico da romã foi feita utilizando como padrões a punicalagina e o ácido elágico, respetivamente.

2.17 – Quantificação do resveratrol

A quantificação do resveratrol foi feita com o equipamento acima descrito, o HPLC acoplado à espectrometria de massa (HPLC-MS), a funcionar em modo de “Multi Reaction Monitoring” (MRM). A quantificação foi feita com base no fragmento do resveratrol com m/z 185. Ou seja, ao longo da separação cromatográfica o espectrómetro de massa vai selecionando o ião com m/z 227, o resveratrol ionizado no modo negativo, vai fragmentando este ião e quantificando com base no ião filho maioritário, observado a m/z 185. A coluna cromatográfica foi a utilizada para as antocianinas. A fase móvel consistiu num gradiente de dois solventes, acetonitrilo, A, e água, B, ambos com 2,5 % de ácido fórmico. O gradiente começou com 40% de A durante 4 minutos, seguido de um aumento até 100% até aos 6 minutos, onde permaneceu durante mais 4 minutos. Finalmente recuperou as condições iniciais (40 % de A e 60 % de B) num minuto e estabilizou a composição do sistema eluente durante mais cinco minutos antes da corrida seguinte. As principais condições de análise do espectrómetro de massa foram as seguintes: pressão de nebulização: 50 psi; fluxo do gás de secagem: 12 L/minuto; temperatura do gás de secagem: 350 °C; potencial do capilar: 3000 V (polaridade negativa); *trap drive*: 26,6; *capillary exit*: -137,5 V; *skimmer*: -15 V. A quantificação foi feita a partir de uma curva de calibração obtida entre 0,1 e 6 mg/L. Nestas condições o limite de deteção é cerca de 0,02 mg/L.

2.18 - Quantificação de aminas biogénicas

A quantificação do teor em aminas biogénicas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e histamina) foi feita por injeção direta das amostras (infusão) utilizando o equipamento de ESI-MS, acima referido. Foram preparadas, soluções contendo 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 μM , de cada amina, em água e em soluções aquosas contendo 50 % vol. de etanol. A cada 1 mL de solução padrão foram adicionados 10 μL de HCl com concentração 0,1 M, 10 μL de uma solução de padrão interno de amantadina-CB7, com uma concentração de 200 μM e 10 μL de CB7, com concentração de 5 mM, de forma a serem obtidas concentrações próximas de 1,0 μM , 2,0 μM e 50 μM , respetivamente. De forma semelhante, foram preparadas amostras de aguardente de medronho, figo e bagaço. Por cada mL de amostra de aguardente foram adicionados 10 μL de HCl com concentração 0,1 M, 10 μL de uma solução de padrão interno, amantadina-CB7, com uma concentração de 200 μM e 10 μL de uma solução de CB7 com uma concentração de 5 mM. A introdução das soluções no sistema foi feita com uma bomba de seringa (KdScientific, model 781100, USA), com velocidade de fluxo de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. As condições de análise foram as seguintes: potencial do capilar 4000 V; pressão de nebulização 20 psi; temperatura do gás de secagem 300 °C; fluxo do gás de secagem 6 L/min, trap drive 68,2; *capillary exit* 250 V; *skimmer* 25 V. As fragmentações foram realizadas utilizando $\Delta m/z$ de 3 e uma amplitude de 1,2 V.

As curvas de calibração foram obtidas a partir das intensidades dos sinais de MS/MS dos complexos de inclusão das respetivas poliaminas e da amantadina. Foram elaboradas curvas de calibração da razão entre a intensidade dos iões resultantes da fragmentação de cada complexo e a intensidade do principal ião resultante da fragmentação do complexo de inclusão amantadina-CB7 (m/z 1163), função da concentração de cada analito. A concentração de cada poliamina foi avaliada utilizando estas curvas de calibração e a razão entre a intensidade dos iões resultantes da fragmentação de cada complexo e a intensidade do ião principal resultante da fragmentação do complexo de inclusão com a amantadina medida nas amostras.

2.19 – Apreciação sensorial

A avaliação sensorial foi realizada por um conjunto de provadores não treinados composto por 55 voluntários recrutados entre alunos, membros da equipa do Instituto

Superior de Engenharia da Universidade do Algarve e produtores de destilados que visitaram o Instituto, com idades compreendidas entre os 18 e os 60 anos. A cada provador foi entregue uma ficha onde deveriam indicar a sua apreciação, de acordo com uma escala hedónica de nove pontos, em que "gostei extremamente" corresponde 9 e "desgostei extremamente" correspondem a 1 (Lim, 2011), relativamente ao aspeto visual, ao cheiro e ao gosto. O teste foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial com luz branca e temperatura controlada. Os provadores receberam em cada prova 15 mL de amostra da bebida num copo de vidro de pé alto (*cépage*) coberto com um vidro de relógio e em cabines individuais.

2.20 – Análise estatística

Praticamente todas as medições foram executadas pelo menos em triplicado; as exceções são indicadas em cada caso específico. Os resultados das medições são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas entre grupos de amostras foram determinadas usando análise de variância de fator único. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. A análise estatística dos resultados e elaboração de gráficos foram realizadas recorrendo aos programas IBM SPSS versão 22 e Microsoft Office Excel 2013.

3 - Discussão

3.1 - Aguardentes

A aguardente de medronho ou simplesmente Medronho, é a joia da coroa das bebidas espirituosas do Algarve. Neste ponto da discussão será analisada com detalhe a composição da aguardente de medronho produzida no Algarve. Serão reportados e analisados resultados de análises dos parâmetros estipulados pelo Decreto-Lei nº 238/2000 de 26 de setembro, obtidos no período 2010 a 2014. Posteriormente será feita uma análise detalhada dos compostos voláteis que caracterizam esta bebida, acompanhada por uma comparação com resultados de aguardentes de medronho produzidas noutras regiões de Portugal e noutros países, e também com aguardentes de outros frutos. Serão avaliados parâmetros que possam servir como “impressão digital” do Medronho. Será também discutida com detalhe a preparação e caracterização da aguardente de batata-doce. Por fim, serão ainda discutidas as propriedades da aguardente de figo e sua retificação parcial.

3.1.1 - Aguardente de medronho

3.1.1.1 - Parâmetros de qualidade

O Decreto-Lei nº 238/2000 de 26 de setembro fixa os parâmetros mínimos de qualidade para a aguardente de medronho. No artigo 3º, ponto 2, é indicado o valor máximo de 15 mg/L para o teor em cobre. No anexo do artigo 3º são indicados os limites relativos a outros parâmetros (Tabela 3.1).

São muitos os produtores que solicitam a avaliação dos parâmetros de qualidade das suas aguardentes para averiguar se estão ou não em conformidade com a legislação. As análises solicitadas têm por objetivo colocar as aguardentes no mercado. Com exceção do teor alcoólico, da acidez total, do extrato seco e do teor em cobre, todos os outros parâmetros são determinados por cromatografia gasosa. A figura 3.1 mostra um perfil típico de aguardente de medronho, obtido por injeção em natureza (direta), utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), com o objetivo de determinar estes parâmetros.

Tabela 3.1 - Parâmetros de qualidade da aguardente de medronho (Decreto-Lei 238/2000 de 26 de Setembro).

Parâmetro	Características/limites
Características organoléticas	Aspeto – Límpido.
	Cor - incolor; topázio (no caso de aguardentes velhas).
	Aroma - a medronho e etéreo.
	Sabor - a medronho e alcoólico.
Título alcoométrico a 20 °C (% vol.)	≥ 42
Extrato seco (g/hl)	< 20
Acidez total (g/hl a.p.) (em ácido acético)	≤ 200
Substâncias voláteis (g/hl a.p.) (*)	≥ 200
Etanal ou acetaldeído (g/hl a.p.)	≥ 5 e ≤ 40
Acetato de etilo (g/hl a.p.)	≤ 300
Metanol (g/hl a.p.)	≥ 500 e ≤ 1000
2-butanol (g/hl a.p.)	≤ 2
1-propanol (g/hl a.p.)	≥ 10 e ≤ 40
Isobutanol (g/hl a.p.)	≥ 30 e ≤ 70
1-butanol (g/hl a.p.)	≤ 3
Isopentanois (g/hl a.p.)	≥ 80 e ≤ 185
Álcoois superiores totais (g/hl a.p.)	≥ 130 e ≤ 300
Isobutanol/propanol	$\geq 1,5$ e ≤ 4

(*) Não incluem os álcoois etílico e metílico, de acordo com a definição constante da alínea k) do n° 3 do artigo 1° do Regulamento (CEE) n° 1576/89, do Conselho, de 29 de Maio."

Na tabela 3.2 apresentam-se os resultados das análises de aguarentes de medronho realizadas no Laboratório de Enologia da Universidade do Algarve, entre 2010 e 2014. Para comparação apresentam-se também os resultados obtidos por G. Versini e colaboradores, para 45 amostras de aguardente de medronho da Serra do Caldeirão, recolhidas em 1992 (Versini *et al.* 1995a). A tabela 3.3 apresenta os resultados de 2014 por região de origem. Os resultados do extrato seco não foram apresentados porque nunca foi detetada qualquer não conformidade e, em geral, os valores encontrados refletem o teor em cobre. Os valores do somatório dos compostos voláteis (sem etanol e metanol) e a razão isobutanol/1-propanol podem ser calculados a partir dos dados apresentados. O

somatório dos álcoois superiores (1-propanol, isobutanol e isopentanois) é apresentado porque este parâmetro é considerado por muitos autores um indicador da qualidade dos destilados. Os álcoois superiores podem influenciar positivamente ou negativamente o aroma das aguardentes (Tešević *et al.*, 2009), tanto pelo seu aroma intrínseco como pelo efeito de solvente sobre outros compostos aromáticos (Moreira, *et al.*, 2012). Teores em álcoois superiores acima de 350 g/hL (a.p.), contribuem para uma percepção sensorial negativa dos destilados (Tsakiris *et al.*, 2014; Rodríguez Madrera *et al.*, 2013; Bovo *et al.*, 2012; López-Vázquez *et al.*, 2012; González *et al.*, 2010).

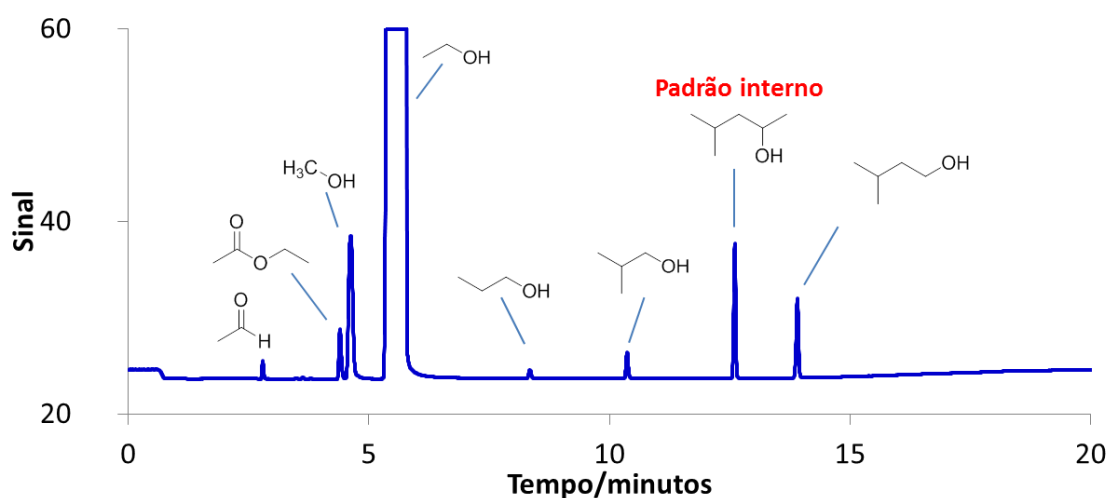


Figura 3.1 - Cromatograma típico da aguardente de medronho (GC-FID), obtido por injeção em natureza (direta). Coluna de polietileno glicol (BP 20M 30 m x 0,32 mm I.D. x 1,0 µm). Temperatura inicial 40 °C durante 5 min, rampa de 5 °C/min até 210 °C.

O teor em etanol é sempre próximo dos 50 % vol. para todas as aguardentes. Em média, as amostras apresentam acidez total abaixo do limite fixado pela legislação, embora relativamente elevado para aguardentes de qualidade, pois a acidez influencia negativamente a qualidade sensorial das bebidas (Santos *et al.*, 2013). Os resultados dos últimos cinco anos indicam uma diminuição no teor em acidez, evolução positiva deste parâmetro (média dos 5 anos 103,3 g/hL (a.p.)), comparativamente com os resultados obtidos por G. Versini e colaboradores (1995) que foi, em média, 170,1 g/hL (a.p.). São escassos os resultados publicados para este parâmetro e os reportados referem-se, em geral, à acidez volátil. Para aguardente de laranja, de jabuticaba e de maçã foram determinados valores de acidez de 37,99 g/hL (Santos *et al.*, 2013), 139,33 g/hL (Duarte *et al.*, 2011) e 40 g/hL (a.p.) (Rodríguez Madrera *et al.*, 2010), respetivamente. De acordo com G. Versini a acidez de aguardentes de qualidade não deve ultrapassar os 30 g/hL

(a.p.), quando expressa em ácido acético. Os valores encontrados indicam que estes níveis de acidez são difíceis de conseguir.

No Instituto San Michell All Adige em Itália, para que as aguardentes de frutos apresentem acidez baixa, é feita uma neutralização. Quando o vapor sai do alambique, neste caso em aço inoxidável, passa por um filtro de cobre contendo carbonato de cálcio antes de entrar na coluna de refrigeração, também de cobre (Figura 3.2). Esta é uma possibilidade interessante para redução da acidez da aguardente de medronho e já foi testada por alguns produtores Algarvios. Devia ser, no entanto, um procedimento generalizado para se conseguir os níveis de acidez indicados por G. Versini.



Figura 3.2 - Destilaria do Instituto San Michell All Adige, Trento, Itália, 1994.

Tabela 3.2 - Resultados dos parâmetros de qualidade de aguardentes de medronho, obtidos no Laboratório de Enologia da Universidade do Algarve, entre 2010 e 2014, e sua comparação com os resultados obtidos por G. Versini para aguardentes de medronho da serra do Caldeirão, preparadas em 1992.

Parâmetros \ ano	2010	2011	2012	2013	2014	1992
(Versini <i>et al.</i> 1995a)						
Nº de amostras	59	59	59	59	59	45
Etanol (% vol.)	49,3 ^α ± 2,8	49,6 ^α ± 2,4	49,1 ^α ± 2,7	49,0 ^α ± 3,7	49,8 ^α ± 2,9	51,5 ± 4,1
Acidez total (g/hL)* (a.p.)	104,4 ^α ± 49,7	96,8 ^α ± 52,7	101,1 ^α ± 74,8	97,5 ^α ± 59,1	94,6 ^α ± 48,8	170,1 ± 171,0
Acetaldeído (g/hL) (a.p.)	40,0 ^α ± 13,5	33,0 ^β ± 7,6	44,9 ^α ± 11,3	44,8 ^α ± 12,2	46,8 ^α ± 13,0	57,3 ± 44,5
Acetato de etilo (g/hL) (a.p.)	236,4 ^α ± 100,0	195,3 ^β ± 90,1	171,7 ^β ± 72,0	251,5 ^α ± 110,5	236,8 ^α ± 85,7	494,0 ± 563,2
Metanol (g/hL) (a.p.)	935,6 ^α ± 157,5	794,8 ^β ± 111,2	804,3 ^β ± 104,0	804,6 ^β ± 81,4	795,4 ^β ± 105,8	898,3 ± 77,9
1-propanol (g/hL) (a.p.)	17,7 ^α ± 4,7	18,7 ^α ± 4,4	19,1 ^α ± 4,0	16,9 ^α ± 3,8	18,2 ^α ± 4,4	14,2 ± 2,5
Isobutanol (g/hL) (a.p.)	46,7 ^α ± 10,0	43,0 ^β ± 6,8	40,9 ^β ± 7,2	38,2 ^γ ± 6,1	38,1 ^γ ± 6,6	45,5 ± 10,7
Isopentanóis (g/hL) (a.p.)	133,0 ^α ± 46,1	129,0 ^α ± 23,3	134,9 ^α ± 22,2	114,6 ^β ± 21,1	111,0 ^β ± 25,5	132,6 ± 34,9
Σ Álc. Superiores (g/hL) (a.p.)	197,3 ^α ± 53,6	186,1 ^α ± 39,5	194,9 ^α ± 29,1	169,2 ^β ± 27,2	167,7 ^β ± 27,4	193,1 ± 44,9
Cobre (mg/L)	2,3 ^α ± 1,4	2,2 ^α ± 1,2	4,5 ^β ± 3,7	3,1 ^α ± 2,7	2,4 ^α ± 1,1	-

*Expresso em ácido acético. Os resultados são expressos como média e respetivo desvio padrão de 59 amostras analisadas em cada ano. Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferenças significativas em cada ano, com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

O etanal ou acetaldeído é um dos primeiros subprodutos do metabolismo das leveduras (González *et al.*, 2010; Apostolopoulou *et al.*, 2005), podendo também resultar da oxidação espontânea ou mediada por microrganismos (Apostolopoulou, *et al.*, 2005). Tem um ponto de ebulição de 21 °C, o que o torna um composto tipicamente de “cabeça”. Pode também formar-se durante a destilação e, como é miscível com água, pode estar presente mesmo na “cauda” (Coldea *et al.*, 2012; Coldea *et al.*, 2011). Este parâmetro, dado o baixo limite imposto por lei, necessita de um controlo rigoroso durante todo o processamento, nomeadamente no sentido de evitar o contacto com o oxigénio durante a fermentação. O acetaldeído apresenta resultados significativamente superiores para as aguardentes com origem fora do Algarve (Tabela 3.3). No Algarve alguns casos ultrapassam o limite da legislação, indicando que muito trabalho está por fazer. Contudo a média dos últimos 5 anos (41,1 g/hL (a.p.), tabela 3.2) é mais baixa do que a encontrada por G. Versini nas amostras de 1992 (57,3 g/hL (a.p.)). Comparando os resultados obtidos com outros de fora do país verificamos que, para 19 aguardentes de medronho, produzidas de forma tradicional na Grécia, o teor em acetaldeído foi de $100 \pm 53,7$ g/hL (a.p) (Soufleros *et al.*, 2005). Na ilha da Sardenha, como resultado de um teste de produção de aguardente de medronho realizado durante dois anos, obtiveram-se teores médios em acetaldeído de 14,0 e 24,0 g/hL (a.p.), em 2003 e 2005, respetivamente (Versini *et al.*, 2011). Noutro ensaio de produção de aguardente de medronho, realizado na região da Galiza, o teor em acetaldeído encontrado foi de $32,7 \pm 1,9$ g/hL (a.p.). De notar que, em condições de investigação controladas, o teor em acetaldeído é sempre mais baixo do que na produção tradicional.

Comparando os resultados do Medronho com os de outros destilados de frutos encontramos para aguardentes de pera, produzidas em Espanha, teores em acetaldeído entre 30 e 50 g/hL (a.p.) (Arrieta-Garay *et al.*, 2013). Ainda para aguardentes de pera produzidas na Sardenha, o teor em acetaldeído varia entre 13,0 e 103,2 g/hL de (a.p.), dependendo da variedade de pera e do ano de colheita (Versini *et al.*, 2012). Em aguardentes de kiwi a média encontrada foi de 153,9 ou 212,2 g/hL (a.p.) dependo da estirpe de levedura utilizada (López-Vázquez *et al.*, 2012).

Tabela 3.3 – Resultados dos teores em compostos voláteis mais abundantes em aguardentes de medronho analisadas em 2014, por região de origem (10 amostras por zona).

Parâmetro\ Zona	Monchique	Barlavento (sem Monchique)	Sotavento	Resto do país
Etanol (% vol.)	51,5 ^α ± 2,2	48,1 ^β ± 4,2	47,2 ^β ± 2,4	50,2 ^α ± 1,8
Acidez total (g/hL)* (a.p.)	98,0 ^α ± 44,5	95,4 ^α ± 70,8	94,8 ^α ± 60,2	119,9 ^α ± 96,9
Acetaldeído (g/hL) (a.p.)	46,3 ^α ± 10,0	44,7 ^α ± 16,7	43,8 ^α ± 10,9	59,4 ^β ± 16,4
Acetato de etilo (g/hL) (a.p.)	239,5 ^α ± 70,7	226,9 ^α ± 117,5	240,6 ^α ± 79,2	279,8 ^β ± 152,1
Metanol (g/hL) (a.p.)	819,1 ^α ± 50,9	768,0 ^α ± 214,5	784,8 ^α ± 108,6	738,9 ^α ± 104,3
1-propanol (g/hL) (a.p.)	18,2 ^α ± 2,2	16,2 ^α ± 5,4	16,5 ^α ± 3,1	19,7 ^α ± 5,3
Isobutanol (g/hL) (a.p.)	38,0 ^α ± 6,4	35,1 ^α ± 10,7	39,0 ^α ± 5,4	37,2 ^α ± 7,4
Isopentanois (g/hL) (a.p.)	108,9 ^α ± 16,4	101,5 ^α ± 29,6	117,6 ^α ± 19,5	125,9 ^α ± 35,7
Σ Alc. superiores (g/hL) (a.p.)	165,0 ^α ± 22,0	155,0 ^α ± 40,9	173,2 ^α ± 23,9	182,8 ^α ± 37,6
Cobre (mg/L)	2,1 ^α ± 0,6	3,4 ^α ± 2,4	4,5 ^α ± 2,5	4,8 ^α ± 4,3

Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa nas 10 amostras do ano 2014 entre regiões com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

O acetato de etilo é produzido em pequena quantidade pelas leveduras durante a fermentação, sendo principalmente formado por bactérias acéticas quando em aerobiose (Tsakiris *et al.*, 2014; Tešević *et al.*, 2009). Este composto é tipicamente de “cabeça” (Da Porto *et al.*, 2010; Galego *et al.*, 1995). Os resultados das análises realizadas no laboratório de Enologia de 2010 a 2014 (média dos 5 anos, tabela 3.2, 224,6 g/hL (a.p.)), indicam que o seu teor se encontra abaixo do limite imposto pela Legislação Portuguesa (300 g/hL (a.p.)), contrariamente ao verificado nas amostras recolhidas em 1992 (494,0 g/hL (a.p.)). De realçar, que em amostras de muitos produtores de pequena dimensão, quando a fermentação é realizada em aerobiose, o acetato de etilo atinge teores da ordem

dos 1000 g/hL (a.p.), contribuindo para desvios-padrão bastante elevados quando se calculam médias de amostras de diferentes proveniências. Os teores em acetato de etilo encontrados nos últimos 5 anos, tal como os da acidez total, são ainda considerados excessivos para aguardentes de qualidade. O teor em acetato de etilo para aguardentes de qualidade não deve exceder 130 g/hL (a.p.) (Versini *et al.*, 2009), de modo a não contribuir negativamente para o aroma do destilado. Nas 19 aguardentes de medronho com origem na Grécia, o teor em acetato de etilo encontrado foi $340,0 \pm 335,5$ g/hL (a.p.) (Soufleros *et al.*, 2005). Nos ensaios realizados na Galiza e na Sardenha este composto encontra-se em muito menor quantidade, $40,7 \pm 3,2$ g/hL (a.p.) na Galiza (González *et al.*, 2011) e, em média, 29,5 e 31,5 g/hL (a.p.) em 2003 e 2005, respetivamente, na Sardenha (Versini *et al.*, 2011).

O metanol não ultrapassa o limite estipulado pela legislação, nem no período de 2010 a 2014, nem nas amostras analisadas por Versini e colaboradores (1995). A formação de metanol está relacionada com as características da matéria-prima e resulta da desmetilação de substâncias pécicas por enzimas pectolíticas metilo-esterase, durante o processo de amadurecimento do fruto (Rodríguez Madera *et al.*, 2013; Coldea *et al.*, 2011; González *et al.*, 2010). Deste modo, a concentração em metanol na primeira destilação está diretamente relacionada com a quantidade de pectina presente no fruto (Coldea *et al.*, 2011). A relação quantidade de pectina do fruto/quantidade de metanol no destilado pode ser utilizada como marcador de origem e/ou a autenticidade do destilado (Moales *et al.*, 2010). Para Coldea e colaboradores se for feita uma redestilação do destilado, o metanol é concentrado na “cabeça” (destilado a descartar), e o “coração” do destilado assim obtido apresenta menor teor em metanol (Coldea *et al.*, 2011). No Algarve a primeira destilação conduz a teores alcoólicos superiores a 50 % vol., razão pela qual não são feitas redestilações. Nas 19 amostras originárias da Grécia e obtidas por métodos tradicionais, o teor em metanol foi 744 ± 297 g/hL (a.p.) (Soufleros *et al.*, 2005). Nos ensaios realizados em Itália, apesar da redestilação, o teor em metanol encontrado foi 808 e 1016 g/hL (a.p.) respetivamente em 2003 e 2005. Nos ensaios realizados em Espanha (Galiza) a destilação foi feita por arraste de vapor com coluna de retificação. Neste caso o teor em metanol foi $320,5 \pm 3,5$ g/hL (a.p.). O sistema de arraste de vapor com coluna de retificação apresenta-se assim como alternativa para diminuição do teor em metanol. Testes realizados com outras aguardentes, nomeadamente com bagaço, revelaram que aguardentes obtidas por sistema de alambique de cobre e por um sistema de coluna com arraste de vapor não apresentam diferenças no teor em metanol (Arrieta-Garay *et al.*,

2014a). Estes investigadores encontram diferenças na quantidade de metanol produzida com diferentes estirpes de leveduras, em qualquer dos sistemas de destilação utilizados. Por isso consideram que diferentes estirpes de leveduras podem condicionar de forma diferente a atividade das enzimas responsáveis pela produção do metanol. No Algarve, em geral, a fermentação do medronho é feita com a microbiota autóctone.

Os álcoois superiores são produzidos pelas leveduras durante a fermentação (Tsakiris *et al.*, 2014; Cortés *et al.*, 2009; Tešević *et al.*, 2009; García-Llobodanin *et al.*, 2008) e são os compostos voláteis presentes em maior quantidade nos destilados. Podem originar efeito sensorial negativo para teores superiores a 350 g/hL (a.p.), (Tsakiris *et al.*, 2014; Rodríguez Madrera *et al.*, 2013; Bovo *et al.*, 2012; Da Porta, *et al.*, 2011; González *et al.*, 2010; Tešević *et al.*, 2009). Os álcoois superiores têm um comportamento semelhante ao do etanol durante a destilação pois apresentam pontos de ebulição relativamente baixos e são solúveis em etanol e parcialmente solúveis em água (García-Llobodanin, *et al.*, 2008). As aguardentes de medronho analisadas entre 2010 e 2014 apresentam em média teor em álcoois superiores de 180,9 g/hL (a.p.). Na experiência de produção realizada na Galiza o teor em álcoois superiores foi $170,3 \pm 5,3$ g/hL (a.p.) (González *et al.*, 2011). Nos destilados originários da Grécia o teor em álcoois superiores foi de $260 \pm 69,4$ g/hL (a.p.) (Soufleros *et al.*, 2005) e nas experiências realizadas na Sardenha foram encontrados valores médios de 438,5 e 303,0 g/hL (a.p.) para 2003 e 2005, respetivamente (Versini *et al.* 2011). O teor dos diferentes álcoois superiores é variável. O 2-butanol é um composto normalmente associado a desenvolvimento bacteriano na matéria-prima (Versini *et al.*, 2012; López-Vázquez *et al.*, 2010; Da Porto *et al.*, 2008; Hernández-Gómez *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 1996). A presença de 2-butanol nas aguardentes de medronho analisadas entre 2010 e 2014 ou não foi detetada ou foi inferior a 0,5 g/hL (a.p.), resultado previsível pelo facto do fruto medronho apresentar pH 3,3 (Santo *et al.*, 2012), condições que dificultam o desenvolvimento bacteriano. A colheita decorre numa época de temperaturas relativamente baixas (outubro a dezembro), sendo os medronhos colocados diariamente nos fermentadores pela maioria dos pequenos produtores. Não há normalmente tempo de armazenamento e assim condições para o desenvolvimento de bactérias. Na experiência realizada na Galiza este composto também não foi detetado e nas experiências realizadas na Sardenha os valores encontrados são inferiores a 0,5 g/hL de (a.p.). Este composto não foi reportado nas amostras oriundas da Grécia. A presença de 1-butanol em teores elevados está também associada a atividade microbiana (Cortés *et al.*, 2009; Hernández-Gomes, *et al.*, 2005) e, tal como o 2-butanol,

a sua presença nos destilados estudados ou não foi detetada ou apresenta teores abaixo de 0,5 g/hL (a.p.). Nas experiências realizadas em Itália e Espanha o 1-butanol apresenta teores inferiores a 1 g/hL (a.p.). Nas aguardentes oriundas da Grécia o teor em 1-butanol foi $7,0 \pm 11,8$ g/hL (a.p.). Relativamente ao teor em 1-propanol, as aguardentes de medronho portuguesas apresentam sempre valores inferiores a 20 g/hL (a.p.), muito abaixo do máximo estipulado pela legislação. Este composto não foi reportado nas aguardentes preparadas na Grécia, e na Galiza o teor encontrado foi $41,0 \pm 0,9$ g/hL (a.p.) (González *et al.*, 2011). Em Itália obtiveram-se 20,0 e 21,5 g/hL (a.p.) em 2003 e 2005, respetivamente (Versini *et al.*, 2011). Este composto pode também ter origem no desenvolvimento bacteriano na fase de armazenamento da matéria-prima (Apostolopoulou *et al.*, 2005). O isobutanol ou 2-metil-1-propanol e os isopentanóis ou álcoois amílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) são os álcoois superiores presentes em teores mais elevados em qualquer das amostras estudadas ou em aguardentes de outros países. O teor destes álcoois encontra-se dentro do limite estipulado pela legislação. Relativamente ao isobutanol os teores médios situam-se próximo de 40 g/hL (a.p.), exceto no caso das aguardentes preparadas na Sardenha em 2003, cujo teor médio foi de 64 g/hL (a.p.). Nas aguardentes de medronho portuguesas a média do teor em isopentanóis, de 2010 a 2014, foi 122,7 g/hL (a.p.). O teor em isopentanóis das aguardentes da Galiza é o mais baixo, 92,5 g/hL (a.p.) (González *et al.*, 2011). Nas aguardentes preparadas na Grécia a média foi 202 g/hL (a.p.) (Soufleros *et al.*, 2005) e nas da Sardenha foi de 354 e 239,5 g/hL (a.p.) em 2003 e 2005, respetivamente (Versini *et al.*, 2011). De acordo com Versini *et al.* (2009), o teor em isopentanóis está relacionado com a assimilação do azoto pelas leveduras. Os teores de outros álcoois superiores, nomeadamente do 1-hexanol, cis e trans-3-hexeno-1-ol e 2-feniletanol, não fazem parte da legislação atual e por isso não são prioridade dos produtores; serão abordados noutro ponto deste trabalho.

Todas as amostras apresentam teores de cobre abaixo do máximo permitido por lei (15 mg/L). De destacar o teor, algo mais baixo, das aguardentes da zona de Monchique, embora não seja suficiente para as diferenciar estatisticamente. Este resultado poderá estar associado à utilização de um sistema de refrigeração por tubo direito e não em serpentina, muito comum noutras localidades (Figuras 1.6 e 1.7). Nestas condições há menor superfície de contacto com o cobre, o que pode estar na origem dos teores mais baixos. Nas aguardentes oriundas da Grécia o teor em cobre foi $1,0 \pm 0,8$ mg/L, mais baixo do que qualquer dos teores encontrados em Portugal para aguardentes de medronho,

mesmo para o caso de Monchique. De realçar que o teor em cobre está também relacionado com a acidez do destilado; quanto mais elevada for a acidez, para um alambique com as mesmas características, maior é o teor em cobre (Galego *et al.*, 1998).

3.1.1.2 - Perfil típico dos compostos voláteis da aguardente de medronho do Algarve

Os compostos voláteis mais abundantes nas aguardentes de medronho, são comuns a todas as aguardentes, pois são o resultado da fermentação alcoólica (Figura 3.3). O que varia de aguardente para aguardente são as proporções relativas.

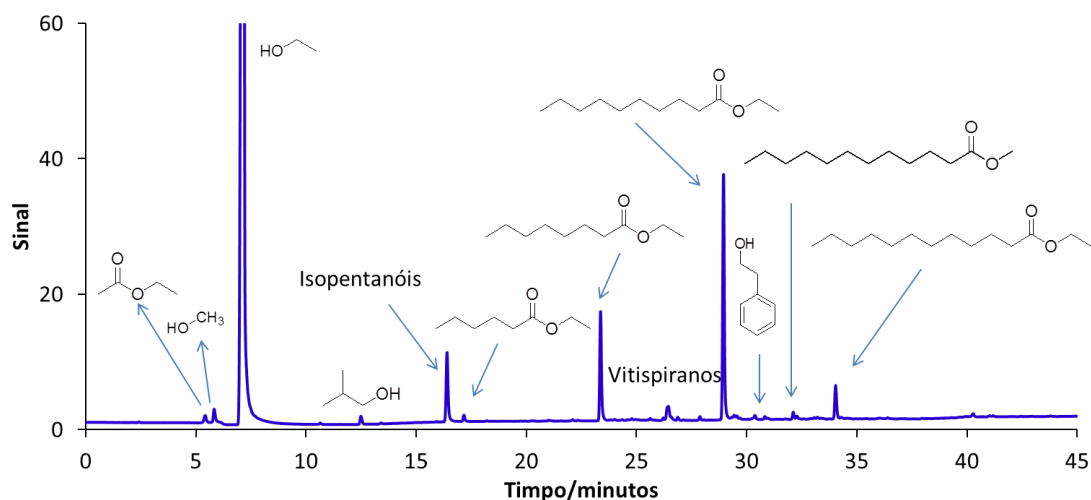


Figura 3.3 - Traço de HS-SPME- GC-FID típico de uma aguardente de medronho. Coluna de polietileno glicol (BP 20M 30 m x 0,32 mm I.D. x 1,0 μ m). Temperatura inicial 40 °C durante 5 min, seguida de aumento de temperatura a 5 °C/min até 210 °C onde permanece 6 min.

Os vitispiranos são compostos típicos da aguardente de medronho (Versini *et al.*, 1995a) que resultam da degradação dos carotenóides presentes no fruto (Mendes-Pinto, 2009). Podem ser também encontrados em algumas aguardentes vínicas (Versini *et al.*, 1995b) mas não foram ainda reportados em aguardentes de outros frutos. Deste modo os vitispiranos podem ser considerados marcadores da autenticidade das aguardentes de medronho.

3.1.1.3 - Diferenças para outras aguardentes de medronho

Em Portugal a aguardente de medronho é tipicamente produzida nas zonas serranas. Após a execução dos projetos PAMAF-IED 4057 e 8005, o interesse por este destilado aumentou no Algarve. Fora do Algarve têm sido os produtores da zona de Coimbra quem tem manifestado mais interesse em melhorar a sua aguardente e em

comparar com aguardentes produzidas noutras regiões. Se relativamente às análises físico-químicas não existem diferenças relevantes entre as aguardentes do Algarve e da região de Coimbra, a apreciação sensorial revela diferenças. Procurar os compostos responsáveis por essa diferença foi um dos objetivos deste trabalho. A tabela 3.4 mostra resultados da análise de alguns compostos voláteis, em aguardentes do Algarve e da região de Coimbra, potencialmente relacionados com as diferenças detetadas na apreciação sensorial.

Os ésteres de peso molecular mais baixo, o hexanoato, octanoato e decanoato de etilo e o acetato de isoamilo conferem aos destilados aroma frutado (Tsakiris *et al.*, 2014; López-Vázquez *et al.*, 2012; Soufleros *et al.*, 2005). Os ésteres de peso molecular mais elevado, nomeadamente o dodecanoato de etilo, o tetradecanoato de etilo, o hexadecanoato de etilo e o linoleato de etilo conferem aos destilados a sensação de presença de cera e/ou ranço (López-Vázquez *et al.*, 2012; Versini *et al.*, 2009). Embora tenham sido analisadas poucas aguardentes, as amostras da região de Coimbra apresentam teor mais elevado em ésteres superiores, nomeadamente em decanoato de etilo e em dodecanoato de etilo.

Os álcoois 1-hexanol e cis-3-hexeno-1-ol conferem aos destilados aroma herbáceo (Arrieta-Garay *et al.*, 2013, Hernández-Gomez *et al.*, 2005). No entanto, o 1-hexanol em teores até 9,8 g/hL (a.p.) não confere aroma desagradável às bebidas (Arrieta-Garay *et al.*, 2013; Apostolopoulou *et al.*, 2005), sendo mesmo considerado que, quando presente em teores até 2,1 g/hL (a.p.), tem um efeito positivo no aroma das aguardentes (Soufleros *et al.*, 2005). As aguardentes portuguesas apresentam teores em 1-hexanol mais baixos do que as oriundas da Grécia. As do Algarve possuem em média de $0,6 \pm 0,2$ g/hL (a.p.) e as do centro do país $0,7 \pm 0,3$ g/hL (a.p.), não havendo diferenças significativas entre os dois grupos. Por outro lado, o cis-3-hexeno-1-ol apresenta para as aguardentes da região de Coimbra um teor cerca de 3 vezes superior ao encontrado em aguardentes do Algarve. O teor em cis-3-hexeno-1-ol, também conhecido por álcool das folhas, apresenta-se como um potencial marcador das aguardentes da região centro de Portugal, conferindo-lhe a nota herbácea detetada na análise sensorial.

O álcool feniletílico ou 2-feniletanol é um composto característico da “cauda” das aguardentes (González *et al.*, 2011; Apostolopoulou *et al.*, 2005), e apresenta aroma agradável a rosas (Tešević *et al.*, 2009; Apostolopoulou *et al.*, 2005). Este composto está presente nas aguardentes provenientes das duas regiões.

Tabela 3.4 - Resultados da quantificação dos compostos voláteis da aguardente de medronho obtidos por extração com diclorometano e análise por GC-MS.

Compostos	Algarve (g/hL (a.p.))	Coimbra (g/hL (a.p.))
Nº de amostras	6	6
Octanoato de etilo	1,1 ^α ± 0,3	1,6 ^β ± 0,3
Decanoato de etilo	1,5 ^α ± 0,3	2,9 ^β ± 0,3
Dodecanoato de etilo	1,1 ^α ± 0,1	1,9 ^β ± 0,4
Tetradecanoato de etilo	0,6 ^α ± 0,4	0,4 ^α ± 0,4
Hexadecanoato de etilo	2,2 ^α ± 0,8	1,8 ^α ± 1,2
Linoleato de etilo	1,6 ^α ± 0,6	0,6 ^β ± 0,3
1-hexanol	0,6 ^α ± 0,2	0,7 ^β ± 0,3
Cis-3-hexeno-1-ol	0,6 ^α ± 0,2	2,0 ^β ± 1,0
Álcool feniletílico	3,0 ^α ± 2,4	4,4 ^α ± 1,8
Furfural	1,9 ^α ± 0,4	0,8 ^β ± 0,2

Os resultados são expressos como a média e desvio padrão de todas as amostras analisadas. Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa nas primeiras 6 amostras, com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

O furfural pode resultar do aquecimento, em meio ácido, dos açúcares (pentoses) (Apostolopoulou *et al.*, 2005) durante o processo de destilação. Apresenta ponto de ebulição relativamente elevado (167 °C) e é relativamente solúvel em água, pelo que a sua concentração será mais elevada a partir do meio do “coração” e até ao final da “cauda” (García-Llobodanin *et al.*, 2008). Nas aguardentes do Algarve o teor em furfural é aproximadamente o dobro do determinado para aguardentes da região de Coimbra. O valor encontrado, $1,9 \pm 0,5$ g/hL (a.p.), é, no entanto, muito inferior ao determinado para aguardentes de pera, nas quais foram encontrados teores entre 2,5 e 8,3 g/hL (a.p.) (García-Llobodanin *et al.*, 2008).

