



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Carla Alexandra Correia Gomes

**CARATERIZAÇÃO DE UÍQUES DE  
DIFERENTES ORIGENS GEOGRÁFICAS COM  
BASE EM TÉCNICAS FLUORESCENTES  
RESOLVIDAS TEMPORALMENTE E HPLC-  
DAD.**

Dissertação apresentada no âmbito do Mestrado em Química Forense, orientada pelo Professor Doutor João Sérgio Seixas de Melo e pela Doutora Telma Sofia Martins Costa, e apresentada à Universidade de Coimbra, ao Departamento de Química.

Setembro de 2023



### Whisky

- 1 Crown Royal (CR)
- 2 Abasolo (ABA)
- 3 Stok Club Straight (SCST)
- 4 Stork Club Smoky (SCSM)
- 5 Bud Spencer (BS)
- 6 Evan Williams (EW)
- 7 Wild Turkey (WT)
- 8 Four Rosés (FR)

- 9 Cutty Sark (CS)
- 10 Grant's (GT)
- 11 Mac-Talla (MT)
- 12 Burberrys 12 anos (BB12)
- 13 Burberrys 15 anos (BB15)
- 14 The Deveron (DV)
- 15 Ballantine's (BL)
- 16 Glenfiddich (GL)
- 17 The Ardmore (ARD)
- 18 Dewar's (DW)

- 19 Armorik (ARM)
- 20 Amrut (AMR)
- 21 Jameson (JM)
- 22 West Cork Blended (WCB)
- 23 West Cork Single (WCS)
- 24 Togouchi (TG)
- 25 The Kurayoshi (KU)
- 26 Kavalan (KV)
- 27 Motörhead 1 (MOT1)
- 28 Motörhead 2 (MOT2)

### Origem

- |   |  |
|---|--|
|  Canadá    |  Índia    |
|  México    |  Irlanda  |
|  Alemanha |  Japão   |
|  USA     |  Taiwan |
|  França  |  Suécia |
|  Escócia |  |

## CARATERIZAÇÃO DE UÍQUES DE DIFERENTES ORIGENS GEOGRÁFICAS COM BASE EM TÉCNICAS FLUORESCENTES RESOLVIDAS TEMPORALMENTE E HPLC- DAD.

Carla Alexandra Correia Gomes

*"The scariest moment is always just before you start."*

*Stephen King*

## Agradecimentos

Com o finalizar de mais uma etapa, não podia deixar de manifestar os meus mais sinceros agradecimentos a algumas pessoas.

No geral, a todos os que me acompanharam neste longo percurso e que contribuíram com o seu apoio e incentivo, o meu maior obrigada!

Em particular,

Ao Professor Doutor J. Sérgio Seixas de Melo, orientador do estágio e autor do tema, pela oportunidade de realizar a tese no seu grupo de investigação, pelo incentivo e auxílio oferecido ao longo deste longo ano.

À Doutora Telma Costa, coorientadora do estágio, pela disponibilidade, incentivo, compreensão, paciência e apoio durante a realização da dissertação e do trabalho laboratorial.

Aos meus colegas de laboratório, de gabinete, de almoço, de visitas turísticas, de lutas e conquistas, futuros e atuais Doutores Ana Clara Beltran, Carla Cunha, Mariana Peixoto, Paulo Barradas, Ricardo Pereira e Gabriel Marques por todos os ensinamentos e por tudo o resto. Estou eternamente agradecida por me terem ajudado sempre que podiam, sei que vos tirei muito tempo. Em particular à Carla, ao Paulo e à Ana por terem ajudado a resolver todos os meus problemas e ainda algumas crises existenciais. Foram sem dúvida os que mais sofreram comigo. Um imenso obrigada!

Ao Professor Doutor Alberto Canelas Pais, à Doutora Tânia Firmino e à Simone por toda ajuda e complacência no apoio às análises quimiométricas.

Às Doutora Susana Lopes e Giussi e à Catarina pela ajuda com o HPLC.

Aos meus pais, à minha irmã e à restante família por acreditarem em mim e me terem dado a oportunidade de seguir o caminho que escolhi para mim e me trouxe até aqui. A eles agradeço o apoio, incentivo e conselhos prestados ao longo do meu percurso académico.

Às amigas que Coimbra me deu para a vida toda, Francisca, Janeiro e Quinteiro obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelos desabafos, pelas saídas, pelas viagens ao mundo, pelas peripécias e memórias. Foram longos anos passados na mesma luta.

E por fim, ao Diogo que foi quem mais sofreu e presenciou de perto os meus desesperos nestes últimos dois anos. A ti, obrigada por todo o carinho, motivação, compaixão e por fazeres com que os dias maus fiquem melhores.

# Tabela de Conteúdos

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>4</b>
<b>TABELA DE CONTEÚDOS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1 UÍSQUES: BEBIDAS ESPIRITUOSAS</b>	<b>16</b>
<b>MATÉRIAS-PRIMAS</b>	<b>24</b>
<b>1.2 COMPOSIÇÃO</b>	<b>26</b>
1.2.1 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS, ÉSTERES E ÁLCOOIS	27
1.2.2 FENÓIS	29
1.2.3 LACTONAS	30
1.2.4 ALDEÍDOS	31
1.2.5 COMPOSTOS NITROGENADOS E SULFÚRICOS	32
<b>1.3 PROCESSOS DE ENVELHECIMENTO</b>	<b>33</b>
<b>1.4 COMPONENTES E PROPRIEDADES DA MADEIRA</b>	<b>34</b>
<b>1.5 REAÇÕES QUÍMICAS ENTRE OS COMPONENTES DA MADEIRA E OS UÍSQUES</b>	<b>36</b>
<b>1.6 AUTENTICAÇÃO DA MARCA</b>	<b>37</b>
<b>1.7 OBJETIVOS DO TRABALHO</b>	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>46</b>
<b>MATERIAIS, MÉTODOS E TÉCNICAS INSTRUMENTAIS</b>	<b>46</b>
<b>SUBCAPÍTULO I</b>	<b>47</b>
<b>2.1 ABSORÇÃO DE LUZ UV-VIS: ASPETOS FUNDAMENTAIS</b>	<b>47</b>
<b>2.2 CARACTERÍSTICAS DA FLUORESCÊNCIA</b>	<b>50</b>
<b>2.2.1 FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO (ESTADO DINÂMICO)</b>	<b>51</b>
<b>2.2 INSTRUMENTAÇÃO</b>	<b>55</b>
<b>2.2.1 ESPETROS DE ABSORÇÃO UV-VIS</b>	<b>55</b>
<b>2.2.2 FLUORESCÊNCIA NO ESTADO ESTACIONÁRIO</b>	<b>55</b>
<b>2.2.3 NS-TCSPC</b>	<b>55</b>

<b>2.2.4 ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE TRANSIENTE DE FEMTOSEGUNDO (FS-TA)</b>	<b>56</b>
<b>2.2.5 FLIM</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>58</b>
<b>SUBCAPÍTULO II</b>	<b>60</b>
<b>2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)</b>	<b>60</b>
<b>2.4 REAGENTES E SOLVENTES</b>	<b>61</b>
<b>2.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES</b>	<b>61</b>
<b>2.5.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS</b>	<b>61</b>
<b>2.5.2 SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA A 40% E SOLUÇÕES PADRÃO</b>	<b>62</b>
<b>2.5.3 FASE MÓVEL</b>	<b>62</b>
<b>2.5.4 EQUIPAMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE</b>	<b>62</b>
<b>2.5.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS</b>	<b>62</b>
<b>2.5.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>64</b>
<b>SUBCAPÍTULO III</b>	<b>66</b>
<b>2.7 QUIMIOMETRIA: ASPETOS FUNDAMENTAIS</b>	<b>66</b>
<b>2.8 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS</b>	<b>67</b>
<b>2.8.1 HCA</b>	<b>67</b>
<b>2.8.2 PCA</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>72</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
<b>3.1 ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS</b>	<b>73</b>
<b>3.2 FLUORESCÊNCIA EM ESTADO ESTACIONÁRIO</b>	<b>76</b>
<b>3.3 FLUORESCÊNCIA EM ESTADO DINÂMICO: FLIM</b>	<b>79</b>
<b>3.4 FLUORESCÊNCIA EM ESTADO DINÂMICO: FS-TA</b>	<b>81</b>
<b>3.5 HPLC-DAD</b>	<b>84</b>
<b>3.6 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA</b>	<b>89</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>98</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>101</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>104</b>
<b>FIGURA A.1: ESPETROS DE ABSORÇÃO DOS 28 UÍSQUES ESTUDADOS, COM INDICAÇÃO DA RESPETIVA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA</b>	<b>104</b>
<b>FIGURA A.2: ESPETROS DE FLUORESCÊNCIA DE EMISSÃO E EXCITAÇÃO DOS 28 UÍSQUES ESTUDADOS, BEM COMO DOS PADRÕES</b>	<b>113</b>

<b>FIGURA A.3: ESPETROS DE ABSORÇÃO EM HPLC-DAD DOS 7 PADRÕES E DA MISTURA COMPARADOS COM OS TEMPOS DE RETENÇÃO ASSOCIADOS A CADA COMPOSTO</b>	<b>116</b>
<b>FIGURA A.4: DENDOGRAMAS DA ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS REPRESENTADO AS SIMILARIDADES ENTRE OS 28 UÍSQUES RELATIVAS AO PAÍS DE ORIGEM, OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES TÉCNICAS: HPLC (ÁREA DOS PICOS, % DE ÁREA E TEMPO DE RETENÇÃO), FS-TA E FLIM.</b>	<b>117</b>
<b>FIGURA A.5: DENDOGRAMAS DA ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS REPRESENTADO AS SIMILARIDADES ENTRE OS 28 UÍSQUES RELATIVAS À CATEGORIA, OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES TÉCNICAS: HPLC (ÁREA DOS PICOS, % DE ÁREA E TEMPO DE RETENÇÃO), FS-TA E FLIM.</b>	<b>118</b>
<b>FIGURA A.6: DENDOGRAMAS DA ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS REPRESENTADO AS SIMILARIDADES ENTRE OS 28 UÍSQUES RELATIVAS AO TEMPO DE ENVELHECIMENTO, OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES TÉCNICAS: HPLC (ÁREA DOS PICOS, % DE ÁREA E TEMPO DE RETENÇÃO), FS-TA E FLIM.</b>	<b>119</b>
<b>FIGURA A.7: DENDOGRAMA DA ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS REPRESENTADO AS SIMILARIDADES ENTRE OS 27 UÍSQUES RELATIVAS AO TEMPO DE ENVELHECIMENTO, OBTIDOS ATRAVÉS DE HPLC (ÁREA DOS PICOS A 280 NM).</b>	<b>120</b>
<b>TABELA A.1: TEMPOS DE DECAIMENTO <math>T_1</math>, <math>T_2</math> E <math>T_3</math> E RESPECTIVOS PRÉ-EXPONENCIAIS <math>A_1</math>, <math>A_2</math> E <math>A_3</math> E CONTRIBUIÇÕES <math>A_1</math>, <math>A_2</math> E <math>A_3</math> OBTIDOS PARA OS 4 UÍSQUES MEDIDOS COM NS-TCSPC, EXCITAÇÃO A 373 NM.</b>	<b>121</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Fabricação de uísque: alambique de Cu (pot still) vs. alambique de coluna (column still).....	18
Figura 1.2 – Estruturas químicas dos ácidos fenólicos retratados ao longo deste trabalho .....	27
Figura 1.3 – Estruturas químicas dos aldeídos fenólicos retratados ao longo deste trabalho.....	30
Figura 1.4 - 3-Metil-4-octanolídeo, isómeros cis e trans, respetivamente .....	30
Figura 1.5 – Estrutura química dos aldeídos furânicos retratados ao longo deste trabalho .....	32
Figura 2.1 - Diagrama de Jablonski-Pérrin, representando os diversos níveis de energia vibracionais (linhas a preto finas) e eletrônicos (linhas a preto grossas) decorrentes de uma excitação eletrónica e os processos de desativação deles resultantes .....	48
Figura 2.2 - Sistema de aquisição de dados FLIM adotado neste trabalho .....	54
Figura 2.3 - Filtração de uma amostra de uísque através de uma membrana porosa 0.45 µm diretamente para o vial de HPLC .....	61
Figura 2.4 - HCA: exemplo de dendrograma de agrupamento hierárquico .....	68
Figura 2.5 - PCA: novo eixo ao longo do qual a variância é maximizada .....	69
Figura 3.1 - Espetros de absorção UV-vis: a) dos padrões diluídos em 40% etanol ( $c=10^{-4}$ M), b) dos uísques puros, c) dos uísques diluídos 1:10 em 40% etanol .....	73
Figura 3.2 - Espetros de emissão (lado esquerdo) e excitação (lado direito) de fluorescência dos uísques Kavalan e Jameson obtidos com diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão, respetivamente .....	77
Figura 3.3 – Representação do a) comprimento de emissão máximo em função do comprimento de onda de excitação para os 28 uísques e b) comprimento de emissão máximo em função do tempo de envelhecimento, quando $\lambda_{exc} = 380$ nm .....	78
Figura 3.4 - Curvas de decaimento de seis amostras de uísque obtidas com $\lambda_{exc} = 375$ nm e com dois filtros ET445/58 e LP390 .....	80
Figura 3.5 – a) Tempos de decaimento $\tau_1$ , $\tau_2$ e $\tau_3$ em função da ordem crescente de $\tau_1$ e b) respetivos pré-exponenciais $a_1$ , $a_2$ e $a_3$ obtidos para os 28 uísques com os filtros ET445 e LP390 .....	80
Figura 3.6 - Contribuição de cada uma das componentes no decaimento, calculadas segundo $c_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n a_i \tau_i}$ , $i = 1 - 3$ .....	81
Figura 3.7 – Representação das componentes $c_1$ , $c_2$ e $c_3$ agrupadas por envelhecimento (a), categoria (b) e país (c) .....	81
Figura 3.8 - Espetros de absorção de transiente obtidos com diferentes tempos .....	82
Figura 3.9 - Cromatogramas obtidos pela análise de HPLC da a) mistura dos padrões e b) de uma amostra de uísque (ARD) a 254, 280 e 320 nm. AG - ácido gálico; 5-HMF – 5-hidroximetilfurfural; F - furfural, AV - ácido vanílico; AS - ácido siríntrico; V – vanilina; SE – siringaldeído; CO – coniferaldeído; SI – sinapaldeído .....	85

Figura 3.10 – Cromatograma obtido pela análise de HPLC para amostra de uísque Jameson (JM) .....	89
Figura 3.11 – a) Dendograma da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 27 uísques relativas às áreas integradas de HPLC (254 nm) considerando os seus perfis químicos. As diferentes cores representam os vários grupos formados (k=5). b) PCA para os uísques com representação dos scores relativos às áreas dos picos em estudo. c) Relação entre as variáveis e as componentes principais PC1 e PC2 .....	92
Figura 3.12 - a) Dendograma da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 28 uísques relativas aos tempos de vida obtidos por fs-TA. As diferentes cores representam os vários grupos formados (k=5). b) PCA para os uísques com representação dos scores relativos aos tempos de vida. c) Impacto das variáveis originais nas duas componentes principais .....	94
Figura 3.13 -a) Dendograma da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 27 uísques relativas aos tempos de vida obtidos por FLIM. As diferentes cores representam os vários grupos formados (k=5). b) PCA para os uísques com representação dos scores relativos aos tempos de vida. c) Impacto das variáveis originais nas duas componentes principais .....	96

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Matérias-primas e método de destilação utilizados na produção de uísques de acordo com a origem geográfica.....	23
Tabela 1.2 – Resumo das diferenças entre os cinco tipos principais de uísque .....	23
Tabela 1.3 – Descrição das 28 amostras de uísques estudadas, incluindo código, destilaria, idade (se conhecida) e barril utilizado .....	40
Tabela 2.1 – Gradiente utilizado na análise por HPLC: Solvente A – água/ácido fórmico (98:2 v/v); Solvente B – metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v) .....	63
Tabela 3.1 – Absorvância a 275 nm ( $A_{275nm}$ ), absorvância a 375nm ( $A_{375nm}$ ) e razão entre as absorvâncias ( $R=A_{375nm}/A_{275nm}$ ) a estes comprimentos de onda para os uísques puros (concentrados) e diluídos numa razão de 1:10 .....	75
Tabela 3.2 – Comprimento de onda de emissão de fluorescência máxima ( $\lambda_{em}^{max}$ ) do AG, 5-HMF, F, AV, AS, SE, CO e numa mistura equimolar ( $10^{-5}M$ ) dos 7 padrões, em solução aquosa com 40% etanol .....	78
Tabela 3.3 - Tempos de decaimento transiente obtidos através da análise global dos decaimentos.....	83
Tabela 3.4 - Tempos de decaimento transiente $\tau_1$ obtidos através da análise global dos decaimentos de soluções dos compostos padrão em solução aquosa com 40% etanol, $c=10^{-4}M$ .....	84
Tabela 3.5 – Tempos médios de retenção dos compostos analisados nos uísques.....	86
Tabela 3.6 – Tabela com as áreas em percentagem calculadas para cada pico identificado em HPLC-DAD, atribuídos aos compostos analisados nos diferentes uísques .....	88
Tabela 3.7 – Labels usadas na análise quimiométrica .....	90

## Resumo

Os uísques são bebidas destiladas produzidas através destilação de cereais fermentados e amadurecidos em barris de madeira incluindo uma variedade de congêneres (compostos responsáveis pelo sabor): álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, compostos carbonil alifáticos, compostos de enxofre e sulfetos alifáticos, compostos nitrogenados heterocíclicos, uma ampla gama de compostos fenólicos simples, aldeídos fenólicos e compostos de oxigênio heterocíclico. Esses ditos congêneres, que são responsáveis pelo perfil sensorial do uísque, dependem da interação lignina-etanol que ocorre durante os processos de fermentação e maturação. Com o avanço das técnicas cromatográficas e do seu acoplamento com a espectrometria de massa, o número de compostos identificados nos uísques aumentou drasticamente.

Os métodos analíticos baseados na espectroscopia UV-vis e fluorescência foram relatados como tendo um grande potencial para abordar questões relacionadas com a autenticação e classificação de bebidas destiladas. Recentemente, foi reportada a importância dos processos de decaimento ultra-rápidos de fluorescência como fonte de informação em uísques. Por ser potencialmente diferenciadora, esta técnica foi usada neste trabalho. De forma a determinar e quantificar os componentes de diferentes uísques, a técnica de HPLC-DAD foi usada com recurso a compostos padrão para comparação dos tempos de retenção ( $t_r$ ) dos principais componentes do uísque. Das áreas integradas foi possível efetuar uma atribuição da maior ou menor percentagem de compostos nos diferentes uísques.

Neste trabalho foram selecionadas 28 amostras de uísques comercializados de 11 países diferentes, consistindo em 10 amostras de uísque escocês, 3 amostras de uísque irlandês, 3 de uísque americano (Bourbon), 2 de uísque japonês, 3 de uísque alemão, 2 da Suécia e 1 da França, Índia, Taiwan, Canadá e México. Estas amostras foram estudadas recorrendo a espectroscopia UV-vis, fluorescência, HPLC-DAD, microscopia de fluorescência temporalmente resolvida (FLIM) e espectroscopia de absorção de transiente femtosegundo (fs-TA), com o objetivo de complementar a informação obtida por técnicas tradicionalmente utilizadas no estudo de uísques com duas técnicas inovadoras neste tipo de aplicação: FLIM e fs-TA.

Os dados obtidos de diferentes marcas de uísques mostraram componentes de decaimento rápido inferiores a 10 ps com o pré-exponencial dominante. Acredita-se que

estes valores são característicos dos congêneres resultantes do processo de maturação, ou seja, da decomposição da lignina em compostos fenólicos (vanilina, ácido siríngico, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído) e de taninos hidrolisáveis e os seus produtos, como o ácido gálico.

Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas foram analisados por HCA e PCA para se observarem as tendências no conjunto de dados.

## Abstract

Whiskies are distilled beverages produced through the distillation of fermented cereals matured in wooden barrels and include a variety of congeners (compounds responsible for the taste): alcohols, carboxylic acids, esters, aliphatic carbonyl compounds, sulfur compounds and aliphatic sulfides, heterocyclic nitrogen compounds, a wide range of simple phenolic compounds, phenolic aldehydes and heterocyclic oxygen compounds. These congeners, which are responsible for the sensory profile of whisky, depend on the lignin-ethanol interaction that occurs during the fermentation and maturation processes. With the advance of chromatographic techniques and their coupling with mass spectrometry, the number of compounds identified in whiskies has increased dramatically.

Analytical methods based on UV-vis and fluorescence spectroscopy have been reported to have great potential for addressing issues related to the authentication and classification of distilled spirits. Recently, the importance of ultrafast fluorescence decay processes as a source of information in whiskies has been reported. As it is potentially differentiating, this technique was used in this work. In order to determine and quantify the components of different whiskies, the HPLC-DAD technique was used with standard compounds to compare the retention times ( $t_r$ ) of the main whisky components. From the integrated areas, it was possible to assign the highest or lowest percentage of compounds in the different whiskies.

In this work, 28 samples of whiskies marketed from 11 different countries were selected, consisting of 10 samples of Scotch whisky, 3 samples of Irish whisky, 3 of American whisky (Bourbon), 2 of Japanese whisky, 3 of German whisky, 2 from Sweden and 1 each from France, India, Taiwan, Canada and Mexico. These samples were studied using UV-vis spectroscopy, fluorescence, HPLC-DAD, fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) and femtosecond transient absorption spectroscopy (fs-TA), with the aim of complementing the information obtained by techniques traditionally used in the study of whiskies with two innovative techniques in this type of application: FLIM and fs-TA.

The data obtained from different whisky brands showed rapid decay components of less than 10 ps with the dominant pre-exponential. It is believed that these values are characteristic of the congeners resulting from the maturation process, i.e. the breakdown

of lignin into phenolic compounds (vanillin, syringic acid, syringaldehyde, coniferaldehyde, sinapaldehyde) and hydrolysable tannins and their products, such as gallic acid.

The results obtained by the different techniques were analyzed by HCA and PCA to observe trends in the data set.