Foram também analisadas, por GC-FID, um pequeno grupo de amostras, com indicação de medronhos provenientes de agricultura biológica, de ambas as regiões (Algarve e Coimbra). Os resultados estão resumidos na tabela 3.5. Os resultados relativos ao teor em cis-3-hexeno-1-ol apresentam a tendência já observada para as amostras sem a indicação de origem biológica. Para este grupo de amostras foram ainda analisados os monoterpenos linalol e α -terpineol. Não foram detetadas diferenças significativas no teor

em monoterpenos entre as amostras do Algarve e as da região de Coimbra. Não estão disponíveis comercialmente padrões de vitispiranos.

Tabela 3.5 - Resultados dos teores em compostos voláteis das aguardentes de medronho, preparados com medronho de agricultura biológica após extração com diclorometano e análise por GC-FID.

Compostos (g/hL (a.p.)	Algarve	Centro (Coimbra)
Nº de amostras	3	3
Acetato de isomilo	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Hexanoato de etilo	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,3
Octanoato de etilo	2,0 ± 0,8	1,7 ± 1,6
Decanoato de etilo	2,5 ± 0,9	2,3 ± 1,8
Dodecanoato de etilo	1,6 ± 0,2	0,4 ± 0,6
Tetradecanoato de etilo	1,0 ± 0,3	0,4 ± 0,4
1-hexanol	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,4
Cis-3-hexeno-1-ol	0,4 ± 0,2	1,3 ± 0,8
Álcool feniletílico	3,1 ± 0,3	3,0 ± 2,5
Furfural	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Linalol	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
α -terpineol	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1

3.1.2 - Aguardente de batata-doce

A batata-doce, *Ipomoea batatas* (L.), variedade Lira, é cultivada há vários séculos na região de Aljezur e zonas limítrofes. Nesta região a produção de batata-doce é desenvolvida por cerca de 300 pequenos produtores, com uma produção média de 20 toneladas/ha, de acordo com a Associação de Produtores local. A importância histórica e económica desta cultura na região motivou a criação de uma Indicação Geográfica Protegida (IGP) (PT-PGI-0005- 0517-03-01.2005), reconhecida pela Comunidade Europeia, a 17 de agosto de 2009. A valorização dos excedentes de batatas danificadas fisicamente ou com dimensões fora das estabelecidas pelo caderno de especificações da

IGP (dimensões entre 8,5 cm por 4,0 cm e os 16,5 cm por 7,1 cm com uma massa entre 50 e 450 g), é preocupação da Associação de Produtores, razão pela qual têm procurado ajuda no sentido de encontrar alternativas. Tal como noutros países produtores, são também geradas grandes perdas associadas às dificuldades na conservação e/ou defeitos físicos (Aina *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2011; Lockwood *et al.*, 2008).

A produção de aguardente foi uma alternativa avaliada durante este trabalho. A batata-doce é pobre em açúcares fermentáveis, embora seja rica em amido (Montefusco *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2013). Para aumentar o rendimento alcoólico é necessário converter o amido em açúcares fermentáveis, isto é, promover a sacarificação. O amido é constituído por cadeias de α -D-glicose cuja estrutura apresenta dois polissacarídeos, a amilose, formada por moléculas lineares, e a amilo-pectina, polissacarídeo altamente ramificado (Campanha & Franco, 2011; Shariffa, *et al.*, 2009). Na batata doce os grânulos de amido apresentam forma variável, poligonal, redonda ou oval, e possuem diâmetros entre 2 e 25 μ m (Chen *et al.*, 2004; Moorthy, 2002). Estes grânulos são insolúveis em água devido às fortes interações por pontes de hidrogénio entre as cadeias que os compõem (Zavareze & Dias, 2011). As propriedades do amido de batata-doce dependem da dimensão dos grânulos (Chen *et al.*, 2004) e do modo como a amilose e a amilo-pectina estão associadas (Zavareze & Dias, 2011). A modificação das propriedades do amido pode fazer-se por processos enzimáticos, químicos, físicos ou combinação destes. Tipicamente, o amido da batata-doce apresenta baixa conversão enzimática para açúcares fermentáveis porque apresenta alguma resistência à α -amilase (hidrolisa as ligações glicosídicas α -(1-4)) e à glucoamilase (produz β -glicose) (Shariffa *et al.*, 2009). Nalgumas indústrias é usada a modificação química, mas nas indústrias alimentar e farmacêutica há preferência pelas modificações físicas, nomeadamente induzidas pela humidade, calor, pressão ou radiação (Lee *et al.*, 2011).

Numa avaliação preliminar, foram preparadas aguardentes a partir de batata-doce assada e cozida, com e sem pele, fermentada com e sem enzimas. Foram testadas enzimas normalmente usadas na fermentação de uvas (cromazina DC da DAL CIN, Milão Itália). Foram obtidos destilados com boas características em todos os casos. Os mais aromáticos foram os preparados com batata-doce assada com pele. Nos ensaios com enzimas, seguidos nas primeiras tentativas de produção desta aguardente, verificou-se um teor relativamente elevado em metanol, característica desfavorável. Optou-se, por isso, apenas pelo tratamento térmico.

3.1.2.1 - Batatas-doces e o tratamento térmico pré-fermentativo

O lote de batatas-doces utilizado na preparação das aguardentes apresentava humidade de 67 % (± 3) e teor de amido também de 67% (± 3), este último tomando por base a massa seca da batata-doce. A tabela 3.6 resume os teores em açúcares encontrados na batata antes e depois dos diferentes processamentos térmicos.

Tabela 3.6 - Teor em açúcares de batatas-doces da variedade Lira não processadas, cozidas e assadas (g/100 g matéria seca).

Batata-doce	Açúcares totais	Açúcares redutores	Glicose	Frutose
Não processadas	$13^{\alpha} \pm 1$	$6^{\alpha} \pm 1$	< 0.2	< 0.2
Cozida	$20^{\alpha} \pm 2$	$16^{\alpha} \pm 2^{\alpha}$	$5,5^{\beta} \pm 0,1$	$2,1^{\beta} \pm 0,1$
Assada (190 °C)	$34^{\alpha} \pm 2$	$27^{\alpha} \pm 2$	$4,8^{\beta} \pm 0,2$	$2,4^{\beta} \pm 0,1$
Assada (130 °C)	$34^{\alpha} \pm 2$	$28^{\alpha} \pm 2$	$6,0^{\alpha} \pm 0,1$	$1,9^{\alpha} \pm 0,2$

Os resultados da média e correspondentes desvios padrão foram obtidos com pelo menos 6 medições. Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

O processo de cozedura contribuiu para um aumento do teor em açúcares totais de 7 %, enquanto que a assadura induz um aumento deste teor em cerca de 21 %, tanto em batatas assadas a 130 °C como a 190 °C. O teor em açúcares redutores também aumenta, consistente com a formação de maltose por tratamento térmico, já referida por alguns autores (Chan *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2013). O aumento dos açúcares totais corresponde a 10 e 30 % do amido, para as batatas cozidas e assadas, respetivamente. Estes resultados indicam uma conversão do amido mais baixa do que a observada por métodos enzimáticos, os quais podem levar a 90 % de conversão (Diaz *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2011). Embora os tratamentos térmicos não atinjam o desempenho dos métodos enzimáticos, a sua utilização não invalida o posterior processamento enzimático. De facto o tratamento térmico desagrega os grânulos de amido (Lai *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2011), tornando mais fácil a sua posterior hidrólise, quer por processos enzimáticos, quer por processos químicos, potenciando assim o rendimento da fermentação.

3.1.2.2 - Compostos voláteis da batata-doce não processada e processada

Os tratamentos térmicos realçam os compostos voláteis da batata-doce (Nakamura *et al.*, 2013, Wang & kays 2000), podendo por isso contribuir para o aroma final do destilado. Os compostos aromáticos das batatas-doces cozidas e assadas às duas temperaturas foram extraídos logo após o processamento e analisados por GC-FID e GC-MS. Os processos de cozedura e de assadura a 130 °C originam vestígios de alguns compostos como por exemplo o furfural (Figura 3.4, traços a) e b)). O processo de assadura a 190 °C origina um perfil de compostos aromáticos bastante diferente (Figura 3.4, traço c)). Os compostos identificados e presentes em maior quantidade são o furfural, o furano-3-metanol, o maltol, o 3-hidroxi-2,3-dihidromaltol, o hidroximetilfurfural e o ácido dodecanóico. Estes compostos são formados durante o tratamento térmico (Nakamura *et al.* 2013, Wang & kays, 2001, Maga, 1989) e muitos deles são encontrados em vários alimentos, apesar de alguns apresentarem alguma toxicidade (Anese & Suman, 2013; López-Vázquez *et al.*, 2012). A escolha recaiu no tratamento por assadura a 130 °C de modo a evitar estes compostos (Figura 3.4, cromatograma b)), além de ser mais favorável do ponto de vista energético.

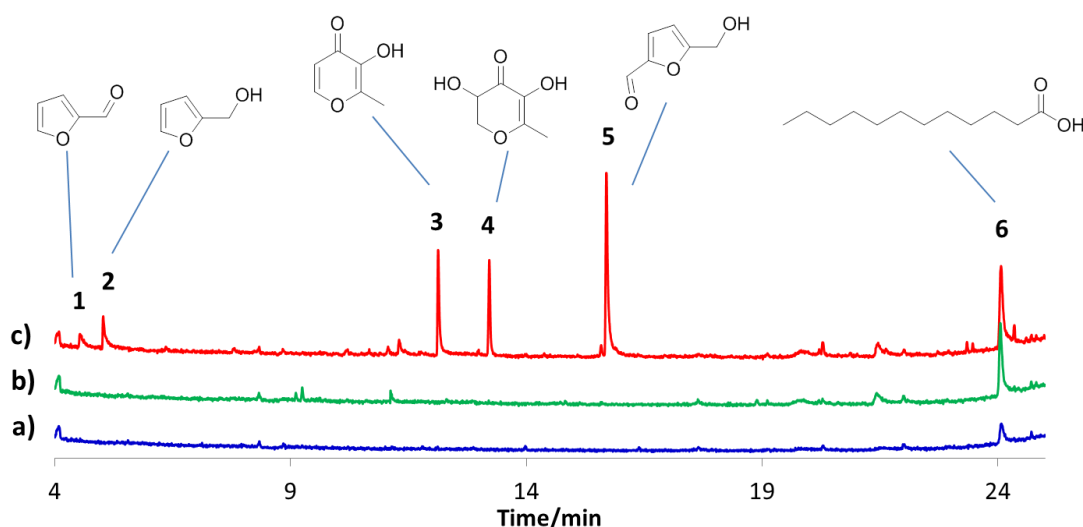


Figura 3.4 - Perfil dos compostos voláteis de batata-doce, cozida, a), assada a 130 °C, b), e assada a 190 °C, c) extração com diclorometano. Coluna de polietileno glicol (AT-WAX MS). Temperatura inicial 50 °C durante 5 e subiu até 240 °C a 10 °C min.

3.1.2.3 - Perfil dos compostos voláteis da aguardente de batata-doce

O teor em etanol das aguardentes de batata-doce depende do tratamento térmico seguido. O teor alcoólico das aguardentes preparadas com batata-doce assada é superior ao das aguardentes preparadas com batata-doce cozida (Tabela 3.7), de acordo com o teor

mais elevado em açúcares fermentáveis que as batatas-doces assadas apresentam (tabela 3.6). Atendendo a que na fermentação cerca de 45 % do teor em glicose e frutose é convertido em etanol (m/m) (Jackson, 2008) verificamos que mais de 80 % dos açúcares foram convertidos durante a fermentação. Para se obter maior rendimento alcoólico, seria necessário, uma maior conversão de amido, recorrendo por exemplo a hidrólise enzimática ou hidrólise química (Duvernay *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2011). A adição de enzimas antes do início da fermentação pode aumentar o rendimento alcoólico dos destilados (Lee *et al.*, 2011).

O teor em metanol e noutros compostos está em conformidade com o regulamento comunitário relativo à produção de bebidas espirituosas (Regulamento (CE) nº 110/2008). O somatório dos álcoois superiores excede os 350 g/hL (a.p.). Como já referido, vários autores consideram que aguardentes com teor em álcoois superiores acima dos 350 g/hl (a.p.) apresentam menor qualidade (Tsakiris *et al.*, 2014; Rodríguez Madrera *et al.*, 2013; Bovo *et al.*, 2012). No entanto, teores semelhantes estão reportados para aguardentes de kiwi, pera, maçã, bagaço, ameixa e cereja (Arrieta-Garay *et al.*, 2014b; Versini *et al.*, 2012; Versini *et al.*, 2009; Schehl *et al.*, 2005).

Tabela 3.7 - Teor dos compostos voláteis mais abundantes na aguardente de batata-doce.

Compostos	Cozida	Assada 190 °C	Assada 130 °C
Etanol, % v/v	32 ^α ± 3	39 ^β ± 1	39 ^β ± 1
Metanol, g/hl (a.p.)	69 ^α ± 3	67 ^α ± 6	63 ^α ± 7
Σ Volatiles sem etanol e metanol, g/hl (a.p.)	446 ^α ± 9	462 ^α ± 36	414 ^α ± 47
Σ Álcoois, superiores g/hl (a.p.)	399 ^α ± 7	413 ^α ± 28	376 ^α ± 43
Acidez total,* g/hl (a.p.)	47 ^α ± 4	13 ^β ± 2	13 ^β ± 2

Os resultados são a média de um mínimo de 6 análises e com a indicação do desvio padrão. Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % (p < 0,05).

Outros compostos voláteis encontrados nas aguardentes de batata-doce, são maioritariamente compostos de fermentação e incluem álcoois, aldeídos e ésteres (Tabela 3.8). Os álcoois 2-metil-1-pentanol (isobutanol), 2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol

Tabela 3.8 - Teor dos compostos voláteis menos abundantes na aguardente de batata-doce e correspondentes limiares de percepção.

Composto	Concentração (g/hL a.p.)			Limiar de percepção (g/hL .a.p.)
	Cozida	Assada	Assada	
	100 °C	190 °C	130 °C	
Álcoois				
1-Propanol	64 ^α ± 2	73 ^α ± 4	68 ^α ± 3	593 ^a
Isobutanol	97 ^α ± 1	98 ^α ± 6	75 ^β ± 12	29 ^a
Isopentanóis	238 ^α ± 3	242 ^α ± 22	234 ^α ± 28	39 ^b
Álcool feniletílico	3,1 ^α ± 0,1	2,4 ^β ± 0,1	4,5 ^γ ± 0,1	6,3 ^b
Acetaldeídos				
Acetaldeído	22 ^α ± 1	20 ^α ± 4	7 ^β ± 0,6	7 ^a
Furfural	0,11 ^α ± 0.02	0,92 ^β ± 0,01	0,11 ^α ± 0,01	9,6 ^b
Benzaldeído	0,65 ^α ± 0,08	0,14 ^β ± 0,01	0,29 ^γ ± 0,01	0,9 ^b
Ésteres				
Acetato de etilo	23 ^α ± 1	26 ^α ± 4	26 ^α ± 3	7,1 ^b
Acetato de isoamilo	0,58 ^α ± 0.01	0,57 ^α ± 0.03	3,04 ^β ± 0,02	0,02 ^b
	0,33 ^α ± 0.01	0,46 ^β ± 0,01	0,58 ^γ ± 0,01	0,012 ^b
Hexanoate de etilo			0,01	
Octanoato de etilo	2,33 ^α ± 0,01	2,72 ^α ± 0,02	3,13 ^β ± 0,01	0,003 ^b
Decanoato de etilo	3,28 ^α ± 0,06	4,55 ^α ± 0,06	4,94 ^α ± 0,17	0,24 ^b
Dodecanoato de etilo	1,39 ^α ± 0,3	2.27 ^β ± 0,05	1,9 ^γ ± 0,38	
Tetradecanoato de etilo	3,19 ^α ± 0,06	3,48 ^α ± 0,32	3,01 ^α ± 0,27	
Outros compostos				
Linalol	0,06 ^α ± 0,01	0,09 ^α ± 0,01	0,11 ^α ± 0,01	0,25 ^c
α-terpineol	0,32 ^α ± 0,08	0,33 ^α ± 0,07	0,38 ^α ± 0,06	75,0 ^c

^aMoreno *et al.* 2005 (determinado em solução com 14 % etanol); ^bGao *et al.* 2014 (determinado em solução com 46 % etanol); ^cCacho *et al.* 2013 (determinado em solução com 40 % etanol). Os resultados são apresentados como média e respectivos desvios padrão para pelo menos 6 medições. Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % (p < 0,05).

(isopentanois) encontram-se acima do limiar de percepção e contribuem para o chamado aroma floral doce básico das aguardentes (Versini *et al.*, 2009).

Teores semelhantes foram reportados para aguardentes de pera, cereja ou ameixa (Versini *et al.*, 2012; Schehl *et al.*, 2005). O teor em álcool feniletílico ou 2-feniletanol é semelhante ao encontrado por exemplo para aguardentes de pera (Versini *et al.* 20012), mas menor do que o encontrado em aguardente de bagaço de uva (Da Porto *et al.* 2010), ou em aguardente de kiwi (Arrieta-Garay *et al.*, 2013).

Os baixos teores em acetaldeído indicam que a fermentação decorreu sem problemas de oxidação (Versini *et al.*, 2009). O teor em acetato de etilo, para qualquer dos ensaios de preparação de aguardente, está muito abaixo de 130 g/hL (a.p.), considerado valor limite até ao qual contribui positivamente para o aroma das aguardentes. Teores acima deste valor são indicadores de condições aeróbias durante o processo de fermentação ou de corte incorreto da aguardente de “cabeça” (Versini *et al.*, 2009).

O teor em ésteres etílicos apresenta-se acima dos respetivos limiares de percepção, conferindo à aguardente um aroma frutado (Tsakiris *et al.*, 2014; Versini *et al.*, 2009). O teor em ésteres etílicos é semelhante ao observado por exemplo para aguardentes de maçã (Rodríguez Madrera *et al.*, 2013; Versini *et al.*, 2009). Os monoterpenos α -terpineol e linalol também foram detetados noutras bebidas preparadas com batata-doce (Ohta *et al.*, 1991; Otha *et al.*, 1990). Apresentam-se, no entanto abaixo do limiar de percepção e por isso pouco contribuem para o aroma da bebida. Estes compostos foram também detetados noutros destilados como o de kiwi, o de pera e o de maçã (Arrieta-Garay *et al.*, 2013; López-Vázquez *et al.*, 2012; Versini *et al.*, 2012; Versini *et al.*, 2009).

Poucas diferenças foram detetadas para o teor em voláteis de aguardentes preparadas com batatas processadas seguindo diferentes tratamentos térmicos. A exceção é o furfural, que apresenta, na aguardente preparada por assadura a 190 °C, um teor nove vezes superior ao das outras. Este composto é um marcador do tratamento térmico (Trakiris *et al.*, 2014; Nakamura *et al.*, 2013; López-Vázquez *et al.*, 2012). Contudo, nos teores encontrados pouco contribui para o aroma da bebida pois a sua concentração está abaixo do limiar de percepção. Outros compostos detetados mas não quantificados na aguarente de batata-doce incluem o 2-metil-benzofurano, a β -damascenona e a β -ionona.

3.1.2.4 - Apreciação sensorial da aguardente

Por se tratar de um produto novo foi feita uma avaliação da apreciação sensorial da aguardente de batata-doce preparada com batatas assadas a 130 °C. A escolha recaiu no destilado preparado seguindo este processo por apresentar o teor mais elevado em ésteres aromáticos (acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo e decanoato de etilo). Foi utilizada uma escala hedónica de nove pontos para classificar a bebida relativamente à aparência, ao cheiro e ao gosto, por 55 provadores não treinados. Os resultados obtidos estão resumidos na figura 3.5.

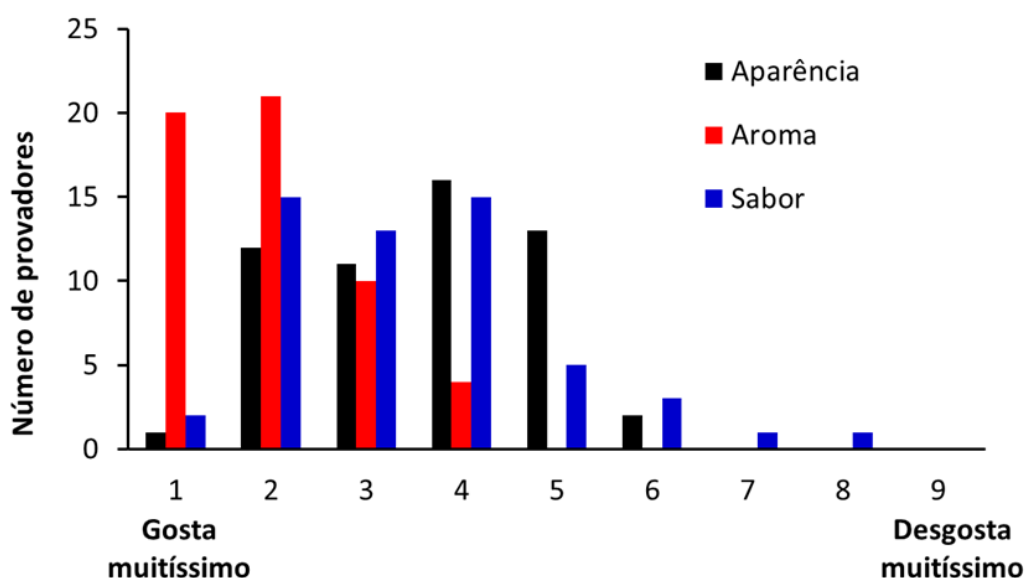


Figura 3.5 - Resultados da apreciação sensorial da aguardente de batata doce.

Todos os parâmetros analisados apresentaram uma aceitação positiva. O aroma é o parâmetro melhor avaliado. O sabor apresenta algumas respostas menos favoráveis, refletindo provavelmente o elevado teor em álcoois superiores, que muitos autores apontam como negativo para as aguardentes (Tsakiris *et al.*, 2014; Rodríguez Madrera *et al.*, 2013; Bovo *et al.*, 2012).

3.1.3 - Aguardente de figo

A aguardente de figo é o destilado com maior produção anual no Algarve (Galego & Almeida, 2007). É talvez a aguardente mais característica da região mediterrânica (Ayed *et al.*, 1992), havendo registos da sua produção industrial no Algarve desde 1790

(Lobo & Vidigal, 1994). Esta aguardente é feita a partir de figos secos e de fraca qualidade, quer pelo pequeno calibre que apresentam, quer pelas bicadas dos pássaros ou outros defeitos, que inviabilizam o seu aproveitamento mais nobre. No Algarve, apesar de muito abundante, esta aguardente não é muito apreciada pelos consumidores devido ao seu aroma intenso, bem como a outros defeitos associados ao processo de produção.

Procurar uma alternativa para valorização dos excedentes deste destilado foi uma solicitação feita ao Instituto Superior de Engenharia. A preparação de licores com aguardente de figo foi uma possibilidade avaliada. No entanto foi necessário corrigir alguns defeitos da aguardente produzida, nomeadamente a redução do seu aroma intenso. A hipótese testada foi a de proceder a uma desodorização parcial, que por um lado, reduzisse a intensidade do aroma, mas por outro lado deixasse a aguardente com características aromáticas que ainda pudessem contribuir positivamente para o aroma final dos licores. A desodorização parcial da aguardente foi estudada com diferentes quantidades de carvão ativado. Os testes feitos em laboratório consistiram na adição de 5, 10, 20, 30 e 40 g de carvão ativado por litro de aguardente. Como controlo foi também analisada a aguardente sem qualquer adição de carvão ativado. A adição foi feita cuidadosamente à superfície da aguardente, colocada em provetas de vidro de um litro. Durante 2 dias o carvão atravessou toda a aguardente por gravidade e depositou-se no fundo da proveta, deixando a aguardente completamente incolor. Após a separação do carvão ativado a aguardente foi utilizada diretamente, com um teor alcoólico de 44 ± 2 % vol., ou concentrada por destilação em destilador enológico (Dujardin-Salleron, Arcueil, França). O carvão usado foi colocado a reciclar em forno ventilado a 350 °C durante 1 h (FIMOR, Pádua, Itália), havendo perdas de 10 % em cada passo. O processo foi posteriormente estendido a uma destilaria industrial. Neste caso foi inserido um filtro entre a saída da “cucurbita” do sistema de destilação e a chegada à serpentina. Foram usados 2 kg de carvão ativado, do mesmo lote do usado em laboratório, para 8 arrobas de figo fermentado, ao iniciar a destilação. Foram recolhidas amostras do “coração” e de “cauda” para avaliar igualmente o efeito no perfil dos voláteis, na acidez total e no teor de cobre.

A figura 3.6 mostra os perfis dos compostos voláteis, usando injeção direta, relativos ao “coração” de uma aguardente não desodorizada e de outra aguardente parcialmente desodorizada (não concentrada) com 10 g/L de carvão ativado. O perfil é semelhante para os compostos mais voláteis, nomeadamente até aos isopentanóis (tr ~ 16,5 minutos). No entanto, os compostos voláteis que apresentam maiores pesos

moleculares, nomeadamente os que eluem depois dos 25 minutos, sofrem redução, ficando muitos deles abaixo do limite de quantificação. A tabela 3.9 apresenta resultados da quantificação dos compostos voláteis em aguardentes não desodorizadas e desodorizadas provenientes de três destilarias distintas, da Associação de Produtores de Tavira (Coop), da destilaria industrial de São Brás de Alportel (SB), ambas do Sotavento Algarvio, e de uma destilaria do Barlavento Algarvio, de São Bartolomeu de Messines (MSM). Nesta última destilaria o estudo foi feito com amostras tratadas em laboratório e com amostras resultantes de uma experiência de desodorização em destilaria industrial.

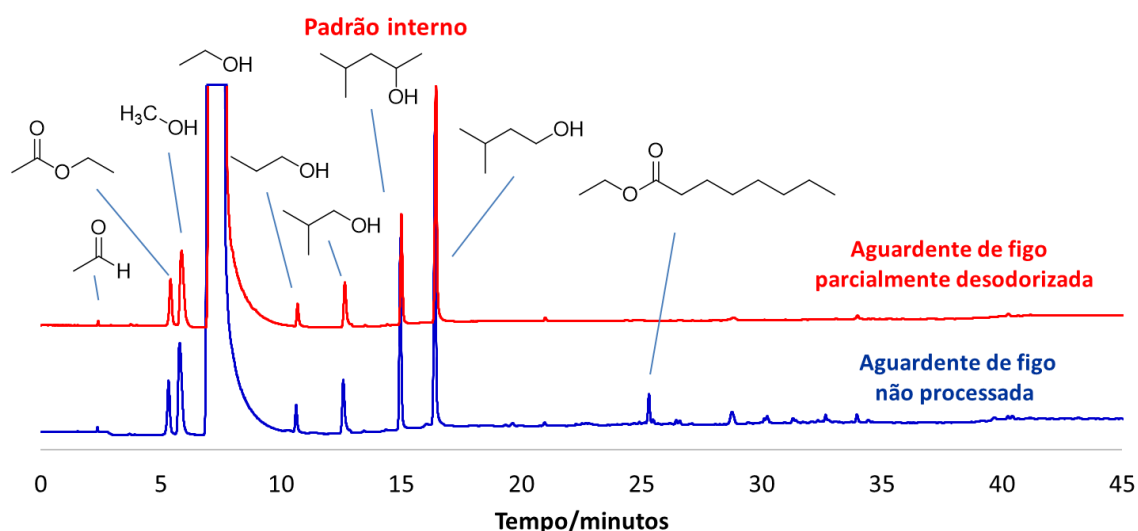


Figura 3.6 - Comparação do perfil de compostos voláteis, por injeção em natureza, de aguardente de figo não processada e de aguardente de figo parcialmente desodorizada com 10 g/L de carvão ativado. Coluna de polietileno glicol (BP 20 M 30 m x 0,32 mm I.D. X 1,0 μ m). Temperatura inicial 40 °C durante 5 min, seguida de aumento de temperatura a 5 °C/min até 210 °C onde permanece 6 min.

As características iniciais das aguardentes de figo são muito diferentes, dependendo da destilaria de origem. O teor em acetaldeído destas aguardentes é baixo em qualquer dos casos (em média < 10 g/hl (a.p.)), quando comparado com o teor em acetaldeído da aguardente de medronho (em média > 40 g/hL (a.p.)), refletindo o facto de ser utilizado o fruto seco (figo) e não um fruto maduro (medronho). O acetato de etilo é mais elevado nas amostras provenientes de MSM, um indicador de contacto com o oxigénio durante o processo de fermentação (Tsakiris *et al.*, 2014; Tešević *et al.*, 2009), mas mesmo nestes caso o acetaldeído é relativamente baixo.

O metanol das aguardentes de figo analisadas apresenta sempre um teor abaixo dos 500 g/hL (a.p.), ao contrário da aguardente de medronho, onde se apresenta sempre

Tabela 3.9 – Compostos voláteis de aguardentes de figo parcialmente desodorizadas (P Desod) e não desodorizadas (N Desod) em Laboratório e na Indústria.

Compostos g/hL (a.p.)	Coop P Desod	Coop N desod	MSM P Desod	MSM N Desod	SB P Desod	SB N Desod	MSM Destilaria (coração)	MSM Destilaria (Cauda)
Etanal	8,0 ± 0,8	10,5 ± 1,1	9,2 ± 0,9	12,1 ± 1,2	4,0 ± 0,4	5,4 ± 0,5	9,5 ± 0,9	7,0 ± 0,7
Acetato de Etilo	98 ± 9,8	120 ± 12	390 ± 39	328 ± 39	31,1 ± 3	21,3 ± 2	310 ± 31	239 ± 24
Metanol	302 ± 30	332,6 ± 33,3	431 ± 43	433 ± 43	282 ± 28	308 ± 31	376 ± 38	411 ± 41
1-propanol	30,4 ± 3	31,0 ± 3	25,1 ± 2	25,2 ± 2	25,6 ± 3	25,2 ± 3	24,1 ± 2	22,2 ± 2
Isobutanol	70 ± 7	63 ± 6	40 ± 4	33 ± 3	45,1 ± 5	42,7 ± 4	34 ± 3	31 ± 3
Isopentanois	310 ± 31	301 ± 31	127 ± 13	122 ± 12	203 ± 20	217 ± 21	120 ± 12	124 ± 12
Σ Álcoois superiores	410 ± 41	395 ± 40	192 ± 19	180 ± 18	274 ± 27	285 ± 29	178 ± 18	177 ± 18
Hexanoato de etilo	< 2,2	< 2,2	< 2,2	< 2,2	< 2,2	< 2,2	< 2,2	< 2,2
Octanoato de etilo	1,5 ± 0,2	55,7 ± 5,6	< 1,0-	57,9 ± 5,8	0,9 ± 0,1	40,9 ± 4	1,9 ± 0,2	14,0 ± 1,4
Decanoato de etilo	1,7 ± 0,2	5,82 ± 0,6	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,9 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Dodecanoato de etilo	0,8 ± 0,1	3,0 ± 0,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3
Tetradecanoato de etilo	< 0,5	2,0 ± 0,2	< 0,5-	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5

acima deste valor. Como o metanol reflete o teor em pectina do fruto (Coldea *et al.*, 2011), este resultado sugere que o figo tem menor teor em pectina do que o medronho.

O teor em álcoois superiores (1-propanol, isobutanol e isopentanóis) apresenta uma grande dispersão de resultados, verificando-se que as amostras processadas no Barlavento (MSM) apresentam teores mais baixos do que as produzidas nas destilarias do Sotavento. Os álcoois superiores são produzidos pelas leveduras durante a fermentação (Tsakiris *et al.*, 2014; Cortés *et al.*, 2009; Tešević *et al.*, 2009; García-Llobodanin *et al.*, 2008), e todos estes produtores fazem fermentações com a microbiota endógena. Os resultados devem refletir a diversidade da microbiota de cada local, o cuidado na secagem e armazenamento dos figos, as características dos próprios frutos, (existem no Algarve, várias variedades de figos) e as condições de fermentação e destilação.

De todos os compostos avaliados, são os ésteres etílicos os que apresentam maior diferença entre as aguardentes parcialmente desodorizadas e as aguardentes não desodorizadas. A desodorização, quer realizada em laboratório quer na experiência em destilaria industrial, reduz de facto o teor destes compostos. No caso do octanoato de etilo, o éster analisado presente em maior teor, a redução é sempre superior a 95 % em laboratório. Na destilaria a avaliação é mais difícil. Tomando como referência a aguardente da mesma destilaria, mas não tratada (de outro lote), o processo induz uma redução de cerca de 75 %.

Além do aroma intenso, as aguardentes de figo, apresentam acidez total relativamente elevada (> 100 g/hL, a.p., quando expressa em ácido acético) e um teor em cobre também elevado, normalmente consequência da elevada acidez. A concentração por destilação e a desodorização parcial reduzem tanto a acidez como o cobre (Tabela 3.10). As primeiras 5 entradas desta tabela 3.10 mostram os teores em cobre e acidez de cinco aguardentes de figo provenientes de diferentes produtores ou lotes de produção. Os teores em cobre são relativamente elevados e a acidez é superior a 100 g/hL, (a.p.), expressa em ácido acético, para todas as amostras estudadas. A concentração por destilação em laboratório da amostra Coop A reduz drasticamente tanto o cobre como a acidez. De salientar que neste processo foi utilizado um destilador enológico e este tipo de destilador não é opção para a produção industrial porque os destiladores enológicos têm balões de vidro com capacidade de 1 L ou semelhante. A adição de carvão leva a um decréscimo na acidez, tanto maior quanto maior a quantidade de carvão utilizada, até um máximo de 40 g/L, enquanto os teores em cobre vão para valores abaixo do limite de deteção. Resultados semelhantes foram obtidos com aguardentes de outras origens,

nomeadamente de MSM e de SB. A análise das amostras processadas na destilaria de MSM (últimas duas entradas da tabela 3.10) revelou uma remoção do cobre menos efetiva que em laboratório e efeito semelhante na acidez.

Tabela 3.10 - Doseamento do cobre e da acidez total em diferentes amostras de aguardente de figo não processadas, parcialmente desodorizadas com carvão ativado e parcialmente desodorizadas com carvão ativado e concentradas.

Amostras	Quantidade de carvão (g/L)	Teor de cobre (mg/L)	Acidez total (g/hL a.p.) (em ácido acético)
Coop A	0	$17,627 \pm 0,005$	$137,2 \pm 0,9$
Coop B	0	$19,593 \pm 0,003$	$157,3 \pm 1,1$
Coop C	0	$5,006 \pm 0,002$	$135,1 \pm 0,8$
MSM	0	$17,291 \pm 0,004$	$185,3 \pm 1,3$
SB	0	$14,676 \pm 0,005$	$125,6 \pm 0,8$
Coop A- concentrada	0	$0,023 \pm 0,001$	$12,0 \pm 0,2$
Coop A- concentrada	5	$< 0,005$	$11,1 \pm 0,3$
Coop A - concentrada	10	$< 0,005$	$9,5 \pm 0,2$
Coop A - concentrada	20	$< 0,005$	$9,5 \pm 0,3$
Coop A - concentrada	30	$< 0,005$	$6,8 \pm 0,2$
Coop A - concentrada	40	$< 0,005$	$4,0 \pm 0,2$
MSM - concentrada	10	$0,042 \pm 0,003$	$21,7 \pm 0,5$
SB - concentrada	10	$0,095 \pm 0,001$	$9,4 \pm 0,4$
MSM – “coração”	2 kg/ destilação	$0,545 \pm 0,002$	$9,0 \pm 0,3$
MSM – “Cauda ou frouxo”	2 kg/ destilação	$2,652 \pm 0,005$	$56,7 \pm 0,9$

Este resultado obtido em destilaria, embora menos eficiente do que em laboratório, pode ser melhorado se se aumentar o teor de carvão por litro de aguardente. Mas mais importante do que a comparação da eficiência entre a desodorização em laboratório e na indústria é o facto ser possível a qualquer produtor melhorar as características da aguardente de uma forma simples.

3.1.4 – Análise de aminas em aguardentes

Poliaminas biogénicas são compostos nitrogenados possuindo mais de um grupo amina e presentes em microrganismos, plantas e animais (Silla Santos, 1996). Estes compostos naturais resultam da descarboxilação de aminoácidos em meio neutro ou ácido ou da aminação/transaminação de aldeídos e cetonas (Silla Santos, 1996; Hillary & Pegg, 2003). Nas bebidas, as poliaminas biogénicas são formadas ou por enzimas dos materiais de partida ou por atividade microbiana (Silla Santos, 1996; Kalač & krausová, 2005). Apesar de desempenharem um papel regulador importante nos sistemas biológicos (Hillary & Pegg, 2003; Wang *et al.*, 2003) a sua presença em alimentos pode originar intoxicações (Border *et al.*, 1996), particularmente quando em conjunto com fatores de potenciação como por exemplo o etanol em bebidas alcoólicas (Maynard & Schenker, 1996)). A análise de aminas biogénicas em alimentos é por isso importante para avaliar tanto a qualidade dos alimentos como a sua potencial toxicidade (Silla Santos, 1996; Kalač & krausová, 2005). Estes compostos praticamente não absorvem acima de 250 nm e apresentam massas relativamente baixas, o que torna a sua deteção por UV-vis ou espectrometria de massa relativamente difícil. Normalmente são utilizados métodos que envolvem derivatização seguida de análise por HPLC com deteção por Uv-Vis ou por fluorescência (Önal *et al.*, 2013; Płotka-Wasyłka, *et al.*, 2015). Como as matrizes são normalmente complexas, os procedimentos analíticos envolvem também vários passos de extração/purificação no sentido de melhorar a sensibilidade e a seletividade, tornando o processo moroso e complexo (Önal *et al.*, 2013; Płotka-Wasyłka, *et al.*, 2015). Métodos simples são por isso desejáveis para analisar estes compostos em alimentos, nomeadamente em bebidas. As poliaminas têm sido particularmente estudadas em cerveja e em vinho e a sua presença está normalmente associada ao processo de fermentação (Guo *et al.*, 2015; Erim, 2013; Pena-Gallego *et al.*, 2012; Pozo-Bayón *et al.*, 2012; Kalač & Křížek, 2003). Não foram encontrados estudos da sua determinação em aguardentes. Este resultado está provavelmente associado à sua baixa volatilidade por destilação (são polícatões em solução aquosa a pH inferior a 7) a partir de soluções aquosas e por isso pouca probabilidade de serem encontradas em teores significativos nestas bebidas. No entanto, o arraste de vapor, processo seguido na preparação de alguns destilados, poderá transportar poliaminas da matriz vegetal para a aguardente.