Capítulo I

**Introdução**

## 1.1 Uísques: bebidas espirituosas

Uísque (whisky ou whiskey - comumente usado na Irlanda e nos EUA) é das bebidas espirituosas mais populares em todo o mundo, feita a partir de grãos maltados ou sacarificados pela diástase do malte neles contido <sup>[1]</sup>. O malte considera-se ser qualquer grão que foi deixado germinar e depois seco.

As regulamentações da União Europeia definem o uísque como uma bebida espirituosa produzida a partir da destilação de um mosto de cereais maltados (mistura de milho, cevada maltada, trigo e/ ou centeio) que tenha sido sacarificado pela diástase do malte e fermentado pela ação da levadura. Deve ser mantida em barris de carvalho com capacidade não superior a 700 L, onde ficará a maturar por um período mínimo de 3 anos <sup>[2]</sup>. A destilação é conduzida a menos de 94,8% em volume para reter o aroma e o sabor derivados das matérias-primas utilizadas e apenas água e caramelo simples (para colorir) podem ser adicionados ao destilado. O teor alcoólico mínimo em volume deverá ser de 40% <sup>[3, 4]</sup>.

Tratando-se de bebidas com características específicas, e sendo obtidas por diferentes processos, existem variados tipos de uísques conforme sejam definidos com base nos padrões de produção, armazenamento e processamento (*Blended, Malt, Single Malt, Rye, Bourbon*) ou definidos como produtos distintivos de certos países (*Scotch, Canadian, Irish*). Para além disso, o sabor do uísque irá depender do tipo de barril usado e da qualidade da madeira, do solo, da vegetação, do clima, da água, dos vapores do mar e das algas. A composição do uísque também muda com o tempo e com as etapas de processamento <sup>[5]</sup>.

Apesar de os egípcios já usarem destilados, isto é, bebidas alcoólicas purificadas através do processo de destilação a partir de uma matéria fermentada, crê-se (alegadamente) ser a Irlanda o berço do uísque <sup>[6]</sup>. No século VI dC., monges já produziam álcool destilado chamado ‘uisge beatha’ (água da vida), destilado a partir da fermentação de frutos, a fim de servir propósitos medicinais. Em 1736 terá mudado de nome para ‘uísque’ e no século IX chegou à Escócia através dos monges, onde a arte da destilação se difundiu. Nesta altura, como a produção já era abundante, começou a ser tributado pelo governo britânico. O pagamento de taxa levou a um exponencial crescimento da produção ilegal e, conseqüentemente, à diversificação e adulteração da bebida. Por vezes, cevada maltada era substituída por batatas e melão. A cevada era também seca com forte fumaça de turfa, durante curtos períodos de tempo, para que o uísque tivesse o aroma de turfa,

batatas e melão <sup>[7]</sup>. Os altos impostos, restrições, guerras e fome forçaram muitos irlandeses e escoceses a migrar para o Canadá e para os Estados Unidos, com quem compartilharam as suas técnicas de destilação. Após alguns anos, entre 1784 e 1823, os governos adaptaram os regulamentos acabando com o contrabando <sup>[5]</sup>.

Alguns anos mais tarde, Coffey, um fiscal irlandês, introduziu uma significativa melhoria no processo de produção de uísque através do desenvolvimento do alambique contínuo. Este avanço permitiu a produção em grande escala e passou a ser utilizado por vários destiladores escoceses. Os alambiques contínuos simplificaram o processo de mistura, facilitaram a separação dos congêneres (componentes responsáveis pelo sabor) e permitiram concentrar o teor alcoólico. Os alambiques tornaram-se, assim, a fonte de sabor do uísque. Os irlandeses, preferindo os seus uísques três vezes destilados, suaves e saborosos, não adotaram esse método <sup>[5]</sup>. Porém, com a popularidade da bebida renovada, a adulteração dos uísques ganhou forma levando ao uso de várias substâncias, inclusive nocivas ao organismo humano, como o metanol (álcool da madeira) <sup>[6, 8]</sup>.

No início do século XX, após constituição da Associação de Uísques Escoceses, era comum, na produção de uísques, o uso de cinco cereais – milho, cevada, aveia, trigo e centeio, o que culminou na criação de três tipos de uísque como o conhecemos hoje: *blended*, grão e malte. *Blended* é uma mistura de grão e malte, o grão resulta de um puré/mosto de diferentes grãos e o malte é feito de cevada maltada (cevada crua que foi embebida, germinada e depois seca para interromper o processo de germinação) <sup>[1, 5]</sup>.

Os processos de produção variam dependendo do tipo de uísque, mas todos envolvem moagem, esmagamento, fermentação e destilação para produzir as bebidas. Em geral os diferentes grãos são macerados e moídos em água durante algum tempo. A maceração vai decompor o amido da cevada em açúcares produzindo um líquido doce, o mosto. Na Escócia, a cevada é embebida em água e depois seca com queima de turfa (material vegetal), afetando a sua composição. Posteriormente, ao mosto arrefecido são adicionadas leveduras com o objetivo de transformar os açúcares em álcool e dióxido de carbono. Após este passo, chamado de fermentação, a percentagem de álcool no mosto encontra-se entre 5 e 10%. Este produto é então destilado duas ou três vezes para separar o álcool da água no líquido fermentado, e para obter o álcool (70% v/v) com os sabores e aromas desejados. A destilação é realizada num alambique (*still*) que pode ser de 2 tipos: em estilo de panela (*pot still*) – alambique de cobre, ou em contínuo (*column still*) – alambique de coluna, Figura 1.1 <sup>[9]</sup>. O cobre é usado tradicionalmente por ser um bom

condutor de calor e extrair enxofre do destilado. Neste sistema, o fermento é aquecido na base, depois evapora ao longo do pescoço e vai condensar em líquido no condensador. No segundo sistema, o alambique é continuamente aquecido e, quando o fermento é colocado na parte fria, este aquece, vaporiza e entra no analisador, passando por entre as placas perfuradas, onde o vapor irá extrair o álcool e os aromas, enviando-os para cima. As placas condensam as partículas mais pesadas deixando apenas passar o vapor de álcool para o condensador [9, 10]. Após este processo, o designado *espírito* é colocado em barris de madeira onde fica a envelhecer durante vários anos até ser, posteriormente, engarrafado [11].

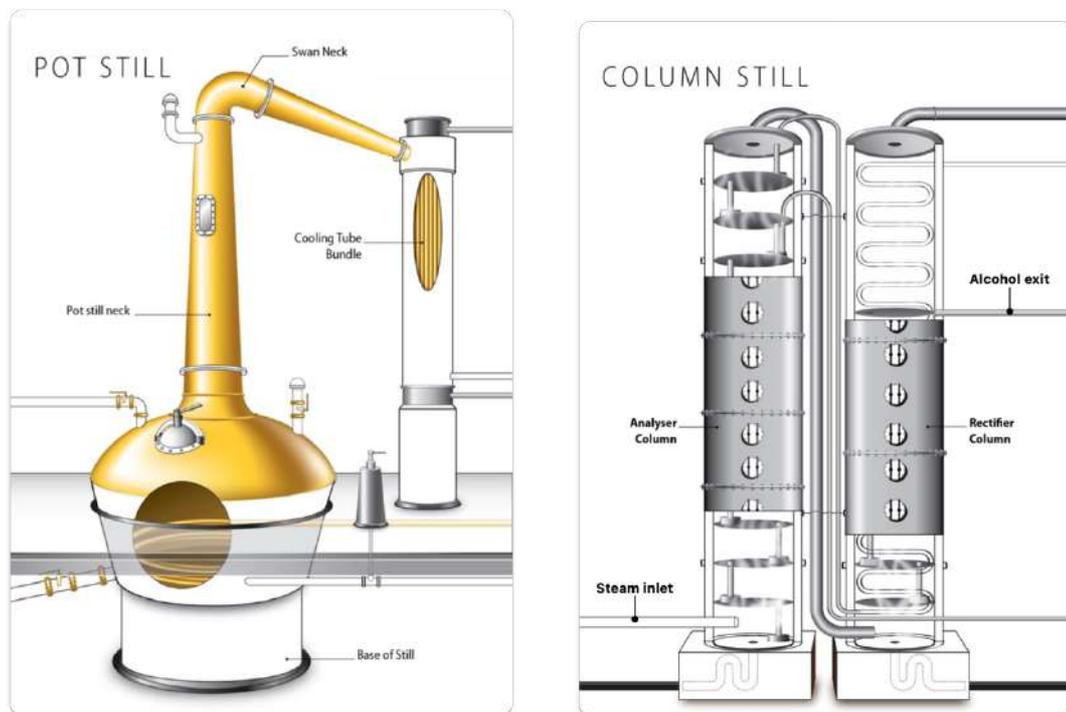


Figura 1.1 - Fabricação de uísque: alambique de Cu (pot still) vs. alambique de coluna (column still)

Fonte: adaptado da página da Wines & Spirits Academy [9]

Em 2009, foram estabelecidos Regulamentos que estabeleceram a definição de uísque escocês [12]. De acordo com estes Regulamentos, uísque escocês é aquele que é destilado na Escócia a partir de água e malte de cevada, ao qual apenas grãos inteiros de outros cereais podem ser adicionados, os quais foram transformados em mosto (puré), convertidos em substrato fermentável por enzimas endógenas (malte) e fermentados apenas pela adição de levedura. Para que possa ser chamado *Scotch* tem obrigatoriamente de ser destilado e envelhecido, na Escócia, pelo menos três anos em barris de carvalho com capacidade igual ou inferior a 700 litros.

Os regulamentos distinguem cinco categorias de *Scotch Uísque* – *single malt*, *single grain*, *blended malt*, *blended grain* e *blended Scotch Uísque*. Na prática, os 3 produtos mais distintos são o malte, o grão e a mistura. O primeiro caracteriza os uísques produzidos exclusivamente a partir de cevada de malte, *grain* (grão) são aqueles produzidos a partir de uma mistura de grãos de cereais não maltados (cevada, trigo e milho) e o *blended* representa aqueles que resultam de uma mistura de 60 a 70% de *grain* com 30 a 40% de *malt*, podendo conter até 50 uísques de malte diferentes. O uísque de malte é sempre de cevada, destilado em alambique de cobre, o uísque de grãos é produzido numa coluna por destilação contínua. *Single malt* e *single grain* significa que são provenientes apenas duma destilaria <sup>[10]</sup>.

Os maltes escoceses têm um caráter diferente dependendo se são da costa oeste, onde produzem maltes altamente turfados, ou das Terras Altas e/ou Terras Baixas. Em contraste, os destilados de grão têm um sabor relativamente neutro, devido aos alambiques de fracionamento contínuo usados para obter um uísque puro e leve <sup>[5]</sup>.

O uísque irlandês tradicional (*Irish*) é feito de uma combinação de cevada maltada e não maltada, destilada triplamente em alambique (em oposição à destilação dupla normalmente usada na Escócia) <sup>[10]</sup>. Como outras combinações podem ser usadas além de cevada, desde que em iguais quantidades, o uísque irlandês tem por si só um sabor semelhante ao do grão. Por ser seco com a queima de carvão em vez de turfa, tem um sabor menos defumado do que o uísque escocês <sup>[6]</sup> e é distintamente suave devido aos alambiques usados serem muito maiores que os usados na Escócia <sup>[13]</sup>. Resistentes por vários anos ao alambique de coluna, apenas recentemente começou a ser empregue pelas destilarias em instalações de grande escala. Os uísques de malte irlandês continuam a ser triplamente destilados, em três alambiques de cobre, e os uísques de grão são continuamente destilados em sistemas de três colunas <sup>[5]</sup>.

À semelhança da Escócia, os principais fornecedores de barris de carvalho da Irlanda são os Estados Unidos. A política de maturação deste país exige que 40% do destilado de malte seja amadurecido em barris de primeiro enchimento enquanto o de grão usa 60%. O mesmo não se aplica aos uísques de grão escocês, pois os barris antes de serem usados são cheios várias vezes com malte. Atualmente, nenhuma destilaria irlandesa recupera barris após estes serem considerados esgotados, o que tipicamente corresponde a três ciclos de maturação <sup>[5]</sup>. O uso de barris temperados com xerez também tem um papel importante na maturação. Estes são provenientes do Porto, Madeira, Málaga e Marsala.

O uísque na América do Norte tem um passado longo e variado. Os seus métodos de produção encontram-se associados a história e tradição, o que não impediu os produtores de continuarem a inovar para atender às necessidades do mercado e avançarem em termos de eficiência e sustentabilidade da produção <sup>[14]</sup>. O uísque produzido na América do Norte conduziu aos *espíritos* regionais de Bourbon, Kentucky, Tennessee e uísques canadenses.

Uma vez que possuem os seus próprios conjuntos de Regulamentos, consentindo uma imensa variedade de produtos, o quadro legislativo *Bureau of Alcohol, Tobacco, Products and Firearms* define o uísque americano como a destilação de um mosto de grãos fermentados com menos de 190° US Proof (95% (v/v)) de forma que o destilado possua o sabor, o aroma e as características geralmente atribuídas ao uísque, amadurecido a não mais de 125 graus de prova (62,5% (v/v)) em barris novos de carvalho carbonizados.

O conteúdo dos cereais presentes no mosto deve ser igual ou superior a 51%, existindo assim seis tipos principais de uísque, todos produzidos a partir de um tipo diferente de cereal (centeio, malte de centeio, malte, trigo, Bourbon e milho). Um Bourbon típico consiste em 51% de milho misturado com centeio e malte (15% cada), o *rye* deve ter essa percentagem de centeio combinado com malte (10%) e milho (39%) <sup>[15]</sup>, o *corn* é um mosto constituído por 80% de milho, centeio e malte (10% cada), amadurecido em barris de carvalho novos ou usados <sup>[6]</sup>. O produto destilado é armazenado por pelo menos 2 anos e devem cumprir os requisitos de teor alcoólico após a destilação (máx. 80% (v/v)) e antes do envelhecimento (máx. 62,5% (v/v)) <sup>[11]</sup>. Para ser rotulado como Bourbon puro nada pode ser adicionado aos ingredientes básicos – grãos, levedura e água - e tem de ser envelhecido em barris de carvalho novo carbonizado, sendo que a cada enchimento deve ser usado um novo barril <sup>[10]</sup>. Se os *espíritos* forem maturados por 2 ou mais anos em barris novos ou não carbonizados e a destilação for inferior a 80% de álcool por volume chamam-se *straight*. Um uísque Bourbon Kentucky *straight* tem de envelhecer pelo menos 1 ano em Kentucky e cumprir as condições anteriores <sup>[5]</sup>, o uísque Tennessee é essencialmente o mesmo que o Bourbon, a única distinção é a inclusão da filtragem de carvão no processo após a destilação. Este passo confere ao uísque notas de carvão ou madeira tostada, caramelo e baunilha, tornando-o mais leve que o Bourbon.

No processo, o milho é cozido sob pressão para que o amido fique gelatina, o centeio é adicionado apenas quando já está em arrefecimento e cevada maltada é adicionada a uma temperatura ainda mais baixa para se converter em açúcar (sacarificação) <sup>[10]</sup>. No início eram destilados em alambiques de Cu, mas foram substituídos pelos alambiques

com coluna dadas as suas vantagens. É comum usar os grãos de uma destilação anterior para acidificar o mosto e restringir as infecções bacterianas, uma vez que já estão gastos. Em destilações modernas, o pH é ajustado por recurso a bactérias do ácido láctico cultivadas no mosto [15], dado que estas fornecem sabores distintos e ajudam a manter a consistência entre lotes [5].

O uísque americano não tem um sabor azedo, uma vez que na maturação fazem sempre uso de um barril novo que lhe transmite um sabor de baunilha [10].

Para os uísques canadenses a mistura é considerada ser a chave. São geralmente produtos de dois uísques, um base e um aromatizante, obtidos a partir de um mosto de cereais sacarificados pela diástase do malte ou por outras enzimas, fermentados pela ação de leveduras ou outros organismos e envelhecidos por não menos de 3 anos em pequenos barris (capacidade inferior a 681 L), podendo conter caramelo [16]. Tradicionalmente, o uísque base correspondente a 10-15% da mistura tem um teor alcoólico mais pesado e o aromatizante tem um teor mais baixo para realçar o sabor dos grãos [6]. Os uísques base são envelhecidos em barris usados anteriormente para vinhos, *sherry*, rum, brandy, Bourbon ou malte, o que reduz a influência do grão e do barril no sabor. Os aromatizantes são geralmente envelhecidos em barris virgens ou numa mistura de barris virgens com barris usados, extraíndo mais sabor dos barris [17]. O facto dos barris serem de menores dimensões vai ter implicação no grau de oxigenação, bem como na cor [5].

Idêntico ao uísque escocês é também o japonês, uma vez que se inspiraram neles, embora tenham evoluído nos últimos anos para assumir um carácter próprio [5, 18]. Inicialmente a cevada era maltada nas próprias destilarias, presentemente, a maioria das destilarias compra a produtores comerciais [5]. Os processos de maceração e destilação são semelhantes aos escoceses, mas cada empresa adota as suas próprias formas de produzir o mosto, seleccionar as leveduras, os alambiques e o teor alcoólico final do destilado [5]. A principal diferença das destilarias japonesas para as escocesas reside precisamente no facto de fazerem uso de alambiques de diferentes tamanhos, permitindo assim criar outros estilos e sabores. A maioria dos barris utilizados são de carvalho americano e espanhol, carbonizados novos ou ex-xerez e ex-bourbon, mas recentemente, também começaram a usar barris de carvalho francês, anteriormente usados para maturar vinho do Porto e da Madeira, e barris de carvalho japonês (*mizunara*). Os barris de carvalho japonês são temperados com vinho xerez por 1 ano antes de serem usados para

maturar. Segundo testes sensoriais, estes conferem aos uísques sabores únicos de coco, ananás e canela [5].

Quando se trata de uísque asiático, mais alguns países alcançaram a fama além do Japão. Taiwan, um dos maiores consumidores de uísque escocês em todo o mundo, começou recentemente a fabricar o seu próprio e em pouco mais de uma década já são um sucesso. O calor tropical e alta humidade característicos da região provocam uma maturação acelerada, o que levou a que o método de produção fosse adaptado para se adequar ao clima quente. A água é extraída das montanhas (rica em minerais), o uso de cevada maltada de origem escandinava e de dois tipos de fermento criam sabores frutados subtropicais [19]. Devido à rápida interação do *espírito* com os barris de madeira, o período de maturação é mais curto permitindo obter um uísque em 4 ou 6 anos semelhante a um uísque que foi amadurecido por 15 ou 25 anos.

A bebida alcoólica destilada mais popular da Índia, o uísque, foi introduzido no século XIX e desde então tornou a Índia num dos maiores mercados do mundo [20]. Tradicionalmente, os uísques indianos são misturados com um álcool neutro produzido a partir do melaço da cana-de-açúcar, a matéria-prima mais barata para a produção de etanol, conferindo-lhes uma identidade distinta dos restantes.

Dividem-se em quatro categorias: *premium*, *prestige*, regular e económico para atender às condições económicas do consumidor. Os uísques económicos consistem apenas em álcool neutro e aromatizantes; a gama intermédia é composta pela mistura de uísques premium *blended* com álcool neutro e aromatizantes, mas não contém malte; os uísques *premium*, semelhantes aos escoceses, contém malte indiano, são fermentados e destilados em alambique e, posteriormente, amadurecidos em barris de carvalho. Em função da disponibilidade de melaço e das alterações do preço, muitos dos uísques *premium* são hoje produzidos a partir de malte e de outros grãos. Porém, a base preferida continua a ser o álcool neutro derivado da cana-de-açúcar devido à fraca presença de congéneres, o que diminui as hipóteses de ressaca, confere ao produto final uniformidade, facilita a produção e ajuda a reter o aroma e sabor dos uísques de malte. O álcool neutro é produzido a partir do melaço por destilação em coluna e a cor é ajustada com a adição de caramelo [5].

Tal como em grande parte da Europa, a destilação de bebidas espirituosas é popular na Alemanha há séculos. A sua produção é, no entanto, relativamente recente, não mais Escócia e Estados Unidos (*single malts*, *blends* e estilos de Bourbon). Todavia, como não

se aplicam na Alemanha as leis rígidas que regem a maturação e os ingredientes do uísque escocês, muito do uísque é lançado relativamente jovem, podendo ser muito diferentes uns dos outros. A França, embora seja líder mundial em vinho, tem vindo a crescer nos últimos anos na indústria do uísque. Inicialmente produziam uísque semelhante ao escocês até que perceberam que podiam refletir o seu território na bebida. Como têm tradições antigas de destilação (Cognac, Borgonha, Calvados e outros), usam os alambiques e os barris já existentes, o que desempenha um papel importante no perfil aromático oferecendo, assim, uma grande variedade de *espíritos* [10]. Para além disso, são os maiores produtores de cevada para malte.

A Tabela 1.1 representa os cinco tipos principais de uísque e a Tabela 1.2 algumas das principais diferenças entre eles.

Tabela 1.1 – Matérias-primas e método de destilação utilizados na produção de uísques de acordo com a origem geográfica

	Uísque escocês e japonês		Uísque irlandês		Uísque americano	Uísque canadense
	Uísque de Malte	Uísque de grãos	Uísque de <i>pot still</i>	Uísque de grãos		
<b>Materiais</b>	cevada maltada	milho, trigo, cevada maltada	cevada maltada, cevada	milho, trigo, cevada	milho, trigo, centeio, cevada maltada	milho, trigo, centeio, cevada maltada, centeio maltado
<b>Destilação</b>	alambique	contínuo	alambique	contínuo	contínuo	contínuo

Tabela 1.2 – Resumo das diferenças entre os cinco tipos principais de uísque

Uísque escocês	Uísque japonês	Uísque irlandês	Uísque americano	Uísque canadense
Barris de carvalho pelo menos 3 anos (reutilizados)	Barris de carvalho pelo menos 3 anos carbonizados (novos ou reutilizados)	Barris de carvalho por um período não inferior a 3 anos (reutilizados)	Barris de carvalho carbonizado min. 2 anos (novos)	Barris de madeira pelo menos 3 anos (novos e reutilizados)
Seco com queima de turfa	Compram cevada	Seco com queima de carvão	Tennessee é filtrado a carvão	Adição de caramelo
Destilação dupla		Destilação tripla		

## Matérias-Primas

O uísque é produzido tradicionalmente pela mistura de grãos de milho, cevada, trigo e centeio, por possuírem um elevado teor de amido fermentável o que, por sua vez, fornecerá um bom rendimento alcoólico [21]. A cevada domina a produção não só por ser fácil de cultivar, crescer em terras inférteis e ser capaz de fermentar naturalmente, mas também por conter um alto teor de amido e enzimas, que aceleram a conversão desse amido em açúcares e depois álcool [10]. Para que a quebra do amido ocorra é necessária a atividade da amílase.

Atualmente, os destiladores de malte procuram variedades de cevada de primavera com baixo teor de nitrogénio para produzir malte com alto nível de extrato fermentável. Os destiladores de grãos querem o oposto, variedades de trigo de inverno, com baixos teores de nitrogénio, para fornecerem bons rendimentos alcoólicos e serem fáceis de processar [5]. A produção de uísque tornou-se pois mais tecnológica e cientistas têm vindo a inventar novas cepas que permitam maior eficiência e rendimentos alcoólicos.

As bactérias do ácido láctico (LAB, do inglês *lactic acid bacteria*) constituem uma pequena parte da microflora natural do grão de cevada. Devido à sua tolerância ao calor e ao pH ácido conseguem persistir durante as fermentações de uísque de malte. Como estas bactérias influenciam a produção de lactonas, através da hidroxilação dos ácidos gordos insaturados, acredita-se que contribuam com notas "doces e gordurosas" desejáveis no uísque de malte. Uma vez que a levedura e as bactérias do ácido láctico afetam o carácter do uísque durante a fermentação, a atividade enzimática deve ser controlada durante o processo [22].

Para a fermentação, é necessário que a levedura possua boas propriedades microbiológicas de modo a que a conversão dos açúcares fermentáveis em etanol seja eficiente. As leveduras podem ser cultivadas especificamente para fornecer a composição e os sabores desejados ou podem ser usadas leveduras recicladas que vão ter outra influência no sabor, sobretudo aquelas utilizadas para o fabrico da cerveja ou leveduras oriundas de outras destilações (ex: Bourbon) [5, 22]. A fermentação de leveduras é, sem dúvida, o passo mais importante na produção de uísque [23].

A qualidade da água é igualmente um aspeto relevante. A mesma tem grande influência no produto final, uma vez que é necessária em várias etapas do processo, nomeadamente para a maceração, para a diluição do *espírito* antes da maturação, para o arrefecimento durante a destilação, para a mistura e em serviços auxiliares.

Várias fontes de água podem ser usadas pelas destilarias: águas superficiais (rios, lagos e canais) por terem grande influência orgânica, devido ao contacto com a turfa e a vegetação; nascentes ou furos por serem fortemente influenciadas pela geologia subjacente; ou água canalizada, pois oferece um abastecimento constante. Dependendo da fonte, a água usada pode conter uma multiplicidade de compostos derivados de plantas de lignina, carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídios, ácidos gordos, iões inorgânicos, entre outras variedades de microrganismos e material. A atividade das bactérias presentes na água, particularmente as bactérias do ácido láctico, também contribui para as qualidades organolépticas do destilado final. Por isso mesmo, a água deve ser controlada de forma a evitar possíveis contaminações químicas e/ou microbiológicas, assim como permanecer livre de matéria indesejável [6, 21].

Em uísques de grão é preferida água dura (pH de 7-8), por atuar como estabilizadora da atividade enzimática, em destilarias de malte é preferida água macia, dado que um pH mais baixo favorece as leveduras. Destiladores de Bourbon optam por água dura também pelo facto de o calcário deter um efeito positivo na produção de congéneres [5, 6].

Na produção escocesa não é comum o tratamento da água, mas noutros países sim. Para a purificação das águas superficiais e subterrâneas é aplicada a filtração por carvão ativado para remover poluentes orgânicos (como são exemplo os pesticidas) e filtrar sólidos residuais e cloro, com a vantagem de melhorar o sabor, cor e o odor. É também habitual desmineralizar a água para que teores altos de cálcio e ferro não provoquem descoloração ou precipitação do uísque. A remoção desses iões e moléculas orgânicas ocorre por meio de métodos como osmose reversa e membranas de nanofiltração. Outras técnicas são usadas para eliminar os microrganismos que possam ter efeitos negativos (filtração estéril, luz UV) e para clarificação da água (filtração com areia, coagulantes) [5].

Os barris empregues na produção do uísque são tradicionalmente de carvalho branco americano (*Quercus alba*) ou de carvalho espanhol (*Q. robur*), para que durante o processo de envelhecimento o sabor do uísque seja influenciado pelos componentes da madeira. A principal diferença entre os carvalhos deve-se à porosidade da madeira.

O carvalho branco é usado maioritariamente por conferir um sabor leve e floral, mas é também usual envelhecer os uísques em barris reciclados. Utilizados anteriormente para maturar outro tipo de bebidas, como vinho tinto, xerez (*sherry*) ou vinho do Porto, estes barris de carvalho europeu contém níveis mais elevados de extratos e de cor [5], uma vez

que os corantes escuros libertados pelos vinhos são apreendidos pela madeira e posteriormente soltos para o uísque, originando assim uma cor característica [6]. Os barris de xerez produzem uísques com características de baunilha, aromas doces e frutados [5].

Na indústria escocesa, os barris de carvalho são reutilizados repetidamente até deixar de haver alteração das propriedades da bebida, o que acontece quando os níveis de compostos extraídos da madeira decrescem. Nessa altura, os barris são trocados ou então podem ser recuperados raspando a superfície interna e carbonizando o interior do barril. Contudo, não terão o mesmo desempenho [6].

## 1.2 Composição

A química do uísque é complexa e inclui muitos sabores e diferentes aromas. Cada *espírito* tem um perfil aromático característico e, como tal, em ordem a determinar cada qualidade individual é necessário determinar a sua composição. Cromatografia gasosa e líquida com diferentes detetores (FID, AED, UV-Vis), espetrometria de massa, espetroscopia de absorção atômica, entre outras técnicas têm permitido analisar os uísques ao longo dos últimos anos. Tais pesquisas permitiram descobrir a sua composição e os perfis de aroma, os quais podem ser usados para esclarecer a sua qualidade e autenticidade, bem como distinguir entre marcas, países e avaliar a sua idade [1].

Os compostos de sabor mais importantes são derivados da madeira durante o envelhecimento, outros sabores vêm do tipo de grão usado, bem como dos processos de fermentação e destilação. O uísque contém diferentes compostos químicos, sendo o etanol e a água os óbvios constituintes maioritários. Os constituintes menores são, como anteriormente indicado, conhecidos como congêneres e incluem álcoois superiores (n-propanol, isobutanol), compostos carbonílicos, ésteres, aldeídos, lactonas, ácidos orgânicos, entre outros [24]. Os congêneres são constituintes naturais do processo de produção, estando cada um deles associado a uma etapa específica. As variações discriminam entre amostras de Bourbon, *Scotch*, Tennessee e *Irish*, bem como entre diferentes *single malt* e *blended* uísques. Em geral, uísques destilados em alambique de cobre possuem mais congêneres do que os destilados em alambique contínuo [5].

Nos diferentes *espíritos* existem quase sempre os mesmos fluoróforos: compostos fenólicos e cumarinas - típicos de bebidas envelhecidas em barris de madeira, fenóis voláteis e anisóis - presentes em qualquer bebida espirituosa [24].

### 1.2.1 Ácidos carboxílicos, ésteres e álcoois

Após o etanol, os maiores congêneres no uísque são os álcoois superiores, ou seja, n-propanol, isobutanol, 2-metilbutanol e 3-metilbutanol, sendo os dois últimos álcoois amílicos. Juntamente com outros principais congêneres voláteis (metanol, acetaldeído e acetato de etilo), todos eles são produzidos pela levedura, durante a fermentação, sendo a sua concentração final influenciada por outros processos: destilação e *blending* [5, 25]. À semelhança dos álcoois, os ácidos e os ésteres alifáticos também se formam, através das leveduras, durante o processo de fermentação. Embora um grande número de ésteres seja produzido aquando da fermentação, como resultado da combinação de álcoois e ácidos gordos ou acetatos, também podem ter origem nas etapas de destilação e maturação [6].

Os ácidos carboxílicos têm impacto no pH de um uísque e são produzidos durante a fermentação e extraídos do barril de madeira durante o envelhecimento. O principal ácido orgânico é o ácido acético, que dá ao uísque o seu sabor azedo característico. Responsável por cerca de 50-90% do conteúdo total de ácidos voláteis [6], a sua proporção em uísques escoceses é de aproximadamente 50% do total de ácidos voláteis e em outros uísques 60–95% [26]. Além disso, os ácidos propiónico, fórmico e butírico contribuem igualmente para o sabor do uísque.

Pequenas quantidades de ácidos aromáticos são normalmente encontradas em bebidas alcoólicas destiladas. A maioria são ácidos fenólicos e advêm dos barris de madeira usados para a maturação [26]. A este grupo pertencem o ácido gálico, o ácido vanílico e o ácido sirínico (Figura 1.2) [27].



Figura 1.2 – Estruturas químicas dos ácidos fenólicos retratados ao longo deste trabalho

Os ésteres nos uísques são um ingrediente chave do seu sabor <sup>[28]</sup> todavia, alguns uísques são filtrados a frio para remover a maioria destes ésteres pois podem causar turvação. Os ésteres mais abundantes são os ésteres etílicos dos ácidos, que permitem refletir a abundância de ácidos, e depois destes os ésteres de acetato como o acetato de isoamilo <sup>[6]</sup>.

Durante a fermentação, a formação dos ésteres ocorre quando a acetil-CoA reage com os álcoois livres, sendo influenciada pelo mosto, levedura, concentração de ácidos gordos insaturados no mosto e temperatura. Na maturação, os ésteres são resultado da esterificação dos ácidos gordos. O acetato de etilo tem origem no ácido acético, a partir da hidrólise dos grupos acetilo da hemicelulose, da oxidação do etanol e da carbonização da madeira. Todos são caracterizados por um aroma intenso e um baixo odor <sup>[1]</sup>, como são o caso do hexanoato de etilo que dá um sabor de maçã doce ou do acetato de isoamilo, um éster com aroma de banana, mas o éster mais importante e mais frequentemente encontrado no uísque é o acetato de etilo. Formado a partir de ácido acético e etanol, dá ao uísque o seu sabor frutado característico. Ésteres etílicos, isoamilo, isobutilo e álcool isoamilo contribuem igualmente com sabores frutados de banana e maçã. O hexanoato de etilo confere caracteres frutados, mas com o aumento da cadeia passa a notas azedas e oleosas relacionadas com a imaturidade do uísque.

Ésteres de ácidos gordos não são propriamente desejados em destilados novos, uma vez que o seu excesso provoca aglomerados, formando uma névoa que turva a bebida durante a redução do álcool para engarrafamento <sup>[28]</sup>. Estes ácidos gordos são derivados do grão usado para fazer o uísque e as suas moléculas contribuem para o sabor e o cheiro característicos do mesmo.

Congéneres como os álcoois (1-propanol, 2-metilpropanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol e álcool feniletílico) são formados na fermentação por reações bioquímicas entre aminoácidos e carboidratos das leveduras, sendo que a sua concentração pode ser reduzida ou mesmo eliminada durante a destilação <sup>[5]</sup>. As quantidades variam consideravelmente entre uísques, mas os compostos n-propanol e isobutanol são comuns para todos.

Resultados mostram que uísques escoceses de grão têm baixas concentrações de 2 e 3-metilbutanol após eluição do isobutanol, em comparação com os uísques de malte que são ricos nesses congéneres voláteis. Tal acontece porque esses dois congéneres,

juntamente com outros, são eliminados do *espírito* (de grão) durante a destilação no alambique de Coffey, sendo depois recuperados como uma mistura de álcoois. Nos uísques misturados, as proporções de 2 e 3-metilbutanol/isobutanol podem ser associadas ao componente de uísque de malte. Como resultado, podem ser usadas para dar uma estimativa das proporções relativas de uísque de malte e grãos presentes nas misturas. Como são misturas de destilados neutros de grãos com outros, os uísques canadenses têm concentrações relativamente baixas de congêneres. Por oposição, o Bourbon é muito rico nesses congêneres, uma vez que não há retificação no processo de destilação [5, 25, 29].

Os álcoois amílicos, juntamente com o furfural são indicativos de destilação em alambique de cobre [25].

### 1.2.2 Fenóis

Diferentes isómeros fenólicos são encontrados nos uísques. Estes contribuem com um sabor amargo e defumado facilmente perceptível, sendo usados para determinar os níveis de turfa nos uísques [25]. A queima da turfa confere sabores distintos à cevada maltada, que após seca, irão ser transferidos para o novo destilado de malte aquando da destilação. Assim como a queima, a carbonização dos barris pode igualmente induzir a produção de compostos fenólicos.

Fenóis simples como o fenol, guaiacol, cresol, xilenol e etilfenol, resultantes da degradação térmica de derivados do ácido benzóico do malte e da fumaça da turfa, são os mais importantes para a contribuição do sabor [23]. Os aldeídos fenólicos como a vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído (Figura 1.3) são formados a partir da quebra da lignina da madeira durante a maturação [6]. Outros compostos fenólicos (ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico), formados a partir das paredes das células dos cereais, são transformados em fenóis por descarboxilações durante a secagem [28].

A principal diferença entre as amostras de diferentes países encontra-se na concentração de orto, meta e para-cresol [1]. O *o*-cresol é o mais abundante no uísque escocês; em uísques Bourbon e canadenses os fenóis e cresóis têm menor impacto e as notas esfumadas têm origem na quebra da lignina [28]. Por outro lado, a maior concentração de eugenol, composto parcialmente responsável pelo sabor picante, é observada em Bourbon.

Uma vez que se acredita que os fenóis se desenvolvam a partir do processo de cura no malte, estando fortemente correlacionados com uísques de maltes [23], nos uísques

escoceses é onde se prevê encontrar maior concentração de fenóis e a mais baixa será em uísques canadenses e Bourbon. Portanto, a quantificação destes possibilita diferenciar os uísques de acordo com a sua origem geográfica [1].



Figura 1.3 – Estruturas químicas dos aldeídos fenólicos retratados ao longo deste trabalho

### 1.2.3 Lactonas

As lactonas de uísque são moléculas bem conhecidas responsáveis pelo sabor e cheiro característicos do uísque, formadas pela desidratação de hidroxiácidos alifáticos e derivados de furanonas [1,6]. Entram no uísque durante o envelhecimento, como isómeros originários dos barris de carvalho, oferecendo aromas doces e gordos [1].

O 3-metil-4-octanolídeo possui quatro isómeros com aromas semelhantes, embora diferentes, caracterizados pelo aroma de coco quando puros. No entanto, apenas dois desses isómeros existem naturalmente, 3S,4S (cis) e 3S,4R (trans) (Figura 1.4). O isómero cis-3-metil-4-otanolídeo, também chamado de 5-butildihidro-4-metilfurano-2-ona, é a forma mais comum de ser encontrada e tem um sabor mais forte [21, 28].

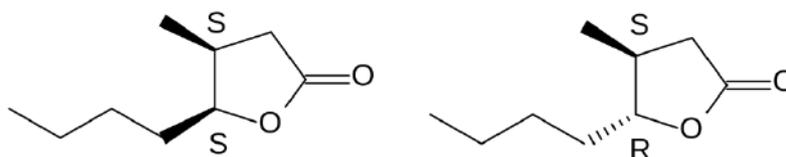


Figura 1.4 - 3-Metil-4-octanolídeo, isómeros cis e trans, respetivamente

As espécies de carvalho usadas têm um grande impacto nas concentrações dos dois isómeros. Nos carvalhos americanos, a cis-lactona é o isómero mais abundante, apenas em uísques amadurecidos em carvalho japonês se desenvolvem substancialmente mais lactonas trans, nunca encontrados em barris de Bourbon ou xerez. A razão entre as formas cis e trans permite concluir se o uísque foi amadurecido em barris de carvalho

americano (>1), onde as concentrações de lactonas são mais altas, assim como o ácido elágico e o ácido gálico [23], ou em outros tipos de carvalho (<1) [21, 25].

#### 1.2.4 Aldeídos

Aldeídos são moléculas produzidas durante todo o processo, com maior foco nas fases de fermentação, destilação e envelhecimento, que dão ao uísque um cheiro característico, muitas vezes sinónimo de erva/verde. Formados a partir da interação de álcool e ácidos orgânicos, muitos desses compostos relacionados com notas verdes são o hexanal, 2- e 3-hexanal [28].

Os aldeídos são críticos tanto para o sabor quanto para o conteúdo aromático do uísque. Os de menor peso molecular têm tendência a ter odores agudos e desagradáveis. O acetaldeído, formado pela oxidação do etanol, é dominante durante a fermentação, por isso usado para determinar o conteúdo total de aldeído [6]. Para além disso, trata-se de uma toxina identificada como um dos principais contribuintes para a ressaca. Aldeídos de maior peso molecular tendem a ter aromas muito apazíveis, como a vanilina e o furfural.

O composto mais familiar é a vanilina, um elemento resultante da decomposição da lignina, responsável pelo aroma de baunilha. Os Bourbon são particularmente conhecidos pelo seu conteúdo de vanilina pois para cada lote de Bourbon novos barris são usados e a carbonização aumenta o conteúdo de vanilina, siringaldeído, ácido vanílico e outros compostos. Uísque amadurecido em barris não tostados possui maiores teores de coniferaldeído, sinapaldeído e ácido gálico, e o ácido vanílico contribui com notas azedas, pungentes e sulfurosas ao invés de doces e florais [28, 30]. O furfural é um aldeído importante que contribui para as bebidas destiladas com notas doces, oleosas e de maçapão, produzido por açúcares a partir da quebra das paredes celulares dos cereais durante a maltagem e a destilação [24]. Principalmente associado ao uísque de malte, a sua concentração aumenta à medida que a concentração de 2- e 3-metilbutanol aumenta, tendo em conta que ambos os congêneres são derivados do malte da mistura [29]. O uísque de malte misturado com uísque de grão é sabido ter menos concentração de furfural [22].

O 5-hidroximetilfurfural é um congêner de maturação relacionado com castas de xerez. Para além de ser um componente dos barris carbonizados, é também encontrado em muitos uísques devido à sua presença em caramelo simples e açúcar queimado [25].

Na Figura 1.5 encontram-se representados os aldeídos furânicos presentes nos uísques.

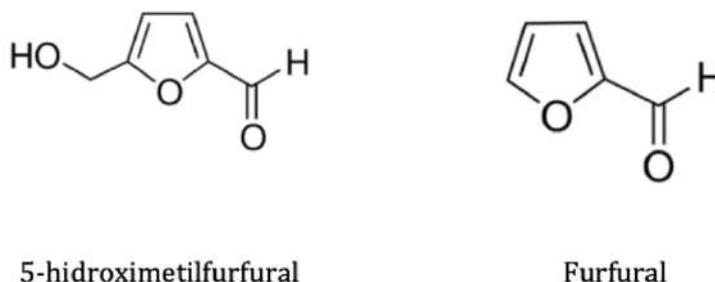


Figura 1.5 – Estrutura química dos aldeídos furânicos retratados ao longo deste trabalho

### 1.2.5 Compostos nitrogenados e sulfúricos

O uísque é produzido através de malte, maceração (*mashing*), fermentação, destilação e maturação. Durante estes processos, vários compostos de enxofre/ sulfúricos são gerados, atuando como importantes fontes de sabores que reduzem a qualidade geral do uísque [28].

Durante a fermentação, a levedura não só converte os açúcares em etanol e dióxido de carbono, como está implicada na formação de compostos de enxofre. Encontram-se no mosto e no uísque da seguinte forma: sulfetos de alquilo (DMS, DMDS e DMTS), tióis (metanotiol), derivados de tiofeno (2-metiltiolan-3-ona, 2-metiltiofeno) e derivados de metionina (MTP) [31]. Congêneres de enxofre de baixo peso molecular atribuem sabores leves e neutros, e à medida que aumenta o seu peso molecular mais intensos se tornam [28].

O malte produz DMS (dimetilsulfeto) durante a germinação que vai ser oxidado a DMSO (dimetilsulfóxido) e dióxido de enxofre. Na fermentação, o DMSO é reduzido a DMS e os ácidos da levedura promovem a saída do dióxido de enxofre e de outros compostos de sulfúricos. Durante a maturação, continua a oxidação do DMS em DMSO e com o tempo, o conteúdo de DMS é reduzido, assim como diminui o de dimetil-dissulfeto (DMDS) seja por evaporação ou conversão em DMTS (dimetil-trissulfeto). Como resultado, as proporções de DMDS/DMTS estabelecem indicadores de maturidade [28].

O impacto do sabor destes compostos aumenta quando diluídos em água, devido à hidrofobicidade, mas diminui pela ação dos congêneres da madeira, do carvão do barril

e do cobre durante a maturação [6, 28, 31]. No processo de destilação, o sulfato de cobre interage com os compostos sulfúricos removendo os congêneres: os íons de Cu acumulados durante a destilação reagem com o metano formando DMDS, que por sua vez será convertido noutros compostos ao longo do processo de destilação. A reação é essencial para a produção de *espíritos* limpos, o nível de cobre no destilado atuando como um indicador da consistência dos *espíritos*. Certos estudos indicam que os níveis de cobre são mais altos no uísque escocês e japonês do que nos uísques irlandês, Bourbon e do Tennessee [28, 31].

A destilação em cobre, para além de remover, também pode aumentar as concentrações de outros congêneres – aldeídos, álcoois e ésteres [28]. Dos compostos heterocíclicos de nitrogénio formados, as piridinas, as pirazinas e os tiazóis contribuem significativamente para o carácter de sabor dos uísques [31].

### 1.3 Processos de envelhecimento

De acordo com os regulamentos, envelhecimento ou maturação caracteriza a ocorrência natural de variadas reações, dentro de um reservatório, que têm como objetivo conferir a uma bebida espirituosa características e qualidades organoléticas que esta não possuía antes [32]. O efeito da maturação torna o destilado bastante distinto, como resultado do seu contacto com o barril. As notas de madeira e os sabores pungentes, ácidos e ásperos do *espírito* são substituídas por aromas doces, suaves, picantes e florais [5]. O tempo de maturação e a qualidade da bebida maturada variam de acordo com o tipo de uísque e a quantidade, mas principalmente com a composição da madeira do barril: o tipo de madeira, tratamento dado ao barril, o uso anterior do barril e o ambiente em que o uísque é maturado [6]. O tipo de barril afeta, portanto, o sabor, a cor e o aroma do uísque. O carvalho tem sido utilizado ao longo de vários anos pelas suas propriedades mecânicas, ou seja, dureza, flexibilidade, resistência e impermeabilidade à água, e porque liberta os extratos necessários para o envelhecimento [33].