O desenvolvimento de aplicações analíticas por utilização de estruturas supramoleculares, passíveis de reconhecimento molecular e autoconstrução (“self-

assembly”) é uma área relativamente nova, conhecida por química analítica supramolecular (Anslyn, 2007). De um modo geral, a detecção com estruturas supramoleculares envolve uma modificação das propriedades químicas/físicas da molécula alvo induzidas pela interação supramolecular, que depois é utilizada para fins analíticos. A detecção de aminas em alimentos utilizando estruturas supramoleculares envolve normalmente detecção ótica, nomeadamente modificação das propriedades de absorção e/ou fluorescência (You, *et al.*, 2015; Minami *et al.*, 2012; Lucas *et al.*, 2011). No entanto, se a interação supramolecular for específica e se a estrutura supramolecular formada sobreviver ao processo de “Electro Spray” (ESI), formando estruturas estáveis na fase gasosa, os sinais de ESI-MS ou de ESI-MS/MS resultantes podem ser utilizados para fins analíticos. Este procedimento foi seguido por utilização de injeção direta (infusão) para detecção de pequenas moléculas utilizando ftalocianinas, (Zhang *et al.*, 2010) compostos explosivos de baixo peso molecular e ácidos carboxílicos utilizando ciclodextrinas (Zhang *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2014) e medicamentos por formação de dímeros e agregados (Sun *et al.*, 2014; Flick *et al.*, 2010; Flick *et al.*, 2019; Nyadong, *et al.*, 2008).

As abundâncias iónicas produzidas por ESI-MS dependem de vários fatores, incluindo a concentração do analito, a afinidade para a superfície da gota e conformação, a presença de outros componentes na solução, e as condições de transmissão no espetrómetro de massa (Ren *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Flick *et al.*, 2010; Flick *et al.*, 2009; Nyadong, *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2004). Os métodos de injeção direta têm várias limitações, principalmente para amostras possuindo elevada complexidade e com compostos não voláteis, como por exemplo sais. Podem ser necessários procedimentos de purificação antes da injeção. As bebidas destiladas contêm principalmente compostos voláteis, tornando-as passíveis de injeção direta em ESI-MS.

Apesar de as poliaminas serem facilmente ionizáveis por ESI-MS no modo positivo, os seus pesos moleculares relativamente baixos tornam a quantificação difícil. Além disso as poliaminas formam iões multicarregados com valores de m/z ainda mais baixos. A utilização de uma estrutura supramolecular que possa interagir com as poliaminas e possa formar complexos estáveis na fase gasosa levaria a detecção para valores de m/z maiores e por isso mais fáceis de utilizar para fins quantitativos.

As aminas e as poliaminas são conhecidas por formarem complexos de inclusão com cucurbiturilos possuindo constantes de complexação bastante elevadas (Assaf *et al.*, 2015; Barrow *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2004).

As constantes de complexação entre o cucurbit[7]urilo (CB7) (ver figura 3.7) e as poliaminas é superior a 10^6 M^{-1} . O ESI-MS também origina a formação de complexos de inclusão entre CB7 e poliaminas estáveis na fase gasosa, principalmente na forma de iões duplamente carregados (Da Silva *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2011; Osaka *et al.*, 2006) e com valores de m/z acima de 600, facilitando por isso a sua deteção. Foi desenvolvido por essa razão um método para detetar e quantificar poliaminas por ESI-MS com CB7. Foram escolhidas as poliaminas putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina (Figura 3.7).

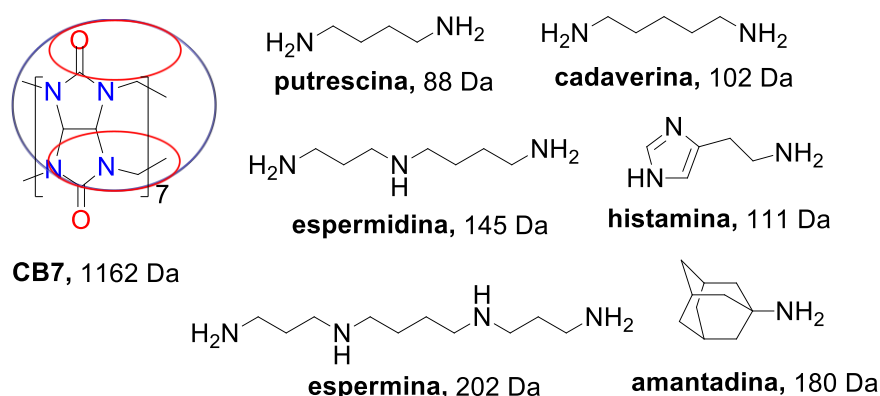


Figura 3.7 - Esquema mostrando a estrutura do CB7 e das poliaminas estudadas. A amantadina foi utilizada como padrão interno.

As bebidas destiladas são compostas maioritariamente por água e etanol. No sentido de estudar o papel do etanol na formação de complexos de inclusão por ESI-MS todos os complexos foram estudados em água e em misturas etanol-água 50:50. Além de água e etanol as bebidas destiladas possuem também uma base comum de compostos voláteis, mas apresentam baixos teores em compostos que possam funcionar como agentes ionizantes. O HCl foi escolhido como agente ionizante e para conferir a todas as soluções, tanto padrão como amostras, propriedades de ionização semelhantes. A Figura 3.8 apresenta um espectro de ESI-MS de CB7 (50 μM) com todas as aminas estudadas, cada uma com concentração 2 μM e com HCl 1 mM. São visíveis sinais de todos os complexos com aminas. Espectro muito semelhante foi obtido para a misturas etanol-água 50:50 com a mesma composição.

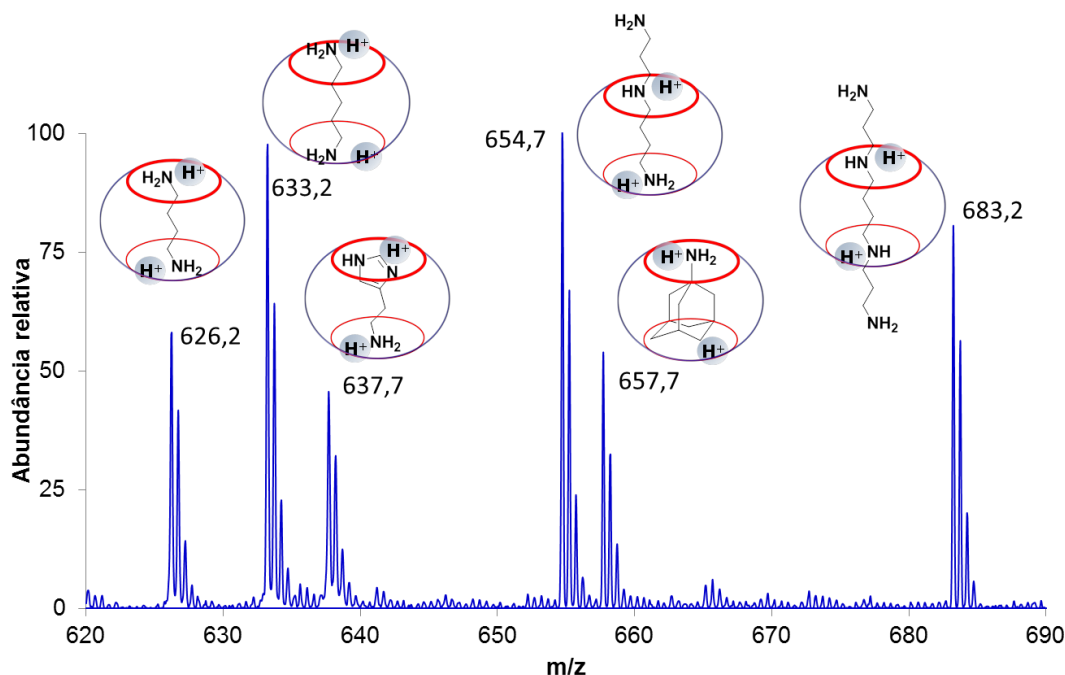


Figura 3.8 – Espectro de ESI-MS de uma solução aquosa contendo 50 μM de CB7, 2 μM cada poliamina e 1,0 mM de HCl. Identificações: 626,2, $[\text{CB7}+\text{putrescina}+2\text{H}]^{2+}$; 633,2, $[\text{CB7}+\text{cadaverina}+2\text{H}]^{2+}$; 637,7, $[\text{CB7}+\text{histamina}+2\text{H}]^{2+}$; 654,7, $[\text{CB7}+\text{espermidina}+2\text{H}]^{2+}$; 657,7, $[\text{CB7}+\text{amantadina}+2\text{H}]^{2+}$; 683,2, $[\text{CB7}+\text{espermina}+2\text{H}]^{2+}$. As figuras constituem uma ilustração dos complexos.

Foi realizado um estudo da intensidade dos sinais função da concentração em HCl, no sentido de otimizar a concentração deste agente ionizante. Os resultados são apresentados na figura 3.9. A intensidade dos sinais aumenta até próximo de 1,0 mM de HCl e depois diminui para todas as aminas. A opção foi adicionar HCl na concentração 1 mM a todas as soluções, tanto padrões como amostras. Respostas semelhantes foram encontradas para soluções em água e em misturas etanol-água 50:50 (v/v), indicando que o etanol tem pouca influência na formação de complexos de inclusão na fase gasosa a partir das soluções estudadas.

É necessária uma estrutura molecular que sirva de referência, tanto para determinar as propriedades de ionização das diferentes matrizes como para utilizar como padrão interno. A amantadina (Figura 3.7) possui todas as características para ser utilizada como padrão interno; forma complexos com constantes elevadas ($\sim 10^{12} \text{ M}^{-1}$), é uma amina sintética, os seus complexos possuem propriedades semelhantes aos das poliaminas estudadas e os seus valores de m/z não se sobrepõem com os das poliaminas naturais (Figura 3.8).

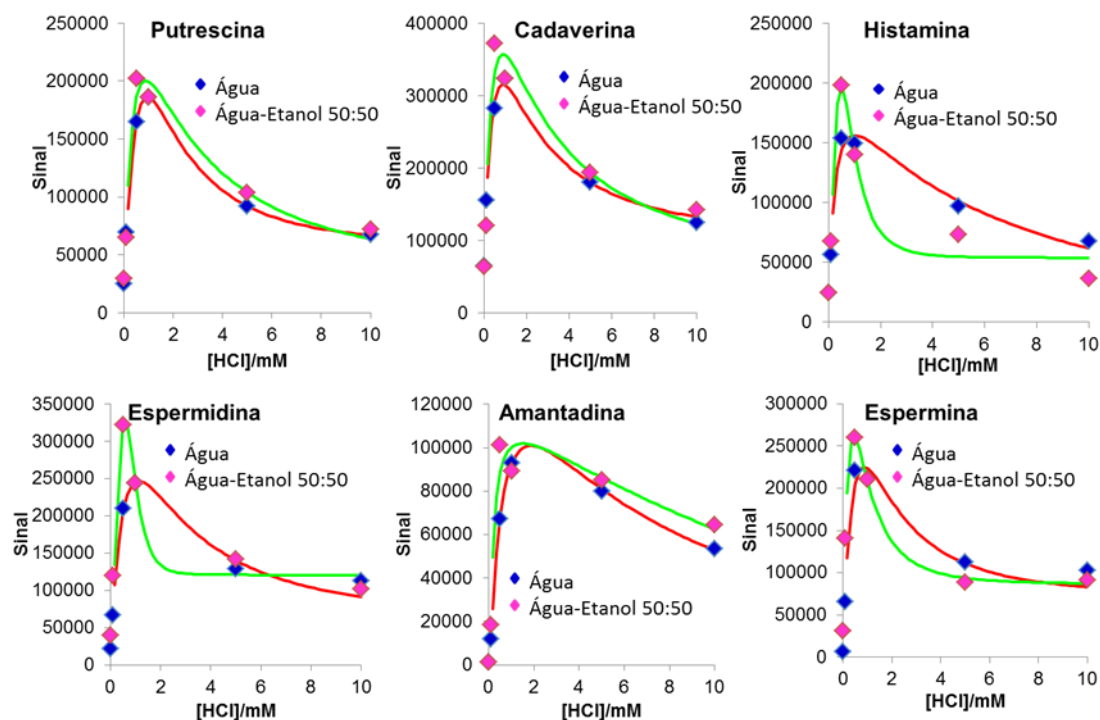


Figura 3.9 - Intensidade dos sinais de ESI-MS dos complexos de inclusão função da concentração de HCl, em modo “full scan” para água e mistura etanol-água 50:50.

A quantificação por MS/MS é conhecida por ser mais seletiva e sensível. Foram feitos estudos de fragmentação de todos os complexos no sentido de avaliar a possibilidade de utilizar os íons resultantes para quantificação. Os espectros de fragmentação são apresentados na figura 3.10. O principal fragmento gerado a partir dos complexos com a putrescina, cadaverina, histamina e amantadina são o CB7 livre monocarregado (m/z 1163). Nalguns casos formam-se também íons que resultam da fragmentação do CB7. Na fragmentação dos complexos com espermidina e espermina os principais fragmentos resultam da eliminação de NH_3 . Os íons utilizados para quantificação são apresentados na tabela 3.11.

Foram preparadas curvas de calibração para cada amina individualmente, em água e mistura etanol-água 50:50, contendo 1 mM de HCl, 50 μ M de CB7 e 2 μ M de complexos CB7 - amantadina. Para comparação foram também preparadas curvas de calibração para cada amina individualmente, mas numa mistura contendo todas as outras e com igual concentração. A figura 3.11 apresenta os sinais obtidos para a putrescina, numa solução etanol-água 50:50, quando individual nesta solução e na presença das outras 4 poliaminas na mesma concentração. Enquanto que para a poliamina individual

na solução a resposta é linear entre 0,2 e 20 μM , quando em presença de outras poliaminas a linearidade observa-se apenas até 10 μM .

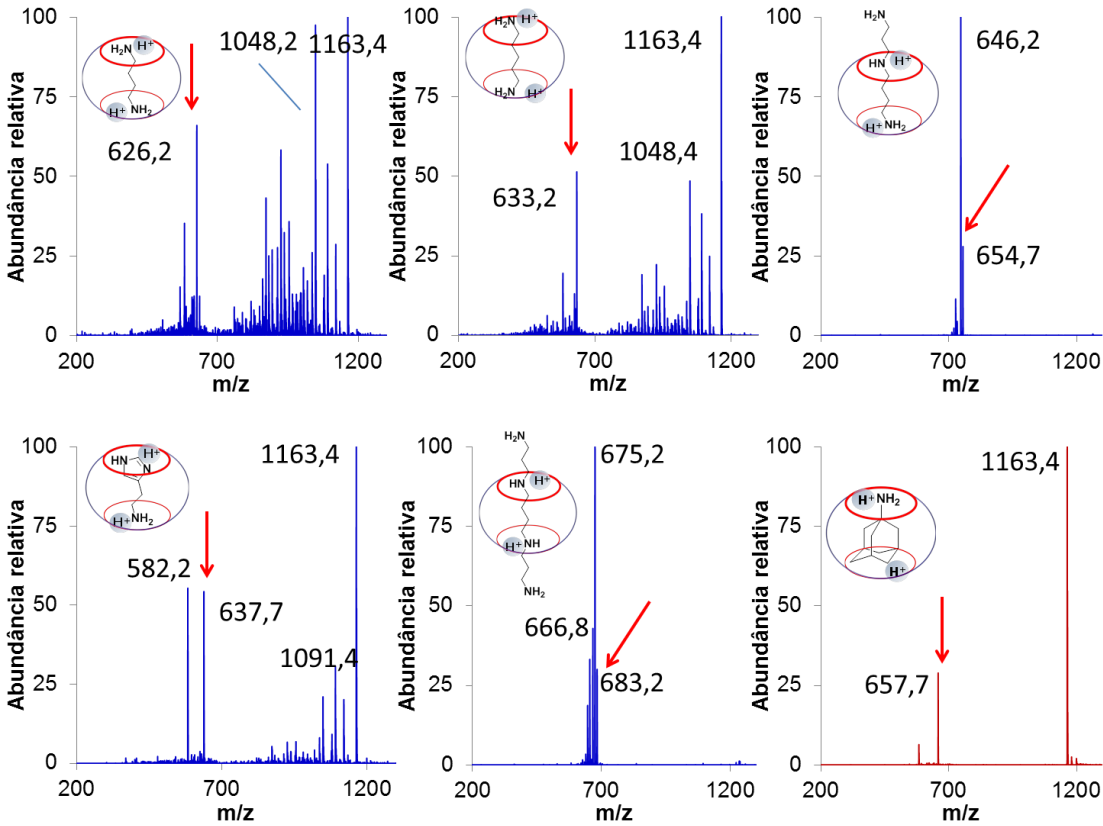


Figura 3.10 - Espectros de fragmentação (MS/MS) dos complexos duplamente carregados das poliaminas estudadas.

Tabela 3.11 - Sinais utilizados na quantificação de poliaminas por ESI-MS/MS.

Amina	Valor de m/z ("full scan")	Fragmentos MS/MS
Putrescina	626	1163, 948
Cadaverina	633	1163, 948
Histamina	638	1163, 1091
Espermidina	654	646
Espermina	683	675, 667
Amantadina	658	1163

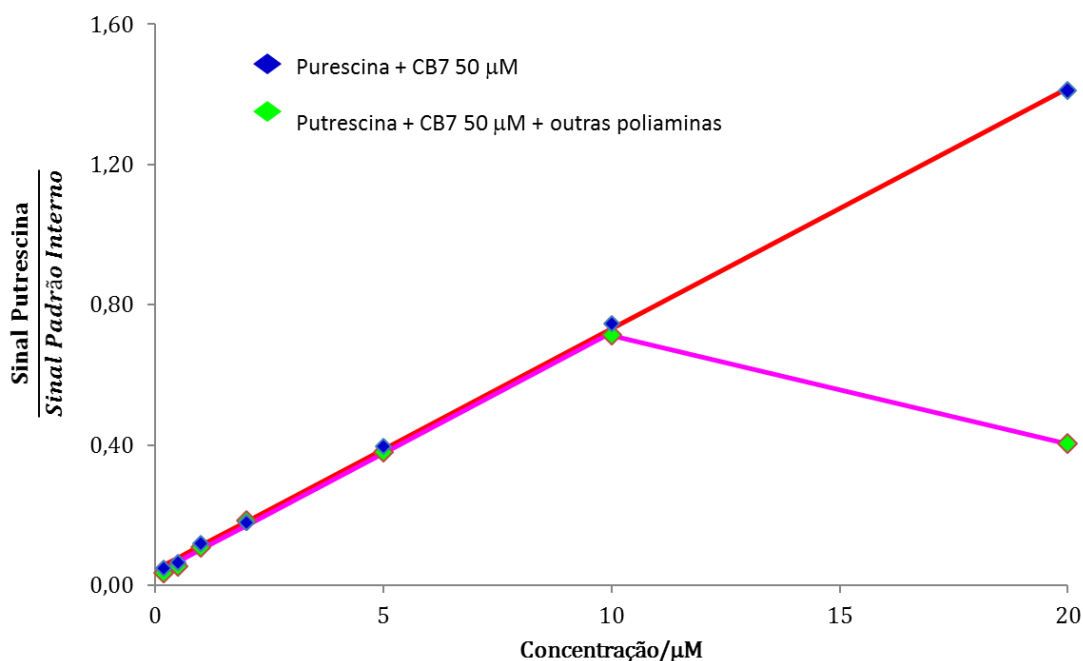


Figura 3.11 - Valor da razão do sinal da putrescina/sinal do padrão interno função da concentração de putrescina, quando individualmente em solução (♦) e na presença de outras poliamidas com a mesma concentração (◆).

Esta não linearidade a partir de 10 μM está relacionada com a concentração de CB7. Para 10 μM de cada poliamina temos 50 μM em poliaminas no total, que é a concentração de CB7 utilizada. A partir desta concentração total em poliaminas, como todo o CB7 foi consumido, não há acréscimo na concentração de complexos. A diminuição do sinal da putrescina, observada a 20 mM, prende-se com o valor das constantes de complexação que é superior para as outras aminas, tornando a putrescina menos competitiva para a formação de complexos. Este resultado indica que a concentração de CB7 a utilizar deve ser superior ao somatório das concentrações de todas as poliaminas.

Foram preparados, em dias diferentes, três replicados para cada uma das sete concentrações em cada poliamina individual, tanto em água como em misturas etanol-água 50:50. Verificou-se a linearidade das respostas para todas as poliaminas, de 0,2 a 20 μM , utilizando 50 μM de CB7, 2 μM de complexos amantadina-CB7 e 1 mM de HCl.

Para avaliar o efeito de matriz foram também preparadas soluções e curvas de calibração numa aguardente de medronho seguindo o mesmo procedimento. As equações das curvas de calibração obtidas encontram-se na tabela 3.12. Os resultados indicam que a matriz aguardente de medronho não introduz grandes diferenças.

Tabela 3-12 - Curvas de calibração obtidas para cada poliamina em água, numa mistura etanol-água 50:50 e numa aguardente de medronho.

Matriz	Água		Água-etanol (50:50)		Aguardente de medronho	
	Equação	R ²	Equação	R ²	Equação	R ²
Putrescina	y=0,0721x+0,0205	0,998	y=0,0687x+0,022	0,998	y=0,0672x+0,0012	0,999
Cadaverina	y=0,1613x+0,0234	0,998	y=0,171x+0,0204	0,999	y=0,2065x+0,028	0,997
Histamina	y=0,2131x+0,0394	0,998	y=0,1817x+0,0554	0,998	y=0,1514x+0,0389	0,997
Espermidina	y=1,8815x-0,2634	0,999	y=1,7044x-0,3663	0,999	y=2,0067x-0,3996	0,997
Espermina	y=1,7951x-0,5132	0,999	y=1,5444x-0,4558	0,999	y=1,8766x-0,3532	0,997

Os limites de deteção foram estimados a partir dos sinais observados para os ensaios em branco. Os valores dos limites de deteção são apresentados na tabela 3.13.

Tabela 3.13 - Limites de deteção das poliaminas em água, estimados a partir dos sinais obtidos a partir de ensaios em branco.

Amina	Limite de deteção/ μ M	Sinal do branco (LD _{ref}) em etanol-água 50:50/Contagens
Putrescina	0,05	300
Cadaverina	0,02	300
Histamina	0,07	450
Espermidina	0,02	900
Espermina	0,02	900

Os limites de deteção dependem da matriz. Neste caso a amantadina pode ser utilizada como sonda das propriedades de ionização da matriz na qual se pretende determinar as poliaminas. Assim, considerando que o sinal do equipamento para o limite de deteção numa matriz de referência é LD_{ref}, os limites de deteção noutras matrizes LD_{desconhecido}, podem ser estimados a partir do sinal da amantadina na matriz desconhecida por utilização da expressão

$$LD_{ref} = LD_{desconhecido} \times IS,$$

onde IS é o sinal MS/MS da amantadina para a matriz em causa, no método desenvolvido com concentração de 2 μ M de complexos amantadina- CB7 e na presença de 50 μ M de CB7 e 1 mM de HCl. Assim, se o sinal do padrão interno baixar por exemplo de 100 000

para 20 000 contagens, o limite de detecção sobe 5 vezes. Pode-se assim testar qualquer matriz para avaliar o desempenho do método para quantificar poliaminas.

No sentido de avaliar o procedimento analítico foram estudadas 10 amostras de aguardente de medronho, 10 de figo e 10 de bagaceira. Os limites de detecção obtidos na aguardente de medronho são semelhantes aos obtidos para solução aquosa. Tal como esperado nas aguardentes de medronho não foram detetadas poliaminas em qualquer das amostras estudadas, de acordo com a esperada baixa volatilidade das poliaminas por destilação a partir de soluções aquosas (são catiões). Nas aguardentes obtidas por arraste de vapor a matriz é mais complexa e os limites de detecção são mais elevados 4 a 5 vezes. A única poliamina detetada foi a putrescina. Esta poliamina foi detetada em 3 amostras de bagaceira e duas de figo. Na maior parte dos casos os teores são próximos dos limites de detecção. Apenas numa das amostras, uma bagaceira, foi detetada putrescina com valores acima dos do limite de detecção, nomeadamente de 2,2 μM .

3.2 - Licores

Nesta secção será discutida a preparação e a caracterização de alguns licores. A amarguinha e a melosa (Monchique) são provavelmente os licores mais conhecidos do Algarve (Galego & Almeida, 2007). A amarguinha nunca foi produzida no Algarve porque a sua patente foi vendida para outra zona do país. No entanto, no Algarve e noutras regiões, são produzidos diversos licores de amêndoa amarga (Galego & Almeida, 2007). Por definição, e atendendo à multiplicidade de agentes aromatizantes e material utilizado na maceração, os licores podem ser bastante variados. O licor de romã será discutido em primeiro lugar. Será caracterizada com algum detalhe a romã da cultivar “Assaria”, nomeadamente os polifenóis do sumo, do mesocarpo (casca) e membranas carpelares e dos extratos resultantes da maceração. Será discutida a utilização de aguardentes de frutos na preparação dos licores de romã. Finalmente será discutida a preparação do licor de bagas de murta e também feita a sua caracterização.

3.2.1 - Licor de romã

3.2.1.1 - Material vegetal

A romã variedade “Assaria” é uma cultivar típica do Algarve (Miguel *et al.*, 2004). Alguns trabalhos têm reportado benefícios para a saúde associados aos compostos deste fruto, principalmente aos elagitaninos e às antocianinas (Mphahlele *et al.*, 2014; Viuda-Martos *et al.*, 2010). Foi iniciado o estudo do material vegetal pela caracterização dos frutos desta cultivar. As características destes frutos foram comparadas com as de frutos de outras cultivares, de outros países e também com as romãs bravas, conhecidas vulgarmente como “da mata”. A tabela 3.14 mostra alguns parâmetros analisados em romãs “Assaria” e “da mata”, em dois pomares distintos do concelho de Faro, colhidas no final de outubro de 2012. Todos os parâmetros analisados são significativamente diferentes entre as duas cultivares. A principal diferença entre os dois tipos é a razão arilos/casca, que é bastante maior na cultivar “Assaria”, possuindo por isso maior massa média e maior teor em sumo (Figura 3.12). A acidez e o teor em polifenóis são significativamente mais elevados nas romãs “da mata”.

Tabela 3.14 - Características das romãs “Assaria” e “da mata” de dois pomares do concelho de Faro.

	“Assaria”	“Assaria”	“da mata”	“da mata”
	Pomar 1	Pomar 2	Pomar 1	Pomar 2
Massa romã (g)	247 ^α ± 30	263 ^α ± 126	177 ^β ± 36	183 ^β ± 43
Diâmetro romã (cm)	7,6 ^α ± 0,4	7,9 ^α ± 0,9	7,1 ^β ± 0,6	7,3 ^β ± 0,5
Massa arilos (g)	0,60 ^α ± 0,15	0,59 ^α ± 0,15	0,31 ^α ± 0,04	0,37 ^α ± 0,07
Casca (%)	28,5 ^α ± 4,9	29,6 ^α ± 1,0	48,1 ^β ± 2,5	47,1 ^β ± 3,4
Sumo (%)	57,6 ^α ± 2,6	57,5 ^α ± 1,1	39,8 ^β ± 2,2	40,4 ^β ± 2,1
°Brix	16,60 ^α ± 0,96	15,06 ^α ± 0,08	17,88 ^β ± 0,11	16,08 ^γ ± 0,20
Componente cromática	5,02 ^α ± 0,20	3,88 ^α ± 0,14	5,48 ^β ± 0,16	5,55 ^β ± 0,18
a*				
pH	3,31 ^α ± 0,02	3,29 ^α ± 0,02	3,14 ^β ± 0,01	3,13 ^β ± 0,01
Polifenóis totais (g/L)	1,114 ^α ± 0,005	1,103 ^β ± 0,004	1,251 ^γ ± 0,006	1,248 ^γ ± 0,005

Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de todas as amostras analisadas em cada caso. Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

Tabela 3.15 - Comparação dos parâmetros físicos do fruto e do sumo de romã de outras variedades.

Parâmetros	Hasnaoui <i>et al.</i>	Mena <i>et al.</i>	Tehranifar <i>et al.</i>	Sepúlveda <i>et al.</i>	Dafny-Yalin <i>et al.</i>
	2011	2011	2010	2010	2010
Diâmetro equatorial (cm)		-	6,9 – 8,2	-	-
Massa do fruto (g)	196 - 674	-	197 – 315		186 - 551
Massa do arilo (g)	0,3 – 0,7	-	-		-
Casca (%)		-	32 - 60	-	-
Sumo (%)		24 - 48	27 - 47	-	-
°Brix		14,45 - 17,60	11,37 - 15,07	15,2 -17,8	14 - 18
pH	2,9 – 4,6	2,52 - 4,00	3,16 - 4,09	2,9 -3,7	
“Vermelho-verde” (a*)		5,0 – 39,0	-	-	0,5 - 6,4
Polifenois totais (mg/L)				676 - 1280	

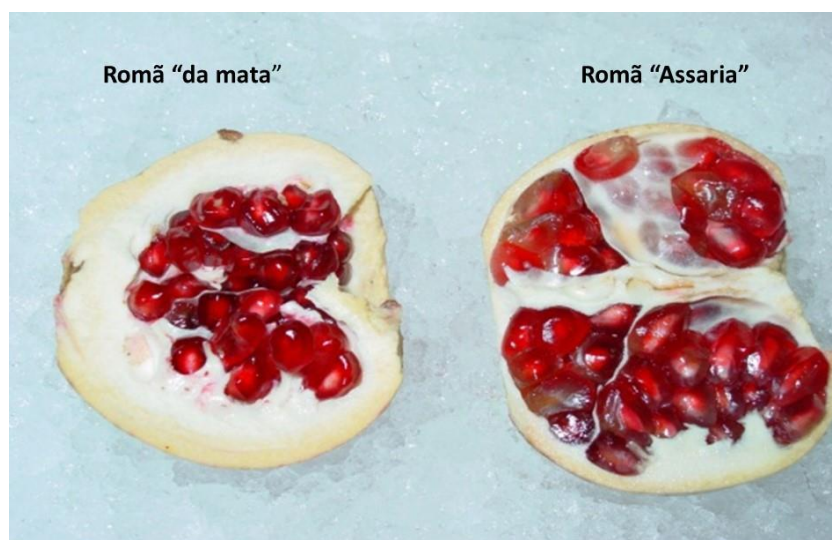


Figura 3.12 - Romã “da mata” e romã “Assaria”.

Da comparação dos resultados obtidos para a romã “Assaria” com os de romãs de outros países (Tabela 3.15) verificamos que a as romãs “Assaria” apresentam a percentagem mais baixa de casca e também o teor mais elevado em sumo. Todos os outros parâmetros se situam nos intervalos mencionados na bibliografia para diferentes cultivares em diferentes países.

3.2.1.2 - Compostos voláteis do sumo de romã

A romã é um fruto pouco aromático. Os compostos voláteis do fruto já reportados na literatura são o 1-hexanol, o cis-3-hexeno-1-ol, o hexanal, o octanal, o nonanal, o α -pineno, o limoneno, o α -terpineol e o β -cariofileno (Mayuoni-Kirshinbaum & Porat, 2014; Melgarejo, *et al.*, 2011; Vázquez-Araújo *et al.*, 2011). A figura 3.13 mostra o perfil dos compostos voláteis do sumo de romã preparado a partir de frutos do pomar de Vale Judeu e analisado após 2, 24 e 72 horas.

Em todos os sumos de romã, recém preparados com frutos da variedade “Assaria”, recolhidos em pomares dos concelhos de Faro, Loulé, Tavira e Silves, o 1-hexanol e o cis-3-hexeno-1-ol são os compostos voláteis que apresentam teores mais elevados, quando analisados por HS-SPME-GC-FID. O cis-3-hexeno-1-ol é conhecido como álcool das folhas e, em conjunto com o 1-hexanol, confere às bebidas o aroma herbáceo (Arrieta-Garay *et al.*, 2013; Hernández-Gomez *et al.*, 2005). O sumo de romã recém preparado é por isso essencialmente não aromático. O teor em voláteis do sumo modifica-se, no entanto, ao longo do tempo. Após 72 horas podem ser detetados o etanol e o acetato de etilo, sintoma da fermentação do sumo. Podem ainda ser observados o α -pineno, o

limoneno e o β -cariofileno, compostos que poderão estar na forma de glicósido no sumo, libertando-se como resultado da fermentação (Hampel *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2009; Ugliano & Moio, 2008). A preparação de licores utilizando sumo ou arilos de romã e álcool retificado tem a desvantagem de dar origem a bebidas não aromáticas.

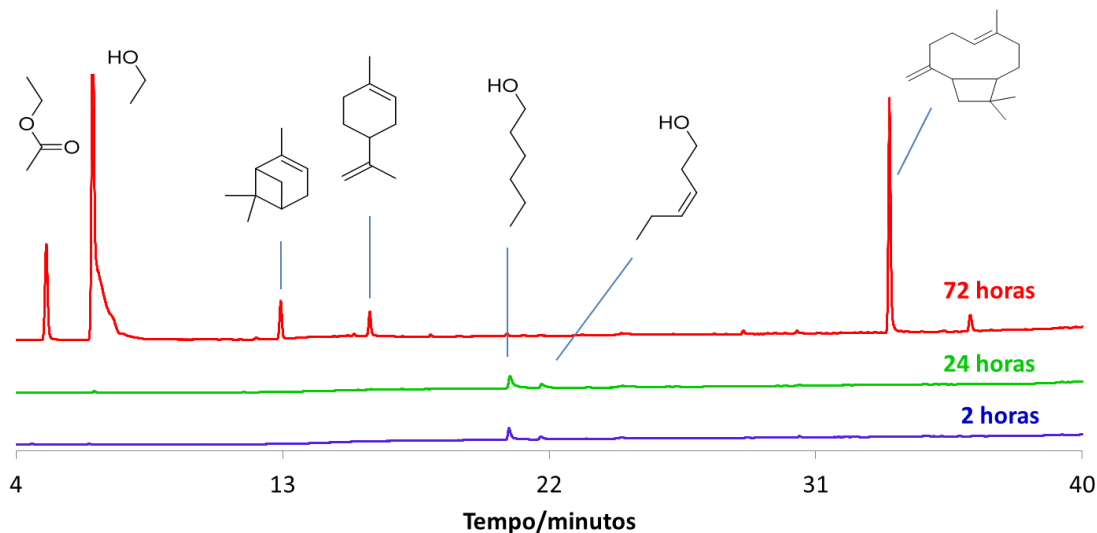


Figura 3.13 - Perfil dos compostos voláteis do sumo de romã ao longo do tempo (2, 24 e 72 horas), obtidos por HS-SPME-GC-FID. Coluna de polietileno glicol (BP 20 M 30 m x 0,32 mm I.D. X 1,0 μ m). Temperatura inicial 40 °C durante 5 min, seguida de aumento de temperatura a 5 °C/min até 210 °C onde permanece 6 min.

3.2.1.3 - Identificação dos compostos fenólicos da romã

Os polifenóis da romã têm sido objeto dos mais variados estudos, desde a sua caracterização no sumo, casca e produtos alimentares relacionados, passando pelo seu poder antioxidante, até aos mais variados efeitos benéficos para a saúde (Mphahlele *et al.*, 2014; Johanningsmeier & Harris, 2011; Viuda-Martos *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2010). A figura 3.14 mostra os espectros de absorção da cianidina-3,5-diglicósido, um representante das antocianinas, da punicalagina e do ácido elágico, representantes dos elagitaninos, e do ácido gálico, representante dos ácidos hidroxibenzoicos, todos compostos característicos da romã. De acordo com os espectros de absorção, a deteção com DAD entre 500 e 550 nm é seletiva para as antocianinas enquanto a 370 nm são detetados simultaneamente derivados do ácido elágico e do ácido galágico, apresentando este comprimento de onda grande seletividade para os elagitaninos. A deteção de ácido gálico e derivados deve ser efetuada a um comprimento de onda inferior a 300 nm, por exemplo a 280 nm.

A figura 3.15 mostra os traços de LC-DAD do sumo de romã obtidos aos comprimentos de onda acima mencionados. Os traços a 520 nm e a 370 nm demonstram

a seletividade para antocianinas e elagitaninos, respetivamente, mesmo em amostras não processadas de sumo de romã. A 280 nm todos os polifenóis absorvem radiação tornando o traço de LC-DAD bastante mais complexo.

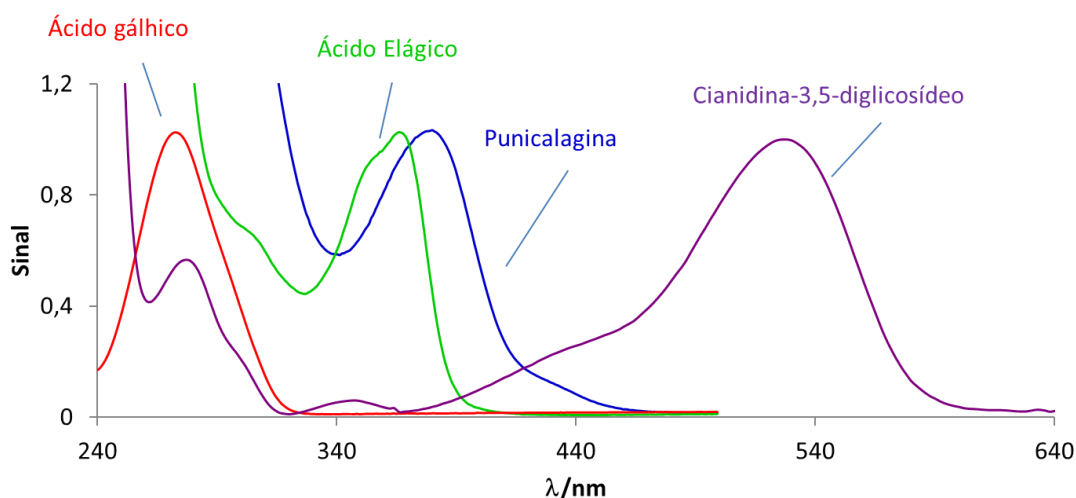


Figura 3.14 - Espectros de absorção da cianidina-3,5-diglicósido, punicalagina, ácido elágico e ácido gálgico normalizados à unidade no máximo de absorção da banda de menor energia.

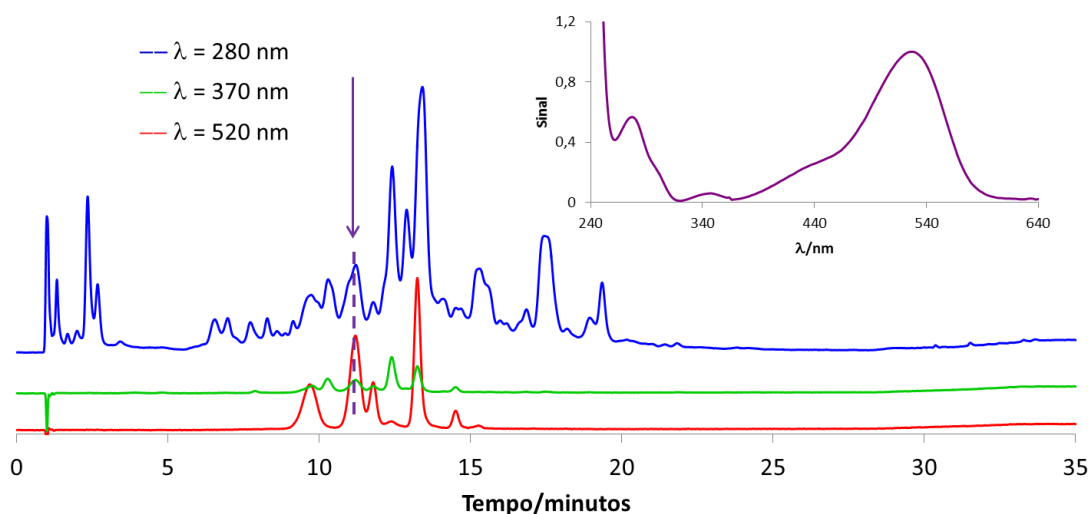


Figura 3.15 - Traços de LC-DAD do sumo de romã a 520, 370 e 280 nm. O *insert* mostra o espetro de absorção obtido a 11,2 minutos. Coluna polimérica PRP-1, Hamilton, tipo C18, de 15 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro, 5 μ m de diâmetro média de partícula, estabilizada 25 °C.