Tradicionalmente, o uísque é amadurecido em barris de carvalho americano (*Q. alba*), o sabor sendo influenciado pelas espécies da madeira e pelo passado do barril. De forma geral, esses barris produzem maiores concentrações de vanilina e lactonas cis, conferindo-lhes um sabor leve e floral. Alternativamente, são usados barris de carvalho europeu (*Q. robur ou sessilis*) que produzem concentrações elevadas de taninos e, conseqüentemente, *espíritos* bastante diferentes do carvalho americano. Os destilados

amadurecidos nestes barris contêm níveis superiores de cor e de extratos do barril, combinando aromas doces, frutados e de baunilha [6, 21]. Em geral, os congêneres que conferem os sabores doces são extraídos da madeira somente após os três anos de maturação. As concentrações da maioria dos açúcares aumenta durante a fase inicial, mas a frutose e o glicerol só são formados no final da maturação [28].

A carbonação do interior dos barris aumenta os produtos derivados da decomposição da lignina e das lactonas, o contrário verifica-se quando os barris são reutilizados muitas vezes. Com o uso repetido, os componentes extraídos do barril diminuem, assim como diminui a evolução da qualidade da bebida. Entre as vantagens de maturação em barris reutilizados estão os sabores complexos que se desenvolvem ao longo do tempo como resultado da hidrólise e oxidação de certos compostos da madeira [5].

A área de superfície de um barril desempenha também um papel importante no processo, tanto para cor como para o grau de oxigenação do destilado. Quanto mais pequena a barrica, mais os congêneres de sabor interagem entre si e, de igual modo, com a madeira [5]. Fatores como o clima e as condições de armazenamento também influenciam o processo de maturação [6].

#### **1.4 Componentes e propriedades da madeira**

A diferença significativa de sabor e aroma entre os destilados amadurecidos deve-se aos compostos que constituem a madeira – matéria-prima usada para o envelhecimento de várias bebidas alcoólicas [33]. Vários fatores como o método de tanoaria, a idade e a secagem da madeira, além da fonte de carvalho usada, variam entre os tipos de barril, contribuindo profundamente para as características organoléticas da bebida [27, 33].

Os extratos de madeira atuam como congêneres de sabor e encontram-se naturalmente presentes dentro das paredes celulares, mas não estão quimicamente ligados a elas. De acordo com a sua composição química, estes compostos podem ser divididos em dois grupos: compostos de massa molecular elevada e compostos de baixo peso molecular [27]. Cerca de 45% do peso da matéria-prima empregue para produzir um barril consiste em produtos de celulose, lignina e hemicelulose (20 a 30%) – compostos de alta massa molecular [27, 28]. Compostos extraíveis como lípidos voláteis, ácidos, açúcares, esteróides, taninos, fenóis e lactonas compõem o restante [28]. A forma como as moléculas

interagem com o *espírito* vai depender do tamanho do barril, do tempo de presença no barril e da torra [33].

A celulose tem pouco ou nenhum efeito sobre o sabor no entanto, é fundamental para a estrutura do carvalho, atuando como componente principal da parede celular que constitui o transportador de extrativos da madeira para o *espírito* [23]. Tratando-se de um homopolímero de glicose, possui propriedades como hidrofiliabilidade, quiralidade e resistência estrutural [27, 28]. Juntamente com a hemicelulose forma uma matriz forte e complexa, na qual a lignina atua como um adesivo [28]. Quando a madeira é sujeita a tratamento térmico, a degradação dos carboidratos e dos açúcares das hexoses e das pentoses das hemiceluloses conduz à formação de furfural, 5-metilfurfural e 5-hidroxi-metilfurfural, que contribuem para os perfis torrados e de caramelo [23, 27].

A hemicelulose e a lignina atuam como precursores aromáticos da carbonização produzindo, sobre a ação do calor, uma gama de moléculas. A hemicelulose é um polímero heterogêneo contendo glicose e muitos açúcares simples, que contribuem com corpo, notas de caramelo tostado e cor. A lignina - um agente de ligação à celulose, é um biopolímero sintetizado a partir de três precursores básicos (*p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Na carbonização, as ligninas são mais estáveis do que os polissacarídeos e contribuem com notas de baunilha, especiarias e fumaça [28].

Outros contribuintes importantes são as substâncias de baixo peso molecular que incluem as lactonas do uísque derivadas dos lípidos e os produtos de degradação da lignina: vanilina, aldeídos aromáticos, ácidos, ésteres e taninos. Dos aldeídos fenólicos, o mais significativo é a vanilina, anteriormente referida como responsável pelo aroma a baunilha [28, 34]. Outros aldeídos incluem o siringaldeído e o coniferaldeído que desempenham um papel importante no carvalho tostado. O aquecimento do barril transmite sabores mais doces e esfumaçados, promovendo mais conteúdo de vanilina. O etanol reage com as ligninas, algumas das quais dão origem a álcoois coníferos e sinápicos, que por sua vez são oxidados em cinamaldeídos (coniferaldeído e sinapaldeído). Esses cinamaldeídos são ainda oxidados a benzaldeídos (vanilina e siringaldeído) [23].

Associados ao carvalho tostado encontram-se igualmente os fenóis. Formados pela degradação térmica da lignina, o guaiacol e outros ácidos fenólicos têm um aroma defumado, semelhante a carvão, mas ao mesmo tempo doce como caramelo. Derivado da

oxidação lipídica, forma-se também o eugenol, um fenol volátil associado à madeira com atributos picantes e cheiro de cravo, canela e noz-moscada [28].

Adicionalmente, existem também os taninos. Os taninos de carvalho (ou sua classificação hidrolisável ativa, elagitaninos) são polifenóis derivados da madeira usada na constituição do barril, fundamentais no processo de maturação, que conferem notas herbáceas, além de afetar a cor. Podem ser hidrolisados a ácido gálico, elágico e glicose, contribuindo com o seu sabor ácido, ou podem ser oxidados criando fragâncias delicadas através da formação de ésteres e acetais [23, 28, 34]. Tendo em conta que o processo de degradação da lignina é relativamente lento, os *espíritos* mais jovens tendem a ter altas proporções de elagitaninos [23].

### 1.5 Reações químicas entre os componentes da madeira e os uísques

A maturação de bebidas espirituosas destiladas é conhecida por alterar os congêneres constituintes de forma a substituírem notas imaturas nos novos destilados por sabores de uísque maduro. Durante o processo, ocorrem transformações físico-químicas e sensoriais na bebida resultantes da extração e degradação dos diversos componentes da madeira. Esses processos e os seus produtos são muito importantes para a qualidade das bebidas espirituosas maduras, produzindo odor, sabor e cor [24, 27, 28, 35]. Embora os mecanismos não sejam totalmente compreendidos, existe alguma certeza de certos fenómenos.

O envelhecimento envolve vários processos:

- 1 Evaporação de componentes voláteis – o etanol aquoso é exposto ao oxigénio, que passa por entre as aduelas (*staves*) do barril, evaporando. Assim, estabelece-se o gradiente alcoólico da bebida [28, 35]
- 2 Perda de alguns componentes de destilado – perda de água e etanol através do barril aumentam a concentração dos componentes voláteis [21, 36]
- 3 Extração direta dos componentes da madeira – depende do tipo, do tamanho e pré-tratamento dado ao barril, da humidade, temperatura, teor alcoólico e período de maturação [27, 28, 36]
- 4 Interação entre a madeira e os componentes do destilado bruto – alteram a partição volátil do líquido para o espaço livre [21, 28, 36]
- 5 Degradação das macromoléculas que constituem a madeira e extração destas no destilado – as ligninas decompõem-se com a formação de compostos fenólicos

(vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, ácidos cinâmico e benzóico), taninos hidrolisáveis e seus produtos (ácidos gálico e elágico) e cumarinas (particularmente escopoleina) [24, 28]

- 6 Reações químicas entre os vários compostos do destilado – reações redox, reações Maillard (reação de escurecimento não enzimática crítica na produção de congêneres de sabor chave), esterificações, hidrólises, polimerizações, acetilações [27, 28]

## 1.6 Autenticação da marca

A alta popularidade e valorização de um destilado, como é o caso do uísque, geralmente induz um maior risco de adulteração; daí que seja importante a autenticação dos produtos comercializados.

As características do uísque são fortemente influenciadas pelos cereais utilizados na fermentação e pelas normas de destilação, maturação e mistura, traduzindo-se em perfis analíticos típicos para vários congêneres e possibilitando a sua utilização como pontos de referência. A autenticidade do uísque divide-se em duas categorias: autenticidade da marca e genérica. A primeira apura se o conteúdo da garrafa corresponde ao nome presente no rótulo; a segunda constata se o líquido em questão se enquadra na definição de uísque [5]. Por norma, a autenticação da marca faz-se por comparação do teor alcoólico de referência com os perfis dos álcoois superiores de outras bebidas como são o metanol, o isobutanol, o n-propanol, o acetato de isoamilo, o acetaldeído e o furfural [29]. O uísque normalmente contém uma concentração de metanol inofensiva. Uma concentração anormalmente alta de metanol sugere que o álcool não é produzido a partir de cereais. Já a ausência de congêneres de maturação sugere que o destilado não foi submetido à etapa de maturação obrigatória [5].

Uma rápida leitura distingue os uísques *blended* como contendo níveis elevados de aguardente de cereais, níveis mais baixos de 2 e 3-metil butanol, níveis ligeiramente superiores de n-propanol e menor concentração de furfural [25, 29]. Os de malte são ricos em álcoois superiores e a concentração de furfural tende a aumentar à medida que aumenta a concentração de 2- e 3-metil butanol. As concentrações de 2- e 3-metil butanol no uísque de grão são relativamente baixas em comparação com n-propanol e isobutanol pois esses dois congêneres, juntamente com outros, são reduzidos em aguardente de grãos durante a destilação no alambique Coffey [29].

O uísque irlandês distingue-se dos restantes com base no perfil dos congêneres dos álcoois superiores, cujas concentrações (n-propanol, isobutanol e de outros álcoois) são geralmente mais baixas que os escoceses fruto da destilação tripla de grãos [37].

Nos uísques Bourbon, os álcoois superiores encontram-se em maior quantidade, quando comparado ao escocês. As concentrações de 2- e 3-metil butanol são altas em comparação com o uísque escocês, um efeito associado aos cereais, processos de fermentação e destilação empregues. As concentrações de n-propanol são relativamente baixas, enquanto as concentrações de isobutanol variam [29].

Os uísques canadenses apresentaram perfis analíticos bem diferentes dos uísques escocês, irlandês ou Bourbon. As concentrações de álcool são baixas em comparação com os outros tipos de uísque, refletindo os altos níveis de modificação durante a destilação dos uísques nas misturas [29].

Relativamente aos barris, aqueles que foram primeiramente cheios com vinho ou xerez produzem mais quantidades de frutose e de glicose do que outros tipos de barris [25]. Os níveis de taninos do carvalho americano são inferiores aos do carvalho europeu e inferiores aos níveis extraídos do carvalho francês. O carvalho americano é menos permeável e mais aromático. O carvalho europeu é mais rico em extraíveis fenólicos, particularmente elagitaninos, e apresenta menores concentrações de lactonas de carvalho e furfurais [33].

## 1.7 Objetivos do trabalho

Uma nota técnica muito recente reporta a existência de componentes de decaimento de fluorescência extremamente rápidas no uísque escocês. Usando a técnica de TCSPC com laser de diodo de picossegundos os uísques continham tempos de vida menores que 50 ps e usando o sistema FLIM as funções de decaimento continham componentes com tempos de vida inferiores a 10 ps com contribuições de 90% [38]. No entanto, os perfis de decaimento obtidos e as amplitudes foram claramente diferentes, dependendo do uísque, o que faz com que seja potencialmente possível diferenciar os mesmos com base em técnicas ultra-rápidas. Os autores indicam desconhecer se os valores são característicos da origem ou idade do uísque [38].

Neste trabalho, o principal objetivo foi a caracterização e diferenciação dos uísques com base nas suas diferentes características - marca, país, tipo, idade, barril – para criação de uma base de dados que permita classificar os diferentes uísques fazendo

uso de técnicas convencionais (fluorescência em estado estacionário) e ultra-rápidas tais como de fs-TA, ns-TCSPC e FLIM, existentes nos nossos laboratórios. Por forma a melhor identificar os componentes dos uísques o estudo foi complementado com a técnica de HPLC-DAD, utilizando-se para este estudo padrões: os componentes principais do uísque. A quimiometria permitiu estabelecer relações entre os dados obtidos. Uma vez que desenvolvimento de métodos de deteção de bebidas falsificadas desempenham um papel vital na salvaguarda da saúde dos consumidores e na proteção do lucro e integridade das marcas, pretende-se que o trabalho permita uma forma expedita de identificar falsificações deste tipo de bebidas.

Os diferentes uísques estudados ao longo deste trabalho, um total de 28, encontram-se representados na Tabela 1.3. De notar que o uísque Motörhead existe em duplicado.

Tabela 1.3 - Descrição das 28 amostras de uísque estudadas, incluindo código, destilaria, idade (se conhecida) e barril utilizado

<b>Amostra</b>	<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>	<b>País de origem</b>	<b>Tipo</b>	<b>Etanol, %vol.</b>	<b>Tempo de envelhecimento (anos)</b>	<b>Barril</b>	<b>Reutilizado</b>
<b>CS</b>	Blended	<b>Cutty Sark</b>	Escócia	Scotch	40	3 anos e 6 meses	Carvalho americano	Vinho Xerez
<b>CR</b>	Blended	<b>Crown Royal</b>	Canadá	Canadian	40	≥ 3	Carvalho americano	Conhaque
<b>GT</b>	Blended (triple wood)	<b>Grant's</b>	Escócia	Scotch	40	12	Carvalho americano, Virgin Oak e Bourbon refil	Xerez
<b>EW</b>	Single barrel Kentucky straight	<b>Evan Williams</b>	USA	Bourbon	43.3	7 anos e 11 meses	Carvalho americano	-
<b>MT</b>	(Islay) Single malt	<b>Mac-Talla Morrison Terra</b>	Escócia	Scotch	46	≥ 3	Carvalho americano	-
<b>BB12</b>	Blended	<b>Burberrys</b>	Escócia	Scotch	40	12	Carvalho	-
<b>BB15</b>	Single malt	<b>Burberrys</b>	Escócia	Scotch		15	Carvalho	-
<b>DV</b>	Single malt	<b>The Deveron</b>	Escócia	Scotch	40	18	Carvalho	Xerez e Bourbon
<b>BL</b>	Blended	<b>Ballantine's</b>	Escócia	Scotch	40	15	Carvalho	Bourbon
<b>JM</b>	Cold Brew coffee	<b>Jameson</b>	Irlanda	Irish	30	≥ 3	Bourbon	Xerez e Bourbon
<b>AMR</b>	Single malt	<b>Amrut (Bagheera)</b>	Índia	Indian	46	≥ 3	Carvalho americano	Carvalho americano
<b>TG</b>	Blended (Pure malt)	<b>Togouchi</b>	Japão	Japanese	40	3 a 9	Carvalho branco americano	Xerez e Bourbon
<b>GL</b>	Single malt	<b>Glenfiddich</b>	Escócia	Scotch	40	12	Carvalho americano, xerez e carvalho francês	Bourbon e depois em Xerez
<b>ARD</b>	Single malt	<b>The Ardmore</b>	Escócia	Scotch	46	12	Carvalho branco americano e madeira Europeia	Bourbon e Vinho do Porto
<b>WT</b>	Straight	<b>Wild Turkey</b>	USA	Bourbon	40.5	5 a 8	Carvalho americano "alligator", revestido com carvão	-
<b>MOT 1 MOT 2</b>	Single malt	<b>Motörhead (2 uni)</b>	Suécia	Single malt	40	5	Carvalho americano e carvalho oloroso (6 meses)	Bourbon

<b>WCB</b>	Blended	<b>West Cork</b>	Irlanda	Irish	40	≥ 3	Carvalho branco americano carbonizado	Bourbon
<b>WCS</b>	Single malt	<b>West Cork</b>	Irlanda	Irish	43	≥ 4	Carvalho branco americano carbonizado	Bourbon e Vinho do Porto
<b>FR</b>	Straight	<b>Four Rosés</b>	USA	Bourbon	40	5	Carvalho americano carbonizado	-
<b>SCST</b>	Rye	<b>Stork Club Straight</b>	Alemanha	Rye	45	2	Carvalho americano e alemão carbonizado	Bourbon e Vinho branco
<b>SCSM</b>	Rye	<b>Stork Club Smoky</b>	Alemanha	Rye	50	2	Carvalho americano e alemão	Laphroaig
<b>ABA</b>	Ancestral corn	<b>Abasolo</b>	México	?		2	Carvalho americano novo torrado	Carvalho americano usado
<b>BS</b>	Single malt	<b>Bud Spencer</b>	Alemanha	Single malt	49	3	Carvalho e madeira de cerejeira	Vinho tinto Amarone e Bourbon
<b>ARM</b>	Single malt	<b>Armorik</b>	França	Single malt	46	3 a 4	Carvalho britânico ou americano	Xerez oloroso
<b>KV</b>	Single malt	<b>Kavalan</b>	Taiwan	Single malt	40	2	Carvalho americano	Vinho do Porto, Bourbon, Brandy, Xerez
<b>KU</b>	Blended (Pure malt)	<b>The Kurayoshi</b>	Japão	Japanese	43	> 3	Carvalho branco	Bourbon
<b>DW</b>	Blended	<b>Dewar's</b>	Escócia	Scotch	40	8	Carvalho	Rum das Caraíbas

## Bibliografia

1. Wisniewska, P., Dymerski, T., Wardencki, W. and Namiesnik, J., *Chemical composition analysis and authentication of whisky*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015. **95**: p. 2159-2166.
2. CFR, Code of Federal Regulations Title 27 Part 5.143 Labelling and Advertising of Distilled Spirits; the Standards of Identity for Distilled Spirits. [cited 2023 2/3/2023]; Available from: <http://www.ecfr.gov>.
3. Rhodes, C., Heaton, K., Goodall, I. and Brereton, PA. , *Gas chromatography carbon isotope ratio mass spectrometry applied to the detection of neutral alcohol in Scotch whisky*. Food Chem, 2009. **114**: p. 697– 701.
4. Christoph, N., Bauer-Christoph, C., *Flavour of spirit drinks: raw materials, fermentation, distillation, and ageing, in Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, ed. by RG Berger. Springer, 2007: p. 219– 239.
5. Russell, I., Stewart, G., Anstruther, A., *Whisky. Technology, Poduction and Marketing*. Elsevier Ltd, 2014. **2nd ed**: p. 1-304.
6. Piggott, J., *Whisky, Whisky and Bourbon: Composition and Analysis of Whisky*. The Encyclopedia of Food and HealthThe Encyclopedia of Food and Health, 2016. **5**: p. 514-518.
7. Lee, M., *Nature and origin of sensory character in scotch whisky*. Strathclyde Thesis Copyright, 2000: p. 2-219.
8. Power, A.C., Néill, C. N., Geoghegan, S., Currivan, S., Deasy, M. and Cozzolino, D., *A Brief History of Whiskey Adulteration and the Role of Spectroscopy Combined with Chemometrics in the Detection of Modern Whiskey Fraud*. Beverages, 2020. **6**: p. 49.
9. *Pot Still Vs Column Still*. 2019 [cited 2023 27/07/2023]; Available from: <https://www.winesandspiritsacademy.com/blog/pot-still-vs-column-still/>.
10. Jackson, M., *Whisky: The definitive world guide*. Vol. 2nd ed. 2017, [https://books.google.pt/books?hl=en&lr=&id=oukzDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA5&dq=Whisky:+The+definitive+world+guide&ots=Y396rAZgIE&sig=Zb1AnXm9VOX1JJia2PzJ4DAZ4DI&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Whisky%3A%20The%20definitive%20world%20guide&f=false](https://books.google.pt/books?hl=en&lr=&id=oukzDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA5&dq=Whisky:+The+definitive+world+guide&ots=Y396rAZgIE&sig=Zb1AnXm9VOX1JJia2PzJ4DAZ4DI&redir_esc=y#v=onepage&q=Whisky%3A%20The%20definitive%20world%20guide&f=false): Dorling Kindersley Ltd. 246-258.
11. Hopfer, H., Gilleland, G., Ebeler, S.E., Nelson, J., *Elemental Profiles of Whisk(e)y Allow Differentiation by Type and Region*. Beverages, 2017. **3**: p. 8.
12. *The Scotch Whisky Regulations*. 2009 [cited 2023 9 /3/2023]; Available from: <https://www.legislation.gov.uk/uksi/2009/2890/regulation/3/made>.
13. Jetro, *Chapter 3 - Whisky in Marketing Guidebook For Major Imported Products*. p. 23-31.
14. Wright, S., Pilkington, H., *Chapter 7 - Whiskies of Canada and the United States*. Academic Press, 2022: p. 87-104.
15. Ralph, R., *The Alcohol Textbook. Chapter 14 - Production of American whiskies: Bourbon, corn, rye and Tennessee*. University Press, 1999. (**3rd edition**). p. 211-223.
16. *Food and Drugs Regulation. Part B. Division 2., in Consolidated Laws of Canada*. 2023: Justice Laws Website

17. *Certificates of Age and Origin for Distilled Spirits Produced or Packaged in Canada Order*, in *SI (2009) SI/2009-61*. 2009, Department of Agriculture and Agri-Food: Canada, Ottawa.
18. Japhe, B. *The story of Japanese whisky, and how Scottish tradition inspired it*. 2022 [cited 2023 12/08/2023]; Available from: <https://www.nationalgeographic.com/travel/article/paid-content-japanese-whisky>.
19. Chen, J., *Chapter 4 - Spirit beverage development in the Asia-China region*, in *Whisky and Other Spirits 2022*, Academic Press. p. 41-61.
20. Maitin, B., *Chapter 4 - Indian whiskies*. Academic Press, 2014. **2nd ed**: p. 27-38.
21. Walker, G.M., Hughes, P.S., *Distilled Spirits e New Horizons: Energy, Environment and Enlightenment*. Nottingham University Press, 2010: p. 33-38, 268-277.
22. Wanikawa, A., *Flavors in Malt Whisky: A Review*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2020. **78**: p. 260-278.
23. Kelly, T.J., O'Connor, C. and Kilcawley, K.N., *Sources of Volatile Aromatic Congeners in Whiskey*. Beverages, 2023. **9**: p. 64.
24. Sádecká, J., Uričková, V. and Jakubíková, M., *Fluorescence Spectroscopy for the Analysis of Spirit Drinks*, in *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences*, , M. Stauffer, Editor. 2016, IntechOpen, : London.
25. Pryde, J., Conner, J., Jack, F., Lancaster, M., Meek, L., Owen, C., Paterson, R., Steele, G., Strang, F. and Woods, J., *Sensory and Chemical Analysis of 'Shackleton's' Mackinlay Scotch Whisky*. Journal of the Institute of Brewing, 2011. **117**: p. 156-165.
26. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t., *Chemical Composition of Alcoholic Beverages, Additives and Contaminants*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1988. **44**.
27. Macedo, C., *Desenvolvimento e validação de um método para a caracterização de vinhos por HPLC-DAD*, in *Escola de Ciências*. 2015, Universidade do Minho.
28. Lee, M., Paterson, A., Piggott, J.R., *Origins of Flavour in Whiskies and a Revised Flavour Wheel: a Review*. Journal of the Institute of Brewing, 2001. **107**: p. 287-313.
29. Aylott, R.I. and W.M. MacKenzie, *Analytical Strategies to Confirm the Generic Authenticity of Scotch Whisky*. Journal of the Institute of Brewing, 2010. **116**: p. 215-229.
30. Clyne, J., Conner, J.M., Paterson, A. and Piggott, J.R., *The effect of cask charring on Scotch whisky maturation*. International Journal of Food Science & Technology, 2007. **28**: p. 69-81.
31. Wanikawa, A. and T. Sugimoto, *A Narrative Review of Sulfur Compounds in Whisk(e)y*. Molecules, 2022. **27**.
32. *Regulamento (CE) Nº 110/2008 de 15 de Janeiro Do Parlamento Europeu E Do Concelho*, in *Nº 110/2008 2008: Jornal Oficial da União Europeia*. p. 16-39.
33. Mosedale, J.R., *Effects of oak wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky*. Forestry, 1995. **68**: p. 203-230.
34. Mosedale, J.R. and J.L. Puech, *Wood maturation of distilled beverages*. Trends in Food Science & Technology, 1998. **9**: p. 95-101.