A identificação das principais antocianinas pode ser realizada por comparação com resultados publicados (Fischer *et al.*, 2011; Sepúlveda *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2000), atendendo ao tipo de fase móvel e estacionária utilizadas, e à posição relativa dos picos.

A detecção com DAD permite obter o espectro de absorção, um elemento de identificação importante (*insert* da Figura 3.15), embora as antocianinas possuam espectros de absorção no ultravioleta-visível muito semelhantes (Peters & Noble, 2014; Xiaowei *et al*, 2014). Só o traço de LC-MS permite uma identificação inequívoca de todas as antocianinas presentes no sumo de romã. A figura 3.16 apresenta o traço das antocianinas do sumo de romã, obtido por LC-DAD a 520 nm, e os correspondentes traços de LC-MS, no modo “single ion”, para cada valor de m/z de cada antocianina. O valor de m/z constitui também um elemento de identificação importante. A fragmentação dos iões mais abundantes ao longo da separação cromatográfica (modo AutoMS) fornece um elemento de identificação adicional: o espectro de massa. A figura 3.17 apresenta o espectro de fragmentação da antocianina com tempo de retenção 11,2 minutos (Figura 3.16). O valor de m/z bem como os iões formados por fragmentação, m/z 449 e m/z 287, indicam que estamos perante a cianidina-3,5-diglicósido. A fragmentação do fragmento com m/z 449, MS^3 ($611 \rightarrow 449$), obtida por injeção direta (infusão) no espectrómetro de massa (ESI-MS) revelou a formação do ião com m/z 287, também de acordo com a estrutura proposta.

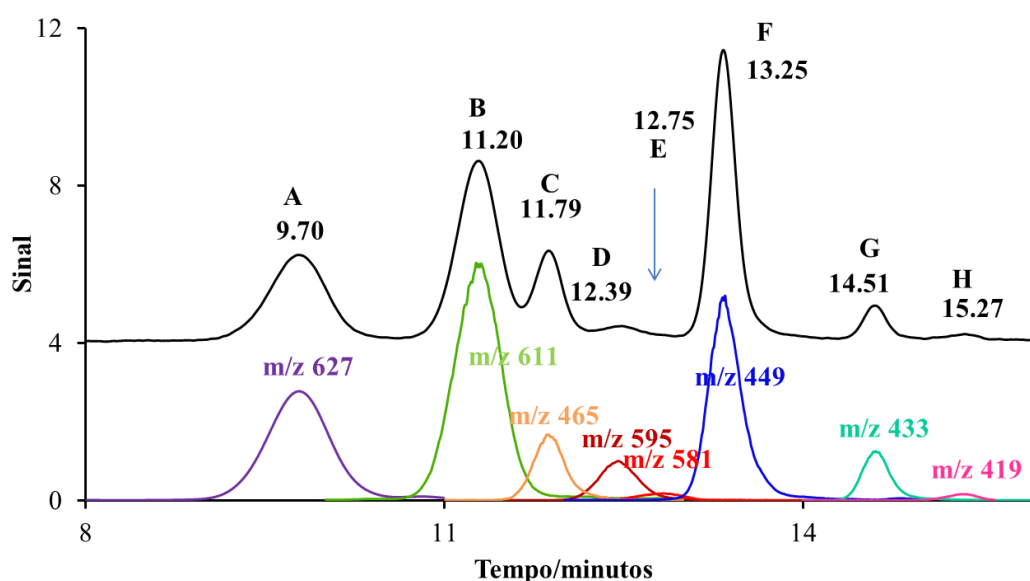


Figura 3.16 - Perfil das antocianinas do sumo de romã obtido por LC-DAD a 520 nm, e correspondentes traços de LC-MS em modo de “single ion” para os valores de m/z das várias antocianinas. A-Delfinidina-3,5-diglicósido; B-Cianidina-3,5-diglicósido; C-Pelargonidina-3,5-diglicósido; D-Delfinidina-3-glicósido; E-Cianidina-pentósido-hexósido; F-Cianidina-glicósido; G-Pelargonidina-glicósido; H-Cianidina-pentósido. Coluna polimérica PRP-1, Hamilton, tipo C18, de 15 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro, 5 μ m de diâmetro média de partícula, estabilizada 25 °C.

O procedimento acima descrito para a identificação da cianidina-3,5-diglicósido, ou seja, considerar o tempo de retenção, o espectro no ultravioleta-visível, o valor de m/z , o espectro de fragmentação (MS^2) e as fragmentações de ordem superior, e ainda a comparação com os resultados já publicados, permitiu identificar inequivocamente os principais polifenóis do sumo de romã e do mesocarpo e membranas carpelares da romã. As tabelas 3.16 e 3.17 apresentam os principais polifenóis identificados no sumo e no mesocarpo e membranas carpelares de romã.

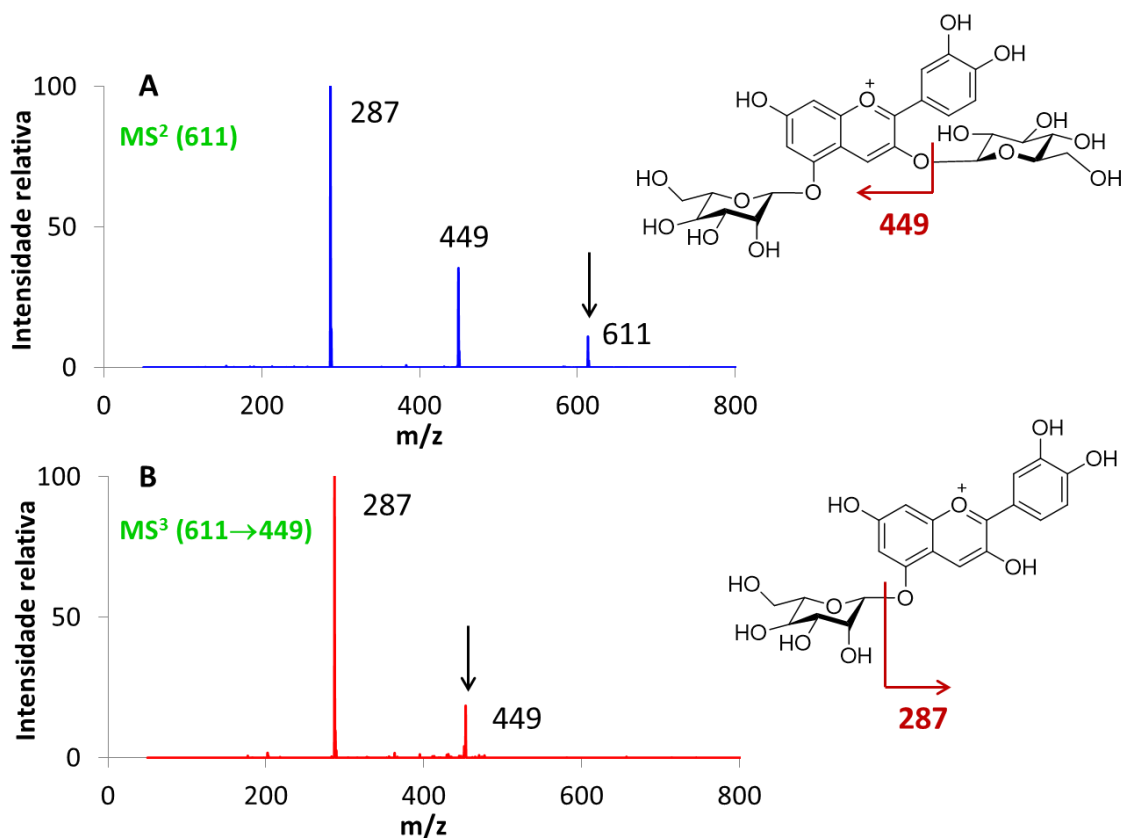


Figura 3.17 - Espectros de fragmentação do íon com m/z 611, MS^2 (611), **A**, e MS^3 (611→449), **B**. Os esquemas mostram possíveis fragmentações. As setas indicam o íon fragmentado. O íon com m/z 611 foi atribuído à cianidina-3,5-diglicósido.

Tabela 3.16 - Ião típico e padrão de fragmentação das várias antocianinas identificadas no sumo de romã.

Nº	Antocianina	M⁺	Fragmentos e abundância (%)
A	Delfinidina-3,5-diglicósido	627	MS ² [627]: 465 (100), 303 (72), 304 (15) MS ³ [627→465]: 303 (100)
B	Cianidina-3,5-diglicósido	611	MS ² [611]: 287 (100), 449 (82) MS ³ [611→449]: 287 (100); 288 (20)
C	Pelargonidina-3,5-diglicósido	595	MS ² [595]: 433 (100), 434 (59), 271 (48) MS ³ [595→433]: 271 (100)
D	Delfinidina-3-glicósido	465	MS ² [465]: 303 (100)
E	Cianidina-pentósido- hexósido	581	MS ² [581]: 449 (100), 287 (77), 419 (29) MS ³ [581→449]: 287 (100)
F	Cianidina-glicósido	449	MS ² [449]: 287 (100)
G	Pelargonidina-glicósido	433	MS ² [433]: 271 (100)
H	Cianidina- pentósido	419	MS ² [419]: 287 (100)

Tabela 3.17 - Ião típico e padrão de fragmentação dos principais elagitaninos encontrados no sumo e na casca de romã.

Nº	Composto	$[M-H]^-$ $/[M-2H]^-$	Fragmentos e abundância (%)
9	Ácido elágico	301	MS ² [301]: 301 (100), 258 (2), 233 (1)
10	HHDP-Hexósido	481	MS ² [481]: 301 (100), 275 (21)
11	Ácido elágico-hexósido	463	MS ² [463]: 301 (100), 300 (35)
12	Punicalaginas	1083 541	MS ² [1083]: 781 (40), 721 (20), 601 (100) MS ² [541]: 303 (100), 601 (87), 781 (56)
13	Punicalinas	781	MS ² [781]: 721 (22), 601 (100)
14	Galoil-hexósido	331	MS ² [331]: 271 (81), 169 (100)
15	Digaloil-hexósido	483	MS ² [483]: 331 (100), 169 (25)
16	“Sanguiin” H10-iso	1567 783	MS ² [1567]: 1209 (14), 935 (84), 915 (28), 783 (29), 765 (100), 783 (100), 451 (7) MS ² [783]: 935 (23), 765 (100)
17	Digaloil-HHDP-hexósido	785	MS ² [785]: 633 (13), 483 (100), 301 (68)
18	“Sanguiin” H10 deriv	1569 784	MS ² [1569]: 935 (52), 785 (81), 765 (100) MS ² [784]: 935 (10), 765 (100)

Abreviaturas: deriv – derivado, HHDP – hexahidroxidifenoil, iso – isômero.

3.2.1.4 – Caracterização dos extratos de mesocarpo e membranas carpelares de romã

A parte esponjosa do mesocarpo e as membranas carpelares da romã são muito ricas em compostos fenólicos, principalmente elagitaninos. Foram preparados vários extratos de mesocarpo e membranas carpelares de romã em soluções contendo diferentes teores em etanol (0, 18, 35 e 70 % vol.) com 16 g/L de mesocarpo e membranas carpelares trituras em fresco, ou o equivalente em pó de mesocarpo e membranas carpelares desidratadas (4 g/L). Todas as soluções de mesocarpo e membranas carpelares de romã apresentam dois isômeros da punicalagina como compostos maioritários (Figura 3.18).

Estes compostos são estáveis em macerados preparados com 70 % de álcool (vol.), com mesocarpo e membranas carpelares no estado fresco ou no estado desidratado a 70 °C durante 3 h. Nos outros macerados, preparados com mesocarpo e membranas carpelares em estado fresco, a punicalagina degrada-se dando origem a dois outros compostos. A análise dos traços de LC-MS revelou a formação das correspondentes punicalinas (Figura 3.18).

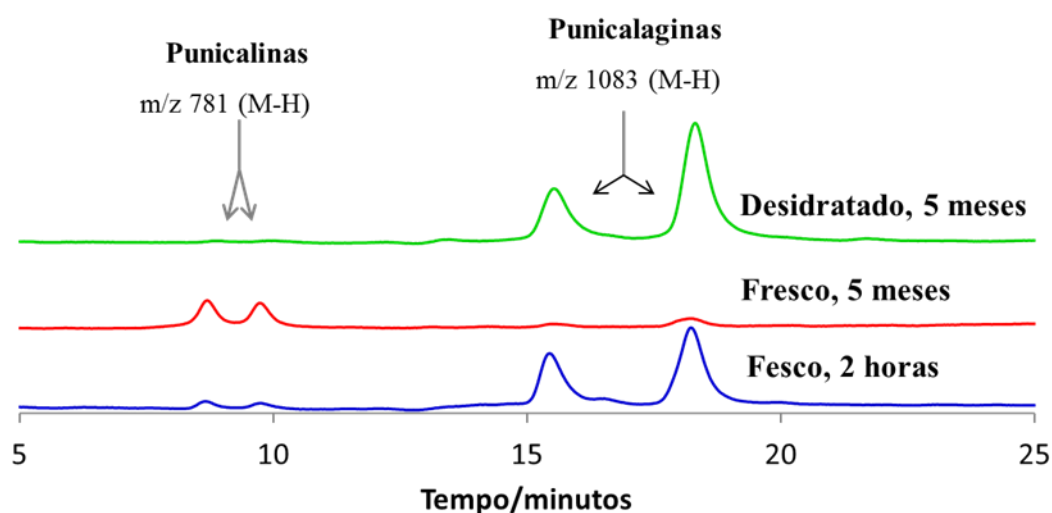


Figura 3.18 - Transformação dos polifenóis nos macerados de casca de romã. A solução de maceração contém 18 % de álcool (vol.). Os perfis foram obtidos para macerados preparados com casca fresca, com 2 horas e 5 meses de maceração, e com pó de casca, com 5 meses de maceração. Coluna polimérica PRP-1, Hamilton, tipo C18, de 15 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro, 5 µm de diâmetro média de partícula, estabilizada 25 °C.

Após cinco meses de maceração, enquanto nos macerados preparados com mesocarpo e membranas carpelares em fresco, praticamente toda a punicalagina se transformou em punicalina, nos macerados preparados com pó desidratado a punicalagina mantém-se estável. Este resultado sugere que a transformação de punicalagina em punicalina segue um processo biológico. O teor em 70 % de álcool desativa os processos biológicos no mesocarpo e membranas carpelares frescos. Nas amostras desidratadas e submetidas a tratamento térmico a desativação biológica ocorre por efeito da temperatura.

3.2.1.5 - Preparação dos licores de romã

A preparação de licores de romã foi inicialmente planeada para ser um processo de aproveitamento e valorização das romãs bravas ou “da mata”, de um modo geral pouco

apreciadas por apresentarem arilos mais pequenos e grande quantidade de casca (Figura 3.12). Neste sentido prepararam-se 3 licores de romã “Assaria” e 3 com romãs “da mata”. Dado que os frutos de romã, bem como os seus arilos e sumo, são não aromáticos (Figura 3.13) e dada a mais-valia que o aroma dos licores representa ao nível do consumidor, a opção foi utilizar na maceração uma aguardente de frutos, em substituição, do usual álcool retificado. A escolha recaiu sobre a aguardente de medronho. Assim, o processo de maceração foi feito com 1 kg de arilos de romã “Assaria” ou “da mata”, por litro de aguardente de medronho concentrada. A concentração da aguardente foi feita em destilador enológico até cerca de 70 % em álcool (vol.). Após seis meses de maceração foi feita a separação dos arilos e adicionado igual volume de um xarope de açúcar. O xarope foi preparado com 1 kg de açúcar por litro de água potável (água fastio). Os licores ficaram mais 6 meses a maturar. No final obtiveram-se licores com um teor alcoólico de 18 ± 2 % vol. e teor em açúcar de 240 ± 5 g/L. A tabela 3.18 resume as principais características dos licores.

Tabela 3.18 - Propriedades dos licores preparados com romãs “Assaria” e romãs “da mata”.

Variedade	Acidez* (g/L)	Fenóis totais (g/L)	Componente cromática a*
“Assaria”	$0,93 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,1$
“Da Mata”	$1,05 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,1$

*expressa em ácido cítrico

Os resultados mostraram que as romãs “da mata” apresentam grande potencial para preparação de licores, originando bebidas mais ricas em polifenóis.

Foi feita a monitorização dos teores em polifenóis totais e em antocianinas nos primeiros 10 dias, para os licores preparados com a variedade “Assaria”. O máximo teor em polifenóis obtém-se passados 7 dias de maceração ($0,73 \pm 0,14$ g/L), enquanto o índice de antocianinas totais é máximo passados 3 dias ($0,31 \pm 0,04$ g/L). Resultado semelhante foi observado para o licor de bagas de murta (Galego *et al.*, 2011).

A tabela 3.19 resume os teores médios em antocianinas e em elagitaninos nos licores preparados com as duas variedades de romã. A preparação de macerados a partir do sumo introduz uma diluição de duas vezes, devido à adição de aguardente, e a preparação do licor, introduz uma diluição total de quatro vezes, devido à posterior adição de agente adoçante ao macerado. Os resultados mostram que os elagitaninos não se

degradam nem durante a maceração nem durante a maturação do licor. As antocianinas, por outro lado, degradam-se logo durante o processo de maceração. Durante este período o teor em antocianinas reduz-se em mais de 80 %. Durante a maturação o teor em elagitaninos permanece estável.

Tabela 3.19 - Teores em antocianinas e em elagitaninos no sumo e em macerados e licores preparados com o sumo.

Compostos (mg/L)	Sumo Fresco	Macerado Após 6 meses	Licor Após 12 meses
Elagitaninos	296,3 ± 15,4	161,4 ± 5,5	86,3 ± 7,0
Antocianinas	135,5 ± 8,0	11,4 ± 1,2	5,3 ± 0,7

No sentido de aumentar o teor em polifenóis do licor e uma vez conhecidas as propriedades dos extratos de mesocarpo e membranas carpelares, prepararam-se licores a partir de macerados contendo pó preparado com mesocarpo e membranas carpelares de romã, após desidratação. Foram preparados quatro licores com frutos provenientes de quatro pomares diferentes, nomeadamente dos concelhos de Faro, Loulé, Tavira e Silves. Os macerados foram preparados com sumo, aguardente de medronho e por adição 5 g/L de pó de mesocarpo e membranas carpelares de romã. Neste caso o tempo de maceração foi um dia, após o qual se adicionou xarope de açúcar. Os principais resultados estão resumidos na tabela 3.20.

A adição de pó preparado com o mesocarpo e membranas carpelares aumenta o teor em polifenóis pelo menos 3 vezes. O valor de b^* é superior nos licores frescos preparados com mesocarpo e membranas carpelares porque está presente a contribuição dos elagitaninos que têm cor amarela. Seis meses de maturação colocam a luminosidade do licor preparado com mesocarpo e membranas carpelares, semelhante à do licor sem adição de mesocarpo e membranas carpelares, após um mês de preparação. Também após seis meses de maturação, as componentes a^* e b^* se tornam semelhantes nos licores preparados com ou sem adição de pó de mesocarpo e membranas carpelares. Este pó torna os licores ligeiramente menos ácidos.

Tabela 3.20 - Teor em polifenóis, parâmetros da cor e pH dos licores de romã.

	Licor sem casca (1 mês)	Licor com 5 g/L de casca (1 mês)	Licor sem casca (6 mês)	Licor com 5 g/L de casca (6 mês)
Polifenóis totais (g/L)	0,42 ^α ± 0,05	1,46 ^β ± 0,07	0,39 ^α ± 0,07	1,23 ^γ ± 0,09
L*	30,7 ^α ± 0,43	27,28 ^β ± 0,14	32,07 ^γ ± 0,76	30,65 ^α ± 0,17
a*	1,08 ^α ± 0,32	1,44 ^β ± 0,18	1,72 ^γ ± 0,46 ^γ	2,10 ± 0,4 ^γ
b*	3,72 ^α ± 0,48	5,15 ^β ± 0,76	1,34 ^γ ± 0,48	1,41 ^γ ± 0,66
pH	3,81 ^α ± 0,03	3,83 ^β ± 0,02	3,80 ^α ± 0,03	3,84 ^α ± 0,03

Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 8 amostras analisadas em cada caso. Em cada linha o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

3.2.1.6 – Compostos voláteis dos licores preparados com aguardente de medronho

Numa bebida espirituosa os compostos voláteis são a primeira percepção do consumidor antes de a colocar na boca. Bebidas à base de sumo da romã são pobres em aromas, embora possam conter um elevadíssimo teor em compostos fenólicos. Para tornar o licor de romã mais aromático, o uso de um álcool aromático como a aguardente de medronho, como agente macerante pode ser uma solução. A figura 3.19 mostra o perfil dos compostos voláteis de um licor de romã preparado com aguardente de medronho. Para comparação foi também incluído o perfil dos compostos voláteis da aguardente de medronho utilizada na sua preparação, antes da concentração e nas mesmas unidades (mg/L).

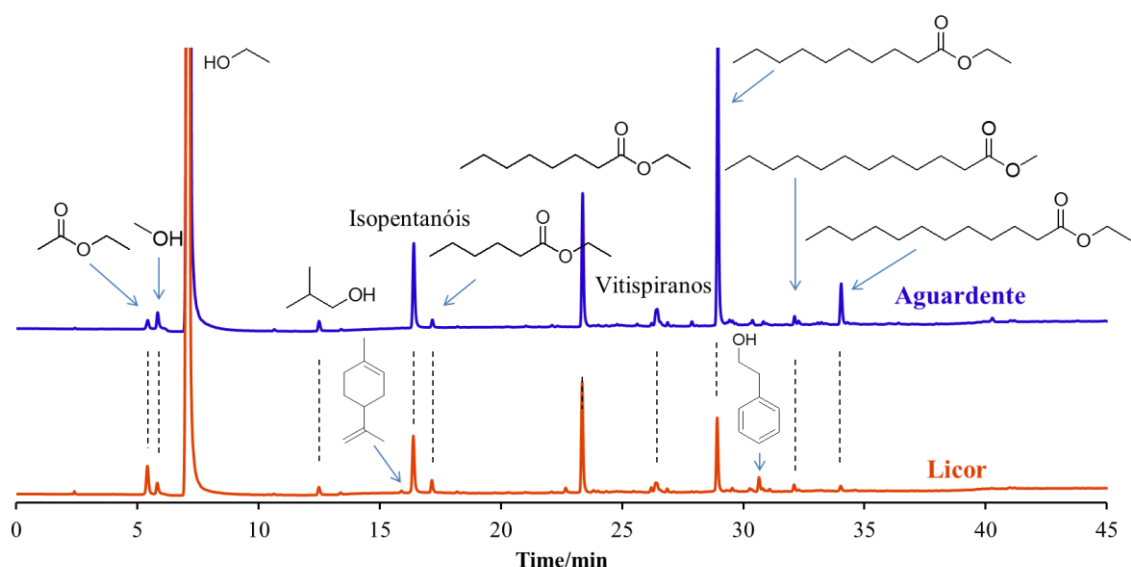


Figura 3.19 - Perfil dos compostos voláteis de um licor de romã e da aguardente de medronho utilizada na sua preparação, obtidos por HS-SPME-GC-FID. Coluna de polietileno glicol (BP 20 M 30 m x 0,32 mm I.D. X 1,0 μ m). Temperatura inicial 40 °C durante 5 min, seguida de aumento de temperatura a 5 °C/min até 210 °C onde permanece 6 min.

O perfil dos compostos voláteis do licor mostra que a maior parte dos compostos aromáticos provêm da aguardente, embora em concentrações mais baixas. A tabela 3.21 apresenta os teores dos diferentes compostos voláteis determinados no licor de romã e na aguardente de medronho e sumo utilizados. Apresentam-se ainda os valores dos limiares de percepção reportados na literatura.

A aguardente de medronho, antes de ser utilizada na preparação dos licores, foi primeiro concentrada em destilador enológico, com o objetivo de reduzir o metanol (Coldea *et al.*, 2011) e outros compostos de cabeça, principalmente o acetato de etilo. O método de análise dos compostos voláteis no caso da aguardente foi a injeção em natureza. No caso dos licores, os álcoois foram determinados após destilação em destilador enológico e os outros compostos voláteis por HS-SPME-GC. Os sumos foram analisados por HS-SPME-GC e HS-SPME-GC-MS.

Tabela 3.21 - Teor em compostos voláteis de um licor de romã e da aguardente e sumo utilizados na sua preparação.

Compostos	Concentração			
	Aguardente (mg/L (a.p))	Licor (mg/L)	Limiares (mg/L)	Sumo (mg/L)
Acetaldeído	80 ±10	2,5 ± 0,4	10 ^a	-
Acetato de etilo	370 ±40	21,8 ± 1,9	32,6 ^b	-
Metanol	6370 ±640	161,4 ±50.5	668 ^a	-
1-propanol	130 ±10	3,6 ±0,7	830 ^a	-
2-butanol	< 0,2	-	1 ^a	-
2-metil-1-propanol	260 ±30	8,9 ± 1,0	28,3 ^b	-
1-butanol	< 0,5	-	0,82 ^a	-
Limoneno	-	0,03 ± 0,01	0,034 ^c	0,008 ± 0,004
Isopentanois	970 ± 100	23,2 ± 1,1	179 ^b	-
Cis-3-hexeno-1-ol	-	<0,007	0,4 ^d	< 0,007
1-Hexanol	< 0,8-	5,58 ± 0,38	5,4 ^b	1,14 ± 0,36
Hexanoato de etilo	< 0,8	-	0,055 ^b	-
Octanoato de etilo	24 ± 2	1,0 ±0,2	0,013 ^b	-
Furfural	35 ± 4	0,5 ±0,1	44 ^b	-
Vitispiranos†	59 ± 6	1,2 ± 0,5	-	-
Trans-cariofileno	-	0,005 ± 0,002	0,064 ^e	0,06 ± 0,01
Decanoate de etilo	< 0,8	-	1,12 ^b	-
1-nonanol	< 0,9	-	na	-
Succinato de etilo	57 ± 6	0,5±0,1	100 ^a	-
Dodecanoato de etilo	83 ± 8	-	-	-
Hexanal	-	<0.008	0,026 ^b	< 0,008
Tetradecanoato de etilo	42 ± 4	-	na	-

†, quantificação usando um fator de resposta unitário -, não detetado; na, não avaliado. ^aMoreno *et al.*, 2005, em solução com 14 % vol. etanol; ^bGao et al., 2014 em solução com 46 % etanol ^cSeideneck & Schieberle, 2011, em água (mg/kg) ^dGuth, 1997, em solução com 10 % vol. de etanol ^eCui *et al.*, 2010, em solução aquosa (mg/kg);

Embora sejam vários os compostos voláteis reportados nos sumos de romã, tais como o 1-hexanol, o limoneno ou o trans-cariofileno, só este último apresenta teores semelhantes aos dos limiares de perceção reportados na literatura. O 1-hexanol é o

composto existente no sumo que apresenta maiores teores no licor. Este composto também está presente na aguardente mas em teor abaixo de 0,8 g/hL (a.p.). Na mistura do sumo com a aguardente o teor deste composto e do trans-cariofileno são mais elevados, provavelmente potenciados pelo efeito do álcool. Os sumos de romã são considerados essencialmente não aromáticos. O perfil dos compostos voláteis do sumo de romã, variedade “Assaria”, estão em linha com os resultados reportados para sumos de outras variedades (Mayuoni-Kirshinbaum & Porat, 2014; Melgarejo, *et al.*, 2011; Vázquez-Araújo *et al.*, 2011). Confirma-se que o sumo de romã pouco contribui para o aroma dos licores com ele preparados.

3.2.1.7 - Estabilidade das antocianinas

As antocianinas são polifenóis importantes nos licores de romã pois, além do seu elevado poder antioxidante (Tezcan *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2000) determinam também a cor dos licores, parâmetro importante para o consumidor (Alighouchi & Barzegar, 2009; Alighouchi *et al.*, 2008). Foi decidido fazer um estudo de longo prazo da estabilidade das antocianinas nos macerados e nos licores para avaliar o papel do teor alcoólico e do teor em açúcar na eventual estabilização destes compostos. Para comparação foi seguido também durante algum tempo o teor em antocianinas nos sumos. O estudo foi feito com oito sumos preparados com romãs colhidas em 4 pomares (concelhos de Faro, Loulé, Silves e Tavira), e respetivos macerados e licores, estes últimos preparados diretamente com o sumo e sem período de maceração. A tabela 3.22 apresenta os resultados da evolução no tempo do teor em antocianinas totais e do teor em cianidina-3,5-diglicósido e em cianidina-3-O-glicósido, representantes das antocianinas diglicosadas e monoglicosadas, respetivamente. Os sumos foram estudados durante apenas uma semana uma vez que começam a fermentar e alguns ganharam fungos. O teor em antocianinas totais é mais elevado do que o encontrado para sumos preparados no estudo anterior, refletindo diferentes estados de maturação dos frutos e armazenamento (Miguel *et al.*, 2004). Após a primeira semana o teor em antocianinas do sumo decresce em cerca de 40 %. No entanto a velocidade de degradação não é igual para todas as antocianinas, sendo as diglicosadas bastante mais estáveis. Este comportamento já foi reportado para sumos de romã de outras variedades (Mena *et al.*, 2014; Gil *et al.*, 2000). Nos macerados as antocianinas são mais estáveis sugerindo um efeito estabilizador do etanol (ver resultados após um mês). Passados 4 meses o teor total em antocianinas diminui cerca de 50 % do

valor inicial. No entanto, enquanto que a antocianina diglicosada apresenta sensivelmente o mesmo teor, a monoglicosada reduziu-se a cerca de 20 % do valor inicial. Após 26 meses apenas se detetam vestígios de antocianinas nos macerados. Nos licores o teor em antocianinas totais e nas duas individuais seleccionadas permanece essencialmente constante no primeiro mês, sugerindo algum efeito estabilizante adicional por parte do açúcar, resultado já reportado por outros investigadores (Nikkhal *et al.* 2007). No entanto, e tal como nos macerados, após 26 meses apenas se detetam vestígios de antocianinas. Estudos de estabilização feitos em macerados e licores em presença de extratos de casca de romã, revelam resultados semelhantes (dentro do erro experimental). Estes resultados indicam que os licores de romã, tal como preparados, sofrerão alterações significativas no teor em antocianinas e na cor durante a maturação e o tempo de prateleira.

Tabela 3.22 - Teor em antocianinas totais e em cianidina-3,5-diglicósido (Ant B) e cianidina-3-glicósido (Ant E), em mg/L, dos sumos, macerados e licores de romã ao longo do tempo.

Tempo após preparação	Sumo			Macerado			Licor		
	Total	Ant B	Ant E	Total	Ant B	Ant E	Total	Ant B	Ant E
Fresco	386 ^α ± 88	86 ^α ± 12	177 ^α ± 51	178 ^α ± 30	39 ^α ± 6	84 ^α ± 24	90 ^α ± 28	22 ^α ± 10	39 ^α ± 10
1 semana	225 ^β ± 76	81 ^α ± 29	51 ^β ± 26	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋
1 mês	a ₋	a ₋	a ₋	120 ^α ± 20	37 ^α ± 12	48 ^α ± 20	78 ^α ± 28	21 ^α ± 9	31 ^α ± 11
4 meses	a ₋	a ₋	a ₋	84 ^χ ± 15	37 ^α ± 9	17 ^β ± 9	67 ^β ± 19	24 ^α ± 8	21 ^β ± 5
26 meses	a ₋	a ₋	a ₋	0,5 ^δ ± 0,3	0,3 ^β ± 0,2	^b 0,0	1,5 ^χ ± 0,7	1,0 ^α ± 0,4	^b 0,0

Os resultados são expressos como média e desvio padrão de oito sumos oito macerados e oito licores. Em cada coluna o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$). ^aNão determinado; ^binferior ao limite de deteção (~ 0,2 mg/L).

3.2.2 - Licor de bagas de murta

A murta (*Myrtus communis* L.) é um arbusto que cresce espontaneamente por todo o Algarve, principalmente junto a pequenas ribeiras. Floresce entre maio e junho e a maturação dos seus frutos, bagas, ocorre entre dezembro e janeiro. No Algarve o licor de bagas de murta era tradicionalmente produzido para combater constipações e problemas digestivos (Galego & Almeida, 2007). Este licor é produzido em larga escala na ilha italiana da Sardenha (Tuberoso *et al.*, 2013; Tuberoso *et al.*, 2008; Tuberoso *et al.*, 2007; Tuberoso *et al.*, 2006; Montoro *et al.*, 2006a; Montoro *et al.*, 2006b; Vacca *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2002) e na ilha francesa da Córsega, tendo desempenhado um papel importante no desenvolvimento socioeconómico destas ilhas (Mulas, 2012; Barboni *et al.*, 2010).

3.2.2.1 - Processo de produção do licor de bagas de murta

O licor de bagas de murta é normalmente produzido por maceração das bagas em solução hidro-alcoólica (Tuberoso *et al.*, 2013; Tuberoso *et al.*, 2008; Tuberoso *et al.*, 2007; Tuberoso *et al.*, 2006; Montoro *et al.*, 2006a; Montoro *et al.*, 2006b; Vacca *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2002). No Algarve a maceração também é o processo de preparação seguido, mas são normalmente utilizadas aguardentes da região como alternativa às soluções hidro-alcoólicas. As bagas de murta utilizadas na preparação dos licores estudados neste trabalho foram colhidas em dezembro e submetidas de imediato ao processo de maceração. A maceração decorreu em aguardente de figo com teor alcoólico de 44 ± 1 % vol. ou em aguardente de figo concentrada e parcialmente desodorizada com 10 g/L de carvão ativado e um teor alcoólico de 70 ± 2 % vol. Após o período de maceração as bagas foram separadas e foi adicionado xarope de açúcar de modo a obter licor com 240 ± 5 g/L de açúcar e teor de álcool de 20 ± 2 % vol.

3.2.2.2 - Caracterização das bagas de murta

Foram selecionadas 3 amostras de 25 bagas para determinar a massa, o diâmetro equatorial, o grau Brix, o pH e o teor em fenóis totais da película (Tabela 3.23). A massa média das bagas de murta é 0,44 g, semelhante à encontrada por Tuberoso e colaboradores (2007) (massas entre 0,19 e 0,49 g). O pH médio é 5,4, também semelhante ao de algumas bagas de murta italianas, cujo pH varia entre 3,5 e 5,45 (Franco *et al.* (2002) ou de bagas

de murta tunisinas (pH de 5,35 a 5,58) (Snoussi *et al.*, 2012). O valor encontrado é, no entanto, mais baixo do que o das bagas de murta turcas (6,57) (Aydin & Özcan, 2007). O °Brix é em média 13, muito menor do que o das bagas de uva, avaliado no mesmo laboratório ou reportado na literatura, que é sempre superior a 20 (Filippetti *et al.*, 2015; Bindon *et al.*, 2013; Puertólas *et al.*, 2010). Não foram encontrados valores de °Brix para bagas de murta reportados na literatura.

Tabela 3.23 – Alguns parâmetros físico-químicos das bagas de murta.

	Massa (g)	Diâmetro equatorial (mm)	pH	°Brix	Polifenóis totais Película (mg/g)*
Amostra 1	0,44 ± 0,17	9,10 ± 1,3	5,39 ± 0,05	12,9 ± 2,5	89 ± 5
Amostra 2	0,45 ± 0,11	9,26 ± 0,77	5,54 ± 0,06	13,1 ± 1,9	97 ± 6

*massa de polifenóis por grama de película desidratada, expresso em ácido gálico

Os polifenóis totais das películas de bagas de murta são em média cerca de 90 mg/g de película seca, semelhantes aos encontrados por Barboni e colaboradores (2010) para as bagas de murta da Córsega (81,3 ou 77,6 mg/g de matéria seca - toda a baga). Teores semelhantes foram também reportados por Fadda & Mulas, 2010, com resultados de 20,3 a 27,3 mg/g, para o fruto fresco. Considerando que o teor em humidade varia entre 66,8 e os 67,1 %, os teores por peso seco são da ordem de 80 mg/g.

3.2.2.3 - Determinação dos compostos fenólicos em macerados e licores

No sentido de otimizar o processo de produção do licor de bagas de murta foram determinados os teores em polifenóis totais e antocianinas totais nos extratos alcoólicos durante os 7 primeiros dias de maceração. Neste estudo foi utilizada aguardente de figo, parcialmente desodorizada, com 10 g/L de carvão ativado e concentrada até um teor alcoólico de 70 ± 2 % vol. Numa primeira fase foram testadas diferentes quantidades de bagas de murta (120, 160, 200 e 240 g) por litro de aguardente (Figura 3.20).

O teor em polifenóis totais aumenta ao longo dos 7 dias de maceração, não se atingindo, um valor máximo durante este período. O teor em antocianinas totais, por outro lado, atingiu o máximo passados 4 a 5 dias, independentemente da quantidade de bagas utilizada por litro de aguardente. Resultado semelhante foi obtido por Tuberoso e

colaboradores (2007). Em qualquer dos casos, quanto maior a quantidade de bagas de murta por litro de aguardente maior é a quantidade de polifenóis extraídos.

Para avaliar o efeito do tipo de processamento prévio da aguardente no teor em polifenóis e antocianinas do licor foram realizados estudos utilizando 300 g/L de bagas de murta maceradas em aguardente de figo, com 44 % de álcool (vol.), e com 70 % de álcool (vol.) não desodorizada e desodorizada com 5 g/L (Desod5), e 30 g/L (Desod30) de carvão ativado (Figura 3.21). As análises foram realizadas durante os primeiros 10 dias de maceração. Para o mesmo tempo de extração todos os macerados preparados com aguardentes de maior teor alcoólico (70 % vol.) apresentam teor em polifenóis aproximadamente o dobro do encontrado em macerados preparados com a aguardente de menor teor alcoólico. As diferentes aguardentes concentradas a 70 % vol. apresentam comportamento semelhante, independentemente do processo de desodorização. Tal como nos estudos anteriores, o máximo teor em antocianinas é atingido passados 4 a 5 dias. O máximo teor em polifenóis atinge-se entre os 8 e os 10 dias de extração. No caso das antocianinas, a capacidade de extração das aguardentes com maior teor alcoólico é ainda mais evidente. De facto, passados dois dias o teor em antocianinas nos macerados preparados com aguardentes contendo 70 % de álcool (vol.) é pelo menos quatro vezes superior ao obtido com a aguardente de menor teor alcoólico.