35. Conner, J.M., A. Paterson, and J.R. Piggott, *Changes in wood extractives from oak cask staves through maturation of scotch malt whisky*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1993. **62**: p. 169-174.
36. Conner, J.M., A. Paterson, and J.R. Piggott, *Analysis of lignin from oak casks used for the maturation of Scotch whisky*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992. **60**: p. 349-353.
37. González-Arjona, D., González-Gallero, V., Pablos, F. and Gustavo González, A., *Authentication and differentiation of irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis*. Analytica Chimica Acta, 1999. **381**: p. 257-264.
38. Becker, W., Heitz, J. and Bergmann, A., *Ultra-fast Fluorescence Decay in Scottish Whisky*, B. Becker & Hickl GmbH, Germany, Editor.



## Capítulo II

# Materiais, Métodos e Técnicas Instrumentais

## Subcapítulo I

Neste subcapítulo, encontram-se descritos os procedimentos utilizados para a obtenção dos espectros de absorção, emissão e excitação de fluorescência e tempos de vida de fluorescência.

### 2.1 Absorção de luz UV-vis: aspetos fundamentais

A base de qualquer processo fotoquímico é fundamentalmente a absorção de luz pela matéria. Para que a molécula absorva luz, esta e um feixe de luz têm de estar em ressonância – lei da conservação da energia <sup>[1]</sup>.

Uma molécula no estado fundamental ( $S_0$ ) pode ser excitada ao absorver um fóton de luz com energia específica, promovendo a sua passagem para um estado eletronicamente excitado ( $S_1...S_n$ ), se a energia do fóton for igual á diferença de energia entre os dois estados – lei de *Planck*. Diz-se, por isso, que a absorção de luz ultravioleta-visível é um processo *quantizado* <sup>[2]</sup>. A excitação ocorre quando se gera um fóton com uma certa energia, com recurso a uma fonte de laser ou uma lâmpada, para que seja absorvido pelo cromóforo.

O espectro de absorção pode ser descrito através da lei de Beer-Lambert. A lei de Beer-Lambert (Eq. 2.1) permite relacionar linearmente a quantidade de luz que foi absorvida ( $A$ ) a um dado comprimento de onda, com a concentração ( $c$ ), o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) e o percurso ótico ( $l$ ). Esta lei declara, assim, que a quantidade de luz absorvida é proporcional ao número de moléculas pelas quais a luz passa <sup>[1]</sup>.

$$A = \epsilon(\lambda).l.c \quad (\text{Eq. 2.1})$$

A lei também afirma que a fração de luz absorvida por um meio transparente é independente da intensidade da luz incidente <sup>[1]</sup>. Desse modo, o valor da absorção pode também ser obtido pelo logaritmo entre a intensidade da radiação transmitida  $I_0$  e a radiação incidente  $I$ :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

Após a absorção de um fóton, a molécula excitada pode libertar a energia absorvida de forma radiativa (emissão de luz), não radiativa (sem emissão de luz, por exemplo através da dissipação de calor) ou segundo reações fotoquímicas (degradação) [3, 4]. Estas vias de desativação podem ocorrer individualmente ou em simultâneo e as mesmas encontram-se representadas no tradicional Diagrama de *Jablonski* (Figura 2.1). Os fluoróforos podem existir em vários níveis de energia vibracional ( $\nu$ ) [1].

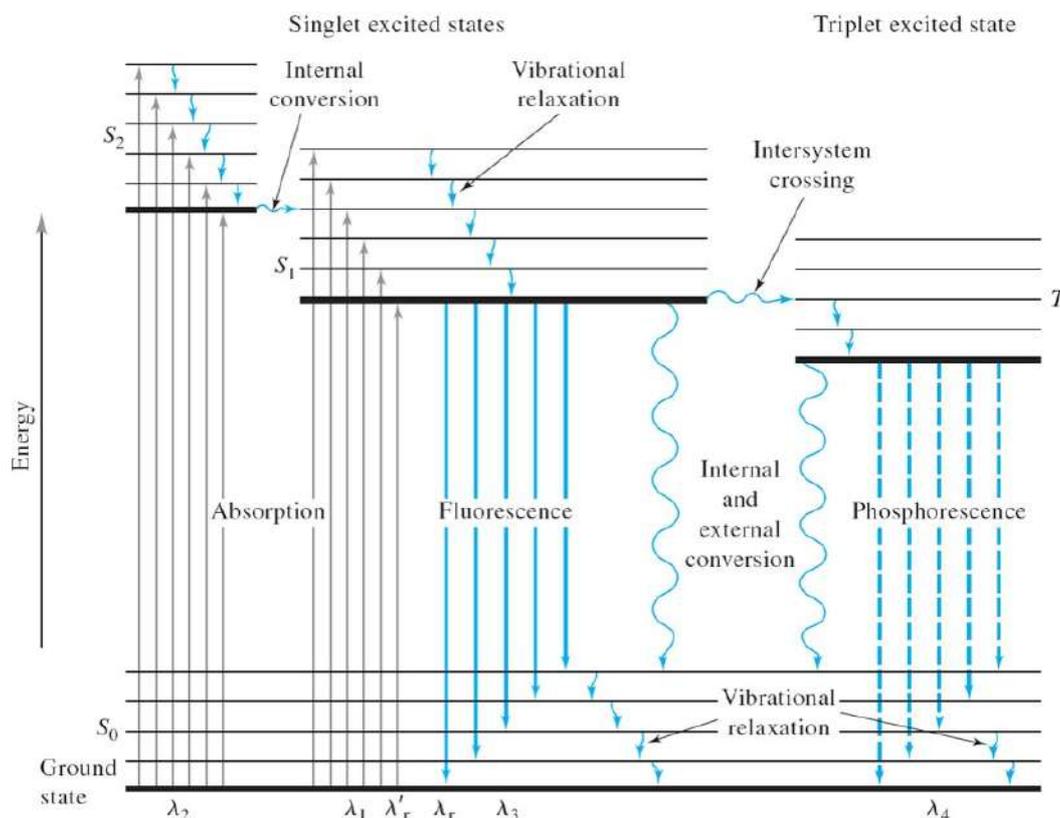


Figura 2.1 - Diagrama de Jablonski-Pérrin, representando os diversos níveis de energia vibracionais (linhas a preto finas) e eletrônicos (linhas a preto grossas) decorrentes de uma excitação eletrônica e os processos de desativação deles resultantes.

Quando no nível de energia  $S_1$ , o regresso para o estado fundamental  $S_0$  pode ocorrer pelos processos de conversão interna, cruzamento intersistemas ou por fluorescência. Quando a molécula regressa para o nível mais baixo de energia vibracional ( $\nu=0$ ) do estado  $S_{n-1}$  em  $10^{-11}$  a  $10^{-12}$  s e assim, gradualmente, chega ao estado  $S_1$  o processo é não-radiativo e designa-se por conversão interna (IC, do inglês *internal conversion*) [5] – transição sem radiação entre dois estados eletrônicos com a mesma multiplicidade de spin [1]. O mesmo acontece se decair de  $S_1$  para  $S_0$  porém, neste nível

pode haver competição com a fluorescência (processo radiativo). A emissão de um fóton, ou seja, a *luminescência* pode envolver ou não alteração da multiplicidade de spin [5].

*Fluorescência* é um fenómeno de luminescência no qual a luz é devida a uma transição do estado singlete de menor energia  $S_1$  (regra de Kasha) para o estado fundamental, ou seja, envolvendo estados com a mesma multiplicidade de spin. Outro fenómeno de luminescência é a *fosforescência*, porém acontece quando a luz é emitida devido às transições que envolvem dois estados de diferentes multiplicidades de spin, ou seja, transições proibidas por spin  $T_1 \rightarrow S_0$ . No estado singuleto excitado  $S_1$ , a molécula pode igualmente passar para o estado tripleto ( $S^1 \rightsquigarrow T^1$ ) e a esta conversão designa-se de cruzamento intersistemas (ISC, do inglês *intersystem crossing*) [6]. Esta via adicional, ISC, trata-se de um processo sem radiação que ocorre entre dois níveis vibracionais isoenergéticos com diferentes multiplicidades de spin [1]. Após esta transição, a dissipação de energia para o estado fundamental pode ocorrer com emissão de *fosforescência* ou não. Tipicamente, os tempos de vida da fluorescência variam entre  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  s, enquanto os da fosforescência são muito elevados (*ms* a  $10^2$  s) [2, 6]. Por fim, a relaxação vibracional está associada à transferência de energia para o solvente sendo, por isso, um fenómeno não radiativo. Normalmente, a conversão interna e o cruzamento intersistemas são seguidos de relaxamento vibracional para o nível mais baixo do novo estado eletrónico [7].

No processo de *fluorescência*, a emissão de um fóton é sempre acompanhada de perda de energia, levando a um desvio nos espectros de emissão de fluorescência para comprimentos de onda maiores (energias mais baixas) em relação aos espectros de absorção [1]. No entanto, se não existir uma alteração da geometria ou do momento dipolar do estado excitado face ao fundamental, os espectros de absorção e emissão são simétricos. Fatores como o solvente e a temperatura podem promover alterações [5].

A diferença entre o comprimento de onda máximo de absorção e o comprimento de onda máximo de emissão é conhecido como desvio de Stokes ( $\Delta\nu$ ) (Eq. 2.3). Esse desvio, do espectro de fluorescência face ao de absorção, deve-se à perda de energia como consequência da conversão interna e da relaxação vibracional de estados superiores e está relacionado com a estrutura da espécie emissora – fluoróforo, e o meio. O comprimento de onda no qual os espectros de absorção e emissão se cruzam corresponde à energia singlete da molécula ( $E_S$ ) [2].

$$\Delta \nu = \nu_{max}^{abs} - \nu_{max}^{em} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

## 2.2 Características da Fluorescência

O aspeto mais importante da fluorescência é o facto de esta ocorrer em comprimentos de onda maiores relativamente aos da absorção. O tempo de vida da fluorescência e o rendimento quântico são talvez as características mais importantes de um fluoróforo [3, 4], os outros sendo a sua energia e constantes de velocidade ( $k$ ).

Após a excitação das moléculas, se o estado excitado for *luminescente* mede-se o tempo de vida,  $\tau$ , através do decaimento da luminescência, uma vez que a intensidade  $I(t)$  é proporcional à concentração quando a excitação diminui exponencialmente com o tempo  $c(t)$  [7]. Os decaimentos de intensidade são dados por

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

onde  $I_0$  é a intensidade em  $t = 0$ , imediatamente após o pulso de excitação. O tempo de vida de fluorescência define-se como o tempo médio em que a molécula permanece no seu estado excitado antes de retornar ao estado fundamental [8, 9]. Este determina o tempo disponível do fluoróforo para interagir ou difundir no seu ambiente e a informação da sua emissão [1]. Este valor é teoricamente definido como o inverso da soma das constantes de velocidade para todos os processos de despovoamento do estado excitado e descrito pela equação, onde  $k_r$  e  $k_{nr}$  são as constantes de velocidade radiativas e não radiativas, respetivamente [10].

$$\tau_F = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

Quando o tempo de vida medido não é igual ao tempo de vida de fluorescência,  $\tau_F$ , existe competição entre os processos não radiativos relacionados à desativação do estado excitado [2].  $\tau_F$  aplica-se somente aos processos de desativação do estado  $S_1$ , definido como

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + \sum_i k_i} \quad (\text{Eq. 2.6})$$

onde  $k_i$  são as constantes de velocidade para os processos competitivos. A constante de velocidade de fluorescência  $k_F$  (ou  $k_r$ ) é dada por

$$k_F = \frac{1}{\tau_F^0} \quad (\text{Eq. 2.7})$$

sendo  $\tau_F^0$  o tempo de vida intrínseco do processo de fluorescência. Este tempo só é igual ao tempo de vida observado,  $\tau_F$ , quando não há outros processos de desativação [5]. Como,

$$k_F = \frac{\phi_F}{\tau_F} \text{ então } \tau_F^0 = \frac{\tau_F}{k_F}.$$

### 2.2.1 Fluorescência Resolvida no Tempo (estado dinâmico)

As medições da fluorescência podem ser classificadas em dois tipos de medições: estado estacionário ou resolvido no tempo (estado dinâmico).

A fluorescência resolvida no tempo é das técnicas mais utilizadas para estudar moléculas, nomeadamente a sua estrutura, função e dinâmica de reação [11]. Quando um fluoróforo é irradiado por um pulso de luz (UV, visível ou NIR) ou luz modulada verifica-se uma alteração na fluorescência que se manifesta durante um curto período de tempo, na escala dos pico-/nanossegundos. A partir da diminuição da intensidade da fluorescência ao longo do tempo avalia-se o tempo de vida de decaimento da espécie fluorescente. O tempo de vida de uma espécie determina, assim, o tempo disponível para o fluoróforo interagir ou se difundir no seu ambiente.

Na fluorescência, grande parte do conteúdo da informação molecular e estrutural está disponível apenas por medições resolvidas no tempo, fornecendo uma melhor compreensão dos processos fotofísicos e fotoquímicos envolvidos no sistema [1, 12]. Nomeadamente, revelam se a extinção é devida à difusão ou à formação de complexos com os fluoróforos no estado fundamental bem como, as reações que levam à formação de agregados, dímeros, excímeros e transferência de energia [8].

#### TCSPC

A técnica de TCSPC (contagem de fotões únicos correlacionados temporalmente), usada para determinar tempos de vida de fluorescência, é uma técnica baseada no princípio de que a probabilidade de distribuição de tempo de um único fotão emitido, após um tempo  $t$  do pulso de excitação, é proporcional à intensidade de fluorescência nesse mesmo instante seguindo, assim, a distribuição estatística de todos os fotões emitidos [8, 11]. Ou seja, para sinais de baixo nível e alta taxa de repetição, a intensidade da luz é tão baixa que a probabilidade de detetar um fotão durante o período de sinal é altamente menor que 1. Quando um fotão é detetado, o tempo do pulso correspondente é medido [1]. Após um grande número de pulsos de excitação, a distribuição da

probabilidade para a emissão de cada fóton único fornece o decaimento da intensidade para todos os fótons emitidos, ao longo do tempo – curva de decaimento [8, 11].

Este método possui uma alta resolução temporal, entre picosegundos (ps) e nanossegundos (ns), permitindo o estudo de fluoróforos com sinais fracos. Quando a luz emitida é pouco intensa, o aparelho cria uma tensão representativa do fluxo ótico que lhe possibilita o registo repetitivo e preciso do tempo e dos fótons únicos emitidos vindos da amostra. Uma vez que o TCSPC não é limitado pela linearidade do detetor, conseguindo medir decaimentos com três ordens de grandeza, faz com que seja um ótimo método para estudar processos multiexponenciais ou não exponenciais [11].

O equipamento possui uma fonte de luz, um monocromador, um detetor de fóton único e uma parte eletrônica ultra-rápida. O comprimento de onda de excitação é selecionado com filtros de interferência ou através de um monocromador. A amostra é excitada por um curto pulso de luz que é depois convertido em pulso elétrico e enviado para um conversor de tempo-para-amplitude (TAC). A emissão de um único fóton vai ser detetada por um fotomultiplicador e os sinais elétricos da fonte de luz e do fotomultiplicador são depois transferidos para um computador com placa TCSPC. Esta placa permite o registo do histograma das contagens em função do tempo. Após muitas contagens, gera-se um histograma de alturas com as chegadas dos fótons por canal, representando a curva de decaimento de fluorescência [1, 7, 11].

### **fs-TA**

A espectroscopia de absorção transiente de femtosegundo (fs-TA) é uma técnica espectroscópica de sonda de bomba (*pump-probe*) poderosa para caracterizar a dinâmica dos estados excitados e dos intermediários reativos durante os seus tempos de vida. Ao inverso da conversão interna, da fluorescência e do cruzamento intersistemas, que levam à perda de energia, a fs-TA investiga em tempo real a formação de novas espécies químicas, deslocação de energia dentro do sistema e transferência de elétrons, bem como a medição de estados singlete e tripleto. Permite a caracterização da absorção de uma amostra opticamente excitada e o tempo de vida associado [13].

Os eventos químicos são iniciados por um pulso de laser ultrarrápido (bomba) e os eventos fotofísicos e fotoquímicos por outro pulso. Inicialmente, uma fração das moléculas é promovida a um estado excitado eletronicamente por meio de um pulso de excitação ultra-curto (ou bomba). Um segundo pulso fraco (pulso de sonda) é enviado

através da amostra com um tempo  $\tau$  menor que o pulso da bomba para medir as alterações na absorção em função do comprimento de onda e desse tempo de atraso. Como resultado, é calculado um espectro de absorção que consiste na diferença entre o espectro de absorção da amostra excitada e o espectro de absorção da amostra no estado fundamental ( $\Delta A$ ). Para extrair a informação são aplicados procedimentos de análise global <sup>[13, 14]</sup>.

$$\Delta A = - \log \frac{I_{bomba} + I_{sonda}}{I_{sonda}} \quad (\text{Eq. 2.8})$$

Um espectro  $\Delta A$  contém 4 contribuições. A primeira é pelo estado fundamental. Uma vez que ocorre a excitação da amostra e menos moléculas permanecem no estado fundamental, a absorção neste estado da amostra excitada vai ser menor do que na amostra não excitada. A segunda é pela emissão estimulada. Ocorre quando um fóton do pulso da sonda induz a emissão de outro fóton na molécula excitada e este retorna ao estado fundamental com um perfil espectral semelhante ao da fluorescência. A terceira contribuição é dada pela absorção do estado excitado. Como após excitação o cromóforo transita para estados excitados mais altos, ocorre a absorção nesses comprimentos de onda. Por último, a quarta é fornecida pela absorção transiente da amostra. O cromóforo, após excitado pode transitar para níveis eletrônicos superiores ou podem ocorrer reações que resultam em estados moleculares transientes (ex: tripletos). A absorção nestes estados de vida longa também é medida <sup>[13]</sup>.

## FLIM

A microscopia de fluorescência temporalmente resolvida (FLIM) é um método de imagem muito bem estabelecido onde as informações do tempo de vida de moléculas fluorescentes são combinadas com a sua localização espacial. Esta combinação produz uma imagem com base nas diferenças da velocidade de decaimento do tempo de vida do estado excitado de uma amostra fluorescente. O sistema FLIM foi implementado tanto na especialidade da frequência, usando luz de excitação modulada, quanto no domínio do tempo, usando fontes de luz pulsada. Em ambos, a luz de fluorescência emitida é medida com resolução temporal <sup>[15, 16]</sup>.

Tem sido amplamente utilizado em imagens devido à sua alta sensibilidade ao meio molecular e às mudanças conformacionais, e por ser independente da concentração do fluoróforo <sup>[16, 17]</sup>. Pode detetar alterações do pH, temperatura, conformação ou

identificar alterações moleculares. Consegue discriminar fluoróforos sobrepostos no espectro usando o tempo de vida da fluorescência, ao contrário da fluorescência de intensidade, e fornecer informações sobre a sua função e comportamento [16].

Uma imagem FLIM é constituída por pixels, sendo em cada pixel determinado o tempo de vida de fluorescência através de dados TCSPC. Para funções complexas de decaimento, o ajuste fornece os tempos de vida e as respectivas amplitudes dos componentes de decaimento. Em casos mais simples, o resultado é a vida útil das funções de decaimento nos pixels individuais [18]. A grande vantagem do FLIM é a sua rápida velocidade de aquisição, pois ao conseguir recolher em simultâneo os tempos de vida de todos os pixels da imagem permite imagens dos tempos de vida em tempo real. Uma desvantagem do TCSPC é que a taxa de contagem do sinal do fóton deve ser mais baixa que o sinal do pulso de excitação de forma que não ocorra sobreposição dos sinais.

Uma vez que se trata de uma técnica temporal, o microscópio deve estar equipado com uma fonte de luz pulsada para a excitação [16]. Após um curto pulso de luz, os tempos de chegada de um grande número de fótons são registados, obtendo-se o decaimento exponencial das moléculas fluorescentes. Para que as imagens geradas sejam exclusivamente dos fótons de fluorescência, a luz emitida é filtrada antes de ser detetada. A resolução deste sistema é da ordem dos nano (ns) e picossegundos (ps) [16]. Uma vez que não foi recolhida imagem das soluções líquidas, usou-se outro modo de aquisição das curvas de decaimento de fluorescência num único ponto, FLIP.

A Figura 2.2 resume os principais componentes de um sistema de aquisição de tempos de vida de fluorescência FLIM.



Figura 2.2 - Sistema de aquisição de dados FLIM adotado neste trabalho.

## 2.2 Instrumentação

### 2.2.1 Espectros de absorção UV-vis

Os espectros de absorção UV-vis dos uísques e dos padrões (ácido gálico, 5-hidroximetil furfural, furfural, ácido vanílico, ácido siríngico, siringaldeído e coniferaldeído) foram registados com o espectrómetro Shimadzu UV-2600, usando células de quartzo *Hellma* de 0.5 cm. Todos os espectros foram obtidos à temperatura ambiente, resolução de 0.5 nm, nos comprimentos de onda compreendidos entre 200 e 800 nm.

### 2.2.2 Fluorescência no estado estacionário

Todos os espectros de fluorescência foram registados num espectralfluorímetro Horiba *Jobin-Ivon Spex Fluorolog 3-2.1* usando células de quartzo *Hellma* de 0.5 cm. Na maioria dos casos, a largura das fendas de excitação e emissão foi de 2 mm (alguns 3 mm) para melhor sensibilidade e o tempo de integração 0.5 segundos. Os espectros obtidos permitiram obter dados como os máximos de emissão. Os dados recolhidos foram corrigidos para a resposta instrumental do sistema utilizado e, posteriormente, tratados com o programa OriginPro8.

O espectralfluorímetro possui uma lâmpada de Xénon 450W e está acoplado a um banho termostaticado mantido, normalmente, a cerca de 20°C.

### 2.2.3 ns-TCSPC

Os decaimentos de fluorescência foram medidos usando um aparelho de contagem de fótons único correlacionado com o tempo de nanossegundos (ns-TCSPC) contruído pelo grupo de fotoquímica. Os decaimentos e a função de resposta instrumental (IRF) foram controladas pelo software *Decays* e recolhidos usando 1240 canais com uma escala de tempo de 97.1 ps/ch, até 500 contagens. A fonte de excitação foi um PicoLed da *PicoQuant* ( $\lambda_{exc} = 373$  nm), monocromadores de excitação e emissão de *Jobin-Yvon H20* para seleção do comprimento de onda, um fotomultiplicador *Philips XP2020Q* para deteção, um conversor tempo-amplitude (TAC) da *Canberra Instruments* (2145), um analisador multicanal *AcuuSpec* e discriminadores START/STOP. Os dados de 4 uísques foram recolhidos a 3 comprimentos de onda de emissão diferentes com excitação a 373 nm. A desconvolução das curvas de decaimento de fluorescência foi realizada através do

programa *SAND* que faz análise com base no método de função de modulação usando o sinal da função de resposta do instrumento recolhido com uma solução de espalhamento (solução aquosa de Ludox). As curvas de decaimento de intensidade foram ajustadas a funções bi e tri-exponenciais.

#### 2.2.4 Espectroscopia de absorção de transiente de femtosegundo (fs-TA)

As experiências de Espectroscopia de absorção de transiente de femtosegundo foram realizadas num espectrómetro Helios da *Ultrafast Systems* com sonda fs-TA (350-1600 nm) e função de resposta instrumental de cerca de 250 fs. Equipado com um laser Spectra-Physics Solstice -100F de femtosegundo acoplado a um amplificador ótico Spectra-Physics TOPAS Prime F para gerar os pulsos. A luz da sonda na faixa UV (375 e 310 nm) passou por um atraso ótico e foi focada num cristal de CaF<sub>2</sub> de conversão vertical para gerar um contínuo de luz branca (350-750 nm). Todas as medições foram obtidas com uma *cuvette* de quartzo de 2 mm com excitação a 375 nm para os uísques e 310 nm para os padrões. O *chirp* espectral dos dados foi corrigido usando o programa Surface Xplorer PRO da Ultrafast Systems.

#### 2.2.5 FLIM

As imagens de tempo de vida foram recolhidas usando um sistema FLIM confocal DCS-120 *Becker e Hickl* (GmbH). O sistema está equipado com um módulo do Sistema TCSPC (SPC-150N), um microscópio ótico invertido NIKON Ti2-N-ND controlado por uma unidade de acionamento galvo (Becker e Hickl GDA-121) e um fotodetector GaAsP híbrido (300–720 nm) controlado por uma placa controladora do detetor DCC-100. Foi usada apenas a objetiva de 20× (Nikon Plan Fluor 20×/0.5). O sistema de microscópio confocal DCS-120 está equipado com um divisor de feixe polarizador. A fonte de excitação é um laser de diodo de picosegundos de comprimento de onda de 375 nm (lasers da série bDL) trabalhando em modo pulsado (taxa de repetição: 80 MHz). O IRF do sistema é inferior a 100 ps. Uma vez que não foram gravadas imagens FLIM por se tratar de uma amostra líquida, sem ponto certo de focagem, trabalhou-se no *Setup* FLIP 80MHz LIVE. A potência total do laser na amostra foi definida para 40% do valor máximo e a emissão recolhida passou por um *pinhole* de 1.5 nm, na maioria dos casos, zoom de 8× e por dois filtros (LP390 e ET445/58 ou ET510/80). Para cada amostra, foram acumuladas cerca de 10 000 contagens. A análise de dados foi realizada por meio de um software de

análise de dados SPCImage NG. As curvas de decaimento foram ajustadas usando o método de ajuste do algoritmo de verossimilhança máxima (ou estimativa de verossimilhança, MLE) em cada pixel. As medições foram realizadas utilizando uma célula cilíndrica de quartzo de 1 mL (25 × 5 mm).

## Bibliografia

1. Costa, T., *Photophysics of Macromolecular Pyrene-Containing systems in Chemistry Department*. 2008, University of Coimbra.
2. Rodrigues, A.C.B., *Betalainas funcionais: semisíntese, propriedades fotofísicas e interações intermoleculares*, in *Instituto de Química*. 2017, Universidade de São Paulo.
3. Castro, C.S., *Synthesis, Photophysical and Molecular Simulation Investigations on Fluorescent Oligomers and Polymers*, in *Chemistry Department*. 2015, University of Coimbra.
4. Zollinger, H., *Colour Chemistry Syntheses, Properties, and Application of Organic Dyes and Pigments*. Verlag Helvetica Chimica Acta: Switzerland, 2003.
5. Seixas de Melo, J.S., *Fotofísica Molecular de Cumarinas e Tiofenos*, in *PhD Thesis, Technical University of Lisbon*. 1996, Technical University of Lisbon.
6. Bagchi, B., *How fast is ultrafast chemistry?* *Current Science*, 1995. **69**: p. 129-140.
7. Evans, R., Douglas, P., Burrows, H., *Applied Photochemistry*. Springer, 2013: p. 533-585.
8. Cunha, C., *Complexos Binucleares de Cumarinas-Au*. Mst Thesis: University of Coimbra, 2020.
9. Periasamy, A., Wodnicki, P., Wang, X. F., Kwon, S., Gordon, G. W. and Herman, B., *Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy using a picosecond pulsed tunable dye laser system*. *Review of Scientific Instruments*, 1996. **67**: p. 3722-3731.
10. Suhling, K., et al., *Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments*. *Medical Photonics*, 2015. **27**: p. 3-40.
11. Arnaut, L.G., *Chapter 3 - Experimental Methods*, in *Chemical Kinetics*. 2021, Elsevier. p. 37-91.
12. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2006. **3rd edition**: p. 1-25.
13. Berera, R., Van Grondelle, R., Kennis, J.T., *Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems*. *Photosynth Res*, 2009. **101**: p. 105-18.
14. Weiner, A.M., *Ultrafast Optics*. 2009, John Wiley & Sons, INC, Publication: Wiley. 563.
15. Oelsner, C., Birke, F., Ermilov, E., Gerber, D., *Measuring steady-state and time-resolved photoluminescence from a positionable, micrometer-sized observation volume with FluoMic add-on*, B. PicoQuant, Editor.
16. Silva, S.F., *Time-Gated Fluorescence Lifetime Microscopy Methods and Instrumentation for Metabolic Imaging*, in *Physics Department*. 2018, University of Coimbra.
17. Datta, R., Heaster, T. M., Sharick, J. T., Gillette, A. A. and Skala, M. C., *Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications*. *J Biomed Opt*, 2020. **25**: p. 1-43.
18. GmbH, B.H., *SPCImage Next Generation: FLIM Data Analysis Software*, B. Becker & Hickl GmbH, Germany, Editor. 2019. p. 3.



## Subcapítulo II

Neste subcapítulo, encontram-se descritos os procedimentos utilizados para a determinação de ácidos fenólicos, derivados furânicos e aldeídos fenólicos em bebidas espirituosas, por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com detetor DAD (do inglês, *diode array detector*).

### 2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O estudo de compostos extraíveis dos barris, nomeadamente ácidos e aldeídos fenólicos e derivados furânicos é de interesse para as características e qualidade dos uísques, como já referido no capítulo I. A deteção destes compostos é comumente realizada por métodos cromatográficos, nomeadamente HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, combinada com vários detetores como MS (espetrometria de massa) ou DAD (*diode array detector*). Esta técnica permite separar os diferentes compostos presentes na mistura e fornecer as respetivas informações qualitativas e quantitativas [1, 2].

Nesta cromatografia, a separação depende da distribuição molecular dos componentes em duas fases: fase móvel e fase estacionária. O sistema de bombas injeta (a altas pressões) a fase móvel, que é líquida, num determinado fluxo. Posteriormente, é injetada a amostra que se pretende separar, entrando em contacto com a fase móvel que, por sua vez, força a amostra a atravessar pela fase estacionária. A fase estacionária consiste numa coluna de separação de aço cheia de pequenas partículas porosas capazes de reter as moléculas por um determinado tempo, dependendo da sua afinidade pela coluna. Se o analito tiver menos afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a móvel, vai eluir mais rapidamente na coluna e os tempos de retenção são menores, ao passo que se tiver maior afinidade pela estacionária permanecerá mais tempo ligado à coluna. À medida que elui na coluna cromatográfica, o analito dirige-se para o detetor, o qual deve ter sensibilidade para detetar as variações de sinal dos componentes individuais eluídos, separados com base nas suas propriedades químicas e físicas. As diferenças na interação entre o composto e a fase estacionária são reproduzidas por um cromatograma figurativo da eluição em diferentes tempos – tempos de retenção [2, 3].

DAD – detetor de arranjo de díodos, é o detetor mais comum para análise de compostos orgânicos a diferentes comprimentos de onda. Este varre as amostras com um feixe de luz de forma a medir a absorbância a vários comprimentos de onda, no tempo em que a espécie foi eluída da coluna. Juntos, os dados espectrais e temporais resultantes ajudam a identificar e quantificar os diferentes componentes presentes na amostra [2].

## 2.4 Reagentes e Solventes

Todos os solventes usados foram adquiridos com grau gradiente HPLC, purezas superiores a 97%. O etanol e o metanol foram obtidos à Fisher e o ácido fórmico foi comprado à Acros Organics (New Jersey, USA). Os padrões são compostos comerciais e foram utilizados sem nenhum tratamento prévio. O siringaldeído (SE) foi comprado à Aldrich, o furfural (F) à Fluka, o ácido siríngico (AS) à TCI e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), o ácido vanílico (AV) e o 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído (Coniferaldeído, CO) pertencem à Sigma-Aldrich. O ácido gálico (AG) não é possível aferir.

A água desionizada ultrapura foi obtida com recurso a um sistema de purificação *Milipore Mili-Q System*.

## 2.5 Preparação das soluções

### 2.5.1 Preparação das amostras

Foram selecionadas as 28 amostras de uísques de diferentes tipos (marca, país, %vol, idade) (pH  $\approx$  4.28) juntamente com os padrões (7) e a sua mistura para analisar em HPLC. Todas as amostras de uísque foram diluídas na proporção 1:1 com uma solução de 40% etanol:água e filtradas através de uma membrana de Nylon de porosidade 0.45  $\mu$ m para os *vials* de HPLC antes da injeção no sistema de HPLC (Figura 2.3).



Figura 2.3 - Filtração de uma amostra de uísque através de uma membrana porosa 0.45  $\mu$ m diretamente para o vial de HPLC

### 2.5.2 Solução hidroalcoólica a 40% e soluções Padrão

A solução hidroalcoólica a 40 % foi preparada num balão volumétrico de 10.0 ± 0.15 mL, usando uma proveta para medir 4 mL de etanol e perfazendo o volume com água ultrapura.

Foram preparadas soluções individuais dos padrões com o objetivo de avaliar os tempos de retenção de cada um. Os padrões foram preparados em balões volumétricos de 2.0 mL para uma concentração final de cada composto de  $10^{-4}$  M em solução hidroalcoólica 40%, dissolvidos na mesma solução. Dessas soluções individuais retirou-se igual quantidade de cada e preparou-se 10 mL de uma nova solução contendo a mistura destes com a solução hidroalcoólica.

### 2.5.3 Fase móvel

A fase móvel é constituída por 2 eluentes preparados separadamente em frascos de 1000 mL. O eluente A foi preparado com água ultrapura e ácido fórmico numa proporção de 98:2 (% v/v) (pH = 2.12), respetivamente. O eluente B é constituído por metanol, água ultrapura e ácido fórmico na proporção 70:28:2 (% v/v/v) (pH = 3.18), respetivamente.

### 2.5.4 Equipamento de método de análise

A cromatografia foi realizada com um sistema de HPLC Lachrom Elite HITACHI (VWR, Alemanha) equipado com uma bomba L-2130, forno de coluna L-2300, um detetor Diode Array L-2455 e um autosampler L-2200, executando o software EZChrom Elite para gestão, aquisição e tratamento de dados. Foi usada como fase estacionária uma coluna cromatográfica C18 de fase reversa, com 5 µm de porosidade, 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro.

### 2.5.5 Condições cromatográficas

O presente método foi desenvolvido para a separação e quantificação de ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e compostos furânicos em uísques. Foi otimizado em ordem a alcançar a melhor separação e resolução dos picos durante o tempo de análise e a melhor limpeza da coluna. Os maiores fatores a ter em consideração foram as condições

instrumentais, nomeadamente a coluna, a temperatura, o volume de injeção, o fluxo e os comprimentos de onda, bem como os solventes e a eluição.

As condições cromatográficas selecionadas foram baseadas nos trabalhos descritos em Cabrita *et al.* [4] e Canas *et al.* [5], otimizadas com base nos resultados obtidos: temperatura da coluna de 40°C, fluxo de 1mL/min, volume de injeção de 20 µL, gradiente binário consistindo no solvente A – água/ácido fórmico (98:2 v/v) e no solvente B – metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v). Antes de inseridos no sistema, os eluentes foram colocados 45 minutos a desarejar em banho de ultrassons. O gradiente utilizado encontra-se descrito na Tabela 2.1, contando com o tempo de limpeza (80-95 min) e acondicionar a coluna (95-110 min). Os cromatogramas foram adquiridos aos comprimentos de onda 254, 280 e 320 nm.

Tabela 2.1 - Gradiente utilizado na análise por HPLC: Solvente A – água/ácido fórmico (98:2 v/v); Solvente B – metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v)

<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
<b>0</b>	95	5
<b>12</b>	70	30
<b>25</b>	45	55
<b>30</b>	30	70
<b>48</b>	0	100
<b>80</b>	0	100
<b>95</b>	95	5
<b>110</b>	95	5

### 2.5.6 Identificação e quantificação dos picos cromatográficos

Os compostos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os das soluções padrão injetadas nas mesmas condições. Os compostos foram detetados nos seus máximos de absorção, a 254 nm e a 280 nm para ácidos fenólicos e derivados furânicos e a 320 nm para aldeídos fenólicos. Interferentes de alta polaridade são separados no início da corrida até 5 minutos, e outros de menor polaridade são eluídos após 40 minutos. Para cada cromatograma obtido, procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes a cada composto.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com recurso às ferramentas Microsoft Excel e Origin 8Pro.

## Bibliografia

1. Macedo, C., *Desenvolvimento e validação de um método para a caracterização de vinhos por HPLC-DAD*, in *Escola de Ciências*. 2015, Universidade do Minho.
2. Pinto, C., *A Forensic (Chemical) Analysis of Portuguese Postage Stamps (1857-1909)*, in *Chemistry Department*. 2017, University of Coimbra: Repository University of Coimbra.
3. Caldeira da Rocha, T., *Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas*, in *Faculdade de Farmácia*. 2015, Universidade do Porto.
4. Cabrita, M.J., C.B. Dias, and A.M.C. Freitas, *Phenolic Acids, Phenolic Aldehydes and Furanic Derivatives in Oak Chips: American vs. French Oaks*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2016. **32**.
5. Canas, S., Belchior, A.P., Spranger, M.I. and Bruno-de-Sousa, R., *High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation*. *Journal of Separation Science*, 2003. **26**: p. 496-502.



## Subcapítulo III

Neste subcapítulo, encontram-se descritos alguns conceitos de Quimiometria, juntamente com os métodos quimiométricos aplicados no tratamento e interpretação da informação mais relevante.

### 2.7 Quimiometria: aspetos fundamentais

Um desafio constante na química é saber como se agrupam dados e como extrair informações dos mesmos. A quimiometria surge, assim, como um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos com enorme potencial para dar resposta à vasta quantidade de informação adquirida <sup>[1, 2]</sup>.

A definição de quimiometria é clara no seu nome, *chemo* significa químico e *metrics* significa medição. É, portanto, a ciência que relaciona métodos matemáticos, estatísticos e outros de lógica para manipular o conjunto de dados químicos obtidos, de forma a entender melhor os processos químicos. Ao longo dos últimos anos, tem sido aplicada a praticamente todas as áreas da química <sup>[1, 3]</sup>.

O tratamento de dados envolve a análise de um grande número de variáveis. Como tal, a análise multivariada possibilita a redução dos dados ou a simplificação estrutural para tornar as interpretações mais fáceis, permitindo a ordenação e agrupamento de objetos, a investigação da dependência entre variáveis, construção de modelos e teste de hipóteses <sup>[1, 4]</sup>. A abordagem quimiométrica utiliza os métodos multivariados, onde todas as variáveis são consideradas ao mesmo tempo, para que o modelo construído se ajuste aos dados e uma maior quantidade de informação seja extraída destes <sup>[3]</sup>.

A quimiometria não é uma ferramenta única, mas uma variedade de métodos, incluindo estatística, eletrónica, computação, química e, principalmente, senso comum. Todas as informações fornecidas pelos programas devem ser avaliadas com senso crítico, não dispensando a participação do operador nas tomadas de decisão <sup>[5]</sup>.

O processamento, a classificação e a calibração de dados são os passos principais de qualquer análise quimiométrica. Esta divide-se em duas categorias principais: métodos de reconhecimento de padrões (RP) e calibração multivariada. O principal objetivo do reconhecimento de padrões é classificar os dados (objetos ou padrões) em várias categorias ou classes. Os métodos de RP são também eles divididos em dois tipos: as abordagens supervisionadas dividem os objetos em grupos de acordo com as suas

características, mas com base em categorias predefinidas; as técnicas não supervisionadas dividem os dados em grupos sem necessidade de conhecimento prévio [6, 7].

## 2.8 Métodos Quimiométricos

Existem vários métodos de análise multivariada. Quando o interesse é explorar padrões de associação dos dados (relações e semelhanças), distinguem-se dois métodos: análise de agrupamentos hierárquica (HCA) e análise de componentes principais (PCA). De forma breve, HCA reúne os objetos com perfis semelhantes segundo um critério escolhido e PCA destaca a informação mais importante do conjunto. Tratam-se ambos de métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões, não sendo por isso necessária identificação das amostras.

### 2.8.1 HCA

A análise de agrupamentos consiste numa técnica não supervisionada que permite a divisão dos dados em grupos de objetos com características semelhantes [1, 4]. Estes objetos são reunidos de forma que se verifique homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos [4].

O processo de agrupamento (*clustering*) combina duas fases. Numa primeira etapa estima-se uma medida de similaridade/ dissimilaridade entre os objetos e depois seleciona-se o método de agrupamento para conduzir à formação dos grupos [4]. Existem várias técnicas de agrupamento, entre as quais o agrupamento hierárquico [1].

Partindo de  $n$  grupos para um só objeto, HCA vai agrupando as amostras baseando-se na distância entre os objetos, de maneira que os mais semelhantes estejam no mesmo grupo hierárquico [7]. Os métodos hierárquicos consistem, assim, numa série de divisões do conjunto de dados, com conseqüente formação de uma série de agrupamentos entre os objetos, os quais podem ser reproduzidos segundo um dendrograma [1, 4]. O dendrograma representa a sucessiva associação dos objetos, com base na sua semelhança, onde cada nível de associação representa uma divisão do conjunto de dados em grupos e cada coluna representa uma variável [1, 2, 4]. Quanto menor a distância entre os objetos, maior a semelhança entre eles [1].

HCA é, portanto, um método popular para organizar os dados e visualizar, de um modo simples, a estrutura de sistemas complexos através de representações hierárquicas.,

São, portanto, especialmente úteis na visualização de semelhanças entre os objetos, os quais tenta agrupar em *clusters* [3].