O perfil das antocianinas nos macerados e licores foi estudado por HPLC com deteção a 520 nm. A identificação foi feita por comparação dos resultados obtidos com os publicados (Montoro *et al.*, 2006b). As antocianinas mais abundantes nos macerados e nos licores preparados com bagas de murta colhidas no concelho de Faro são a delfinidina-3-O-glicósido, a cinidina-3-O-glicósido, a petunidina-3-O-glicósido e a malvidina-3-O-glicosido (Figura 3.32). A análise posterior dos macerados e licores por LC-MS permitiu confirmar a identificação das antocianinas mais abundantes. Com base nos resultados de LC-MS foram atribuídos os sinais com $m/z = 465, 449, 479$ e 493 , à delfinidina-3-O-glicósido, cianidina-3-O-glicósido, petunidina-3-O-glicósido e malvidina-3-O-glicósido, respetivamente (tabela 3.24). Estudos realizados por Franco e colaboradores (2002) mostraram que estas são também as antocianinas mais abundantes em extratos preparados com 120 g de bagas de murta da Sardenha por litro de solução hidro-alcoólica (etanol água 80:20).

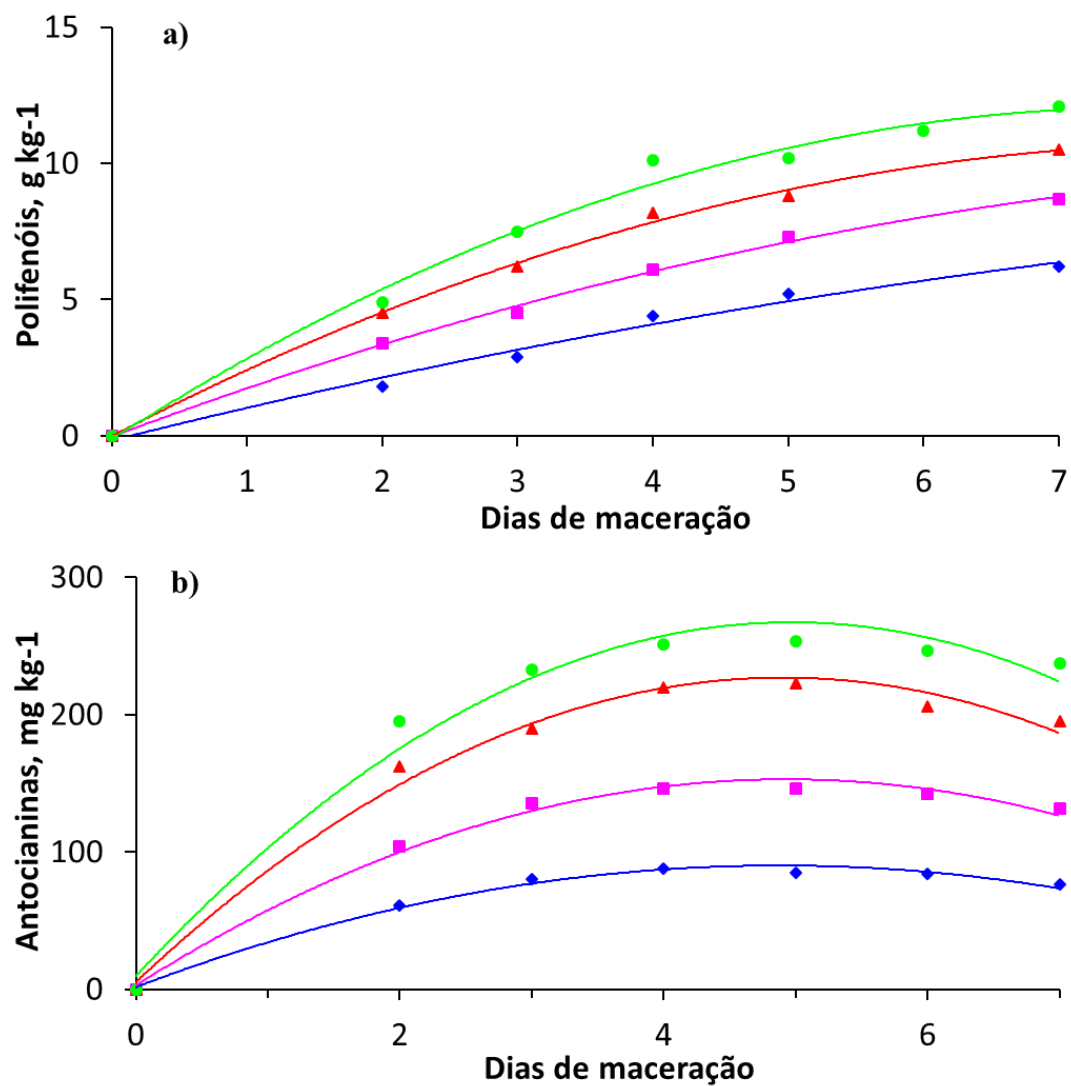


Figura 3.20 - Evolução dos teores em polifenóis totais, a), e antocianinas, b), nos macerados ao longo do tempo. —◆— 120 g/L de bagas; —■— 160 g/L de bagas; —▲— 200 g/L de bagas; —●— 240 g/L de bagas.

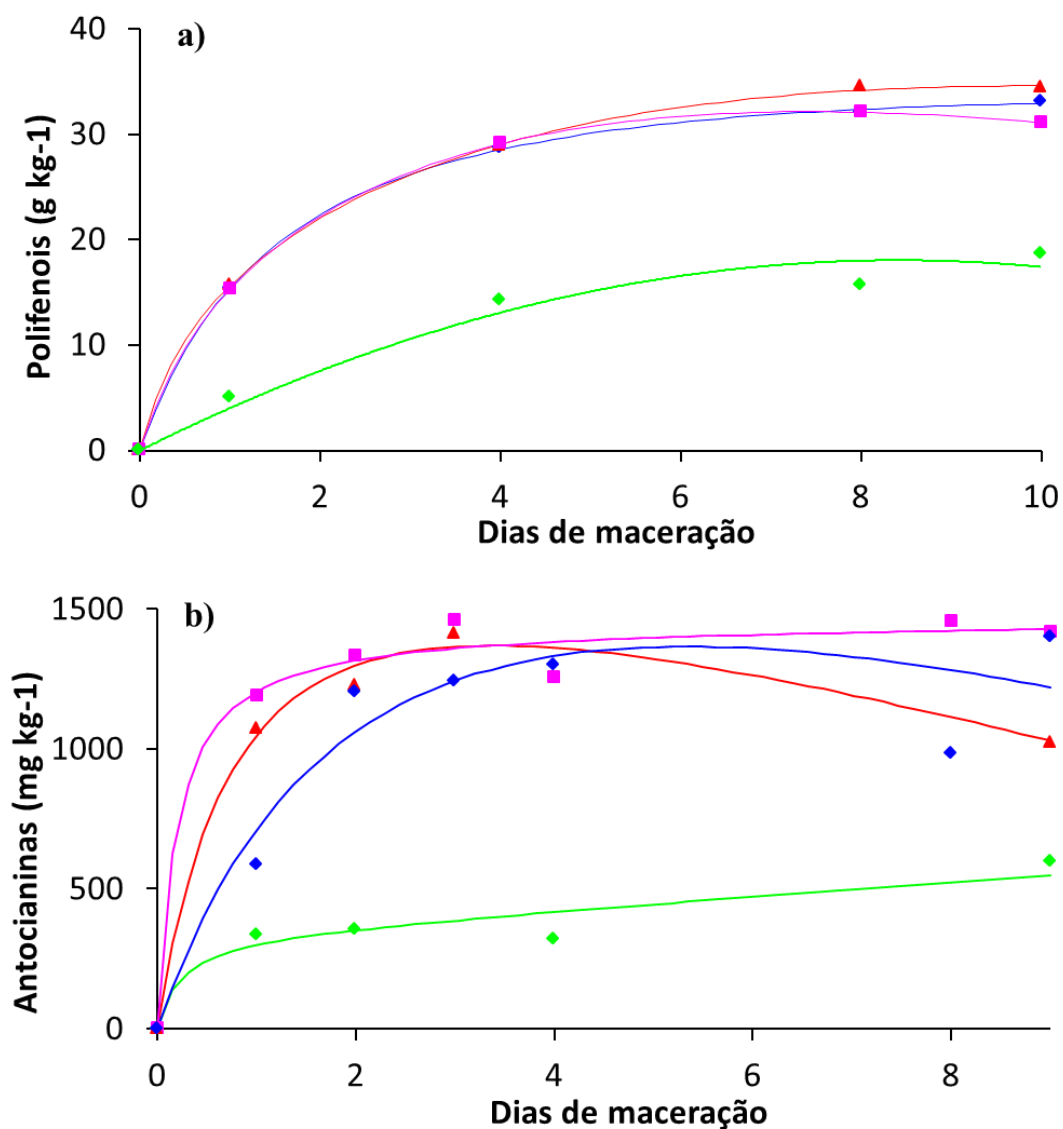


Figura 3.21 - Evolução dos teores em polifenóis totais, a), e antocianinas, b), nos macerados ao longo do tempo. . -♦- aguardente com 44 % de álcool (vol.); -■- aguardente com 70 % de álcool (vol.) não desodorizada; -▲-aguardente com 70 % de álcool (vol.) desodorizada com 5 g/L de carvão ativado; -♦- aguardente com 70 % de álcool (vol.) desodorizada com 30 g/L de carvão ativado.

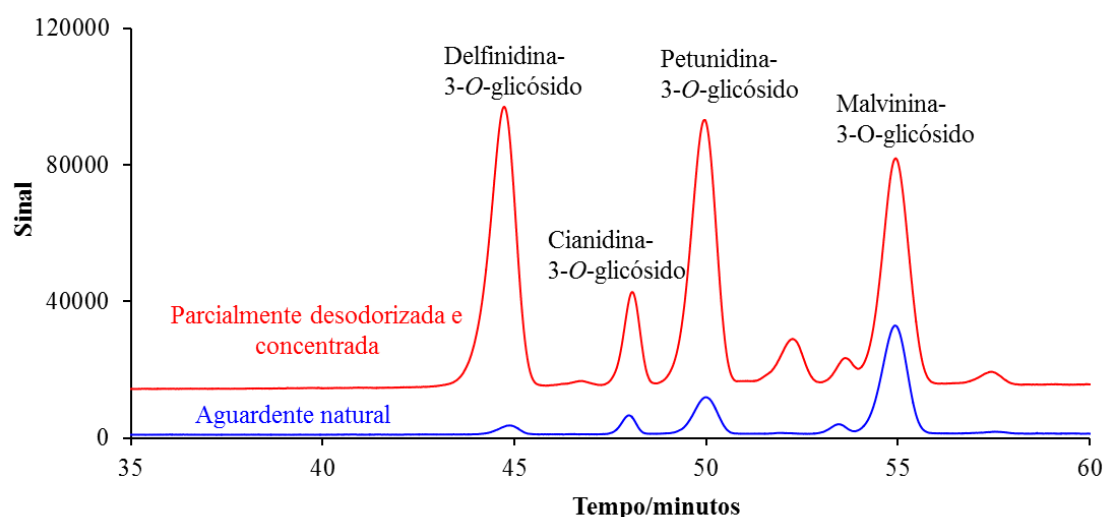


Figura 3.22 - Perfil de antocianinas de dois licores preparados com 120 g/L de bagas de murta e aguardente natural (—) e parcialmente desodorizada e concentrada (—), após 5 meses de maturação. Coluna *Chromopac*, 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro com diâmetro de partícula 5 μ m.

Tabela 3.24 - Ião típico e padrão de fragmentação das várias antocianinas identificadas nas bagas de murta e nos licores com elas preparados.

Nº	Antocianina	M ⁺	Fragmentos e abundância (%)
1	Delfinidina-3-O-glicósido	465	MS ² [465]: 303 (100)
2	Cianidina-3-O-glicósido	449	MS ² [449]: 287 (100)
3	Petunidina-3-O-glicósido	479	MS ² [479]: 317 (100)
4	Malvidina-3-O-glicósido	493	MS ² [493]: 331 (100)

Os resultados mostram que as características dos licores, nomeadamente o seu teor em polifenóis em geral e antocianinas em particular depende das propriedades da aguardente utilizada na maceração. A aguardente concentrada apresenta melhor desempenho, tanto na extração de polifenóis como de antocianinas. A desodorização depois da concentração não tem efeito claro sobre qualquer destes dois parâmetros. O perfil das antocianinas nos licores depende também da aguardente utilizada na maceração. Enquanto que na aguardente com menor teor alcoólico (44 % vol.) a malvidina-3-O-glicósido é a antocianina mais abundante, com outras aguardentes mais concentradas as antocianinas que apresentam maiores teores são a delfinidina-3-O-glicósido e a

petunidina-3-O-glicósido. O perfil obtido com a aguardente de menor teor alcoólico é semelhante ao reportado por Montoro e colaboradores (2006b), por utilização de misturas hidro-alcoólicas com 70:30 de etanol/água e um período de maceração de 40 dias. O mesmo foi verificado por Snoussi e colaboradores (2012) com bagas de murta tunisinas maceradas em 70 % de etanol durante 40 dias. De salientar que as antocianinas se degradam durante a maturação (figura 3.21). De facto, o teor máximo é atingido passados 4-5 dias, e depois decresce. A degradação das antocianinas associada, ao longo período de maceração, pode estar na origem das diferenças observadas entre os licores preparados no Algarve e na Sardenha. De acordo com Nikkhah e colaboradores (2007), o açúcar tem um efeito estabilizante nas antocianinas. A adição de açúcar na preparação dos licores estabilizou as antocianinas, o que contribuiu também para as diferenças entre os perfis obtidos experimentalmente e os reportados por Montoro e colaboradores (2006a). A malvidina-3-O-glicósido é também a antocianina mais abundante nos extratos preparados por Franco e colaboradores (2002). No mesmo trabalho, Franco e colaboradores (2002), avaliaram a percentagem de antocianinas em 11 licores comerciais e verificaram que, em média, a malvidina-3-O-glicósido corresponde a 79,9 % do total de antocianinas dos licores.

Foi avaliada também a eventual presença de trans-resveratrol nos extratos hidro-alcoólicos, nas películas e nas grainhas das bagas de murta. Os resultados obtidos por LC-MS indicam a presença deste composto, mas em quantidades baixas, cerca de 0,08 mg/L em extratos de película. Não foi detetada a presença de stilbenos em extratos hidro-alcoólicos de murtas da Sardenha (Tuberoso *et al.*, 2013).

3.2.2.4 – Compostos voláteis do licor de murta

O aroma dos licores de murta preparados com soluções hidro-alcoólicas provém das bagas de murta. Estes frutos são bastante aromáticos e por isso aromatizam os licores com eles preparados. Entre os compostos aromáticos das bagas de murta contam-se principalmente os monoterpenos. A preparação de licores de murta com aguardentes de frutos, tal como no caso dos licores de romã, introduz também compostos voláteis da aguardente no aroma do licor. A figura 3.23 apresenta o perfil dos compostos voláteis das bagas de murta e de um licor com elas preparado (aproximadamente um ano de maturação), ambos obtidos por HS-SPME-GC-FID.

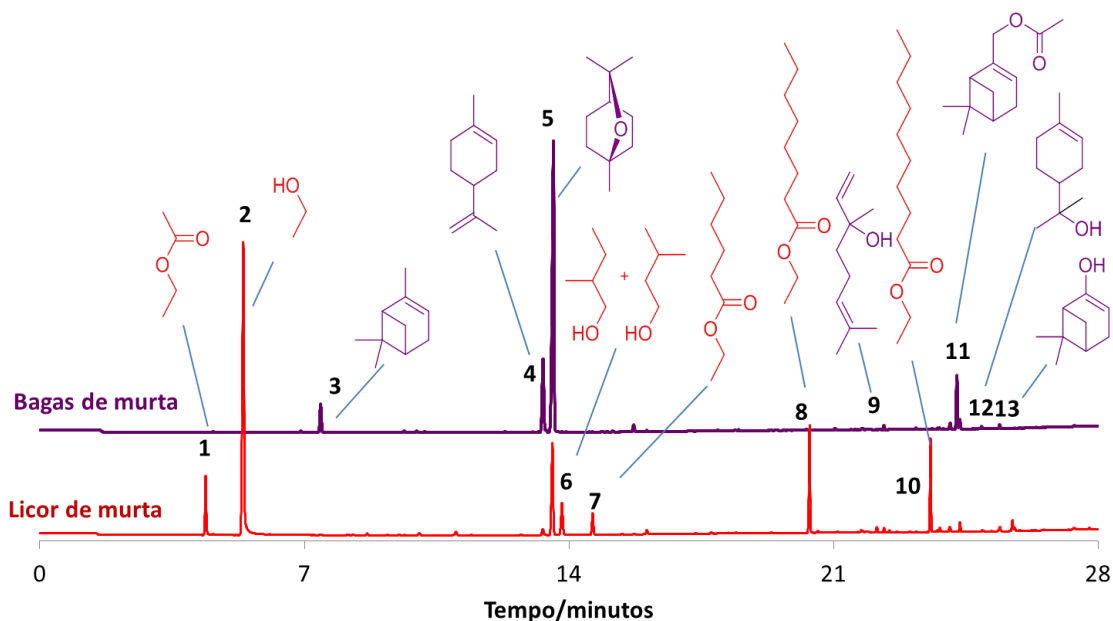


Figura 3.23 - Perfil dos compostos voláteis (HS-SPME-GC-FID) de bagas de murta e de um licor de murta, preparado com aguardente de figo concentrada e parcialmente desodorizada, com um ano de maturação. 1 – acetato de etilo; 2 – etanol; 3 – α -pineno; 4 – limoneno; 5 – eucaliptol; 6 – isopentanois; 7 – hexanoato de etilo; 8 – octanoato de etilo; 9 – linalol; 10 – decanoato de etilo; 11 – acetato de mirtenilo; 12 – α -terpineol; 13 – mirtenol. Coluna de polietileno glicol ZB WAX de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Temperatura inicial 40 °C, durante 5 min, seguida de aumento de temperatura a 5 °C/min até 210 °C.

Os compostos voláteis mais abundantes das bagas de murta são o α -pineno, o limoneno, o eucaliptol e o acetato de mirtenilo. O mirtenol, bem como o acetato de mirtenilo, são compostos voláteis característicos da murta e por isso podem ser utilizados como marcadores dos licores preparados com este fruto.

O terpeno maioritário nos licores de bagas de murta é o eucaliptol, composto com origem nas bagas. A aguardente enriquece o perfil com os ésteres, nomeadamente o octanoato de etilo e o decanoato de etilo, conferindo um aroma adicional frutado aos licores. No entanto o perfil dos compostos voláteis de licores recém preparados apresenta algumas diferenças. Dos 5 monoterpenos representativos dos licores de murta, o eucaliptol é o composto mais abundante (Tabela 3.25). Os outros terpenos incluem o α -pineno, o limoneno, o linalol, o acetato de mirtenilo e o mirtenol.

Os 11 licores comerciais estudados por Franco e colaboradores apresentam também o eucaliptol como composto maioritário e as concentrações variam entre 3,86 mg/L e 61,01 mg/L. Os extratos hidro-alcoólicos estudados por Tuberoso e colaboradores (2006) apresentaram diferenças significativas relativamente aos por nós preparados. Na maior parte dos extratos estudados por Franco e colaboradores (2006) o α -pineno é o

composto volátil dominante. O mirtenol apresenta teores abaixo do 0,3 mg/L (Franco *et al.* 2002).

Tabela 3.25 - Quantificação dos monoterpenos majoritários em licores de bagas de murta recém preparados com aguardente de figo dos produtores Coop-A e MSM.

Compostos (mg/L)	Licor 1 Coop – A*	Licor 2 MSM*	Licor 3 MSM**	Licor 4 MSM***
α -pineno	0,51 \pm 0,42	0,15 \pm 0,04	0,23 \pm 0,06	0,54 \pm 0,30
Limoneno	0,26 \pm 0,28	0,38 \pm 0,11	0,27 \pm 0,11	0,28 \pm 0,16
Eucaliptol	47,67 \pm 13,34	57,19 \pm 13,34	94,04 \pm 15,30	42,84 \pm 17,19
Linalol	3,16 \pm 0,86	3,75 \pm 1,19	2,10 \pm 0,96	1,78 \pm 1,65
Mirtenol	1,36 \pm 0,30	1,47 \pm 0,31	0,46 \pm 0,32	0,33 \pm 0,25

*Licores preparados com 200 g/L de bagas de murta

**Licores preparados com 200 g/L de bagas de murta mas colhidas três semanas antes

***Licores preparados com 100 g/L de bagas de murta colhidas três semanas antes

3.3 - Vinhos licorosos do Algarve

Os vinhos licorosos do Algarve são preparados utilizando uvas de várias castas e com períodos de estágio em recipientes de madeira de 2 a 10 anos. Embora muito apreciados são pouco conhecidos, mesmo pelos algarvios. No decorrer deste trabalho foram iniciados estudos com vinhos licorosos típicos da região. No entanto, a reestruturação das adegas locais e as várias dificuldades associadas não permitiram o desenvolvimento deste tópico tanto quanto desejado. É, no entanto, uma área com potencial no Algarve e deve ser explorada no futuro. São primeiro apresentados resultados de avaliação das características físicas de uvas de castas autorizadas na região, a Castelão, a Touriga Nacional, a Sória, a Aragonês, a Trincadeira, a Syrah ou Shyraz e a Cabernet Sauvignon. Segue-se a determinação do teor em antocianinas da casta Castelão, também conhecida por Periquita ou João de Santarém (Sun *et al.*, 2011; Neves *et al.*, 2010), e de alguns vinhos preparados com essa casta. Posteriormente é apresentado um método para quantificação do resveratrol por LC-MS e sua aplicação na quantificação deste composto em vários vinhos da região.

3.3.1 - Características dos bagos de uva de castas autorizadas na região do Algarve

No sentido de avaliar as características das uvas mais utilizadas na região demarcada Algarve para a produção de vinhos, foram feitos contatos com vários produtores. Todos os produtores manifestaram interesse na participação. Foi iniciada a colaboração com a Quinta Morgado da Torre (MT) de Portimão, Quinta dos Vales (QV) de Estômbar e Quinta dos Correias (QC) de Luz de Tavira.

As uvas foram colhidas na primeira semana de setembro de 2011, entre as 7 e as 8 h da manhã, de forma aleatória e em diferentes videiras e cachos em diferentes posições/orientações geográficas (Orts *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2001). As uvas foram transportadas para o laboratório a temperaturas entre os 4 e os 5 °C. A tabela 3.26 resume os resultados obtidos.

Tabela 3.26 - Características físico-químicas de uvas de diversas castas autorizadas no Algarve.

Amostras	Massa (g)	Diâmetro equatorial (mm)	pH	Brix	Densidade sumo (g/cm ³)
Castelão QV	3,2 ^α ± 0,6	16,9 ^α ± 1,3	3,64 ^α ± 0,04	24,3 ^α ± 0,3	1,102 ^α ± 0,004
Castelão QC	2,1 ^β ± 0,7	14,6 ^β ± 0,2	3,63 ^α ± 0,04	24,1 ^α ± 0,4	1,101 ^α ± 0,003
Trincadeira QC	2,5 ^γ ± 0,7	15,3 ^γ ± 0,5	3,51 ^γ ± 0,03	22,9 ^γ ± 0,3	1,099 ^γ ± 0,003
Trincadeira MT	2,4 ^γ ± 0,7	14,8 ^γ ± 0,6	3,50 ^γ ± 0,02	23,7 ^p ± 0,3	1,105 ^p ± 0,002
Síria QV	2,1 ^τ ± 0,9	14,0 ^τ ± 0,2	3,22 ^τ ± 0,04	21,3 ^τ ± 0,4	1,090 ^τ ± 0,006
Síria MT	2,1 ^τ ± 0,9	14,0 ^τ ± 0,2	3,23 ^τ ± 0,03	21,1 ^τ ± 0,4	1,089 ^τ ± 0,005
Aragonês QC	2,1 ± 0,5	14,6 ± 0,1	3,49 ± 0,03	22,5 ± 0,4	1,096 ± 0,004
Touriga QV	1,9 ± 0,4	13,7 ± 1,4	3,45 ± 0,02	22,5 ± 0,5	1,095 ± 0,005
Syrah MT	1,3 ± 0,4	11,8 ± 0,2	3,69 ± 0,02	26,0 ± 0,4	1,115 ± 0,003
Cabernet MT	1,7 ± 0,5	13,0 ± 0,2	3,29 ± 0,03	21,5 ± 0,4	1,092 ± 0,004

Os resultados da massa e do diâmetro são a média e o desvio padrão de 25 bagos. Os resultados dos restantes parâmetros são a média de três amostras. Em cada coluna, para a mesma casta, o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

Das castas estudadas, as uvas de menor dimensão são as da casta Syrah. É também esta a casta que apresenta maior teor em sólidos solúveis (grau Brix) e consequentemente maior densidade do sumo. Numa análise estatística da dimensão do conjunto de todas as bagas não há diferença significativa, mas comparando casta a casta, a Syrah apresenta diferenças em relação a todas as outras exceto a Touriga-Nacional e a Cabernet Sauvignon. As uvas da casta Castelão da Quinta dos Vales são as que apresentam maiores dimensões e são estatisticamente diferentes das das uvas da mesma casta colhidas na Quinta dos Correias. As amostras de uvas da casta trincadeira não apresentam diferenças significativas ao nível das dimensões, mas apresentam diferenças ao nível do pH, sólidos solúveis e densidade do sumo. As amostras da casta Síria, a única casta branca estudada, apresentam o pH mais baixo.

3.3.2 - Teor em polifenóis totais

Foi feito um estudo comparativo do teor em polifenóis totais da película e das grainhas de uvas tintas das castas Castelão e Trincadeira e de películas de uvas brancas da casta Síria. A extração dos compostos fenólicos foi feita em metanol com 25 bagos por 25 ml. Os resultados estão resumidos na tabela 3.27.

Tabela 3.27 - Polifenóis da película e das grainhas de várias castas, em mg/g de película desidratada e de grainha respetivamente.

Amostras	Película	Grainha
Castelão QV	25,7 ^α ± 0,8	48,8 ^γ ± 0,6
Castelão QC	30,8 ^β ± 0,9	50,6 ^κ ± 0,7
Trincadeira QV	19,8 ^ρ ± 0,8	43,7 ^υ ± 0,9
Trincadeira QC	21,3 ^ρ ± 0,9	44,8 ^ξ ± 0,6
Síria QV	7,5 ^ψ ± 0,5	-
Síria MT	9,1 ^ζ ± 0,7	-

Os resultados são a média e o desvio padrão de 3 amostras. Em cada coluna, para a mesma casta, o mesmo símbolo indica a não existência de diferença significativa com um nível de significância 95 % ($p < 0,05$).

Os teores em polifenóis reportados para diversas castas mediterrânicas, por grama de película, são em geral superiores aos encontrados, variando entre 71,8 e 196,7 mg/g de película desidratada, com extração em água, e entre 173,6 a 224,9 mg/g de película desidratada, quando a extração é feita com etanol a 70 % etanol (Ky & Tiessedre, 2015). Os mesmos autores determinaram também maiores teores em polifenóis totais nas grainhas (128 e 215 mg/g de massa seca em água e 195 a 215 mg/g de massa seca em 70 % de etanol). Noutro estudo com uvas de diversas castas da Galiza, Ortega-Regules e colaboradores (2006) também encontraram maiores teores em polifenóis nas películas, valores entre 73,3 e 106,6 mg/g de matéria seca. Estudos em uvas da casta Muscadine cultivadas na Flórida revelaram teores em polifenóis totais entre 13 e 30 mg/g de película seca (Sandhu & Gu, 2010), valores próximos dos encontrados para as castas do Algarve.

Foram também avaliados os teores em polifenóis totais de 3 vinhos licorosos, 4 vinhos tintos, um vinho branco e um vinho rosé, estes dois últimos preparados apenas com a casta Castelão. A tabela 3.28 resume os resultados obtidos.

Tabela 3.28 - Polifenóis totais em diversos vinhos licorosos e não licorosos da região do Algarve.

Amostras	Tipo de vinho	Polifenóis totais (mg/L)
Algar seco	Licoroso	955 ± 8
Muska doce	Licoroso	118 ± 3
Terras do Infante	Licoroso	206 ± 5
Lagoa 2007	Tinto	1549 ± 8
Terras da Luz 2010	Tinto	2278 ± 4
Tapada da Torre 2010	Tinto	2692 ± 12
Marquês dos Vales Selecta 2009	Tinto	818 ± 8
Marquês dos Vales Selecta 2010	Rosé	130 ± 5
Marquês dos Vales Selecta 2010	Branco	81 ± 5

Os resultados são a média e o desvio padrão de 3 amostras de cada vinho.

Os resultados indicam que o vinho branco apresenta o teor mais baixo em polifenóis totais, resultado esperado, já que na produção deste vinho se utiliza apenas o sumo da uva. O vinho licoroso Muska apresenta teor em polifenóis igualmente baixo. Neste caso a razão prende-se com a utilização de uvas brancas da casta Moscatel na sua preparação. Na Quinta do Lopes, em Lagos, o vinho Muska é preparado com uvas produzidas em agricultura biológica e os vinhos estagiados em madeira de carvalho, por um período mínimo de 2 anos. O vinho licoroso Terras do Infante, que após a união das adegas do Algarve se passou a designar Algarmoscatel, é igualmente preparado com uvas da casta Moscatel, mas permanece um período mínimo de 8 anos em casco de madeira de carvalho. Neste vinho o teor em polifenóis é aproximadamente o dobro do encontrado no vinho Muska. O Algar seco é o vinho licoroso estudado que apresenta maior teor em polifenóis totais. Este vinho é feito com uvas brancas da casta Síria, e é envelhecido em madeira de carvalho, seguindo um processo de envelhecimento dinâmico.

As amostras de vinho rosé analisadas também apresentam teores em polifenóis totais relativamente baixos, resultado da tecnologia própria de produção, com maceração pelicular pré-fermentativa apenas durante 2 a 4 horas. As amostras de vinho tinto da Quinta dos Vales apresentam o teor em polifenóis totais mais baixo. A maior dimensão das uvas da casta Castelão pode ser um dos fatores responsáveis por este resultado, embora este vinho não seja monocástico. Na sua produção são utilizadas também as castas

Aragonez, Syrah e Trincadeira. Os outros vinhos são preparados com castas diferentes. O vinho Tapada da Torre é feito com as castas Aragonez, Touriga-Nacional, Syrah e Cabernet-Sauvignon. O vinho tinto Lagoa é feito com as castas Trincadeira, Castelão e Negra-Mole. O vinho Terras da Luz é feito com Castelão e Touriga-Nacional. A tecnologia de preparação é também diferente. Na Quinta dos Vales as uvas para produção de vinho tinto, depois de esmagadas, sofrem um processo de maceração refrigerada nos primeiros 3 dias (fase pré-fermentativa), com o objetivo de potenciar a extração das antocianinas (De Santis & Frangipane, 2010; Gómez-Miguel & Herédia, 2004; Gómez-Plaza *et al.*, 2000). Só após esta fase é iniciada a fermentação turbulenta, na presença das películas e grainhas, por um período de 4 a 6 dias. Nas outras quintas, não é feita a maceração refrigerada, iniciando-se a fermentação logo após o esmagamento das uvas. As películas e as grainhas são mantidas durante os primeiros 8 a 15 dias de fermentação. Em todas as quintas cada casta é fermentada e maturada em separado e só no final se preparam os lotes de vinho com as misturas desejadas.

A comparação dos resultados obtidos para os polifenóis totais dos vinhos do Algarve com os polifenóis totais avaliados em 54 vinhos espanhóis (mínimo de 1194 mg/L até um máximo de 2523 mg/L) (Pérez-Trujillo *et al.*, 2011) e 11 vinhos da Croácia (mínimo de 1012 a um máximo de 3204 mg/L) (Šeruga *et al.*, 2011), mostra que os teores encontrados nos vinhos do Algarve se situam no intervalo dos teores encontrados para outros vinhos, com exceção do Marquês dos Vales, que apresenta um teor em polifenóis menor.

3.3.3 - Caracterização do perfil de antocianinas da casta Castelão

As amostras de uvas da casta Castelão, colhidas na primeira semana de setembro de 2011, e de vinhos brancos, rosé e tintos feitos com essa casta, foram disponibilizados pela empresa Quinta dos Vales, de Estômbar.

O perfil das antocianinas da película de uva da casta Castelão é dominado pela malvidina-3-O-glicósido. Outras antocianinas identificadas na película incluem a delphinidina-3-O-glicósido, a petunidina-3-O-glicósido, a peonidina-3-O-glicósido, a malvidina-3-O-acetilglicósido e a malvidina-3-O-coumaroilglicósido. A identificação foi feita com base nos traços de LC-MS, nos padrões de fragmentação (Tabela 3.29) e em resultados já publicados para estes compostos (Sun *et al.*, 2011; Kammerer *et al.*, 2004; Dallas & Laureano, 1994).

Tabela 3.29 - Ião típico e padrão de fragmentação das várias antocianinas identificadas nas películas de uvas da casta Castelão e nos vinhos com ela preparados.

Nº	Antocianina	M ⁺	Fragmentos e abundância (%)
1	Delfininida-3-O-glicósico	465	MS ² [465]: 303 (100)
2	Petunidina-3-O-glicósido	479	MS ² [479]: 317 (100)
3	Peonidina-3-O-glicósido	463	MS ² [301]: 433 (100)
4	Malvidina-3-O-glicósido	493	MS ² [493]: 331 (100)
5	Malvidina-3-O-acetilglicósido	535	MS ² [535]: 331 (100)
6	Malvidina-3-O-coumaroilglicósido	639	MS ² [639]: 331 (100)

O perfil de antocianinas obtido para o vinho rosé monocástico é praticamente equivalente ao das películas, sugerindo a eventual utilização do perfil das antocianinas como verificação da autenticidade de vinhos monocásticos da casta Castelão. O perfil das antocianinas tem sido sugerido como indicador de origem das variedades de uvas usadas na produção dos vinhos, embora seja necessário ter em conta a sua degradação (Gómez-Ariza *et al.*, 20006; Revilla *et al.*, 2001).

A quantificação das antocianinas foi feita a partir do traço de HPLC-DAD obtido a 520 nm, utilizando como padrão a malvidina-3-O-glicósido. A quantificação das outras antocianinas foi feita utilizando também este padrão. Foi assumido que todas as antocianinas apresentam o mesmo coeficiente de absorção a este comprimento de onda. A peonidina-3-O-glicósido aparece como um ombro da malvidina-3-O-glicósido (compostos **3** e **4** da Figura 3.24).

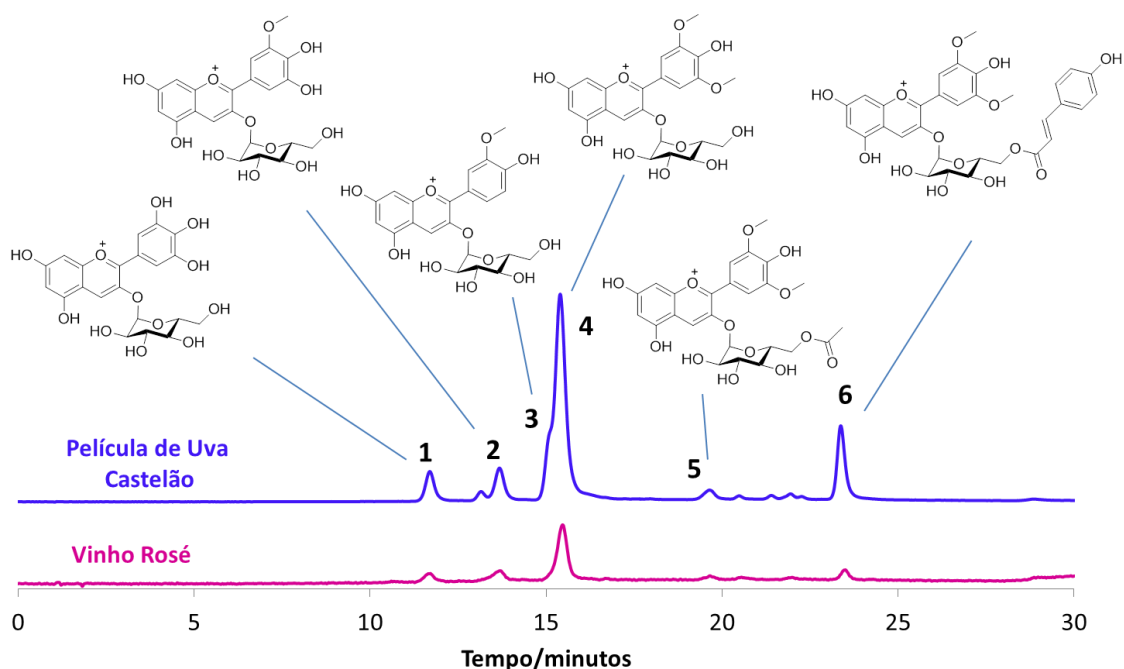


Figura 3.24 - Perfil de antocianinas obtido por HPLC-DAD a 520 nm de um extrato metanólico de películas de uvas da casta Castelhão e de um vinho rosé com elas preparado. Os *inserts* mostram a estrutura molecular das antocianinas identificadas. 1 - delphinidina-3-O-glicósido; 2 - petunidina-3-O-glicósido; 3 - peonidina-3-O-glicósido; 4 - malvidina-3-O-glicósido; 5 - malvidina-3-O-acetilglicósido; 6 - malvidina-3-O-coumaroilglicósido. Coluna polimérica PRP-1, Hamilton, tipo C18, de 15 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro, 5 μ m de diâmetro média de partícula, estabilizada 25 °C.

A quantificação destas duas antocianinas foi feita com base nos respectivos traços de LC-MS em modo de “single ion”, polaridade positiva, para os iões com m/z 463 e m/z 493, respetivamente. Os resultados foram comparados com os de uma curva de calibração obtida com a malvidina-3-O-glicósido por monitorização do ião com m/z 493. Neste caso também foi assumido um fator de resposta à ionização por ESI semelhante para as duas antocianinas. Esta aproximação é razoável atendendo a que as moléculas apresentam estrutura molecular semelhante e também carga positiva intrínseca, indicando esferas de hidratação semelhantes. As curvas de calibração foram preparadas com padrões de concentrações entre 0,5 mg/L e 50 mg/L. O limite de quantificação foi cerca de 0,5 mg/L no caso da deteção por LC-DAD, a 520 nm, e uma ordem de grandeza inferior com deteção por LC-MS. Os resultados da quantificação são apresentados na tabela 3.30.

Tabela 3.30 - Teores em antocianinas das películas da casta Castelão e do vinho rosé com elas preparado.

Antocianina	1	2	3	4	5	6
Películas (mg/g de película)	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,2	0,28 ± 0,03	1,1 ± 0,1	0,06 ± 0,01	0,32 ± 0,03
Vinho rosé (mg/L)	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,5 ± 0,05	7,2 ± 0,7	1,2 ± 0,1	12,7 ± 1,3

Os resultados são a média e o desvio padrão de 2 amostras

O teor em antocianinas no vinho rosé preparado com a casta Castelão do Algarve é inferior ao encontrado em vinhos tintos preparados com a casta Castelão no Instituto Superior de Agronomia de Lisboa (Dallas & Laureano, 1999), decorrente da própria tecnologia de preparação do vinho rosé. No vinho Rosé, a antocianina que apresenta valores mais próximos do dos vinhos tintos (16,3 mg/L) é malvidina-3-O-coumaroilglicósido (12,1 mg/L). Pelo contrário, a peonidina-3-O-glicósido e a malvidina-3-O-glicósido apresentam teores inferiores em cerca de 27 vezes.