Uma vez que conecta as amostras baseando-se na distância direta entre os objetos no dendograma [7], há dois fatores a ter em consideração: o tipo de medida de similaridade e o tipo de ligação [2]. A forma mais simples consiste em agrupar os elementos mais próximos e substituí-los por um ponto localizado a metade da distância – distância Euclidiana [1]. Após decidida a medida de distância, das quais a euclidiana e a Mahalanobis são as mais comuns, agrupam-se as amostras [7]. Existem diferentes tipos de métodos para determinar a ligação entre os objetos (simples, completa, média, centróide e variância mínima). Consistem todas em estratégias para estabelecer as distâncias entre os objetos e o grupos ou entre grupos [2, 4]. Sucessivamente, as amostras são agrupadas de acordo com os grupos formados anteriormente [4, 7].

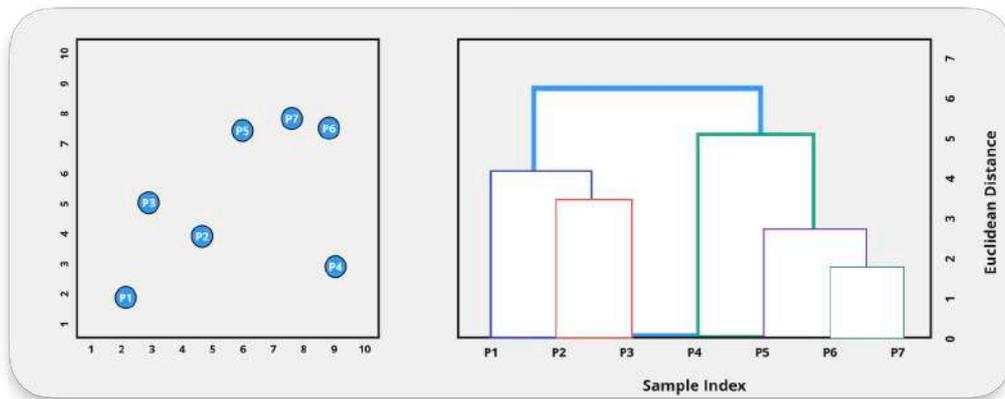


Figura 2.4 - HCA: exemplo de dendrograma de agrupamento hierárquico  
Fonte: Data Science [8]

### 2.8.2 PCA

A análise de componentes principais, uma das técnicas de análise multivariada mais conhecida, consiste num método simples e não paramétrico de extração de informações relevantes em dados desconhecidos. O objetivo é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados multivariados através de novos vetores - independentes e de menores dimensões - designados por componentes principais (PC), mas mantendo tanto quanto possível a variabilidade dos dados para que se consigam observar as diferenças entre as variáveis e as relações entre os dados. De um modo geral, este método representa os dados originais através de variáveis que reúnam a maior variabilidade possível neles contida. Cada componente (PC) consiste numa combinação linear das variáveis originais.

As mesmas são ortogonais entre si e são usadas para que se obtenha uma representação mais eficiente do sistema [1, 2, 4, 7]. A primeira componente principal (PC1) representa a combinação linear de máxima variância dos dados originais, a segunda (PC2) apresenta a segunda maior variância dos dados originais e por aí adiante para as restantes componentes, desde que não se correlacionem com cada um das anteriores [3, 4, 7]. Os dados são representados num sistema bi ou tridimensional, onde os objetos no novo sistema de eixos designam-se por *scores* e os pesos das variáveis originais intitulam-se de *loadings* [1, 2].

Aplicando este método, fica ao alcance a simplificação e a redução de dados, a deteção de *outliers*, grupos e tendências, a seleção de variáveis, a classificação e a previsão [1, 4].

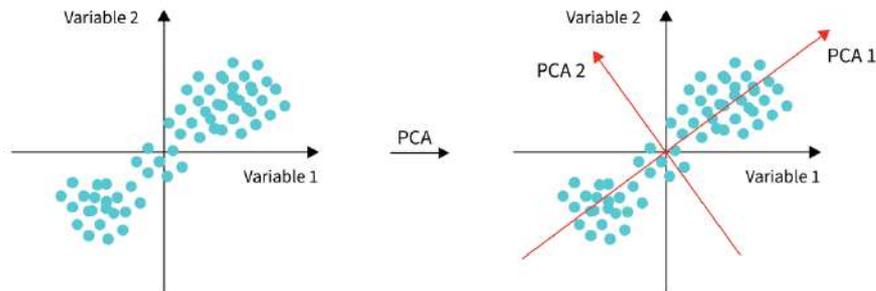


Figura 2.5 - PCA: novo eixo ao longo do qual a variância é maximizada  
Fonte: Scaler topics [9]

## Bibliografia

1. Firmino, T., *Aplicações em quimiometria. Do diagnóstico médico à quimiometria*, in *Departamento de Química*. 2011, Universidade de Coimbra.
2. Santos, J., *Métodos Quimiométricos em Ciências do Desporto*, in *Departamento de Química*. 2020, Universidade de Coimbra.
3. Héberger, K., *Chapter 7. Chemoinformatics - multivariate mathematical-statistical methods for data evaluation*. 2008, *Medical Applications of Mass Spectrometry*: Elsevier.
4. Ferreira, S.C.R., *Análise multivariada sobre bases de dados criminais*, in *Departamento de Química*. 2012, Universidade de Coimbra.
5. Ferreira, S., *Chemometrics and Statistics. Experimental Design*, in *Encyclopedia of Analytical Science*. 2019, Academic Press. p. 420-424.
6. Brereton, R., *Pattern recognition in chemometrics*, in *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2015, Elsevier. p. 90-96.
7. Schneider, M., Vacaro, B.B., Marcelo, M.C.A., *Exploratory Analysis Methods Applied to the Infrared Spectrometry Teaching*. *Revista Virtual de Química*, 2018: p. 229-243.
8. *Dendrogram in hierarchical clustering*. [cited 2023 13 de Agosto de 2023]; Available from: <https://datascience.stackexchange.com/questions/116551/dendrogram-in-hierarchical-clustering>.
9. *Principal Component Analysis*. [cited 2023 13 de Agosto de 2023]; Available from: <https://www.scaler.com/topics/nlp/what-is-pca/>.



## Capítulo III

# Resultados e Discussão

Os procedimentos descritos no capítulo anterior foram aplicados aos vinte e oito uísques e aos sete padrões estudados. Nesta secção apresentam-se os resultados mais relevantes obtidos segundo essas metodologias.

### 3.1 Espectroscopia de absorção UV-vis

Os espectros de absorção dos 28 uísques foram adquiridos no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 600 nm. Foram também adquiridos os espectros de absorção de 7 compostos padrão, tipicamente encontrados nos uísques, numa mistura 40% etanol/água: ácido gálico (AG), 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), furfural (F), ácido vanílico (AV), ácido siríngico (AS), siringaldeído (SE) e coniferaldeído (CO). A Figura 3.1 mostra os espectros de absorção dos padrões e de todos os uísques estudados. Uma vez que o espectro de absorção de 15 uísques se encontrava saturado na região de comprimentos de onda de 200-400 nm (ver Figura A.1 em Anexo), foi necessário efetuar uma diluição de um factor de 10. Essa diluição possibilitou a definição da região específica do espectro (Figura 3.1.c) e conseqüentemente retirar informação na região espectral de 250 a 400 nm, a qual contém as informações dos congéneres.

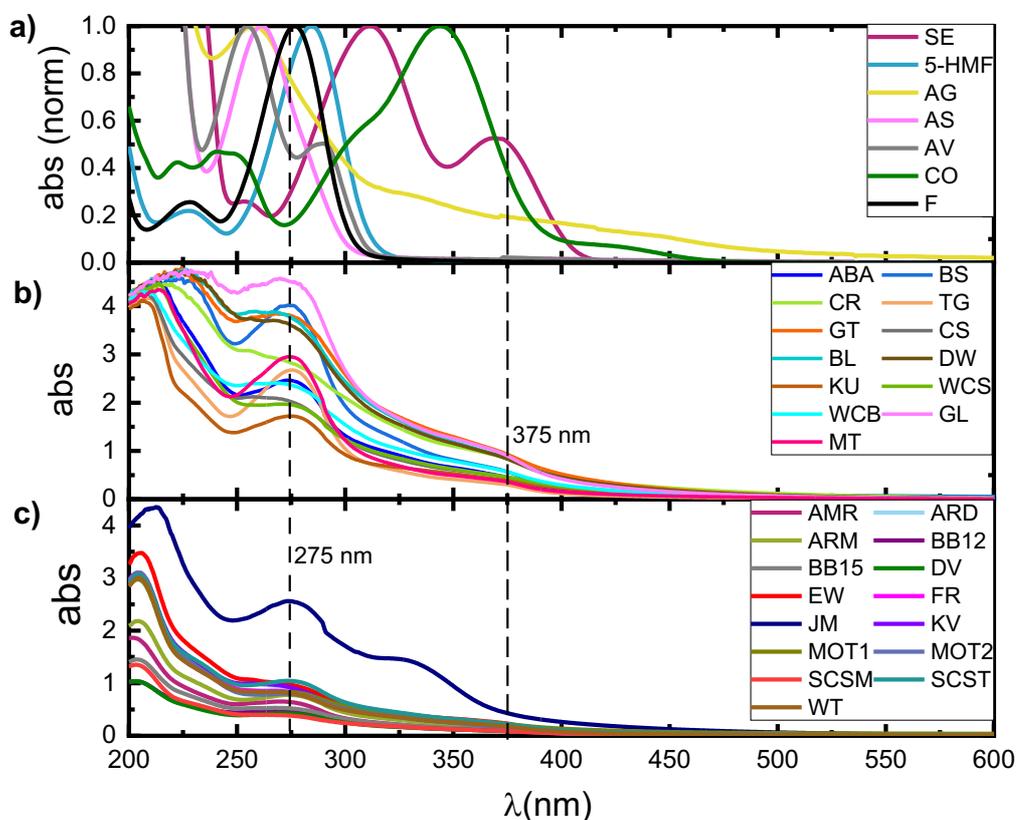


Figura 3.1 - Espectros de absorção UV-vis: a) dos padrões diluídos em 40% etanol ( $c=10^{-4}$  M), b) dos uísques puros, c) dos uísques diluídos 1:10 em 40% etanol

Os 28 uísques estudados apresentam bandas de absorção semelhantes na região do UV. Todos eles têm em comum uma banda de absorção alargada com máximo a 275 nm e um ombro em torno da região dos 370-375 nm. As mudanças observadas nos valores de absorvância podem estar associadas à presença de congêneres produzidos durante a fermentação e a maturação em barris de carvalho. A presença de compostos fenólicos voláteis, provenientes da queima de turfa na etapa de secagem da cevada maltada, bem como a adição de caramelo para ajustar a cor da bebida, são outros aspectos relevantes a considerar (ver Introdução). Conclui-se, portanto, que estes fatores estabelecem uma relação entre o tempo de maturação e o teor de congêneres <sup>[1]</sup>. Através da Figura 3.1.b é perceptível a observação da existência de uma diferença significativa na absorção entre os espectros de marcas com mais anos de envelhecimento (GL, GT, BL, DW) daqueles com menor idade, sugerindo que essas marcas apresentam maiores valores de absorção e, portanto, de alguns dos congêneres.

Comparando os espectros de absorção dos uísques com os padrões, bandas de absorção na região entre 210 nm e 280 nm encontram-se associadas à presença de furfural e 5-HMF, típicos de bebidas alcoólicas envelhecidas em barris de carvalho <sup>[1, 2]</sup> e à presença de vanilina <sup>[3]</sup>. Estudos anteriores revelam que o hidroximetilfurfural é o principal componente do caramelo, sendo responsável pela maior percentagem do valor de absorção a 280 nm <sup>[1]</sup>. Isso é justificado pelo facto deste ser proveniente da reação de açúcares com outros compostos presentes nos barris, resultando num aumento progressivo do seu conteúdo <sup>[2]</sup>. O mesmo é possível confirmar através da observação dos espectros de absorção da Figura 3.1.a. Como se pode observar pela comparação dos espectros dos padrões e dos uísques, também o AV, AS e AG podem ser responsáveis pelas propriedades espectrais características nessa banda no UV. Na gama de comprimentos de onda de 300 a 450 nm, a banda de absorção coincide com a faixa de comprimentos de onda característica dos aldeídos, nomeadamente do siringaldeído e do coniferaldeído. Existe literatura referindo que os componentes da amostra mais abundantes, como água, álcool, ácidos orgânicos e açúcares, não absorvem significativamente na região de comprimentos de onda UV (200–600 nm) portanto, o solvente (mistura etanol/água) praticamente não tem influência nas medições <sup>[2, 4]</sup>.

Na Tabela 3.1 encontram-se as absorvâncias obtidas a 275 nm ( $A_{275nm}$ ) e 375 nm ( $A_{375nm}$ ), assim como a razão entre elas ( $R=A_{375nm}/A_{275nm}$ ). Embora os espectros de absorção

apresentem características semelhantes, constata-se que alguns uísques apresentam bandas a 370-375 nm mais intensas, indicando um aumento da concentração de CO e SE.

Tabela 3.1 – Absorvância a 275 nm ( $A_{275nm}$ ), absorvância a 375nm ( $A_{375nm}$ ) e razão entre as absorvâncias ( $R=A_{375nm}/A_{275nm}$ ) a estes comprimentos de onda para os uísques puros (concentrados) e diluídos numa razão de 1:10

Uísque	Categoria*	Tempo de envelhecimento	$A_{375NM}$	$A_{275NM}$	R
<b>DILUÍDOS (1:10)</b>					
JM-IR	CB	3	0.430	2.559	<b>0.17</b>
BB12-GB	BL	12	0.091	0.486	<b>0.19</b>
SCST-DE	RY	2	0.219	1.043	<b>0.21</b>
SCSM-DE		2	0.088	0.382	<b>0.23</b>
AMR-FR	SM	3	0.111	0.639	<b>0.17</b>
MOT2-SE		5	0.148	0.795	<b>0.19</b>
ARM-IN		3	0.149	0.776	<b>0.19</b>
BB15-GB		15	0.109	0.520	<b>0.21</b>
KV-TW		2	0.192	0.914	<b>0.21</b>
DV-GB		18	0.091	0.424	<b>0.22</b>
ARD-GB		12	0.192	0.876	<b>0.22</b>
MOT1-SE		5	0.223	0.828	<b>0.27</b>
WT-US	BB	5 a 8	0.178	0.808	<b>0.22</b>
FR-US		5	0.190	0.827	<b>0.23</b>
EW-US		8	0.231	0.970	<b>0.24</b>
<b>CONCENTRADOS</b>					
TG-JP	BL	3 a 9	0.297	2.676	<b>0.11</b>
BL-GB		15	0.840	3.758	<b>0.22</b>
KU_JP		>3	0.389	1.723	<b>0.23</b>
DW-GB		8	0.833	3.598	<b>0.23</b>
CS-GB		3	0.492	2.114	<b>0.23</b>
WCB-IR		≥3	0.567	2.363	<b>0.24</b>
GT-GB		12	0.929	3.804	<b>0.24</b>
CR-CA		≥3	0.836	2.820	<b>0.30</b>
ABA-MX	AC	2	0.447	2.459	<b>0.18</b>
MT-GB	SM	≥3	0.358	2.948	<b>0.12</b>
BS-DE		3	0.567	4.012	<b>0.14</b>
GL-GB		12	0.899	4.497	<b>0.20</b>
WCS-IR		≥4	0.459	1.971	<b>0.23</b>

\*CB = Cold brew, BL = Blended, RY = Rye, SM = Single malt, BB = Bourbon, AC = Ancestral corn.

Mackenzie relata que marcas específicas de uísque apresentam faixas de absorção consistentes, sendo por isso possível identificar adulterações ou falsificações do produto original [5]. Existem vários estudos que conseguiram distinguir as bebidas com base em parâmetros como o ambiente de maturação e idade [3], ou a autentificação [6]. No presente estudo, considerando uísques dentro da mesma marca, por exemplo SCST e SCSM, razão *R* apresenta valores semelhantes, ou seja, 0.21 e 0.23, respetivamente. No entanto, existem outras marcas de uísques que apresentam valores semelhantes. Agrupando os uísques por categoria, podemos encontrar alguma concordância nos valores obtidos existindo, no entanto, alguns desvios que podem estar relacionados com diversos fatores, nomeadamente com o diferente tempo de envelhecimento.

### 3.2 Fluorescência em estado estacionário

Na Figura 3.2 encontram-se representados os espectros de emissão de fluorescência obtidos com excitação ao longo da banda de absorção de dois uísques: Kavalan (KV) e Jameson (JM). Os espectros de emissão dos restantes uísques, assim como os espectros de excitação colhidos ao longo da banda de emissão encontram-se na Figura A.2, em Anexo.

A emissão intrínseca dos uísques ocorre na região entre 340–750 nm (Figuras 3.2 e A2, em Anexo), sendo que para comprimentos de onda mais baixos existe uma grande sobreposição com o pico de Raman da água. A banda de emissão de fluorescência possui contribuições de diferentes componentes dos uísques: caramelo, cumarinas, taninos e outros compostos fluorescentes originários de barris de madeira [7]. Tal facto parece ser corroborado pelo espectro de emissão de fluorescência, onde é possível identificar um desvio dos máximos de emissão para o vermelho à medida que aumenta o comprimento de onda de excitação (Figuras 3.2 e 3.3.a.). Além disso, os espectros de excitação de fluorescência colhidos ao longo da banda de emissão também variam; o aumento do comprimento de onda de emissão resulta num desvio do espectro de excitação para maiores comprimentos de onda, validando o facto da emissão resultar de diferentes cromóforos: aldeídos, álcoois, ésteres e ácidos. Os espectros de excitação de fluorescência estão normalizados e apesar de possuírem uma banda a  $\lambda > 450$  nm e a sua intensidade ser inferior em relação aos comprimentos de ondas anteriores, não é residual. Tal pode significar que os componentes minoritários são muito fluorescentes.

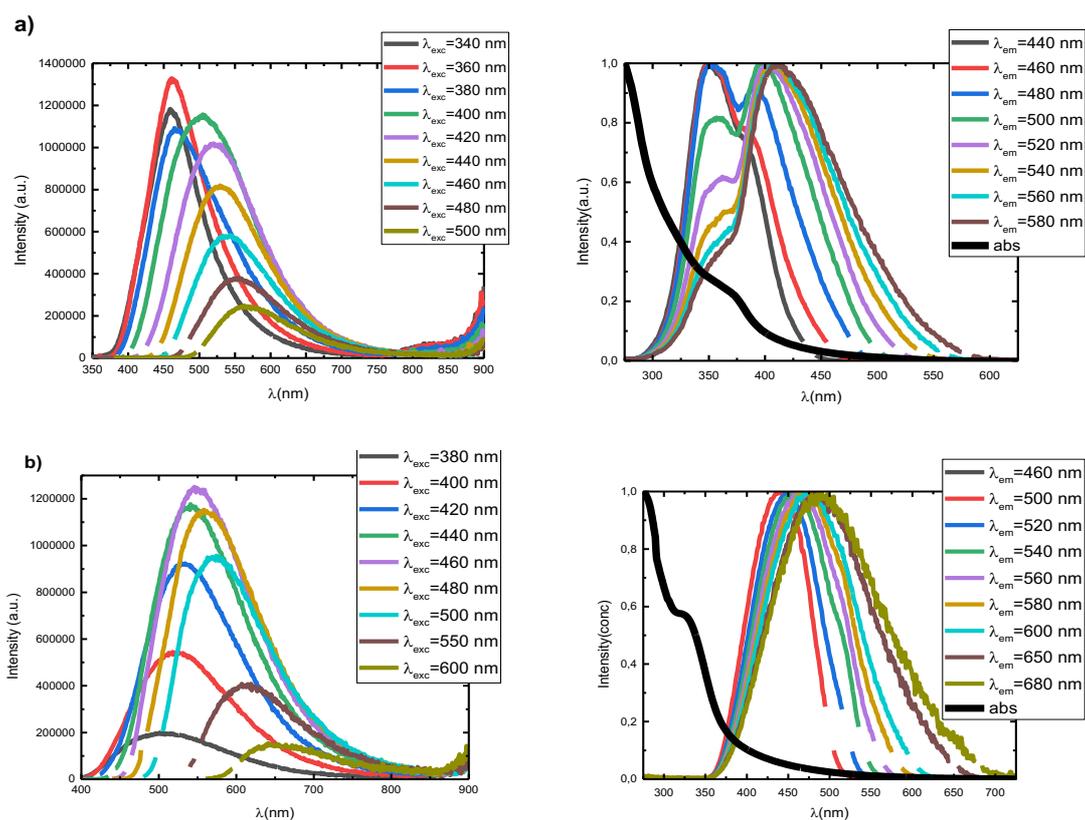


Figura 3.2 - Espectros de emissão (lado esquerdo) e excitação (lado direito) de fluorescência dos uísques Kavalan e Jameson obtidos com diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão, respetivamente

Na Figura 3.3.b está representado o comprimento de emissão máxima em função do tempo de envelhecimento, quando  $\lambda_{exc} = 380$  nm. Verifica-se que o  $\lambda_{em}^{max} = 461 (\pm 3)$  nm com exceção de três uísques cujos máximos correm a  $\lambda_{em}^{max} > 470$  nm: Jameson (JM\_IR), Kurayoshi (KU\_JP) e Grants (GT\_GB). Em comum tem todos eles o facto de terem sido amadurecidos em barris de carvalho anteriormente usados amadurecer para Bourbon. Comparando com os  $\lambda_{em}^{max}$  dos sete padrões estudados, os resultados obtidos parecem indicar que nestes três uísques a emissão resultante da excitação a 380 nm poderá estar associada à emissão do CO, cujo  $\lambda_{em}^{max} = 468$  numa solução a 40% etanol (Tabela 3.2).