Relativamente ao teor em antocianinas da película, no estudo já referido sobre várias castas da Região Mediterrânica (Ky & Teissedre, 2015), quer a extração seja feita com água quer com solução contendo 70 % de etanol, também é a malvidina-3-O-glicósido a antocianina que apresenta teores mais elevados em todas as castas estudadas, variando de 0,11 a 1,78 mg/g de película desidratada em solução aquosa, e de 6,76 a 14,82 mg/g de película desidratada em solução com 70 % de etanol. Os teores encontrados nas películas de uva da casta Castelão situam-se no intervalo dos resultados reportados nos extratos aquosos, embora tivessemos utilizado metanol. Relativamente ao teor total em antocianinas extraídas das películas de uvas da casta Castelão (2,1 mg/g de película desidratada), os valores encontrados são semelhantes aos obtidos por Ky & Teissedre (2015), que se situam entre 0,24 e 7,32 mg/g quando obtidos em solução aquosa e entre 18,0 e 22,3 mg/g quando obtidos com solução com 70 % de etanol. Num estudo realizado por Kammara e colaboradores (2004) para várias castas, utilizando metanol com 0,1 % de HCl, também se verificou que a antocianina com maior teor é a malvidina-3-O-glicósido, com teores que variam entre 1,1 e 50,98 mg/g de casca seca. Só num caso foi encontrado um teor semelhante ao determinado na casta Castelão estudada.

3.3.4 - Quantificação do resveratrol

O resveratrol, apresenta dois isômeros cis-resveratrol e o trans-resveratrol (Paulo *et al.*, 2011) e é um composto fenólico não flavonóide encontrado em várias espécies vegetais incluído a videira e seus frutos (Di Stefano, & Flamini; 2008). A produção destes compostos pelas plantas tem sido associada à resposta a diversos fatores externos de *stress*, como por exemplo o desenvolvimento de fungos como, a *Botrytis cinérea*, e a radiação ultravioleta (Sternbo, *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2006). Os fatores de produção também influenciam o teor em resveratrol. O aumento do teor destes compostos pode surgir devido ao aumento de temperatura, a níveis elevados de SO₂ e/ou a decréscimo do pH (Paulo *et al.*, 2011; Sternbo, *et al.*, 2007). São vários os estudos que indicam que este composto apresenta benefícios para a saúde, nomeadamente atividade anticancerígena, antioxidante, inibidora da agregação das plaquetas, anti-inflamatória e cardioprotetora (Sternbo *et al.*, 2007; Pignatelli, *et al.*, 2006; Aggarwal *et al.*, 2004). Na sequência destes potenciais benefícios, têm sido desenvolvidos vários trabalhos reportando métodos para a sua quantificação (Paulo, *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2006; Urpí-Sardà *et al.*, 2005). Estão também reportados vários estudos no sentido de induzir o aumento dos teores em resveratrol, nomeadamente utilizando radiação ultravioleta (Wang *et al.*, 2015; Cupri *et al.*, 2013; Guerrero *et al.*, 2010) e ultrassons (Hasan *et al.*, 2014; González-Barrio *et al.*, 2009).

Foi desenvolvido um método de quantificação deste composto na gama de concentrações normalmente encontrada nos vinhos e que permite também a quantificação em vinhos licorosos e outras bebidas. O método envolve a utilização do equipamento de LC-MS no modo de “Multi Reaction Monitoring” (MRM). Neste modo é isolado o m/z correspondente à molécula que se pretende quantificar, é fragmentado este ião e a quantificação é feita com base num ou mais fragmentos ou iões-filho. Podem ainda fazer-se fragmentações de ordem superior e quantificar com base nos fragmentos produzidos pela fragmentação dos iões-filho. No entanto, a perda de sinal associada a cada etapa de fragmentação, piora a razão sinal/ruído em grande parte dos casos. O desenvolvimento do método começou com a obtenção de um espectro de fragmentação de primeira ordem na polaridade em que o analito ioniza melhor. O resveratrol ioniza bem no modo negativo. A figura 3.25 apresenta o espectro de fragmentação obtido neste modo.

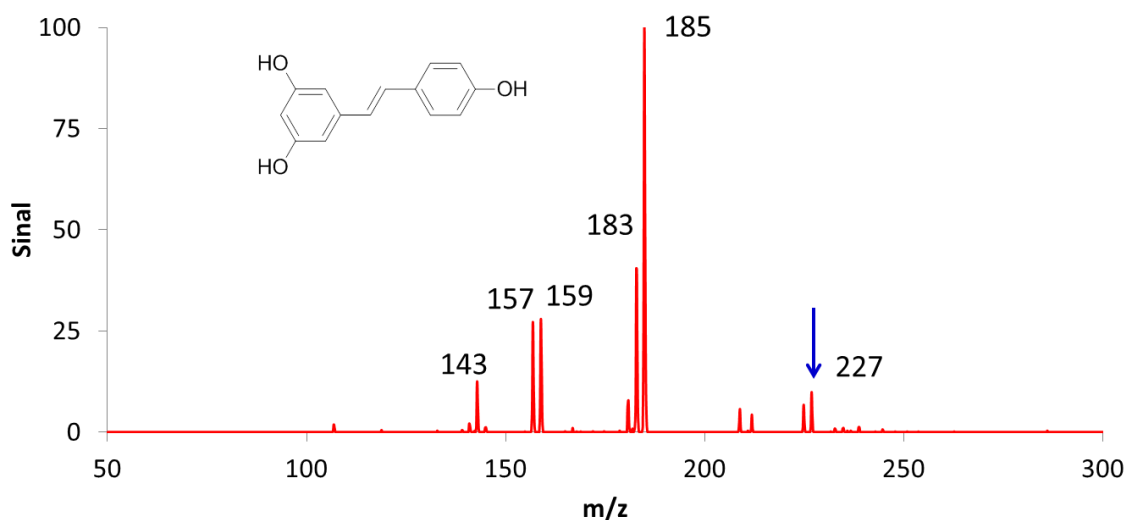


Figura 3.25 - Espectro de fragmentação do resveratrol no modo negativo. A seta indica o ião fragmentado, $[M-H]^-$. O *insert* mostra a estrutura molecular do resveratrol.

O espectro apresenta um pico base com m/z 185. A opção foi fazer a quantificação com base no sinal deste ião. Assim, depois de ser estabelecido o método cromatográfico para o resveratrol, foi escolhido o modo MRM e isolado o ião com m/z 227 ($\Delta m/z = 2$). Foi feita a fragmentação com energia suficiente para fragmentar todo o resveratrol e isolado o ião com m/z 185 ($\Delta m/z = 2$). A mesma transição foi utilizada para quantificar resveratrol e os seus metabolitos em amostras de origem biológica (Sun *et al.*, 2006). O limite de quantificação obtido (correspondente à razão sinal/ruído na proporção 10:1) foi de 0,02 mg/L, semelhante ao encontrado por outros autores em vinho utilizando LC-DAD (Paulo *et al.*, 2011) mas sem passo de concentração (20 vezes).

A tabela 3.31 resume os teores em trans-resveratrol encontrados em películas de uvas de várias castas e em vinhos do Algarve.

Tabela 3.31 - Teores em trans-resveratrol encontrados em películas de uva e vinhos do Algarve.

Produto	Unidade	Trans-resveratrol
Película Castelão QV	µg/g de casca seca	19,8 ± 1,9
Película Trincadeira QV	µg/g de casca seca	43,9 ± 4,2
Película Syrah QMT	µg/g de casca seca	8,6 ± 0,9
Película Cabernet QMT	µg/g de casca seca	26,8 ± 2,5
Película Touriga QC	µg/g de casca seca	14,0 ± 1,4
Aragonez QC	µg/g de casca seca	5,1 ± 0,5
Vinho tinto Lagoa 2007	mg/L	1,6 ± 0,2
Vinho tinto Terras da Luz 2010	mg/L	6,1 ± 0,5
Vinho tinto Tapada da Torre 2010	mg/L	0,8 ± 0,1
Vinho tinto Marques dos Vales 2009	mg/L	0,13 ± 0,02

Os resultados são a média e o desvio padrão de 2 amostras

Os teores em trans-resveratrol encontrados nas películas de uvas da casta Castelão por Sun e colaboradores (2006) (abaixo de 20 mg/kg de película) são semelhantes aos encontrados nas películas das uvas da mesma casta no Algarve (19,8 mg/kg). O mesmo trabalho reporta teores em resveratrol de películas de uvas da casta Syrah pelo menos duas vezes superiores (> 20 mg/kg) aos encontrado nas amostras da mesma casta com origem no Algarve.

No caso dos vinhos é o Terras da Luz que apresenta o teor mais elevado em resveratrol. Estudos realizados em mais de 100 vinhos portugueses indicaram teores em trans-resveratrol variando entre 0,6 g/L e 1,0 g/L (Ribeiro e Lima *et al.*, 1999). Em vinhos espanhóis o teor em trans-resveratrol varia entre 0,06 e 36,13 g/L (Feijó *et al.*, 2008).

4 - Conclusões

A produção de bebidas espirituosas no Algarve continua a ser uma atividade com elevado impacto socioeconómico. Além das bebidas produzidas tradicionalmente, a produção de novas bebidas é uma mais-valia para a valorização dos recursos biológicos existentes, particularmente os excedentários ou de fraca qualidade. Uma correta avaliação da qualidade dos recursos existentes, baseada no conhecimento detalhado das suas características físico-químicas, associada a metodologias de processamento otimizadas com base no conhecimento e a uma caracterização detalhada do produto final, potencia a qualidade e a rentabilidade. Foi esta a abordagem seguida neste trabalho: caracterização dos materiais de partida, avaliação do processamento e caracterização do produto final. A melhoria da qualidade das aguardentes de medronho é paradigmática. Nestas aguardentes foi o conhecimento adquirido do processamento, aliado ao resultado das análises de rotina, que mais contribuiu para a redução, quer dos teores em acetato de etilo, quer da acidez total, os dois problemas mais graves apresentados por estes destilados. Os produtores que há mais tempo procuram analisar as suas aguardentes, seguem agora as sugestões de melhoria indicadas e apresentam melhores resultados. Foi também a análise detalhada das aguardentes de medronho de várias origens que permitiu identificar e quantificar parâmetros que podem ser utilizados como marcadores geográficos. O cis-3-hexeno-1-ol apresenta teores cerca de 3 a 4 vezes mais elevados nas aguardentes de medronho da região de Coimbra do que nas da região do Algarve, apresentando por isso potencial para vir a ser considerado um marcador geográfico da aguardente de medronho.

A aguardente de batata-doce foi desenvolvida como resposta à solicitação de valorização das batatas-doces da variedade Lira que apresentavam calibres fora do fixado pela IGP. É um produto novo e muito aromático, de baixo teor em metanol, acetato de etilo e acidez, que deve continuar a ser estudado no sentido de tentar aumentar o rendimento alcoólico e reduzir o teor em álcoois superiores, sem alterar os aromas.

A aguardente de figo apresenta grandes melhorias de qualidade se for parcialmente desodorizada com carvão ativado. O processo pode ser realizado aquando da produção ou posteriormente e reduz significativamente o teor em compostos voláteis de peso molecular mais elevado, o cobre e a acidez total. No Algarve a aguardente de figo

é muitas vezes utilizada na produção de licores. Se for valorizada por este processo origina também licores de melhor qualidade.

Os produtos alimentares com base na romã são essencialmente não aromáticos. A utilização de aguardentes de frutos para produzir licores de romã origina bebidas aromáticas. Os licores de romã são bastante ricos em polifenóis. O teor destes compostos pode ser ainda aumentado adicionando o mesocarpo e membranas carpelares do fruto durante a maceração. O licor apresenta uma cor rosa bastante atrativa devida à presença de antocianinas. Estes compostos são mais estáveis nos licores devido à presença de álcool e açúcar. Passados dois anos as antocianinas são praticamente residuais sendo a cor final da bebida, amarelo, originada pelos elagitaninos que se mantêm estáveis. As romãs bravas conhecidas na região por “da mata”, e pouco apreciadas por apresentarem arilos mais pequenos e maior teor de casca, podem ter na produção de licor uma excelente aplicação.

As bagas de murta são material vegetal, em geral, não aproveitado na região. Ao contrário do que se passa na ilha da Sardenha, onde são exaustivamente utilizadas quer na produção de licores, quer para a indústria farmacêutica. No Algarve a produção de licores é feita pontualmente, mas tem grande potencial, porque estas bagas, ao contrário dos arilos de romã, além de conterem elevado teor em antocianinas, apresentam também elevado teor em eucaliptol e limoneno, que contribuem para um aroma duradouro dos licores. Licores de murta preparados com aguardente de figo parcialmente desodorizada constituem uma alternativa bastante interessante da melhoria dos recursos agrícolas e biológicos da região.

Os vinhos no Algarve têm grande tradição. No início do século XXI surgiu outro conceito de produção de vinhos, os vinhos de Quinta. Na classe das bebidas espirituosas os vinhos licorosos têm sido essencialmente produzidos pelas adegas do Algarve, que têm estado em fase de reestruturação, o que tornou difícil um estudo sistemático destes vinhos. As técnicas usadas na análise dos licores e dos produtos aromatizantes foram igualmente eficazes na análise de vinhos e de uvas. Das castas estudadas, a casta Trincadeira apresentou o maior teor em resveratrol. O perfil de antocianinas das películas das uvas da casta Castelão mostrou ter potencial para a determinação da autenticidade de vinhos preparados com esta casta. Em geral os vinhos licorosos estudados apresentam baixo teor

em polifenóis por serem preparados maioritariamente com castas brancas. Esta é uma área com bastante potencial para desenvolver no futuro.

Atualmente estão a ser desenvolvidos estudos no sentido da preparação de aguardentes de alfarroba e de framboesa de elevada qualidade. Irá ser seguida a mesma abordagem: valorização dos recursos biológicos da região, particularmente do material vegetal agrícola não aproveitado, para preparação de novas bebidas, processo apoiado em análises físico-químicas detalhadas.

5 – Bibliografia

- Aaby, K., Ekeberg, D. & Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria X ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 4395-4406.
- Ahmas, N. Zuo, Y., Lu, X., Anwar, F. & Hameed, S. (2016). Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants, *Food Chemistry*, **190**: 80-89.
- Ahmed, S.A., Chatterjee, A., Maity, B. & Seth, D. (2015). Supramolecular interaction of a cancer cell photosensitizer in the nanocavity of cucurbit[7]uril: a spectroscopic and calorimetric study, *International Journal of Pharmaceutics*, **492**: 103–108.
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S. & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research*, **24**: 2783–2840.
- Aina, A.J., Falade, K.O., Akingbala, J.O. & Titus, P., (2012). Physicochemical properties of Caribbean sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) starches, *Food and Bioprocess Technology*, **5**: 576-583.
- Alamanni, M.C. & Cossu, M. (2004). Radical scavenging activity and antioxidant activity of liquors of myrtle (*Myrtus communis* L.) berries and leaves, *Italian Journal of Food Science*, **2**:197-208.
- Alamprese, C. & Pompei, C. (2005). Influence of processing variables on some characteristics of nocino liqueur, *Food Chemistry*, **92**: 203-209.
- Alamprese, C., Pompei, C. & Scaramuzzi, F. (2005). Characterization and antioxidant activity of nocino liqueur, *Food Chemistry*, **90**: 495-502.
- Alañón, M.E., Rubio, H., Díaz-Maroto, M.C. & Pérez-Coello, M.S. (2010). Monosaccharide anhydrides, new markers of toasted oak wood used for ageing wines and distillates, *Food Chemistry*, **119**: 505-512.
- Alcarde, A.R., Souza, P.A. & Belluco, A.E.S. (2011). Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **31**: 355-360.
- Alighourchi, H. & Barzegar, M (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage, *Journal of Food Engineering*, **90**: 179–185.
- Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization, *European Food Research and Technology*, **227**: 881-887.
- Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P. & Nogueira, J.M.F. (2009). Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica, *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, **95**: 69-77.
- Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G. & Piskula, M.k. (2009). Influence of Postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods, *Molecular Nutrition and Food Research*, **53**: S151-S183.
- Anese, M. & Suman, M. (2013). Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food, *Food Research International*, **51**: 257-264.
- Andreia, V., Nadia, N., Teresa, R.M. & Andrea, A. (2003). Analysis of some italian lemon liquors (Limoncello), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 4978-4983.

- Anslyn, E. V. (2007). Supramolecular analytical chemistry, *The Journal of Organic Chemistry*, **72**: 687-699.
- Antón, M.J., Valles, B.S., Hevia, A.G. & Lobo, A.P. (2014). Aromatic Profile of Ciders by Chemical quantitative, Gas Chromatography-Olfactometry, and Sensory Analysis, *Journal of Food Science*, **79**: S92-S99.
- Antoniolli, A., Fontana, A.R. Piccoli, P. & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec, *Food Chemistry*, **178**: 172-178.
- Apostolopoulou, A.A., Flouros, A.I., Demertzis, P.G. Akrida-Demertzi, K. (2005). Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates, *Food Control*, **16**: 157-164.
- Araki, K. & Toma, H.E. (2002). Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos, *Química Nova*, **6**: 962-975.
- Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food, *Food Chemistry*, **135**: 1708-1717.
- Arrieta-Garay, Y., Blanco, P., López-Vázquez, C., Rodríguez-Bencamo, J.J., Pérez-Correa, J.R., Lopez F. & Orriols I. (2014a). Effects of distillation system and yeast strain on the aroma profile of albariño (*Vitis vinifera* L.) Grape Pomace Spirits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**: 10552-10560.
- Arrieta-Garay, Y., López-Vázquez, Blanco, P., Pérez-Correa, J.R., Orriols I. & Lopez F. (2014b). Kiwi spirits with stronger floral and fruity characters were obtained with a packed column distillation system, *Journal of the Institute of Brewing*, **120**: 111-118.
- Arrieta-Garay, Y., Perez-Correa, J.R., López-Vázquez, C., Orriols I. & López, F. (2013). Aromatically enhanced pear distillates from blanquilla and conference varieties using a packed column, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**: 4936-4942.
- Arrizon, J. & Gschaedler, A. (2007). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration, *Journal of Applied Microbiology*, **102**: 1123-1131.
- Arrizon, J., Calderón, C. & Sandoval, G. (2006). Effect of different fermentation conditions on the kinetic parameters and production of volatile compounds during the elaboration of prickly pear distilled beverages, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**: 921-928.
- Asqueri, E.R., Silva A.G.M. & Cândido, M.A. (2009). Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **29**: 896-904.
- Assaf, K.I. & Nau, W. M. (2015). Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis, *Royal Society of Chemistry*, **44**: 394-418.
- Aydin, C. & Özacan, M.M. (2007). Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, **79**: 453-458.
- Ayed, N., Vidal, J.P. & Cantagrel, R. (1992). Analyse des composés volatils d'une eau-de-vie de figue (*Ficus carica*) Tunisienne. In: 1^{er} Symposium Proceedings – Scientifique International de Cognac - Élaboration et Connaissance des Spiritueux, (edited by R. Cantagrel). Pp: 432-435, Paris, Tec & Doc.
- Balcerek, M., Pielech-Przybylska, K., Patelski, P., Sapiriska, E. & Ksiezopolska, M. (2013). The usefulness of intermediate products of plum processing for alcoholic fermentation and chemical composition of the obtained distillates, *Journal of Food Science*, **78**: S770-S776.
- Barboni, T., Venturini, N., Paolini, J., Desiobert, J-M., Chiaramonti, N. & Costa, J. (2010). Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic

- beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries, *Food Chemistry*, **122**: 1304–1312.
- Barham, P., Skibsted, L.H., Bredie, W.L.P., Frøst, M.B., Møller, P., Risbo, J., Snitkjær, P. & Mortensen, L.M. (2010). Molecular gastronomy: a new emerging scientific discipline, *Chemical Reviews*, **110**: 2313–2365.
- Barooah, N., Pemberton, B.C., Johnson, A.C. & Sivaguru, J. (2008). Photodimerization and complexation dynamics of coumarins in the presence of cucurbit[8]urils, *Photochemical & Photobiological Sciences*, **7**: 1473–1479.
- Barrow, S.J., Kasera, S., Rowland, M.J., Barrio, J.d. & Scherman, O.A. (2015). Cucurbituril-based molecular recognition, *Chemistry Reviews*, **115**: 12320 – 12406.
- Basílio, N., Cabrita, L & Pina, F. (2015). Mimicking positive and negative copigmentation effects in anthocyanin analogues by host-guest interaction with cucurbit[7]uril and β -cyclodextrins, *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry*, **63**: 7624–7629.
- Basílio, N., & Pina F. (2014). Flavylum network of chemical reactions in confined media: modulation of 3',4',7-trihydroxyflavilium reactions by host–guest interactions with cucurbit[7]uril, *ChemPhysChem*, **15**: 2295 – 2302.
- Batista, F.M.R., Follegatti-Romero, L.A. & Meirelles, A.J.A. (2013). A new distillation plant for neutral alcohol production, *Separation and Purification Technology*, **118**: 784–793.
- Batista, F.M.R., Follegatti-Romero, L.A. & Meirelles, A.J.A. (2013). A new distillation plant for neutral alcohol production, *Separation and Purification Technology*, **118**: 784–793.
- Baytekin, B., Baytekin, T & Schalley, C. A. (2006). Mass spectrometric studies of non-covalent compounds: why supramolecular chemistry in the gas phase? *Organic & Biomolecular Chemistry*, **4**: 2825–2841.
- Belleville, J. (2002). The French Paradox: Possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases, *Nutrition*, **18**: 173–177.
- Berlanga, T.M., Peinado, R., Millán, C., Mauricio, J.C. & Ortega, J.M. (2004). Influence of blending on the content of different compounds in the biological aging of sherry dry wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 2577–2578.
- Biernacka, P. & Wardencki, W. (2012). Volatile composition of raw spirits of diferente botanical origin, *Journal of the Institute of Brewing*, **118**: 393–400.
- Bindon, K., Varelas, C., Kennedy, J., Holt, H. & Herderich, M. (2013). Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 1. Grape and wine chemistry, *Food Chemistry*, **138**: 1696–1705.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino T. & Vasapollo, G. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skins extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide, *Separation and Purification Technology*, **64**: 192–197.
- Bodmer, S., Imark, C. & Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: Histamine and food processing, *Inflammation Research*, **48**: 296–300.
- Bojanowski, V. & Hummel, T. (2012). Retronasal perception of odors, *Physiology & Behavior*, **107**: 484–487.
- Borges, G.B.V., Gomes, F.C.O., Badotti, F., Silva, A.L.D. & Machado, A.M.R. (2014). Selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and accurate separation of distillate fractions reduce the ethyl carbamate levels in alembic cachaças, *Food Control*, **37**: 380–384.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W. & Crozier, A. (2010). Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 3901–3909.
- Bortoletto, A.M. & Alcarde, A.R. (2013). Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods, *Food Chemistry*, **139**: 695–701.

- Bovo, B., Carlot, M., Fontana, F., Lombardi, A., Soligo, S., Giacomini, A. & Corich, V. (2015). Outlining a selection procedure for *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape marc to improve fermentation process and distillate quality, *Food Microbiology*, **46**: 573-581.
- Bovo, B., Carlot, M., Lombardi, G., Lante, A., Giacomini, A., Corich, V. (2014). Exploring the use of *Saccharomyces cerevisiae* commercial strain and *Saccharomyces ludwigii* natural isolate for grape marc fermentation to improve sensory properties of spirits, *Food Microbiology*, **41**: 33-41.
- Bovo, B., Nardi, T., Fontana, F., Carlot, M., Giacomini, A. & Corish, V. (2012). Acidification of grape marc for alcoholic beverage production: Effects on indigenous microflora and aroma profile after distillation, *International Journal of Food Microbiology*, **152**: 100-106.
- Bovo, B., Andrichetto, C., Carlot, M., Corich, V., Lombardi, A. & Giacomini, A. (2009). Yeast population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of grappa, a traditional Italian alcoholic beverage, *International Journal of Food Microbiology*, **129**: 221-228.
- Bowles, E.J. (2000). The basic chemistry of aromatherapeutic essential oils, Sydney.
- Bravo L., (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Review*, **56**: 317-333.
- Brockgreitens, J. & Abbas, A. (2005). Responsive food packaging: Recent progress and technological prospects, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **15**: 3-15.
- Brown, L., Kroon P.A., Das, D.K., Das, S., Tosaki, A., Chan, V., Singer, M.V. & Feick, P. (2009). The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **33**: 1513-1523.
- Brown, G. (1996). L'art des alcools à travers le monde, Hachette Pratique, Paris.
- Budić-Leto, I., Gracin, L., Lovrić, T. & Vrhovsek, U. (2008). Effects of maceration conditions on the polyphenolic composition of red wine 'Plavac mali', *Vitis*, **47**: 245-250.
- Buendía, B., Gil, M.I., Tudela, J.A., Gady, A.L., Medina, J.J., Soria, C., López, J.M. & Tomás-Barberán, F.A. (2010). HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 3916-3926.
- Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M. & Terracciano, A. (2007). Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry*, **21**: 2955-2964.
- Cacho, J., Moncavo, L., Palma, J.C., Ferreira, V. & Culleré, L., (2013). The impact of grape variety on the aromatic chemical composition of non-aromatic peruvian pisco, *Food Research International*, **54**: 373-381.
- Cacho, J., Moncavo, L., Palma, J.C., Ferreira, V. & Culleré, L. (2012). Characterization of the aromatic profile of the Italia variety of Peruvian pisco by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometry detection systems, *Food Research International*, **49**: 117-125.
- Caldeira, I., Anjos, O., Portal, V., Belchior, A.P. & Canas, S. (2010). Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels, *Analytica Chimica Acta*, **660**: 43-52.
- Caldeira, I., Sousa, R.B., Belchior, A.P. & Clímaco, M.C. (2008). A sensory and chemical approach to the aroma of wooden aged Lourinhã wine brandy, *Ciências e Técnica Vitivinícola*, **23**: 97-110.

- Caldeira, I., Mateus, A.M. & Belchior, A.P. (2006). Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrel, *Analytica Chimica Acta*, **563**: 264-273.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sciences*, **74**: 2157-2184.
- Câmara, J.S., Marques, J.C., Perestrelo, R.M. & Rodrigues, F. (2007). Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings, *Journal of Chromatography A*, **1150**: 198–207.
- Campanha, R.B. & Franco, C.M.L. (2011). Gelatinization properties of native starches and their Nāegeli dextrans, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **106**: 799–804.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marqués, J.C. & Cacho, J. (2006). Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines, *Analytica Chimica Acta*, **563** :180-187.
- Cao, L., Šekutor, M., Zavalij, P.Y., Mlinarić-Majerski, K., Glaser, R. & Isaacs, L. (2014). Cucurbit[7]uril-guest pair with an attomolar dissociation constant, *Angewandte Chemie International*, **53**: 988 –993.
- Capobianco, M., Oliveira, E.S. & Cardeal, Z.L. (2013). Evaluation of methods used for the analysis of volatile organic compounds of sugarcane (Cachaça) and fruit spirits, *Food Analytical Methods*, **6**: 978 – 988.
- Cappiello, A. Famigliini, G., Palma, P., Pierini, E., Termopoli, V. & Trufelli, H. (2011). Direct-EI in LC-MS: Towards a universal detector for small-molecule applications, *Mass Spectrometry Reviews*, **30**: 1242-1255.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Szychowski, P.J., Vázquez, M.V., Hernández, F. & Wojdyło, A. (2015). Technological aspects as the main impact on quality of quince liquors, *Food Chemistry*, **167**: 387-395.
- Cardeal, Z.L. & Marriott, P.J. (2009). Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits, *Food Chemistry*, **112**: 747–755.
- Carvalho, G.G.P., Fernandes, F.E.P., Pires, A.J.V. (2006). Métodos de determinação dos teores de amido e pectina em alimentos para animais, *Revista Electrónica de Veterinária REDVET*, **1**: 1-12.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernandez, M.E., Rodríguez, J.A. & Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, **113**: 859-871.
- Castillo, M.L.R., Flores, G. & Herraiz, M. (2008). On-line RPLC–GC analysis of terpenes using polydimethylsiloxane as a packing material, *Food Chemistry*, **107**: 545–550.
- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. & Meireles, M.A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – An overview, *Food Research International*, **44**: 499-509.
- Ceballos-Magaña, S.G., Jurado, J.M., & Roberto Muñoz-Valencia, R., Alcázar, A., Pablos, F. & Martín, M.J. (2012). Geographical authentication of tequila according to its mineral content by means of support vector machines, *Food Analytical Methods*, **5**: 260 – 265.
- Cerezo, A.B., Tesfaye, W., Soria-Díaz, M.E., Torijo, M.J., Mateo, E., Carcia-Parrilla M.C. & Troncoso, A.M. (2010). Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing, *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**: 175-184.
- Chan, C-F., Chiang, C-M., Lai, Y-C, Huang, C-L., Kao, S-C. & Liao, W.C. (2014). Changes in sugar composition during baking and their effects on sensory attributes of baked sweet potatoes. *Journal of Food Science and Technology*, **51**: 4072-4077.

- Chao, S-H., Huang, H-Y., Kang, Y-H., Watanabe, K. & Tsai, Y-C. (2013). The diversity of lactic acid bacteria in a traditional Taiwanese millet alcoholic beverage during fermentation, *LWT - Food Science and Technology*, **51**: 135-142.
- Cheng, P., Fan, W. & Xu, Y. (2014). Determination of Chinese liquors from different geographic origins by combination of mass spectrometry and chemometric technique, *Food Control*, **35**: 153-158.
- Cheng, P., Fan, W & Xu, Y. (2013). Quality grade discrimination of chinese strong aroma type liquors using mass spectrometry and multivariate analysis, *Food Research International*, **54**: 1753–1760.
- Chen, Z., Schols, H.A. & Voragen, A.G.J. (2004). Differently sized granules from acetylated potato and sweet potato starches differ in the acetyl substitution pattern of their amylose populations, *Carbohydrate Polymers*, **56**: 219–226.
- Chernikova, E.YU., Fedorov, YU, V. & Fedorova, O.A. (2012). Cucurbituril as a new "host" of organic molecules in inclusion complexes, *Russian Chemical Bulletin*, **61**: 1363-1390.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in food are more complex than often thought, *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**: 223S-229S.
- Chiva-Blanch1, G., Arranz1, S., Lamuela-Raventos, R.M., & Estruch, R. (2013). Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies, *Alcohol and Alcoholism*, **48**: 270–277.
- Chung, W-S., Turro, N.J., Silver, J. & Noble, W.J. (1990). Modification of Face Selectivity by Inclusion in Cyclodextrins, *Journal of the American Chemical Society*, **112**, 1202-1205.
- Cizkova, H., Voldrich, M., Prokoratova, V. & Kvasnicka, F. (2004). Determination of egg yolk content in egg liqueurs, *Czech Journal of Food Sciences*, **22**: 9-15.
- Clifford, M.N. (2000). Miscellaneous phenols in foods and beverages – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1126-1137.
- Cole, R.B. (2000). Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, **35**: 763-772.
- Coldea, T.E., Socaciui, C., Tofană, M. Vékony, N. & Ranta, N. (2012), Impact of Distillation Process on the Major Volatile Compounds as Determined by GC-FID Analysis in Apple Brandy Originated from Transylvania, Romania, *Bulletin of University of Agricultural Science and Veterinary Medicine*, **69**: 228-235.
- Coldea, T.E.R., Socaciui, C., Pârv, M. & Vodnar, D. (2011). Gas-Chromatography analysis of major volatile compounds found in traditional fruit brandies from Transylvania, Romania, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **39**: 109-116.
- Conner, J.M.; Birkmyre, L., Paterson, A. & Piggott, J.R. (1998). Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**: 121-126.
- Contreras, U., Barbosa-García, O., Pichardo-Molina, J.L., Ramos-Ortíz, G., Maldonado, J.L., Meneses-Nava, M.A., Ornelas-Soto, N.E. & López-de-Alba, P.L. (2010). Screening method for identification of adulterate and fake tequilas by using UV–VIS spectroscopy and chemometrics, *Food Research International*, **43**: 2356–2362.
- Cortés, S., Rodríguez R., Salgado, J. M. & Domínguez, J.M. (2011). Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of major volatile compounds, *Food Control*, **22**: 673-680.
- Cortés, S., Salgado, J.M., Rodríguez, N. & Domínguez, J.M. (2010). The storage of grape marc: Limiting factor in the quality of the distillate, *Food Control*, **21**:1545-1549.
- Cortés, S., Gil, M.L. & Fernandez, E. (2009). Chemical affinities between the major volatile compounds present in a grape pomace distillate, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**: 1221-1226.

- Cortés, S., Gil, M.L. & Fernández, E. (2005). Volatile composition of traditional and industrial orujo spirits, *Food Control*, **12**: 383-388.
- Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A. & Pieters, L. (2008). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) Infection – An update (1998-2007), *Planta Medica*, **74**: 1323-1337.
- Crozier, A., Rio, D.D. & Clifford M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds, *Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 446-467.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. & Clifford M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Natural Product Reports*, **26**: 1001-1043.
- Crupi, P., Pichierri, A., Basile, T. & Antonacci, D. (2013). Postharvest stilbenes and flavonoids enrichment of table grape cv Redglobe (*Vitis vinifera* L.) as affected by interactive UV-C exposure and storage conditions, *Food Chemistry*, **141**: 802–808.
- Crupi, M.L., Costa, R., Dugo, P., Dugo, G. & Mondello, L. (2007). A comprehensive study on the chemical composition and aromatic characteristics of lemon liquor, *Food Chemistry*, **105**: 771-783.
- Cui, L., Liu, C-Q & Li, D-J. (2010). Changes in volatile compounds of sweet potato tips during fermentation, *Agricultural Sciences in China*, **9**: 1689-1695.
- D' Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, **43**: 348-361.
- Dafny-Yalin, M., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Kerem, Z., Holland, D. & Amir, R. (2010). Color, sugars and organic acids composition in aril juices and peel homogenates prepared from different pomegranate accessions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 4342-4352.
- Dallas, C. & Laureano, O. (1994). Effect of SO₂ on the extraction of individual anthocyanins and colored matter of three Portuguese grape varieties during winemaking. *Vitis*, **33**: 41-47.
- Da Porto, C. Decorti, D. & Tubaro, F. (2011). Evaluation of volatile compounds and antioxidant capacity of some commercial rums from Dominican republic, *International Journal of Food Science & Technology*, **46**: 988-993.
- Da Porto, C., Natolino, A. & De Corti, D. (2010). Batch distillation of grappa: effect of the recycling operation, *International Journal of Food Science & Technology*, **45**: 271-277.
- Da Porto C. & Decorti, D. (2008). Effect of cooling conditions on separation of volatile compounds in grappa using tray packed columns without reflux, *International Journal of Food Science and Technology*, **43**: 638-643.
- Da Porto, C., Pizzale, L., Bravin, M. & Conte, L.S. (2003). Analyses of orange spirit flavour by direct-injection gas chromatography–mass spectrometry and headspace solid-phase microextraction/GC–MC, *Flavour and Fragrance Journal*, **18**: 66–72.
- Da Porto, C. (2002). Volatile composition of 'grappa low wines' using different methods and conditions of storage on an industrial scale, *International Journal of Food Science and Technology*, **37**: 395-402.
- Da Silva, J.P., Choudhury, R., Porel, M., Pischel, U. Jockusch, S., Hubbard, P.C., Ramamurthy V. & Canário, A.V.M. (2014). Synthetic versus Natural Receptors: Supramolecular Control of Chemical Sensing in Fish, *ACS Chemical Biology*, **9**: 1432-1443.
- Davies, A.J. & Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**: 716-720.
- Davis, R.A., Hofmann, A., Osman, A., Hall, R.A., Mühlischlegel, F.A., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T. & Poulsen, S-A. (2011). Natural product-based phenols as novel probes

- for mycobacterial and fungal carbonic anhydrases, *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**: 1682-1692.
- Decreto-Lei nº 238/2000 de 26 de setembro, Diário da República I série A, Imprensa Nacional, **223**: 5145-5147.
- Decreto-Lei nº 257/1987 de 25 de junho, Diário da República I série, Imprensa Nacional, **143**: 2428-2429.
- Decreto-Lei nº 560/1999 de 18 de dezembro, Diário da República I série, Imprensa Nacional, **293**: 9049-9058.
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Rosa, A.P.B. & Blaschek, H.P. (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology, *Chemical Engineering and Processing*, **47**: 76-82.
- Delgado, R., Durán, E., Castro, R. Natera, R. & Barroso, C.G. (2010). Development of a stir bar sorptive extraction method coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds in Sherry brandy, *Analytica Chimica Acta*, **672**: 130–136.
- Demets, G. J-F. (2007). Cucurbiturilas, *Química Nova*, **30**: 1313-1322.
- Demyttenaere, J.C.R., Martínez, J.I.S., Verhé, R., Sandra, P. & Kimpe, N. (2003). A nalysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction, *Journal of Chromatography A*, **985**: 221–232.
- De Rosso, M. & Cancian, D. (2009). Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols, *Wood Science and Technology*, **43**: 375-385.
- De Santis, D. & Frangipane, M.T. (2010). Effect of prefermentative cold maceration on the aroma and phenolic profiles of a Merlot red wine. *Italian Journal of Food Science*, **22**: 47-53.
- Diaz, J.T., Chinn, M.S. & Truong, V-D. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweetpotatoes for ethanol production and anthocyanins extraction. *Industrial Crops and Products*, **62**: 53-60.
- Dickschat, J.S. (2014). Capturing volatile natural products by mass spectrometry, *Natural Products Reports*, **31**: 838-861.
- Dietler, M. (2006). Alcohol: anthropological/archaeological perspectives, *Annual Review of Antropology*, **35**: 229-249.
- Diretiva 2008/84/CE de 27 de agosto de 2008, *Jornal Oficial da União Europeia*, **L 235**:1-175.
- Diretiva nº 92/1983 (CEE) de 19 de outubro de 1992, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, **L 316**: 0021-0027.
- Di Stefano, R. & Flamini, R. (2008). High performance liquid chromatography analysis of grape and wine polyphenols. In: Hyphenated techniques in grape and wine chemistry, Flamini R. (Editor), John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England.
- Dornas, W.C., Oliveira, T.T., Rodrigues-das-Dores, R.G., Santos, A.F. & Nagem, T.J. (2007). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo, *Revista de Ciencias Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **28**: 241-249.
- Douglall, D.K. & Baker, D.C. (2008). Effects of reaction mixture and other components on the determination of the equilibrium and rate constants of the hydration reactions of anthocyanins, *Food Chemistry*, **107**: 473-482.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M. & Teixeira, J.A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation, *Food Chemistry*, **112**: 929-935.

- Du, H., Fan, W. & Xu, Y., (2011). Characterization of geosmin as source of earthy odor in different aroma type chinese liquors, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 8331–8337.
- Duarte, W.F., Amorin, J.C., Lago, L.A., Dias, D.R. & Schwan, R. F. (2011). Optimization of fermentation conditions for production of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) spirit using the response surface methodology, *Journal of Food Science*, **76**: C782-C790.
- Duvernay, W.H., Chinn, M.S. & Yencho, G.C. (2013). Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol, *Industrial Crops and Products*, **42**: 527-537.
- Drynan, J.W., Clifford, M.N., Obuchowicz, J., & Kuhnert, N. (2010). The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols, *Natural Products Reports*, **27**: 417-462.
- Ebeler, S.E., Terrien, M.B. & Butzke, C.E. (2000). Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 625-630.
- Eiro, M.J. & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 7461-7466.
- Erdman, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. & Burrowes, J. (2007). Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, *Journal of Nutrition*, **137**: 7185-7375.
- Erim, F.B. (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples, *Trends in Analytical Chemistry*, **52**: 239–247.
- Escarpa, A. & Gonzalez, C., (2001a). An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in food, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **31**: 57-139.
- Escarpa, A. & Gonzalez, C., (2001b). Total extractable phenolic chromatographic index: an overview of the phenolic: class contents from different sources of foods, *European Food Research and Technology*, **212**: 439-444.
- Esteban-Decloux, M., Deterre, S., Kadir, S., Giampaoli, P., Albet, J., Joulia, X. & Baudouin, O. (2014). Two industrial examples of coupling experiments and simulations for increasing quality and yield of distilled beverages, *Food and Bioproducts Processing*, **92**: 343-354.
- Estevan, M.A., Villanueval, M.J., Lissarrague, J.R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**: 409-420.
- Fadda, A. & Mulas, M. (2010) Chemical changes during myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit development and ripening, *Scientia Horticulturae*, **125**: 477-485.
- Fan, W., Xu, Y. & Han, Y. (2011). Quantification of volatile compounds in chinese ciders by stir bar sorptive extraction (SBSE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS), *Journal of the Institute of Brewing*, **117**: 61-66.
- Fan, G., Lu, W., Yao, X., Zhang, Y, Wang, K. & Pan, S. (2009). Effect of fermentation on free and bound volatile compounds of orange juice, *Flavour and Fragrance Journal*, **24**: 219-225.
- Fan, W. & Qian, M.C. (2006a). Identification of aroma compounds in Chinese ‘Yanghe Daqu’ liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry, *Flavour and Fragrance Journal*, **21**: 333-342.
- Fan, W. & Qian, M.C. (2006b). Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” liquors by aroma extract dilution analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 2695-2704.

- Fan, Y. & Dearden, D.V. (2011). Gas phase cucurbit[n]uril chemistry, *Israel Journal of Chemistry*, **51**: 551-558.
- Ferreira, V., López, R. & Cacho, J.F. (2000). Quantitative determination of the odorants of Young red wines from different grape varieties, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1659-1667.
- Fiches, G., Deleris, I., Saint-Eve, A., Passot, S., Brunerie, P. & Souchon, I. (2014). Influence of the nonvolatile fraction on the sensory perception of 40 % (V/V) ethanol-containing french grape brandies, *Journal of Sensory Studies*, **29**: 56-63.
- Fischer, U.A., Carle, R. & Kammerer, D.R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ, *Food Chemistry*, **127**: 807-821.
- Filippetti, I., Movahed, N., Allegro, G., Valentini, G., Pastore, C., Colucci, E & Intrieri, C. (2015). Effect of post-veraison source limitation on the accumulation of sugar, anthocyanins and seed tannins in *Vitis vinifera* cv. Sangiovese berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **21**: 90–100.
- Fitzgerald, G., James, K.J., MacNamara, K. & Stack, M.A. (2000). Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **896**: 351-359.
- Flamini, R. & Traldi, P. (2010). Mass Spectrometry in grape and wine chemistry, Wiley, New Jersey.
- Flamini, R., Vedova, A.D., Cancian, D., Panighel, A. & De Rosso, M. (2007). GC/MS-positive ion chemical ionization and MS/MS study of volatile benzene compounds in five different woods used in barrel making, *Journal of Mass Spectrometry*, **42**: 641-646.
- Flamini, R. (2005). Some advances in the knowledge of grape, wine and distillates chemistry as achieves by mass spectrometry, *Journal of mass spectrometry*, **40**: 705-713.
- Flamini, R. (2003). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols, *Mass spectrometry reviews*, **22**: 218-250.
- Flick, T.G., Leib, R.D. & Williams, E. R. (2010). Direct standard-free quantification of Tamiflu and other pharmaceutical tablets using clustering agents with electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **82**: 1179-1182.
- Flick, T.G., Leib, R.D. & Williams, E. R. (2009). Standard-free quantitation of mixtures using clusters formed by electrospray mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **81**: 8434-8440.
- Fotakis, C., Christodouleas, D., Kokkotou, K., Zervou, M., Zoumpoulakis, P., Moulos, P., Liouni, M. & Calokerinos, A. (2013). NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits, *Food Chemistry*, **138**: 1837-1846.
- Franco, A.A., Versini, G., Mattivi, F., Dalla Serra, A., Vacca, V. & Manca, G., (2002). Analytical characterisation of Myrtle berries, partially processed products and commercially available liqueurs, *Journal of commodity science*, **41**: 143-267
- Frankel, E.N., German, J.B., Kinsella, J.E., Parks, E. & Kanner, J. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *The Lancet*, **341**: 454-457.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M.P.M. (2006). New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols, *Medicinal Research Reviews*, **26**: 747-766.
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine microbiology: Practical applications and procedures*. New York: Springer.
- Gabelica, V. & De Pauw, E. (2005). Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources, *Mass Spectrometry Reviews*, **24**: 566-587.
- Gago, S., Basílio, N., Fernandes, A., Freitas, V., Quintas, A. & Pina, F. (2014). Photochromism of the complex between 4'-(2-hydroxyethoxy)-7- hydroxyflavylium

- and β -cyclodextrin, studied by ^1H NMR, UV-Vis, continuous irradiation and circular dichroism, *Dyes and Pigments*, **110**: 106-112.
- Galego, L.R. (2013). Produção e análise de aguardente de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.), Lição apresentada para prestação de provas públicas de competências pedagógicas e técnico-científicas, 4 de Março de 2013, Universidade do Algarve.
- Galego L.R., Jockusch S. & Da Silva J.P., (2013). Polyphenol and volatile profiles of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit extracts and liquors, *International Journal of Food Science & Technology*, **48**: 693-700.
- Galego, L.R., Estevinho, L.M. & Da Silva, J.P. (2012). Pomegranate liquor preparation and analysis. In: Proceedings International Conference on Food Safety, Quality and Nutrition Greening The Food Industry (edited by B.K. Tiwari and C. Smith), Pp 38-42, Manchester.
- Galego, L.R., Da Silva, J.P., Almeida, V.R., Bronze, M.R. & Boas, L.V. (2011). Preparation of novel distinct highly aromatic liquors using fruit distillates, *International Journal of Food Science & Technology*, **46**: 67-73.
- Galego, L.R. & Almeida V.R. (2007). Aguardentes de frutos e licores do Algarve História, técnicas de produção e legislação, Edições Colibri, Lisboa. (ISBN 987-972-772-722-3).
- Galego, L.R., Bento F., Almeida V.R, Teixeira, A.J.M. & Jesus, J.P. (2001). Início do estudo do envelhecimento da aguardente de medronho, *Tecnovisão*, **11**: 44-46.
- Galego, L.R., Bento, F., Almeida, V.R., Martins, A.N., Jesus J.P., Vilas Boas, L., (1998). Variação do teor em cobre ao longo de uma destilação experimental para obtenção de aguardente de medronho, Atas do XII encontro Luso-Galego de Química, Porto, Pp. 5.02.
- Galego, L.R. (1995). Otimização de parâmetros para a produção de aguardente de medronho, dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Alimentar/Qualidade.
- Galego, L.R., Martins, M.A.N., Almeida, V.R., Versini, G. (1995). Valorization of Arbutus Destillate, Atas do Euro Food Chem VIII, Austria, Pp. 341-344.
- Gslipo, R.C., Canhoto, A.J., WLL, M.D. & Morgan, S.L. (1999). Analysis of volatile fragrance and flavour compounds by headspace solid-phase microextraction and GC-MS, *Journal of Chemical Education*, **76**: 245-248.
- Gao, W., Fan, W. & Xu, Y. (2014). Characterization of the key odorants in light aroma type chinese liquor by gas chromatography olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**: 5796-5804.
- García-Beneytez, E., Cabello, F.& Revilla E. (2003). Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **51**: 5622-5629.
- García-Llobodanin, L., Ferrando, M., Güell, C. & López F. (2010). Influence of the fermentation pH on the final quality of Blanquilla pear spirits, *International Journal of Food Science & Technology*, **45**: 839-848.
- García-Llobodanin, L., Senn, T., Ferrando, M., Güell, C. & López F. (2008). Pear distillates: influence of the raw material used on final quality, *European Food Research and Technology*, **228**: 75-82.
- García-Llobodanin, L., Achaerandio, I., Ferrando. M., Güell, C., & López, F. (2007). Pear distillates from pear juice concentrate: effect of lees in the aromatic composition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 3462-3468.
- García-Martín, S., Herrero, C., Peña, R.M. & Barciela, J. (2010). Solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) determination of volatile compounds in orujo spirits: multivariate chemometric characterization, *Food Chemistry*, **118**: 456-461.

- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compounds-Extraction systems for fruit and vegetable samples, *Molecules*, **15**: 8813-8826.
- Gaziano, J.M. & Manson, J.E. (1996). Diet and heart disease. The role of fat, alcohol, and antioxidants, *Cardiology Clinics*, **14**: 69-83.
- Geil C.R., Hayes, D.M., McClain, J.A., Liput, D.J., Marshall, S.A. Chen, K.Y. & Nixon, K. (2014). Alcohol and adult hippocampal neurogenesis: Promiscuous drug, wanton effects, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **54**: 103–113.
- Genovese, A., Piombino, P., Gambuti, A. & Moio, L. (2009). Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations, *Food Chemistry*, **114**: 100-107.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M. & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 4581-4589.
- Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T. & Lourenzo, F. (2006). Anthocyanins profile as fingerprint of wines using atmospheric pressure photoionisation coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **570**: 101–108.
- Gómez-Míguez, M. & Heredia, F.J. (2004). Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 5117-5117.
- Gómez-Plaza, E. Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M. & Martínez, A., (2000). Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 736-741.
- González-Álvarez, M.J., Carmona, T, Evrem, D., & Mendicuti, F. (2014). Binding of a neutral guest to cucurbiturils: photophysics, thermodynamics and molecular modelling, *Supramolecular Chemistry*, **26**: 5-6.
- González-Barrio, R., Vidal-Guevara, M.L., Tomás-Barberán, F.A. & Espín, J.C. (2009). Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**: 374–382.
- González, E.A., Agrasar, A.T., Castro, L.M.P., Fernández, I.O. & Guerra, N.P. (2011). Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus ideaus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo*, L.) and characterization of their distillates, *Food Research International*, **44**: 1419-1426.
- González, E.A., Agrasar, A.T., Castro, L.M.P., Fernández, I.O. & Guerra, N.P. (2010). Production and Characterization of Distilled Alcoholic Beverages Obtained by Solid-State Fermentation of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) and Black Currant (*Ribes nigrum* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 2529–2535.
- Goldberg, D.M. & Soleas, G.J. (2011). Wine and health: A paradigm for Alcohol and Antioxidants, *Journal Medical Biochemistry*, **30**:93-102.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. & Hermosin-Gutiérrez, I. (2007) HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence, *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**: 618-626.
- Goulas, V. & Manganaris, G.A. (2012). Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus, *Food Chemistry*, **131**: 39-47.
- Granato, D., Oliveira C.C., Caruso, M.S.F., Nagato, L.A.F. & Alaburda, J. (2014). Feasibility of different chemometric techniques to differentiate commercial brazilian sugarcane spirits based on chemical markers, *Food Research Interntationa*, **60**: 212-217.
- Gresele, P., Cerletti, C., Guglielmini, G., Pignatelli, P., Gaetano, G. & Violi, F. (2011). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **22**: 201-211.

- Grønbæk, M. (2004). Epidemiologic evidence for the cardioprotective effective effects associates with consumption of alcoholic beverages, *Pathophysiology*, **10**: 83-92.
- Grosch, W. (2001). Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission, *Chemical Senses*, **26**: 533-545.
- Gross, J.H. (2004). Mass Spectrometry, Springer, New York.
- Guebailia, H.A., Chira, K., Richard, T., Mabrouk, T., Furiga, A., Vitrac, X., Monti, J-P, Delaunay, J-C & Mérillon, J-M. (2006). Hopeaphenol: the first resveratrol tetramer in wines from North Africa, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 9559-9564.
- Guerrero, E.D., Bastante, M.J.C., Mejías, R.C., Martín, R.N. & Barroso, C.G. (2011) Characterization and differentiation of sherry brandies using their aromatic profile, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 2410-2415.
- Guerrero, R.F., Puertas, B., Fernández, M.I., Paima, M. & Cantos-Villar, E. (2010). Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparision of different subspecies of Vitis, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**: 231–238.
- Guide Pratique D'Alcoométrie, (2002). OUDIN Press, Poitiers, França.
- Guo, Y-Y., Yang, Y-P., Peng, Q. & Han, Y. (2015). Biogenic amines in wine: a review, *International Journal of Food Science and Technology*, **50**: 1523–1532.
- Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 3027-3032.
- Gutiérrez, L., Zapata, A., Coll, L & Díez, C. (1995). Analytical study of the mineral and sugar fractions of peach liqueurs, *Food Chemistry*, **54**: 113-117.
- Guyot, S., Marnet, N. & Drilleau, J. (2001). Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 14-20.
- Hager, J.W. (2004). Recent trends in mass spectrometer development, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**: 845-850.
- Häkkinen, S. & Auriola, S., (1998). High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries, *Journal of Chromatography A*, **829**: 91-100.
- Hampel, D., Robinson, A.L., Johnson, A.J. & Ebeler, S.E. (2014). Direct hydrolysis and analysis of glycosidically bound aroma compounds in grapes and wines: comparison of hydrolysis conditions and sample preparation methods, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **20**: 361–377.
- Hang, Y.D. & Woodams, E.E. (2010). Influence of apple cultivar and juice pasteurization on hard cider and eau-de-vie methanol content, *Bioresource Technology*, **101**: 1396–1398.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids, *Natural Product Reports*, **18**: 310-333.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., (2000). Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **55**: 481-504.
- Harnly, J.M., Bhagwat, S. & Lin L-Z. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**: 47-61.
- Harris, D., Mckinnon, S., Boyd, R.K. (1979). Origins of the base peak in the electron-impact spectrum of limonene, *Organic Mass Spectrometry*, **14**: 265-272.
- Harris, D., Mckinnon, S., Boyd, R.K. (1979). Origins of the base peak in the electron-impact spectrum of limonene, *Organic Mass Spectrometry*, **14**: 265-272.
- Harrison, B.M. & Priest, F.G. (2009). Composition of peats used in the preparation of malt for scotch whisky production – influence of geographical source and extraction depth, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 2385-2391.

- Hasan, M.M., Yun, H-K., Kwak, E-J. & Baek, K-H. (2014). Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits, *Ultrasonics Sonochemistry*, **21**: 729–734.
- Haslam, E. (2007). Vegetable tannins - Lessons of phytochemical lifetime, *Phytochemistry*, **68**: 2713-2720.
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, H., Liu, J. & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review *Journal of the Institute of Brewing*, **120**: 157-163.
- Heffernan, S.P., Kelly, A.L. & Mulvihill, D.M. (2009). High-pressure-homogenised cream liqueurs: Emulsification and stabilization efficiency, *Journal of Food Engineering*, **95**: 525-531.
- Hernández-Gómez, L.F., Úbeda, J. Arévalo-Villena, M. & Briones, A. (2009). Novel alcoholic beverages: production of spirits and liqueurs using maceration of melon fruits in melon distillates, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**: 1018-1022.
- Hernández-Gómez, L.F., Úbeda, J. & Briones, A. (2008). Characterisation of wines and distilled spirits from melon (*Cucumis melo* L.), *International Journal of Food Science Technology*, **43**: 644-650.
- Hernández-Gómez, L.F., Úbeda-Iranzo, J., García-Romero, E. & Briones-Pérez, A. (2005). Comparative production of different melon distillates: Chemical and sensorial analyses, *Food Chemistry*, **90**: 115-125.
- Hernández-Gómez, L.F., Úbeda J & Briones, A. (2003) Melon fruit distillates: comparison of different distillation methods, *Food Chemistry*, **82**: 539-543.
- Herve, E., Pricw, S., & Burns, G., (2003). Eucalyptol in wines showing a “Eucalyptus” aroma, ETS Laboratories, USA (<http://www.etslabs.com/assets/Eucalyptol%20Poster%20Herve%202003.pdf>, accessed 1/3/2015).
- Hillarya, R.A. & Pegg, A.E. (2003). Decarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1647**: 162-166.
- Hollman, P.C.H. (2001). Evidence for health benefits of plants phenols: local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**: 842-852.
- Hossain, M.B., Rai, K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B. & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 10576-10581.
- Hu, N., Wu, D., Cross, K., Burikov, S., Dolenko, T., Patsaeva, S. & Shaefer, D.W. (2010). Dstructurability: A collective measure of the structural differences in vodkas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 7394-7401.
- Hu, W., Jiang, A., Jin, L., Liu, C., Tian, M. & Wang, Y. (2011). Effect of heat treatment on quality, thermal and pasting properties of sweet potato starch during yearlong storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**: 1499–1504.
- Huang, W-Y., Cai, Y-Z., Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, **62**: 1-20.
- Huber, L.S., Hoffmann-Ribani, R., Rodriguez-Amaya, D.B., (2009). Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones, *Food Chemistry*, **113**: 1278-1282.
- Huber, G.M. & Rupasinghe, H.P. (2009). Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts, *Journal of Food Science*, **74**: C693-700.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, **126**: 1821-1835.

- Jacobson, J.L., (2006). *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*, New York, Springer.
- Jaiswal, V., DerMarderosian, A. & Porter, J.R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.), *Food Chemistry*, **118**: 11-16.
- Jakopic, J., Colaric, M., Veberic, R., Hudina, M., Solar, A. & Stampar, F. (2007). How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur? *Food Chemistry*, **104**: 100-105.
- Jelén, H.H., Majcher, M. & Dziadas, M., (2012). Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review, *Analytica Chimica Acta*, **738**: 13-26.
- Jelén, H.H., Ziolkowska, A. & Kaczmarek, A. (2010). Identification of the botanical origin of raw spirits produced from rye, potato, and corn based on volatile compounds analysis using a SPME-MS method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 12585–12591.
- Jelén, H.H. (2006). Solid-phase microextraction in the analysis of food taints and off-flavors, *Journal of Chromatographic Science*, **44**: 399-415.
- Jerkovic, V., Bröhan, M., Monnart, E., Nguyen, F., Nizer, S. & Collin, S., (2010). Stilbenic profile of cocoa liquors from different origins determined by RP-HPLC-APCI (+)-MS/SM detection of a new resveratrol hexoside, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 7067-7074.
- Jin, Y., YU, C., Denman, R. & Zhang, W. (2013). Recent advances in dynamic covalent chemistry, *Chemical Society Reviews*, **42**: 6634 – 6654.
- Johanningsmeier, S.D. & Harris, G.K. (2011). Pomegranate as a functional food and nutraceutical source, *Annual Review of Food Science and Technology*, **2**: 181-201.
- Jurado, J.M., Ballesteros, O., Alcázar, A., Pablos, F. Martín, M.J., Vilchez, J.L. & Navalón, A. (2008). Differentiation of certified brands of origins of Spanish white wines by HS-SPME-GC and chemometrics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **390**: 961 – 970.
- Jurado, J.M., Ballesteros, O., Alcázar, A., Plabos, F., Martín, M.J., Vilchez, J.L. & Navalón, A. (2007). Characterization of aniseed-flavoured spirit drinks by headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry and chemometrics, *Talanta*, **72**: 506-511.
- Kalač, P. & krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation, implications for grow, *Food Chemistry*, **90**: 219-230.
- Kalač, P. & Křížek, M. (2003). A review of biogenic amines and polyamines in beer, *Journal of the Institute of Brewing*, **109**: 123-128.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. & Schieber, A. (2004). Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 4360-4367.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *Internation Journal of Mass Spectrometry and Ion Process*, **78**: 53-68.
- Kebarle, P. & Peschke, M. (2000). On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions, *Analytica Chimica Acta*, **406**: 11-35.
- Kelebek, H., Canbas, A. & Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey, *Food Chemistry*, **107**: 1710-1716.
- Khan, M.K., Zill-E-Huma & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols, *Journal of Food Composition and Analysis*, **33**: 85-104.
- Khanbabaee, K. & Ree, T.V. (2001). Tannins: classification and definition, *Natural Product Reports*, **18**: 641-649.

- Kim, K., Selvapalam, N., Ko, Y.H., Park, K.M., Kim, D. & Kim, J. (2006). Functionalized cucurbiturils and their applications, *Chemical Society Reviews Chem*, **36**: 267–279.
- Kim, K., Selvapalam, N. & OH, D.H. (2004). Cucurbiturils – a new family of host molecules, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **50**: 31–36.
- Kind, T. & Fiehn, O. (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry, *Bioanalytical reviews*, **2**: 23–60.
- Klatsky, A.L. (2010). Alcohol and cardiovascular health. *Physiology & Behavior*, **100**: 76–81.
- Kłosowski, G. & Czapryński, B. (2006). Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Food Engineering*, **72**: 242–246.
- Kolomiets, O.A., Lachenmeier, D.W., Hoffmann, U. & Siesler, H.W. (2010). Quantitative determination of quality parameters and authentication of vodka using near infrared spectroscopy, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **18**: 59–67.
- Komes D., Belščak-Cvitanović, A. Horžić, D., Drmić, H., Škrabal, S. & Miličević. B. (2011) Bioactive and sensory properties of herbal spirit enriched with cocoa (*Theobroma cacao* L.) polyphenolics, *Food Bioprocess Technology*, **5**: 2908–2920.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Rusak, G., Likić, S. & Berendika, M. (2010). Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis, *Phytochemical Analysis*, **22**: 172–180.
- Kong, J-M., Chia, L-S, Goh, N-K. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, **64**: 923–933.
- Kostiainen, R. & Kauppila, T.J. (2005). Analysis of Steroids by Liquid Chromatography. In: *Modern methods for lipid analysis by liquid chromatography/Mass spectrometry and related techniques*, (Edited by W. C. Byrdwell), Pp. 472–486, USA: AOCS Press.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food and Bioproducts Processing*, **89**: 217–233.
- Kubola, J. & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng), *Food Chemistry*, **127**: 1138–1145.
- Ky, I. & Teissedre, P-L. (2015). Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: polyphenolic content and antioxidant activity, *Molecules*, **20**: 2190–2207.
- Lachenmeier, D. W., Schmidt, B. & Bretschneider, T. (2008). Rapid and mobile brand authentication of vodka using conductivity measurement, *Microchimica Acta*, **160**: 283–289.
- Lachenmier, D.W., Burri, P.A., Fauser, T., Frank, W. & Walch, S.G. (2005). Rapid determination of alcoholic strength of egg liqueur using steam distillation and oscillation-type densimetry with peristaltic pumping, *Analytica Chimica Acta*, **537**: 377–384.
- Lagona, J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti, S & Isaacs, L. (2005). The cucurbit[n]uril family, *Angewandte Chemie International*, **44**: 4844 – 4870.
- Lai, Y-C, Huang, G-L., Chan, C-F., Lien, C-Y. & Liao, W.C. (2013). Studies of sugar composition and starch morphology of baked sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), *Journal of Food Science and Technology*, **50**: 1193–1199.
- Landete, J.M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health, *Food Research International*, **44**: 1150 – 1160.
- Lange, D.W. (2006). From red wine to polyphenols and back: A journey through the history of French Paradox, *Thrombosis Research*, **119**: 403–406.

- Laroze, L., Soto C. & Zúñiga, M.E. (2010). Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes, *Electronic Journal of Biotechnology*, **13**: 1-11.
- Ledauphin, J., Le Milbeau, C., Barillier, D. & Hennequin, D. (2010). Differences in the volatile compositions of French labeled brandies (Armagnac, Calvados, Cognac, and Mirabelle) using GC-MS and PLS-DA, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 7782-7793.
- Ledauphin, J., Lefrancois, A., Marqueta, N., Beliean-Leymarie, M. & Barillier, D. (2006). Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in calvados and cider, *LWT*, **39**: 1045-1052.
- Ledauphin, J., Saint-Clair, J-F, Lablanquie, O., Guichard, H. Fourier, N. Guichard, E. & Barillier, D. (2004). Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and Cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 5124-5134.
- Lee, H-S., Cho, Y-H., Park, J., Shin, H-R & Sung, M-K (2013). Dietary intake of phytonutrients in relation to fruit and vegetable consumption in Korea, *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, **113**: 1194-1199.
- Lee, C.J., Shin, S.I., Kim, Y., Choi, H.J. & Moon, T.W. (2011). Structural characteristics and glucose response in mice of potato starch modified by hydrothermal treatments, *Carbohydrate Polymers*, **83**: 1879–1886.
- Leemhuis, H., Kelly, R. M. & Dijkhuizen, L. (2010). Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**: 823 – 835.
- Lehn, J-M (2007). Química Supramolecular conceitos e perspetivas, Instituto Superior Técnico, Lisboa.
- Lehn, J-M (2002). Toward complex matter: supramolecular chemistry and self-organization, *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 4763-4768.
- Lehn, J.M. (1978) Cryptates: Inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules, *Pure and Applied Chemistry*, **50**: 871-892.
- Lemaur, V., Carroy, G., Poussique, F., Chirot, F., Winter, J.D, Isaacs, L., Dugourd, P., Cornil, J & Gerbaux, P. (2013). Homotropic allostery: In-depth structural analysis of the gas-phase noncovalent complexes associating a double-cavity cucurbit[n]uril-type host and size-selected protonated amino compounds, *ChemPlusChem*, **78**: 959-969.
- Leopoldino, M., Russo, N. & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, **125**: 288-306.
- Lemière, F. (2001). Interfaces for LC-MS, Guide to LC-MS.
- Levsen, K., Schiebel, H-M., Terlouw, J.K., Jobst, K.J., Elend, M-, PreiB, A., Thiele, H. & Ingendoh, A. (2007). Even-electron ions: a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions, *Journal of Mass Spectrometry*, **42**: 1024-1044.
- Li, X., Song, H., Yao, S., Jia, C., Yang, Y. & Zhu, W. (2011). Quantitative analysis and recovery optimisation of flavonoids and anthocyanins in sugar-making process of sugarcane industry, *Food Chemistry*, **125**: 150–157.
- Li, C., Chun-quan, L. & Da-jing, L. (2010). Changes in volatile compounds of sweet potato tips during fermentation, *Agricultural Sciences in China*, **9**: 1689-1695.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D. & Pretorius, I.S. (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates, *Yeast*, **23**: 641-659.
- Lim, J., 2011. Hedonic scaling: A review of methods and theory, *Food Quality and Preference*, **22**: 733–747.

- Lin, L-Z & Harnly, J.M. (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 1084-1096.
- Liu, M.; Han, X.; Tu, K.; Pan, L.; Tu, J.; Tang, L.; Liu, P.; Zhan, G.; Zhong, Q. & Xiong, Z. (2012) Application of electronic nose in Chinese spirits quality control and flavour assessment, *Food Control*, **26**: 564-570.
- Liu, S., Zavalij, P. Y. & Isaacs, L. (2005). Cucurbit[10]uril. *Journal of the American Chemical Society*, **127**: 16798-16799.
- Llorach, R., Martínez-Sánchez A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. & Ferreres, F. (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole, *Food Chemistry*, **108**: 1028-1038.
- Lobo, C.B.L. & Vidigal, L. (1994). Memórias sobre a Agricultura do Algarve e Melhoria que pode ter, Separata Nº XXIV dos anuários do Município de Faro.
- Lockwood, S., King, J.M. & Labonte, D.R. (2008). Altering pasting characteristics of sweet potato starches through amino acid additives, *Journal of Food Science*, **73**, C373-C377.
- López-Ramírez, J.E., Martín-del-Campo, S.T., Escalona-Buendía, H., García-Fajardo, J.A. & Estarrón-Espinosa, M. (2013). Physicochemical quality of tequila during barrel maturation. A preliminary study, *CyTA – Journal of Food*, **11**: 223-233.
- López-Vázquez, C., García-Llobodanin, L., Pérez-Correa, J.R. López, F., Blanco, P. & Orriols, I. (2012), Aromatic characterization of pot distilled kiwi spirits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 2242 – 2247.
- López-Vázquez, C., Bollaín, M.H., Moser, S. & Orriols, I. (2010). Characterization and differentiation of monovarietal grape pomace distillate from native varieties of Galicia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 9657–9665.
- Lorgil, M. & Salen, P. (2008). The mediterranean diet: rationale and evidence for its benefit, *Current Atherosclerosis Report*, **10**: 518-522.
- Lucas, D., Minami, T., Iannuzzi, G., Cao, L., Wittenberg, J., Anzenbacher, P. & Isaacs, L. (2011). Templated Synthesis of Glycoluril Hexamer and Monofunctionalized Cucurbit[6]uril Derivatives. *Journal of the American Chemistry Society*, **133**: 17966–17976.
- Lukić, I., Milićević, B., Tomas, S., Radeka, S. & Peršurić, D. (2012). Relationship between volatile aroma compounds and sensory quality of fresh grape marc distillates, *Journal of the Institute of Brewing*, **118**: 285-294.
- Lukić, I., Milićević, B., Banović, M., Tomas, S., Radeka, S. & Peršurić, D. (2011). Secondary aroma compounds in fresh grape marc distillates as a result of variety and corresponding production technology, *Food Technology and Biotechnology*, **49**: 214-227.
- Luthria, L.D., Mukhopadhyay, S. & Krizek, D.T. (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation, *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: 771-777.
- Lynch, A.G. & Mulvihill, D.M. (1997). Effect of sodium caseinate on the stability of cream liqueurs, *International Journal of Dairy Technology*, **50**: 1-7.
- Lyons, T.P. (2003). Production of Scotch and Irish whiskies: their history and evolution. In: *The Alcohol Textbook*, (edited by Jacques, K.A., Lyons, T.P., Kelsall, D.R.) Pp. 137-168. Nottingham University, Nottingham.
- MacNamara, K., Lee, M. & Albert, R. J. (2010). Rapid gas chromatographic analysis of less abundant compounds in distilled spirits by direct injection with ethanol-water venting and mass spectrometric data deconvolution, *Journal of Chromatography A*, **1217**: 136-142.
- MacNamara, K., Leardi, R. & McGuigan, F. (2009). Comprehensive investigation and optimisation of the main experimental variables in stir-bar sorptive extraction (SBSE)-

- thermal desorption-capillary gas chromatography (TD-CGC), *Analytica Chimica Acta*, **636**: 190-197.
- Macz-Pop, G.A., González-Paramás, A.M., Pérez-Alonso, J.J. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2006). New Flavanol-Anthocyanin condensed pigments and anthocyanin composition in Guatemalan beans (*Phaseolus* spp.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 536-541.
- Maggi, F., Bílek, T., Cristalli, G., Papa, F., Sagratini, G. & Vittori, S. (2009). Comparison of the characterisation of the fruit-like aroma of *Teucrium flavum* L. subsp *flavum* by hydrodistillation and solid-phase micro-extraction, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**: 2505-2518.
- Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D.R., Schieber, A. & Carle, R. (2008). Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace, *European Food Research and Technology*, **227**: 267-275.
- Malhis, L.D., Bodoor, K., Assaf, K. I., Al-Sakhen, N.A. & El-Barghouthi, M.I. (2015). Molecular dynamics simulation of a cucurbituril based molecular switch triggered by pH changes, *Computational and Theoretical Chemistry*, **1066**: 104-112.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O. & Amiot, M.J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin – based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 170-176.
- Mandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Lo Turco, V., Cacciola, F., Cacciola, F., Rich, G.T., Bisignano, C., Saija, A., Dugo, P., Cross, K.L., Parker, M.L., Waldron, K.W. & Wickham, M.S.J. (2010). Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.), *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**: 166-174.
- Mantell, C., Rodríguez, M. & Ossa, E.M. (2003). Kinetics and mathematical modeling of anthocyanin extraction with carbon dioxide and methanol at high pressure, *Separation Science and Technology*, **38**: 3689-3712.
- Martín-del-Campo, S.T., Gómez-Hernández, H.E., Gutiérrez, H., Escalona, H., Estarrón, M. & Casío-Ramírez, R. (2011). Volatile composition of tequila. Evaluation of three extraction methods, *CyTA – Journal of Food*, **9**: 152-159.
- Martuscelli, M., Arfelli, G., Manetta, A.C. & Suzzi, G. (2013). Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy), *Food Chemistry*, **140**: 590–597.
- Masino, F. & Montevecchi, G. (2009). Composition of some commercial grappas (grape marc spirit): the anomalous presence of 1,1-diethoxy-3-methylbutane: a case study, *European Food Research Technology*, **228**: 565-569.
- Masson, E., Ling, X., Joseph, R., Kyeremeh-Mensah, L & Lu, X (2012). Cucurbituril chemistry: a tale of supramolecular success, *RSC Advances*, **2**: 1213–1247.
- Maynard, L.S. & Schenker, V.J. (1996). Monoamine-oxidase inhibition by ethanol in vitro, *Nature*, **196**: 574-576.
- Mayuoni-Kirshinbaum, L. & Porat, R. (2014). The flavor of pomegranate fruit: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**: 21-27.
- Mckay, D.L., Chen, C-Y O., Zampariello, C.A. & Blumberg, J.B. (2015). Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults, *Food Chemistry*, **168**: 233-240.
- Melgarejo, P., Calín-Sánchez, A., Várquez-Araújo, L., Hernández, F., Martínez, J. J., Legua, P. & Carbonell-Barrachina, A.A. (2011). Volatile composition of pomegranates from 9 Spanish cultivars using headspace solid phase microextraction, *Journal of Food Science*, **76**: S114-S120.

- Meličević, B. Banović, M., Kovačević-Ganić, K. & Gracin, L. (2002). Impact of grape varieties on wine distillates flavour, *Food Technology and Biotechnology*, **40**: 227-232.
- Mena, P., Martí, N. & García-Viguera (2014). Varietal blends as a way of optimizing and preserving the anthocyanin content of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**: 6936– 6943.
- Mendes, D.C., Ramamurthy, V. & Da Silva, J.P. (2015). Identification of guest – host inclusion complexes in the gas phase by electrospray ionization – mass spectrometry, *Journal of Chemical Education*, **92**: 1091-1094.
- Mendes-Pinto, M.M. (2009). Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **483**: 236–245.
- Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D. Neves, A. & Martins, D. (2004). Anthocyanin Concentration of “Assaria” pomegranate fruits during different cold storage conditions, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **5**: 338-342.
- Minami, T., Esipenko, N., Zhang, B., Kozelkova, M., Isaacs, L., Nishiyabu, R., Kubo, Y. & Anzenbacher, P. (2012). Supramolecular Sensor for Cancer-Associated Nitrosamines. *Journal of the American Chemistry Society*, **134**: 20021–20024.
- Mock, W.L. & Shih, N.Y. (1986). Structure and selectivity in host-guest complexes of cucurbituril, *Journal of Organic Chemistry*, **51**: 4440-4446.
- Mohamed, S. (2014). Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease, *Trends in Food Science & Technology*, **35**: 114-128
- Mohaptra, S., Patra, J., Popova, S., Duhig A. & Rehm, J., (2010). Social cost of heavy drinking and alcohol dependence in high-income countries, *International Journal of Public Health*, **55**: 149–157.
- Montefusco, M. & Durante, M. (2014). Assessment of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] for bioethanol production in southern Italy, *Plant Biosystems*, **148**: 1117-1126.
- Monteiro, S.S., Guerreiro, C.S.T., Sequeira L.J.G. & Galego L.R. (2009). Aguardentes com mel, CD do 9º Encontro de Química dos Alimentos, Angra do Heroísmo.
- Monteiro, M., Albuquerque, U.P., Araújo, E.L. & Amorim, E.L.C. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia, *Química Nova*, **28**: 892-896.
- Montes-Navajas, P., Baumes, L.A., Corma, A. & Garcia, H. (2009). Dual-response colorimetric sensor array for the identification of amines in water based on supramolecular host–guest complexation, *Tetrahedron Letters*, **50**: 2301-2304.
- Montoro, P., Tuberoso, G.I.G., Piacente, S., Perrone, A., De Feo. V., Cabras, P. & Pizza, C., (2006a). Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1614-1619.
- Montoro, P., Tuberoso, G.I.G., Perrone, A., Piacente, S., Cabras, P. & Pizza, C. (2006b). Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Chromatography A*, **1112**: 232-240.
- Moorthy, S.N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review, *Starch/Stark*, **54**: 559-592.
- Moreira, R.F.A., Netto, C.C. & Maria, C.A.B. (2012). A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil, *Química Nova*, **35**: 1819-1826.
- Moreno, J.A., Zea, L., Moyano, L. & Medina, M. (2005). Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing, *Food Control*, **16**: 333-338.
- Mochly-Rosen, D. & Zakhari, S (2010). Alcohol and health, *Alcohol Research & Health*, **33**: 76-86.

- Mphahlele, R.R., Fawole, O.A., Stander, M.A. & Opara, U.L. (2014). Preharvest and postharvest factors influencing bioactive compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.)—A review, *Scientia Horticulturae*, **178**: 114-123.
- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Lins-Neto, E.M.F., Araújo, E.I., & Amorim, E.L.C. (2006). Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region, *Journal of Ethnopharmacology*, **105**: 173-186.
- Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K. & Khodaparast, M.H.H. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juice of eight Iranian cultivars, *Food Chemistry*, **115**: 1274-1278.
- Mulas, M. (2012). Il mirto specie spontanea e coltivata, Editrice Democratica Sarda, Sardegna, Italia.
- Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **113**: 226-238.
- Naczki, M. & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95-111.
- Naczki, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1523-1542.
- Nakamura, A. Ono, T., Yagi, N. & Miyazawa, M. (2013). Volatile compounds with characteristic aroma of boiled sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cv Ayamurasaki, *I. batatas* L. cv Beniazuma and *I. batatas* L cv Simon 1), *The journal of Essential Oil Research*, **25**: 497-505.
- Nassiri-Asi, M. & Hosseinzadeh, H. (2009). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds, *Phytoterapy research*, **23**: 1197-1204.
- Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M. & Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure – activity relation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 1453-1459.
- Nayak, B., Liu, R.H. & Tang, J. (2015). Effect of processing on phenolic antioxidant of fruits, vegetables and grains – a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55**: 887-918.
- Neves, A.C., Spranger, M.I., Zhao, Y., Leandro M.C. & Sun, B. (2010). Effect of addition of commercial grape seed tannins on phenolic composition, chromatic characteristics, and antioxidant activity of red wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 11775-11782.
- Nicoletti, I., Rossi, A., Giovino, G. & Corradini, D. (2007). Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by reverse phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 3304-3311.
- Nikićević, N., Veličković, M., Jadranin, M., Vučković, I., Mirpslav, N., Vujisić, L., Stanković, M., Urošević, I., Tešević, V. (2011). The effects of the cherry variety on the chemical and sensorial characteristics of cherry brandy, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **76**: 1219-1228.
- Nikkhah, E., Khayami, M., Heidari, R. & Jamee, R. (2007). Effect of sugar treatment on stability of anthocyanin pigments in berries, *Journal of Biological Sciences*, **7**: 1412-1417.
- Nishizuka, T., Fujita, Y., Sato, Y., Nakano, A., Kakino, A., Ohshima, S., Kanda T., Yoshimoto, R. & Sawamura T. (2011). Procyranidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox, *Proceeding of the Japan Academy, Serie B Physical and Biological*, **87**: 104-113.

- Nóbrega, I.C.C. (2003). Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasos-espectrometria de massas, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **23**: 210-216.
- NP 3263, (1990). Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de etanal, acetato de etilo, metanol, 2 butanol, 1-propanol, 2 metil-1-propanol, 2-propanol-1-ol, 1 butanol, 2-metil-1 butanol + 3 metil-1-butanol. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 2442, (1988). Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de cobre por espectrofotometria de absorção atômica, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 2441, (1988). Bebidas Alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de cobre. Método colorimétrico. Processo corrente. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 2224, (1988). Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de açúcares totais. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 2223, (1988). Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de açúcares redutores. Método de Luff-Schoorl. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 2143, (1987). Bebidas alcoólicas e espirituosa. Determinação do teor alcoólico em volume (grau alcoólico volumétrico). Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 2139, (1987). Bebidas alcoólicas e espirituosas. Determinação do teor de acidez total, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 1420, (1987). Frutos, produtos hortícolas e seus derivados. Determinação dos açúcares totais, dos açúcares redutores e dos açúcares não redutores (sacarose) Técnica de Luff-Schoorl. Processo corrente. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP 783 (1985). Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Preparação de amostra para análise. Método de rotina. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- Nyadong, L., Late, S., Green, M.D., Banga, A. & Fernández, F.M. (2008). Direct quantification of active ingredients in solid artesunate antimalarials by noncovalent complex forming reactive desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **19**: 380-388.
- Ogah, O., Watkins, C.S., Ubi, B.E. & Oraguzie, N.C. (2014). Phenolic compounds in *Rosaceae* fruit and nut crops, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**: 9369-9386.
- Ohe, T.H.K., Silva, A.A, Rocha, T.S., Godoy, F.S. & Franco, D.W. (2014). A Fluorescence-based method for cyanate analysis in ethanol/water media: Correlation between cyanate presence and ethyl carbamate formation in sugar cane spirit, *Journal of Food Control*, **79**: C1950-C1955.
- Önal, A. Tekkeli, S.E.K & Önal. C. (2013). A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry* **138**: 509–515.
- OIV (2015) Compendium of international methods of analysis of spirits beverages of viticultural origin, International organisation of vine and wine, Paris.
- O’keefe, J.H., Bhatti, S.K., Bajwa, A., DiNicolantonio, J.J & Lavie, C. J. (2014). Alcohol and cardiovascular health: The dose makes the poison... or the remedy, *Mayo Clinic Proceedings*, **89**: 382-393.
- Ohta., T., Morimitsu, Y., Sameshima, Y. & Ohba, T. (1991). Transformation from geraniol, nerol and their glucosides into linalool and a terpeneol during *shochu* distillation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72**: 347-351.
- Ohta, T., Ikuta, R., Morimitsu, Nakashima, M., Morimitsu, Y., Samuta, T. & Saiki, H. (1990). Characteristic flavor of kansho-shochu (sweet potato spirit), *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**: 1353-1357.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability, *Analytica Chimica Acta*, **563**: 26–32.

- Orts, M.L.H., Martínez-Cutillas, A., López-Roca, J.M. & Gómez-Plaza, E. (2005). Effect of moderate irrigation on grape composition during ripening, *Spanish Journal of Agricultural Research*, **3**: 352-361.
- Osaka, I., Kondou, M., Selvapalam, N., Samal, S., Kim, K., Rekharsky, M.V., Inoue, Y. & Arakawa, R. (2006). Characterization of host-guest complexes of cucurbit[n]uril (n=6,7) by electrospray ionization mass spectrometry, *Journal Mass Spectrometry*, **41**: 202-207.
- Oun, R., Floriano, R.S., Isaacs, L., Rowan, E. G. & Wheate, N.J. (2014). The *ex vivo* neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbituril-based macrocyclic drug delivery vehicles, *Toxicology Research*, **3**: 447-455.
- Paulo, L., Domingues, F., Quiroz, J.A. & Gallardo, E. (2011). Development and validation of an analytical method for the determination of trans- and cis-resveratrol in wine: analysis of its contents in 186 Portuguese red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 2157–2168.
- Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B. & Galensa, R. (2004). Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSⁿ, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 3784-3791.
- Pastor, A. & Martínez-Viviente, E. (2008). NMR spectroscopy in coordination supramolecular chemistry: A unique and powerful methodology, *Coordination Chemistry Reviews*, **252**: 2314–2345.
- Pažžitná, A. & Špánik, I. (2014). Enantiomeric distribution of major chiral volatile organic compounds in juniper-flavored distillates, *Journal of Separation Science*, **37**: 398–403.
- Pecić, S., Veljović, M., Despotović, S., Leskošek-Čukalović, I., Jadranin, M., Tešević, V., Nilšić, M. & Nikićević, N (2012). Effect of maturation conditions on sensory and antioxidant properties of old Serbian plum brandies, *European Food Research and technology*, **235**: 479-487.
- Pedroso, M.P., Godoy, L.A.F., Fidélis, C.H.V., Ferreira, E.C., Poppi, R.J. & Augusto, F. (2009). Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC), *Química Nova*, **32**: 421-430.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2012). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Amines in Must and Wine: A Review, *Food Reviews International*, **28**: 71–96.
- Peña, R.M., Barciela, J., Herrero, C. & García-Martín S. (2008). Headspace solid-phase microextraction gas chromatography- mass spectrometry analysis of volatiles in orujo spirits from defined geographical origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 2788-2794.
- Penha, E.M., Braga, N.C.A.S, Matta, V.M., Cabral, L.M.C., Modesta, R.C.D. (2001). Utilização do Retentado da Ultrafiltração do Suco de Acerola na Elaboração de Licor, *Boletim CEPA*, **19**: 267-278.
- Penteado, J.C.P & Masini, J.C. (2009). Multivariate analysis for the classification differentiation of Brazilian sugarcane spirits by analysis of organic and inorganic compounds, *Analytical Letters*, **42**: 2747-2757.
- Pérez-Trujello, J.L., Hernandez, Z., López-Bellido, F.J. & Hermosin-Gutiérrez, I. (2011). Characteristic Phenolic Composition of Single-Cultivar Red Wines of the Canary Islands (Spain), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 6150–6164.
- Pêssego, M., Da Silva, J.P. Moreira, J.A. & García-Río, L. (2013). Differences in cucurbit[7]uril: surfactant complexation promoted by the cationic head group, *ChemPlusChem*, **78**: 1058-1064.

- Peters, R.D. & Noble, S.D. (2014). Spectrographic measurement of plant pigments from 300 to 800 nm, *Remote Sensing of Environment*, **148**: 119–123.
- Pietruszka, M.; Pielech-Przybylska, K. & Szopa, J.S. (2010). Synthesis of higher alcohols during alcoholic fermentation of rye mashes, *Food Chemistry and Biotechnology*, **74**: 51–64.
- Pignatelli, P., Ghiselli, A., Buchetti, B., Carnevale, R., Natella, F., Germanò, G., Fimognari, F., Di Santo, S., Lenti L. & Violi, F. (2006). Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine, *Atherosclerosis*, **188**: 77–83.
- Piggott J. R. & Holm, A. M. (1983). Descriptive sensory analysis of gin flavour. In: Flavour of distilled beverages origin and development (Edited by Piggott), Ellis Horwood Limited, Great Britain.
- Pina, F., Melo, M.J., Laia, C.A.T., Parola, J. & Lima, J.C. (2012). Chemistry and applications of flavylum compounds: *a handful of colours*, *Chemical Society Reviews*, **41**: 869–908.
- Pina, F. (2000). Sistemas fotocrômicos em memórias ópticas. Um olhar sobre a química como fonte de informação, *Boletim da Sociedade Portuguesa e Química*, **76**: 6–11.
- Pino, J.A., Tolle, S., Gök, R. & Winterhalter, P. (2012). Characterisation of odour-active compounds in aged rum, *Food Chemistry*, **132**: 1436–1441.
- Pino, J.A. & Fajardo, M. (2011). Volatile composition and key flavour compounds of spirits from unifloral honeys, *International Journal of Food Science & Technology*, **46**: 994–1000.
- Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T. & Vicente, A.A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**: 1937–1949.
- Płotka-Wasyłka, J., Morrison, C. Biziuk, M. & Namieśnik, J. (2015). Chemical derivatization processes applied to amine determination in samples of different matrix composition, *Chemical Reviews*, **115**: 4693–46718.
- Plutowska, B., Biernacka, P. & Wardencki, W. (2010). Identification of Volatile Compounds in Raw Spirits of Different Organoleptic Quality, *Journal of the Institute of Brewing*, **116**: 433–439.
- Plutowska, B. & Wardencki, W. (2008). Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages-A review, *Food Chemistry*, **107**: 449–463.
- Plutowska, B. & Wardencki, W. (2008b). Determination of volatile fatty acid ethyl esters in raw spirits using solid phase microextraction and gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, **613**: 64–73.
- Poiana, M., Geraldina, A., Donatella, A. & Marisa, DM (2006) Alcoholic extracts composition from lemon fruits of the Amalfi-Sorrento peninsula, *Journal of Essential Oil Research*, **18**: 32–437.
- Poisson, L. & Schieberle, P. (2008). Characterization of most odor-active compounds in an american bourbon whisky by application of the aroma extract dilution analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 5813–5819.
- Poli, A., Marangoni, F., Avogaro, A. et al., (2013). Moderate alcohol use and health: A consensus document, *Nutrition, Metabolism Et Cardiovascular Diseases*, **23**: 487–504.
- Pouwels, E.K.J. & Kostkiewicz, M. (2009). The Mediterranean diet, Part II: Red wine and cardiovascular disease – more facts, less fancy, *Drugs of the future*, **34**: 565–574.
- Portaria nº 364/2001, de 9 de abril de 2001, *Diário da República 1ª série B*, **84**: 2108.
- Pozo-Bayón, M.A., Monagas, M., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M.V. (2012). Wine Features Related to Safety and Consumer Health: An Integrated Perspective, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**: 31–34.

- Prochowicz, D., Kornowicz, A., Justyniak, I., Lewiński, J. (2016). Metal complexes based on native cyclodextrins: Synthesis and structural diversity, *Coordination Chemistry Reviews*, **306**: 331–345.
- Proestos, C. & Komaltis, M., (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds, *LWT – Food Science and Technology*, **41**: 652–659.
- Puértolas, E., López, N., Saldaña G., Álvarez, I & Raso, J. (2010). Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering*, **98**: 120–125.
- Qi, Z., Heinrich, T., Moorthy S. & Schalley C.A. (2015). Gas-phase chemistry of molecular containers, *Chemical Society Reviews*, **44**: 515–531.
- Ramamurthy, V. & Gupta, S. (2015). Supramolecular photochemistry: from molecular crystals to water-soluble capsules, *Chemical Society Reviews*, 2015, **44**: 119–135.
- Ramamurthy, V., Jockusch, S. & Porel, M. (2015). Supramolecular Photochemistry in Solution and on Surfaces: Encapsulation and Dynamics of Guest Molecules and Communication between Encapsulated and Free Molecules, *Langmuir*, **31**: 5554–5570.
- Regulamento (CE) N° 1169/2011 do Parlamento Europeu, do Conselho de 25 de outubro de 2011, *Jornal Oficial da União Europeia*, **L 304**, 18–63.
- Regulamento (CE) N° 110/2008 do Parlamento Europeu, do Conselho de 15 de janeiro de 2008, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, **L 39**: 16–54.
- Regulamento (CE) N° 2676/90 do Parlamento Europeu, do Conselho de 17 setembro, 1990, *Jornal Oficial da União Europeia*, **L 272**, 1–192.
- Regulamento (CEE) N° 1576/1989 do Parlamento Europeu, do Conselho de 29 de maio de 1989, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, **L 160**: 0001–0017.
- Revilla E., García-Beneytes, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G. & Ryan, J-M. (2001) Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them, *Journal of Chromatography A*, **915**: 53–60.
- Riachi L.G., Santos Â., Moreira R.F.A. & De Maria, C.A.B. (2014). A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits, *Food Chemistry*, **149**: 159–169.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Marijean, A., Dubourdieu, D., (2006). Handbook of enology - the chemistry of wine stabilization and treatments, Wiley, England.
- Ribéreau-Gayon, P. & Stonestreet, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge, *Bulletin de la Société chimique de France*, **9**: 2649–2652.
- Robb, D.B., Covey, T.R. & Bruins, A. P. (2000). Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **72**: 3653–3659.
- Robbins R.J., (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2866–2887.
- Rodríguez Madrera, R., Bedriñana, R.P., Hevia, A.G., Arce, M.B. & Valles, B.S. (2013). Production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts, *Food and bioproducts processing*, **91**: 623–631.
- Rodríguez Madrera, R.R., Valles, B.S. & Lobo, A.P. (2011). Chemical and sensory changes in fresh cider spirits during maturation in inert containers, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**: 797–804.
- Rodríguez Madrera, R.R., Lobo, A.P. & Alonso, J.J.M. (2010). Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits, *Food Research International*, **43**: 70–78.

- Rodríguez Madrera, R. & Valles, B.S. (2007). Determination of volatile compounds in cider spirits by gas chromatography with direct injection, *Journal of Chromatographic Science*, **45**: 428-434.
- Rodríguez-Solana, R., Rodríguez, N., Domínguez, J.M. & Cortés, S. (2012). Characterization by chemical and sensory analysis of commercial grape marc distillate (orujo) aged in oak wood, *Journal of the Institute of Brewing*, **118**: 215-212.
- Rødtjer, A., Skibsted, L.H. & Andersen, M.L. (2006). Identification and quantification of phenolics in aromatic bitter and cherry liqueurs by HPLC with electrochemical detection, *European Food Research and Technology*, **223**: 663-668.
- Rosso, M., Panichel, A., Vedova, A.D., Stella, L. & Flamini, R. (2009). Changes in chemical composition of red wine aged in acacia, Chestnut, mulberry and oak wood barrels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 1915-1920.
- Rouessac, F. & Rouessac, A. (2000). Chemical analysis modern Instrumentation methods and techniques, Wiley, Chichester.
- Rowland, M.J., Atgie, M., Hoogland, D. & Scherman, A. (2015). Preparation and supramolecular recognition of multivalent peptide – polysaccharide conjugates by cucurbit[8]uril in hydrogel formation, *Biomacromolecules*, **16**: 2436–2443.
- Ruijschop, R.M.A.J., Boelrijk, A.E.M., Graaf, C. & Westerterp-Planrenga, M.S. (2009). Retronasal aroma release and satiation: a review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 9888-9894.
- Saalfank, R.W., Maid, H. & Scheurer, A. (2008). Supramolecular coordination chemistry: the synergistic effect of serendipity and rational design, *Angewandte Chemie International*, **47**: 8794 – 8824.
- Sacher, J., García-Llobodanin, L., López, F., Segura, H & Pérez-Correa, J.R. (2013). Dynamic modeling and simulation of an alembic pear wine distillation, *Food and Bioprocess Technology*, **91**: 447-456.
- Saco, P., Flores, J., Taboada, J., Otero, A. & Varela, J. (2006). Rule-based intelligent monitoring and control of marc brandy stills, *Computers and Chemical Engineering*, **30**: 1132-1140.
- Sádecká, J., Tóthová, J & Májek, P. (2009). Classification of brandies and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy, *Food Chemistry*, **117**: 491–498.
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J.P. & Cheynier, V. (2004). Demonstration of occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and model solutions, *Analytical Chimica Acta*, **513**: 325-332.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition*, **130**: 2073S-2085S.
- Scarborough, H. (1945). Observations on the nature of vitamin P and the vitamin P potency of certain foodstuffs, *The Biochemical Journal*, **39**: 271-278.
- Schwarz, M., Picazo-Bacete, J.J., Winterhalter, P. & Hermosín-Gutiérrez, I. (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 8372-8381.
- Sampaio, A., Dragone, G., Vilanova, M., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. (2013). Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground, *LWT - Food Science and Technology*, **54**: 557-563.
- Sandhu, A.K. & Gu, L. (2010). Antioxidant capacity phenolic content and profiling of phenolic compounds in the seeds skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 4681-4692.

- Santos, C., Botelho, G., Caldeira, I., Torres, A. & Ferreira, F.M. (2014). Antioxidant activity assessment in fruit liquors and spirits: methods comparison, *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **29**: 28-34.
- Santos, C.C.A.A., Duarte & W.F., Schwan, R.F. (2013). Inoculated fermentation of orange juice (*Citrus sinensis* L.) for production of a citric fruit spirit, *Journal of the Institute of Brewing*, **119**: 280 – 287.
- Santo, D.E., Galego, L., Gonçalves, T. & Quintas, C. (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations, *Food Research International*, **47**: 45-50.
- Sanz, M., Simón, B.F., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., Hernández, M.T. & Estrella, I. (2012). Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Analytica Chimica Acta*, **732**: 33-45.
- Sanz, M., Simón, B.F., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., Cadahía, E., Hernández, T., Estrella, I. & Pinto, E. (2011). Effect of toasting intensity at cooperage on phenolic compounds in acacia (*Robinia pseudoacacia*) heartwood, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 3135-3145.
- Sara, C., Leandro, M.C., Spranger, M.I. & Belchior, A.P. (1999). Low molecular weight compounds of Chestnut wood (*Castanea sativa* L.) and corresponding aged brandies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 5023-5030.
- Schehl, B. , Lachenmeir, D., Senn, T. & Heonisch, J. (2005). Effect of the stone content on the quality of plum and cherry spirits produced from mash fermentations with commercial and laboratory yeast strains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 8230–8238.
- Schehl, B.; Müller, C., Senn & Heinisch, J.J. (2004). A laboratory yeast strain suitable for spirit production, *Yeast*, **21**: 1375-1389.
- Schneider, H-J. (2009). Binding mechanisms in supramolecular complexes, *Angewandte Chemie International*, **48**: 3924 – 3977.
- Schipilliti, L., Bonaccorsi, I., Cotroneo, A., Dugo, P. 6 Mondello, L., (2013). Evaluation of gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) for the quality assessment of citrus liqueurs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**: 1661-1670.
- Schulz, K., Dreßler, J., Sohnius, E-M. & Lachenmeier, D.W. (2007). Determination of volatile constituents in spirits using headspace trap technology, *Journal of Chromatography A*, **1145**: 204–209.
- Schwarz, M., Rodríguez M., Guillén, D. & Barroso, C.G. (2011). Analytical characterisation of a brandy de Jerez during its ageing, *European Food Research and Technology*, **232**: 813-819.
- Schwarz, M., Rodríguez M., Martínez, C., Bosquet, V. & Guillén, D. (2009). Antioxidant activity of brandy de Jerez and other aged distillates and correlation with their polyphenolic content, *Food Chemistry*, **116**: 29-33.
- Seideneck, R. & Schieberle, P. (2011). Comparison of the key aroma compounds in hand squeezed and unpasteurised, commercial NFC juices prepared from Brazilian Pera Rio oranges. *European Food Research Technology*, **232**: 995-1005.
- Sellappan S., Akoh, C.C. & Krewer, G., (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2432-2438.
- Sentandeu, E., Navarro, J.L. & Sendra, J.M. (2010). LC-DAD-ESI/MSⁿ determination of direct condensation flavanol – anthocyanin adducts in pressure extracted pomegranate (*Punica granatum* L.) juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 10560-10567.

- Sepúlved, E., Sáenz, C., Peña, A., Robert, P. Bartolomé, B. & Gómez-Cordovés, C. (2010). Influence of the genotype on the anthocyanin composition, antioxidant capacity and color of Chilean Pomegranate (*Punica granatum* L.) juices, *Chilean Journal of Agricultural Research*, **70**: 50-57.
- Serçe, S., Özgen, M., Torun, A.A. & Ercişli, S. (2010). Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. *Ericaceae*) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey, *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**: 619-623.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A-M. & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects, *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**: S130-S329.
- Servili, M., Rizzello, C.G., Taticchi, A., Esposito, S., Urbani, S., Mazzacane, F., Maio, I.D., Selvaggini, R., Gobetti, M. & Cagno, R.D. (2011). Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, **147**: 45-52.
- Šeruga, M., Novak, I. & Jakobek, N. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chemistry*, **124**: 1208–1216.
- Shahidi, F., Janitha, P.k. & Wanasundara, P.D. (1992). Phenolic antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**: 67-103.
- Shariffa, Y.N., Karim, A. A. Fazilah, A. & Zaidul, I.S.M. (2009). Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature, *Food Hydrocolloid*, **23**: 434-440.
- Shen, S-C., Tseng, K-C., Chao, F.T & Wu, J. S-B. (2007). Color quality of rose liqueur, *Journal of Food Quality*, **30**: 202-217.
- Silla Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology*, **29**: 213-231.
- Silva, M.L., Malcata, F.X. & De Revel, G. (1996). Volatile contents of grape marcs in Portugal, *Journal of Food Composition and analysis*, **9**: 72-80.
- Silva, O. (2010). Substâncias de origem natural como fonte de suplementos alimentares. In: *Nutraceuticos e Alimentos Funcionais*. Pp.13-40. LIDEL, Lisboa. (ISBN: 978-972-757-624-1).
- Silva, O., Gomes, E.T, Wolfender, J-L., Marston, A., Hostettmann, K., (2000). Application of high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry to the characterization of ellagitannins from *Terminalia macroptera* roots, *Pharmaceutical research*, **11**: 1396-1401.
- Silva, M.L. & Malcata, F. X. (1998). Relationships between storage conditions of spirits obtained therefrom, *American Journal of Enology and Viticulture*, **49**: 56-64.
- Silva, M.L., Malcata, F.X. & Revel, G. (1996). Volatile contents of grape marcs in Portugal, *Journal of Food Composition and Analysis*, **9**: 72-80.
- Simirgiotis, M.J. & Schmeda-Hirschmann, G. (2010). Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the withe strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *Chiloensis* from *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques, *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**: 545-553.
- Simón, B.F., Pérez-Illarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C. & Estrella, I. (1992). Importance of phrnicolic compounds for the characterization of fruit juices, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 1531-1535.
- Símon B.F., Sanz, M., Cadahia, E., Esteruelas, E. & Muñoz, A.M. (2014a). Montargeted GC-MS approach for volatile profile of toasting in cherry, chestnut, false acacia, and ash wood, *Journal of Mass Spectrometry*, **49**: 353-370.

- Simón, B.F., Sanz, M., Cadahía, E., Martínez, J., Esteruelas, E. & Muñoz, A.M. (2014b). Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood, *Food Chemistry*, **143**: 66–76.
- Snoussi, A., Hayet, B.H.K., Essaidi, I., Zgoulli, S., Moncef, C.M., Thonart, P. & Bouzouita, N. (2012). Improvement of the composition of Tunisian myrtle berries (*Myrtus communis* L.) alcohol extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 608–614.
- Soares, R.M.A., Da Silva, J.P. & Galego, L.G. (2012). Pear and strawberry tree spirits – a comparative study. In: Proceedings International Conference on Food Safety, Quality and Nutrition Greening The Food Industry (edited by B.K. Tiwari and C. Smith), Pp 248–251, Manchester.
- Soufleros, E.H., Mygdaline, S.A. & Natskoulis, P. (2005). Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate “Koumaro” by aromatic and mineral composition, *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**: 699–716.
- Soufleros, E.H., Mygdalia, A.S. & Natskoulis, P. (2004). Characterization and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate “Mouro” by flavor compounds and mineral analysis, *Food Chemistry*, **86**: 625–636.
- Stampar, F., Solar, A., Hundina, M., Veberic, R. & Colaric, M., (2006). Traditional walnut liqueur – cocktail of phenolics, *Food Chemistry*, **95**: 627–631.
- Stervbo, U., Vang, O., Bonnessen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine, *Food Chemistry*, **101**: 449–457.
- Sun, B., Neves, A.C., Fernandes, T.A., Fernandes, A.L., Mateus, N., De Freitas, V. Leandro, C. & Spranger, M.I. (2011). Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 6550–6557.
- Sun, B., Ana M. Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P. & Isabel Spranger, M.I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation, *Analytica Chimica Acta*, **563**: 382–390.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. & Spranger, M.I. (2001). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several portuguese grapevine varieties and red wines, *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **16**: 23–34.
- Sun, J. Qin, Z., Liu, J. Zhang, C. & Luo, H. (2014). Highly sensitive and specific detection of histamine via the formation of a self-assembled magic number cluster with thymine by mass spectrometry, *Analyst*, **139**: 3154–3159.
- Surveswaran, S., Cai, Y-Z., Corke, H. & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants, *Food Chemistry*, **102**: 938–953.
- Szent, L & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients, *Trends in Food Science & Technology*, **15**: 137–142.
- Takahashi, K. & Goto-Yamamoto, N. (2011). Simple method for the simultaneous quantification of medium-chain fatty acids and ethyl hexanoate in alcoholic beverages by gas chromatography-flame ionization detector: Development of a direct injection method, *Journal Chromatography A*, **1218**: 7850–7856.
- Tan, J.B.L. & Lim, Y.Y. (2015). Critical analysis of current methods for assessing in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts, *Food Chemistry*, **172**: 814–822.
- Tapas, A.R., Sakarkar, D.M. & Kakde, R.B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: A review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **7**: 1089–1099.
- Teixeira, L.J.Q., Ramos, A. M., Chaves, J.B.P., Silva, P.H.A. & Stringheta, P.C. (2005). Avaliação Tecnológica da extração alcoólica no processamento de licor de banana, *Boletim CEPA*, **23**: 329–346.

- Terrier, N., Poncet-Legrand, C. & Cheynier, V. (2009). Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. In: *Wine chemistry and Biochemistry*, (Edited by M.V. Moreno-Arribas & M.C. Polo). Pp.463-507. London: Springer.
- Tešević, V., Nikičević, N., Milosavljević, S., Bajić, D., Vajs, V., Vučković, I., Vujisić, L., Đorđević, I., Stanković, M. & Veličković, M. (2009). Characterization of volatile compounds of 'Drenja', an alcoholic beverage obtained from the fruits of cornelian cherry, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **74**: 117-128.
- Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M., Diken, T., Özçelik, B., Erim, B (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices, *Food Chemistry*, **115**: 873–877.
- Tomás-Barberán, F.A., & Espín, J.C. (2001a). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**: 853-876.
- Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B. & Kader, A.A. (2001b). HPLC-DAD-ESIMS Analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 4748-4760.
- Tranchida, P.Q., Donato, P., Cacciola, F., Beccaria, M., Dugo, P. & Mondello, L. (2013). Potential of comprehensive chromatography in food analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, **52**: 186–205.
- Troszyńska A., Narolewska, O., Robredo, S., Estrella, I., Hernández, T., Lamparski, G. Amarowicz, R. (2010). The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds, *Food Quality and Preference*, **21**: 463-469.
- Tsakiris, A., Kallithraka, S. & Kourkoutas, Y. (2014). Grape brandy production, composition and sensory evaluation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**: 404-414.
- Tuberoso, C.I.G., Boban, M., Bifulco, E. Budimir, D. & Pirisi, F.M. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of *Cannonau* wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey, *Food Chemistry*, **140**: 686-691.
- Tuberoso, C.I.G., Rosa, A., Bifulco, E., Melias, M.P., Atzeri, A., Pirisi, F.M. & Dessì M.A. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts, *Food Chemistry*, **123**: 1242-1251.
- Tuberoso, C.I.G., Barra, A & Cabras, P. (2008). Effects of different technological processes on the chemical composition of myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts, *European Food Research and Technology*, **226**: 801-808.
- Tuberoso, C.I.G., Melis, M. Angioni, A., Pala, M. & Cabras, P. (2007). Myrtle hydroalcoholic extracts obtained from different selections of *Myrtus communis* L., *Food Chemistry*, **101**: 806-811.
- Tuberoso, C.I.G., Barra, A., Angioni, A., Sarritzu, E., & Pirisi, F.M. (2006). Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts and essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 1420-1426.
- Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., & Amir, R., (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 9559-9570.
- Ugliano M. & Moio, L., (2008). Free and hydrolytically released volatile compounds of *Vitis vinifera* L. cv. Fiano grapes as odour-active constituents of Fiano wine. *Analytica Chimica Acta* **621**: 79–85.
- Urpí-Sardà, M., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M, Jaeger, W., Missits, M., Covas, M-I & Andres-Lacueva, C. (2005). Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid

- chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry Journal*, **77**: 3149-3155.
- Vacca, V., Piga, A., Del Caro, A., Fenu, P.A.M. & Agabbio, M. (2003). Changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity in industrial red myrtle liqueurs during storage, *Nahrung/Food*, **47**: 442 – 447.
- Valderrama, J.O., Faúndez, C. A. & Toselli, L.A. (2012a). Advances on modeling and simulation of alcoholic distillation. Part 1: Thermodynamic modelling, *Food Bioproducts modelling*, **90**: 819-831.
- Valderrama, J.O., Toselli, L.A. & Faúndez, C. A. (2012b). Advances on modeling and simulation of alcoholic distillation. Part 2: Process simulation, *Food Bioproducts modelling*, **90**: 832-840.
- Valls, J., Millán, S., Martí, M.P., Borràs, E. Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, *Journal of Chromatography A*, **1216**: 7143-7172.
- Vázquez-Araujo, L., Rodríguez-Solana, R., Cortés-Díez, S.M. & Domínguez, J.M. (2013). Study of the suitability of two hop cultivars for making herb liqueurs: volatile composition, sensory analysis, and consumer study, *European Food Research and Technology*, **237**: 775-786.
- Vázquez-Araújo, L., Koppel, K., Chambers E., Adhikarina, K. & Carbonell-Barrachina, A.A. (2011). Instrumental and sensory aroma profile of pomegranate juices from the USA: differences between fresh and commercial juice, *Flavour Fragrance*, **26**: 129-138.
- Venturini, C.G., Nicolini, J., Machado, C. & Machado, V.G. (2008). Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas, *Química Nova*, **31**: 360-368.
- Vera-Guzmán A.M., Guzmán-Gerónimo & López, M. G. (2010). Major and minor compounds in a mexican spirit, young mezcal coming from two agave species, *Czech Journal of Food Sciences*, **28**: 127-132.
- Versini, G., Franco, M.A., Moser, S. & Manca, G. (2012). Characterisation of pear distillates from wild and cultivated varieties in Sardinia, *International Journal of Food Science & Technology*, **47**: 2519-2531.
- Versini, G., Moser, S., Franco, M.A. & Manca, G. (2011). Characterisation of strawberry tree distillate (*Arbutus unedo* L.) produced in Sardinia, *Journal of Commodity Science, Technology and Quality*, **50**: 197-206.
- Versini, G., Franco, M.A., Moser, S., Barchetti, P. & Manca, G. (2009). Characterisation of apple distillates from native varieties of Sardinia Island and comparison with other Italian products, *Food Chemistry*, **113**: 1176-1183.
- Versini, G., Seeber, R., Dalla Serra, A., Sferlazzo, G., Carvalho, B. & Reniero, F. (1995a). Aroma compounds of arbutus distillate. In: Food flavors generation, analysis and process influence, (edited by Charalambous). Pp. 1779-1790. London, Elsevier Science.
- Versini, G., Dalla Serra, A., Orriols, I., Inama, S. & Marchio, M. (1995b). Bartlett pear unsaturated ethyl decanoate and C9 compounds among components characterizing cv. Catalan roxo grape marc distillates, *Vitis*, **34**: 57-62.
- Vichi, S.; Riu-Aumatell, M., Mora-Pons, M.; Buxaderas, S. & López-Tamames, E. (2005). Characterization of volatiles in different dry gins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 10154-10160.
- Villière, A., Arvisenet, G., Lethuaut, L., Prost, C. & Sérot, T. (2012). Selection of a representative extraction method for the analysis of odourant volatile composition of French cider by GC-MS-O and GC-TOF-MS, *Food Chemistry*, **131**: 1561-1568.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J.A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**: 635-654.

- Viskupičová, J., Ondrejovič, M. & Šturdik, E. (2008). Bioavailability and metabolism of flavonoids, *Journal of Food and Nutrition Research*, **47**: 151-162.
- Vriesekoop, F., Rathband, A., Mackinlay, J. & Bryce, J.H. (2010). The evaluation of dextrans during the mashing and fermentation of all-malt whisky production, *Journal of the Institute of Brewing*, **116**: 230-238.
- Wang, C., Delcros, J-G. Cannon, L., Konate, F., Carias, H., Biggerstaff, J., Gardner, R. A. & Otto, IV, (2003). Defining the Molecular Requirements for the Selective Delivery of Polyamine Conjugates into Cells Containing Active Polyamine Transporters, *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**: 5129-5138.
- Wang, J-F; Ma, L., Xi, H-F; Wang, L-J. & Li, S-H. (2015). Resveratrol synthesis under natural conditions and after UV-C irradiation in berry skin is associated with berry development stages in 'Beihong' (V. vinifera _ V. amurensis), *Food Chemistry*, **168**: 430-438.
- Wang, H., Cao, G. & Pior, R.L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 304-309.
- Wagner, B.D.; Boland, P.G., Lagona, J. & Isaacs, L. (2005). A cucurbit[6]uril analogue: host properties monitored by fluorescence spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry B*, **109**: 7686 – 7691.
- Xia, E-Q., Deng G-F., Guo, Y-J. & Li, H-B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 622-646.
- Xiao, Z., Yu, D., Niu, Y., Chen, F., Song, S, Zhu, J. & Zhu, G. (2014). Characterization of aroma compounds of Chinese famous liquors by gas chromatography–mass spectrometry and flash GC electronic-nose, *Journal of Chromatography B*, **945– 946**: 92– 100.
- Xiaowei, H, Xiaobo, Z., Jiewen, Z., Jiyong, S., Xiaolei, Z. & Holmes, M. (2014). Measurement of total anthocyanins content in flowering tea using near infrared spectroscopy combined with ant colony optimization models, *Food Chemistry*: **164**: 536– 543.
- Yamamoto, H., Mizutani, M., Yamada, K., Iwaizono, H. & Takayama, K. (2012). Characteristics of aromatic compound production using new shochu yeast MF062 isolated from shochu mash, *Journal of the Institute of Brewing*, **118**: 406-411.
- Yilmaz, E. & Soylak, M. (2014). Development a novel supramolecular solvent microextraction procedure for copper in environmental samples and its determination by microsampling flame atomic absorption spectrometry, *Talanta*, **126**: 191-195.
- Yoshizaki, Y., Takamine, K., Shimada, S., Uchihori, K., Okutsu, K., Tamaki, H., Ito, K., & Sameshima, Y. (2011). The Formation of β -Damascenone in Sweet Potato *Shochu*, *Journal of the Institute of Brewing*, **117**: 217–223.
- You, L., Zha, D. & Anslyn, E.V. (2015). Recent advances in supramolecular analytical chemistry using optical sensing, *Chemical Reviews*, **115**: 7840-7892.
- Yu, Z., Dahlgren, R.A. & Northup R.R. (1999). Evolution of soil properties and plant communities along an extreme edaphic gradient, *European Journal of Soil Biology*, **35**: 31-38.
- Yucesoy, D. & Ozen, B. (2013). Authentication of a Turkish traditional aniseed flavoured distilled spirit, raki, *Food Chemistry*, **141**: 1461-1465.
- YunFeng, C. & YuanJiang, P. (2014). The effect of cation size (H^+ , Li^+ , Na^+ , and K^+) on McLafferty-type rearrangement of even-electron ions in mass spectrometry, *Science China Chemistry*, **57**: 662-668.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A. & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention, *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**: 675-685.
- Zakhari, S. & Li, T. (2007). Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease, *Hepatology*, **46**: 2032-2039.

- Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In: Wine chemistry and biochemistry, (edited by Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C.). Pp-3-26. Springer, Madrid.
- Zavareze, E.R. & Dias, A.R.G. (2011). Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review, *Carbohydrate Polymers* **83**: 317–328.
- Zhang, S., Liu, J, Chen, Y., Xiong, S., Wang, G. Chen, J. & Yang, G. (2010). A novel strategy for MALDI-TOF MS analysis of small molecules, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **21**: 154-160.
- Zhang, M., Shi, Z., Bai, Y, Gao, Y, Hu, R. & Zhao, F. (2006). Using molecular recognition of beta-cyclodextrin to determine molecular weights of low-molecular-weight explosives by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **17**: 189-193.
- Zhao, Y.P., Wang, L., Li, J.M., Pei, G.R. & Liu, Q.S. (2011). Comparison of volatile compounds in two brandies using HS-SPME coupled with GC-O, GC-MS and sensory evaluation, *South African Journal of Enology and Viticulture*, **32**: 9-20
- Zhao, Q., Duan, C-Q. & Wang, J., (2010). Anthocyanins Profile of Grape Berries of *Vitis amurensis*, its hybrids and their wines, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 2212-2228.
- Zhao, Y., Xu, Y., Li, J., Fan, W. & Jiang, W. (2009). Profile of volatile compounds in 11 brandies by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Food Science*, **74**: C90-C99.
- Zhang, C., Ao, Z., Chui, W., Shen, C., Tao, W. & Zhang, S. (2011). Characterization of volatile compounds from Daqu-a traditional Chinese liquor fermentation starter, *International Journal of Food Science and Technology*, **46**: 1591–1599.
- Zhang, H., Woodams, E.E & Yong, D. Hang, Y.D. (2012). Factors affecting the methanol content and yield of plum brandy, *Journal of Food Science*, **77**: T79-T82.
- Zhang, R., Wu, Q & Xu, Y. (2013). Aroma characteristics of Moutai-flavour liquor produced with *Bacillus licheniformis* by solid-state fermentation, *Letters in Applied Microbiology*, **57**: 11-18.
- Zhang, Y-X Li, Q-Y, Yan, L-l. & Shi, Y., (2011). Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales, *Bioresource Technology*, **102**: 4573-4579.
- Zheng, X-W, Yan, Z., Han, B-Z, Zwietering, M.H., Samson, R.A., Boekhout, T. & Nout, M.J.R. (2012). Complex microbiota of a Chinese “Fen” liquor fermentation starter (Fen-Daqu), revealed by culture-dependent and culture-independent methods, *Food Microbiology*, **31**: 293-300.
- Zheng, H-Z., Hwang, I-W & Chung, S-K. (2009). Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes, *Journal of Zhejuang University Science B*, **10**: 912-919.
- Zhu, S., Lua, X., Ji, K., Guo, K., Li, Y., Wu, C., Xu, G. (2007). Characterization of flavor compounds in Chinese liquor Moutai by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **597**: 340-348.
- Ziółkowska, A. & Jelén, H.H. (2012). Differentiation of raw spirits of rye, corn and potato using chromatographic profiles of volatile compounds, *Journal of Science and Food Agricultural*, **92**: 2630-2637.
- Zizumbo-Villarreal, D., Vargas-Ponce, O., Rosales-Adame, J.J., Colunga-GarcíaMarín, P. (2013). Sustainability of the traditional management of Agave genetic resources in the elaboration of mezcal and tequila spirits in western Mexico, *Genetic Resources and Crop Evolutions*, **60**: 33–47.