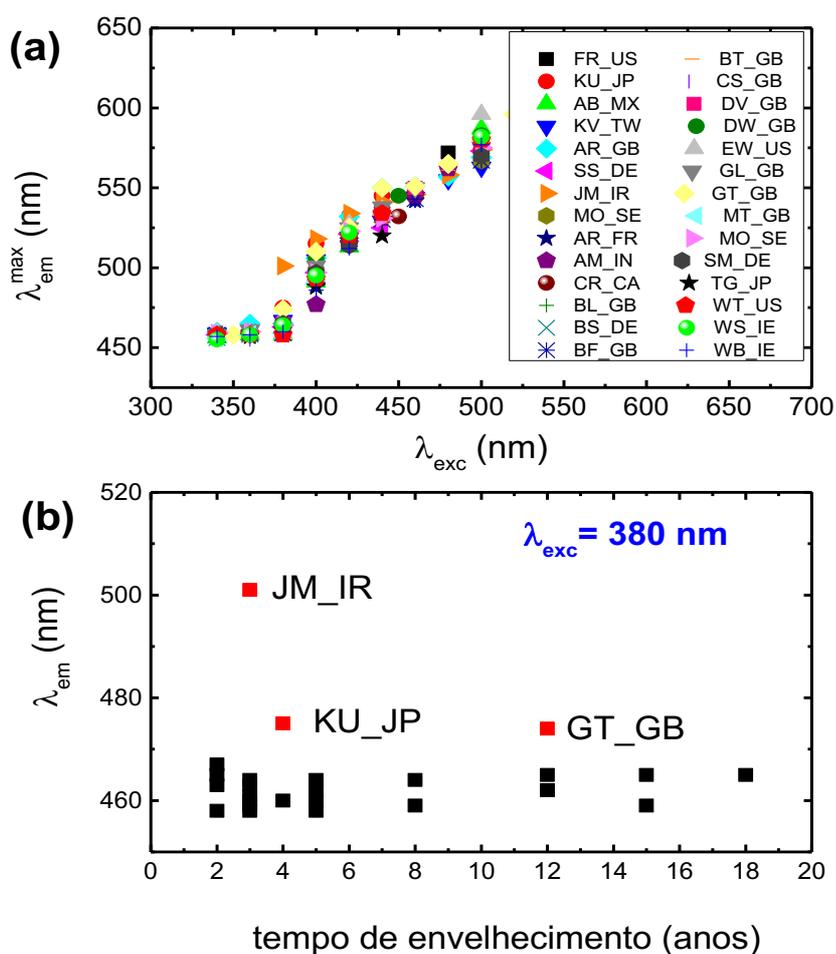


Figura 3.3 – Representação do a) comprimento de emissão máxima em função do comprimento de onda de excitação para os 28 uísques e b) comprimento de emissão máxima em função do tempo de envelhecimento, quando  $\lambda_{exc} = 380$  nm

Tabela 3.2 - Comprimento de onda de emissão de fluorescência máxima ( $\lambda_{em}^{max}$ ) do AG, 5-HMF, F, AV, AS, SE, CO e numa mistura equimolar ( $10^{-5}M$ ) dos 7 padrões, em solução aquosa com 40% etanol

Solução	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{em}^{max}$ (nm)
Ácido Gálico	265	340
5-hidroximetilfurfural	275	340
Furfural	275	337
Ácido vanílico	295	340
Ácido siríngico	260	325
Siringaldeído	310	411
	370	415
Coniferaldeído	380	468
Mistura	280	338
	355	404

### 3.3 Fluorescência em estado dinâmico: FLIM

Os decaimentos de fluorescência dos uísques foram obtidos através da técnica de FLIM. As curvas de decaimento das 28 amostras de uísque (6 das quais encontram-se representadas na Figura 3.4) foram ajustadas através da soma de 3 exponenciais (exceto para o uísque CS): o tempo de decaimento mais curto  $\tau_1$  varia entre 140 ps e 460 ps; o tempo de vida intermédio encontra-se entre 1.7-3.5 ns e o  $\tau_3$  entre 6.4 e 13.5 ns. Na Figura 3.5 encontram-se representados os tempos de decaimento e respetivos pré-exponenciais por ordem crescente de tempo de vida mais curto  $\tau_1$ . Os tempos de decaimento  $\tau_2$  e  $\tau_3$  parecem variar aleatoriamente, no entanto o pré-exponencial  $a_2$  aumenta tendencialmente com o aumento de  $\tau_1$ , enquanto o  $a_1$  diminui. Tal traduz-se visivelmente, pois as curvas parecem íngremes, indicando que a principal diferença está na componente mais rápida (Figura 3.4). No que se refere à contribuição de cada uma das componentes no decaimento ( $c_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n a_i \tau_i}$ ,  $i = 1 - 3$ ), verifica-se que as componentes com os tempos de decaimento mais elevados ( $\tau_2$  e  $\tau_3$ ) são dominantes (Figura 3.6). Tendo em consideração a influência de três fatores – país de origem, categoria e tempo de envelhecimento – no valor de cada uma das componentes observa-se que o aumento do tempo de amadurecimento contribui para o aumento de  $c_2$  e a diminuição do  $c_3$ , enquanto o  $c_1$  permanece praticamente constante (ver Figura 3.7). A componente  $c_2$  está, provavelmente, associada aos compostos fenólicos e cumarinas, típicos de bebidas envelhecidas em barris de madeira e/ou aos produtos de reação entre o destilado e os componentes da madeira, mas o mais provável é o aumento do  $c_2$  estar relacionado com o acetato de etilo, como resultado do aumento de ácido acético com o tempo de maturação. Tal é sugerido, pois estudos indicam que o ácido acético, o acetaldeído e o acetato aumentam com o período de maturação e de armazenamento [8], porém, estes não são fluorescentes, mas a conversão do ácido acético resulta em acetato de etilo, o qual é fluorescente. É importante notar que os uísques cuja idade não é totalmente definida não foram incluídos nas análises.

Através da técnica de ns-TCSPC, foram analisados 3 uísques (FR, TG e WT) a três comprimentos de onda. Segundo um ajuste tri-exponencial, os resultados mostraram-se concordantes com os dados de FLIM: um tempo de vida curto (inferior a 1 ns), um intermédio e um longo (superior a 4.5 ns), sendo a componente do decaimento mais elevada ( $\tau_3$ ) a que apresentou maior contribuição (Tabela A.1, em Anexo).

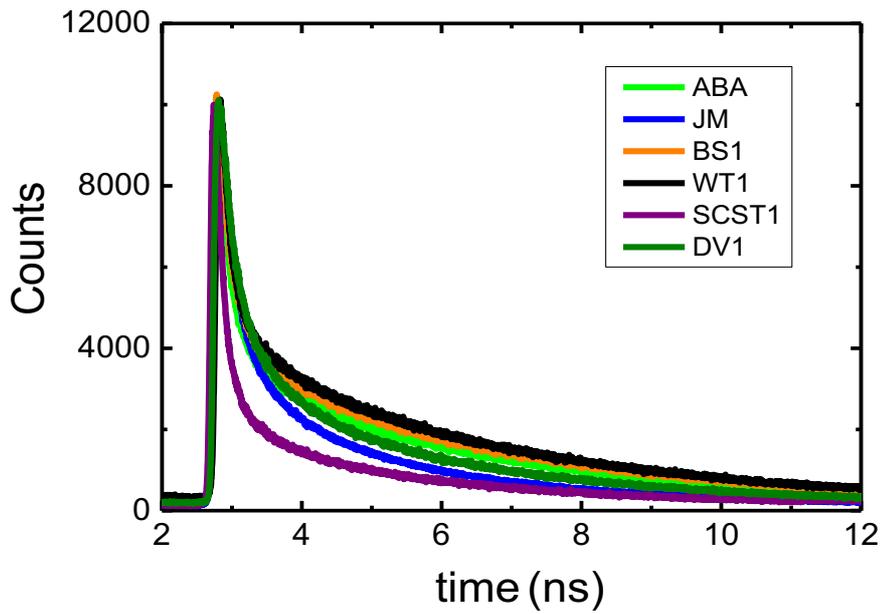


Figura 3.4 - Curvas de decaimento de seis amostras de uísque obtidas com  $\lambda_{exc}= 375 \text{ nm}$  e com dois filtros ET445/58 e LP390

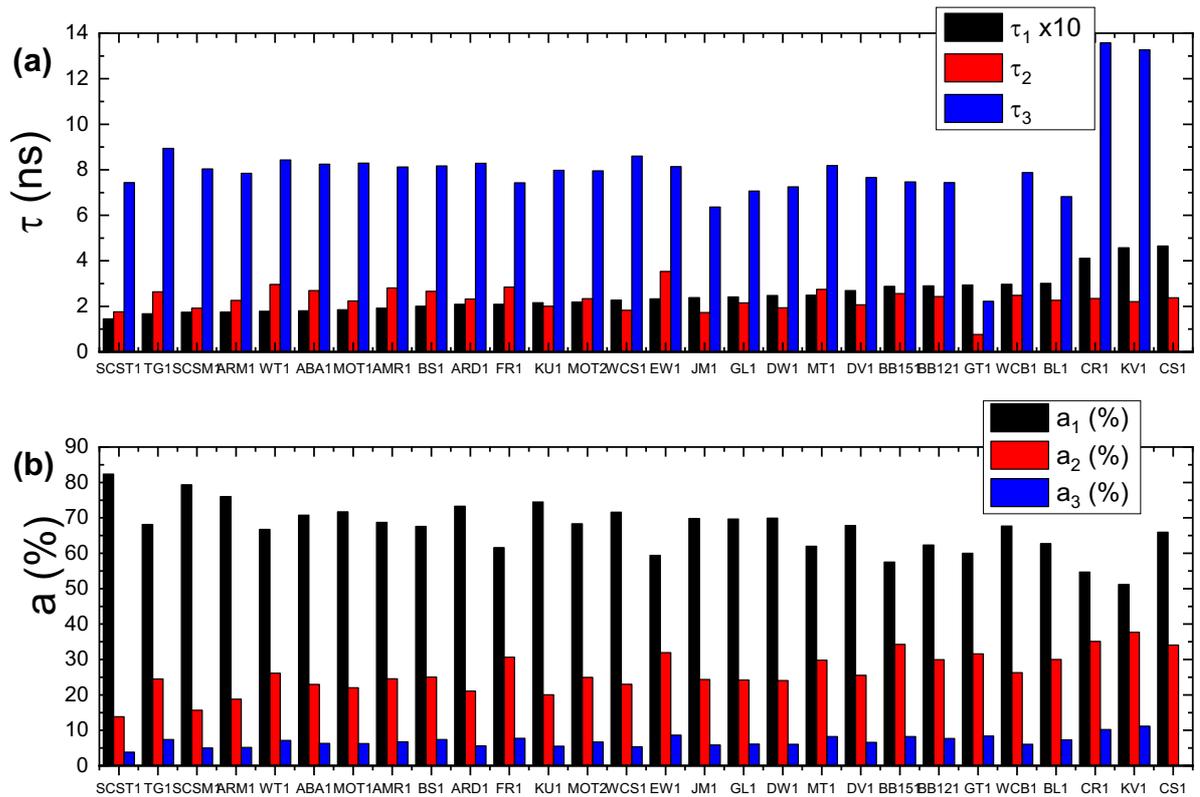


Figura 3.5 – a) Tempos de decaimento  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  e  $\tau_3$  em função da ordem crescente de  $\tau_1$  e b) respectivos pré-exponenciais  $a_1$ ,  $a_2$  e  $a_3$  obtidos para os 28 uísques com os filtros ET445 e LP390

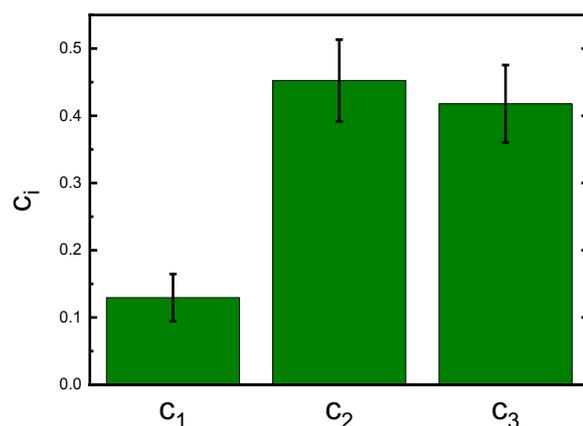


Figura 3. 6 - Contribuição de cada uma das componentes no decaimento, calculadas segundo  $c_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n a_i \tau_i}$ ,  $i = 1 - 3$

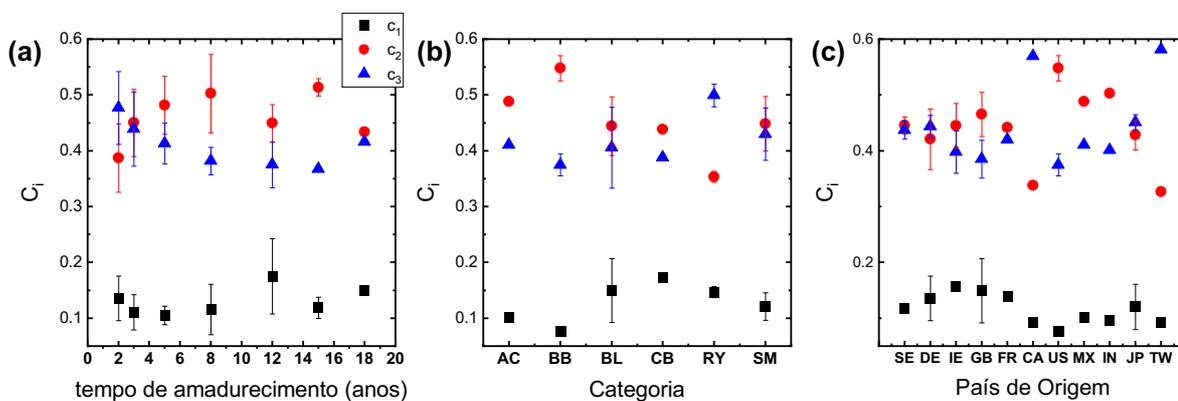


Figura 3.7 – Representação das componentes  $c_1$ ,  $c_2$  e  $c_3$  agrupadas por envelhecimento (a), categoria (b) e país (c)

### 3.4 Fluorescência em estado dinâmico: fs-TA

Para caracterizar melhor o tempo curto e procurar se os resultados estão de acordo com a nota publicada pela Becker <sup>[9]</sup>, recorreu-se à caracterização dos tempos de vida por fs-TA. Os uísques foram medidos com excitação a 375 nm, para ser comparável com os dados de FLIM, mas no caso dos 7 padrões tal não foi possível uma vez que alguns não absorvem nessa zona. Assim, apenas o espectro de absorção transiente com excitação a 375 nm foi obtido para o CO e SE, os espectros AG, AV e AS foram obtidos com excitação a 300 nm e para o furfural e 5-HMF não se obteve sinal transiente.

Os decaimentos dos uísques por absorção de transiente exibiram características de absorção de banda larga que se estendem de 380 nm para a região do infravermelho próximo (Figura 3.8), desviando com o tempo, e alguns uma característica negativa entre

450–500 nm (Figura 3.8.b). Atribuímos a característica negativa à emissão estimulada das moléculas fotoexcitadas e as características positivas à sua absorção de estado excitado (ESA). Tempos obtidos inferiores a 1 ps foram considerados dinâmica de solvatação do solvente (etanol e água).

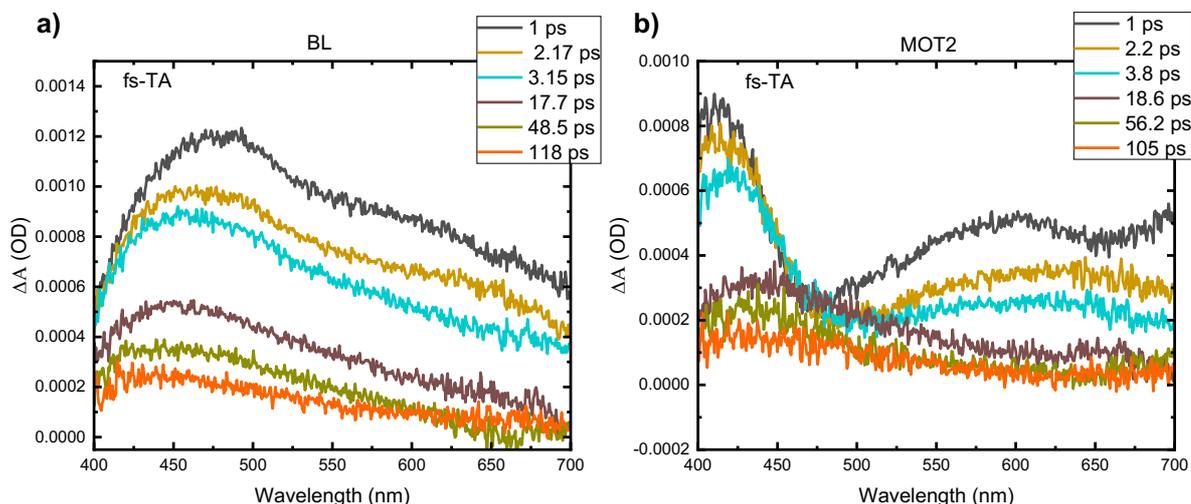


Figura 3. 8 - Espectros de absorção de transiente obtidos com diferentes tempos

Os decaimentos das 28 amostras de uísques foram analisados através da análise global dos mesmos. Nestes procedimentos, as curvas são ajustadas com a mesma equação multiexponencial, isto é, são ajustados os mesmos tempos de vida para todos os comprimentos de onda (Grupo I, Tabela 3.3). Esta metodologia revelou-se mais apropriada visto que os tempos de vida variam nos diferentes comprimentos de onda, apesar de ser espectável que alguns componentes se mantenham ao longo das bandas. A mesma metodologia foi adotada nas soluções dos compostos padrão (Tabela 3.4). As curvas de decaimento de absorção transiente de 10 dos 28 uísques estudados foram ajustadas através da soma de duas exponenciais (Tabela 3.3): um tempo de decaimento (médio) mais curto  $\tau_1$  de  $3.18 \pm 0.510$  ps e um tempo de decaimento mais longo  $\tau_2$  que se encontra no intervalo  $45.29 - 56.74$  ps, dependendo da amostra. Comparando com os valores dos padrões, atribui-se o  $\tau_1$  ao CO e o  $\tau_2$  ao AG. Nos restantes uísques o ajuste é triexponencial, sendo possível identificar dois grupos (II e III, Tabela 3.3). Estes dois grupos possuem componentes com tempos de decaimentos semelhantes  $\tau_1 = 1.12 - 2.45$  ps e  $\tau_3 = 65.32 - 117.5$  ps, as quais correspondem ao SE e ao AS, respetivamente. No entanto, estes dois grupos de uísques diferem na componente intermédia: num dos grupos

é possível identificar o tempo de decaimento  $\tau_2$  que assume valores entre 8.29 – 10.03 ps correspondente ao AG e/ou CO, enquanto que no Grupo III  $\tau_2 = 13.16 – 22.46$  ps, o qual pode ser atribuído à emissão do SE.

Tabela 3.2 - Tempos de decaimento transiente obtidos através da análise global dos decaimentos

<b>Grupo</b>	<b>Uísque</b>	<b><math>\tau_1</math> (ps)</b>	<b><math>\tau_2</math> (ps)</b>	<b><math>\tau_3</math> (ps)</b>
<b>I</b>	EW	3.038	47.46	
	WT	3.395	50.71	
	MOT1	3.781	53.94	
	MOT2	3.829	56.74	
	TG	2.203	45.29	
	ARD	2.763	47.87	
	GT	3.71	51.78	
	GL	2.636	47.04	
	CS	3.377	50.84	
	DV	3.043	48.23	
<b>II</b>	WCS	1.41	10.03	83.93
	JM	1.262	8.357	73.76
	ARM	1.12	8.864	70.89
	KV	1.328	8.294	65.32
	ABA	1.142	8.912	74.59
<b>III</b>	FR	2.158	18.02	104.9
	BB15	2.453	19.42	116.6
	BB12	2.163	15.23	103.1
	BL	2.066	17.33	117.5
	KU	2.119	14.35	95.9
	WCB	1.909	14.65	97.98
	SCSM	1.577	13.16	87.86
	DW	2.052	15.05	88.03
	AMR	1.937	17.66	110.7
	CR	2.204	13.96	99.1
	BS	1.958	18.35	107.5
	MT	1.687	14.56	82.01
	SCST	2.376	22.46	147.2

Tabela 3.3 - Tempos de decaimento transiente  $\tau_1$  obtidos através da análise global dos decaimentos de soluções dos compostos padrão em solução aquosa com 40% etanol,  $c=10^{-4}M$

Solução	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\tau_1$ (ps)	$\tau_2$ (ps)
SE	375	1.75	17.29
CO	375	2.28	9.00
AG	300	7.72	30.49
AS	300	7.42	110.00
AV	300	4.98	309.70

A análise individual das curvas de decaimento a cada comprimento de onda resulta em ajuste bi- ou tri-exponencial dependendo do comprimento de onda considerado e/ou uísque. Esta análise atribui ao tempo curto a maior contribuição,  $\tau_1$  com o pré-exponencial dominante.

### 3.5 HPLC-DAD

Um total de 36 amostras (28 uísques, 7 padrões e a mistura dos padrões) foram analisadas de acordo com o método analítico descrito no capítulo e subcapítulo II. Na Figura 3.9, encontram-se exemplos de dois cromatogramas obtidos durante as análises de HPLC. A identificação é baseada na comparação dos espectros de absorção UV-vis (entre 200 e 400 nm) e dos tempos de retenção dos uísques observados a três comprimentos de onda (254 nm, 280 nm e 320 nm) com os padrões e os dados da literatura [10-13]. O tempo de retenção ( $t_r$ ) para cada padrão é apresentado na Figura 3.9.a.

Todos os valores estão dentro das faixas correspondentes de tempos (Tabela 3.5) e absorvâncias (Anexo A.3). Existe uma elevada concordância entre os picos/tempos de retenção obtidos nos uísques e nos compostos padrão, permitindo a identificação de cinco compostos distintos nas amostras de uísque. No entanto, o pico com tempo de retenção de aproximadamente 10.25 minutos aparece no tempo de retenção do 5-HMF, apesar de o seu perfil apresentar algumas semelhanças com o pico atribuído ao AG na mistura de padrões (Figura 3.9.a e A.3). Portanto, é possível que nos uísques o AG e o 5-HMF se encontrem muito próximos ou sobrepostos (co-eluição) devido à má resolução obtida sob estas condições cromatográficas e às baixas concentrações destes compostos na mistura, não sendo possível identificar os picos no ruído da linha de base. Nesse sentido, uma vez que não foi possível identificar valores distintos para o AG e o 5-HMF, esse pico com

tempo de retenção de aproximadamente 10.25 minutos foi atribuído à mistura dos dois (AG/5-HMF).

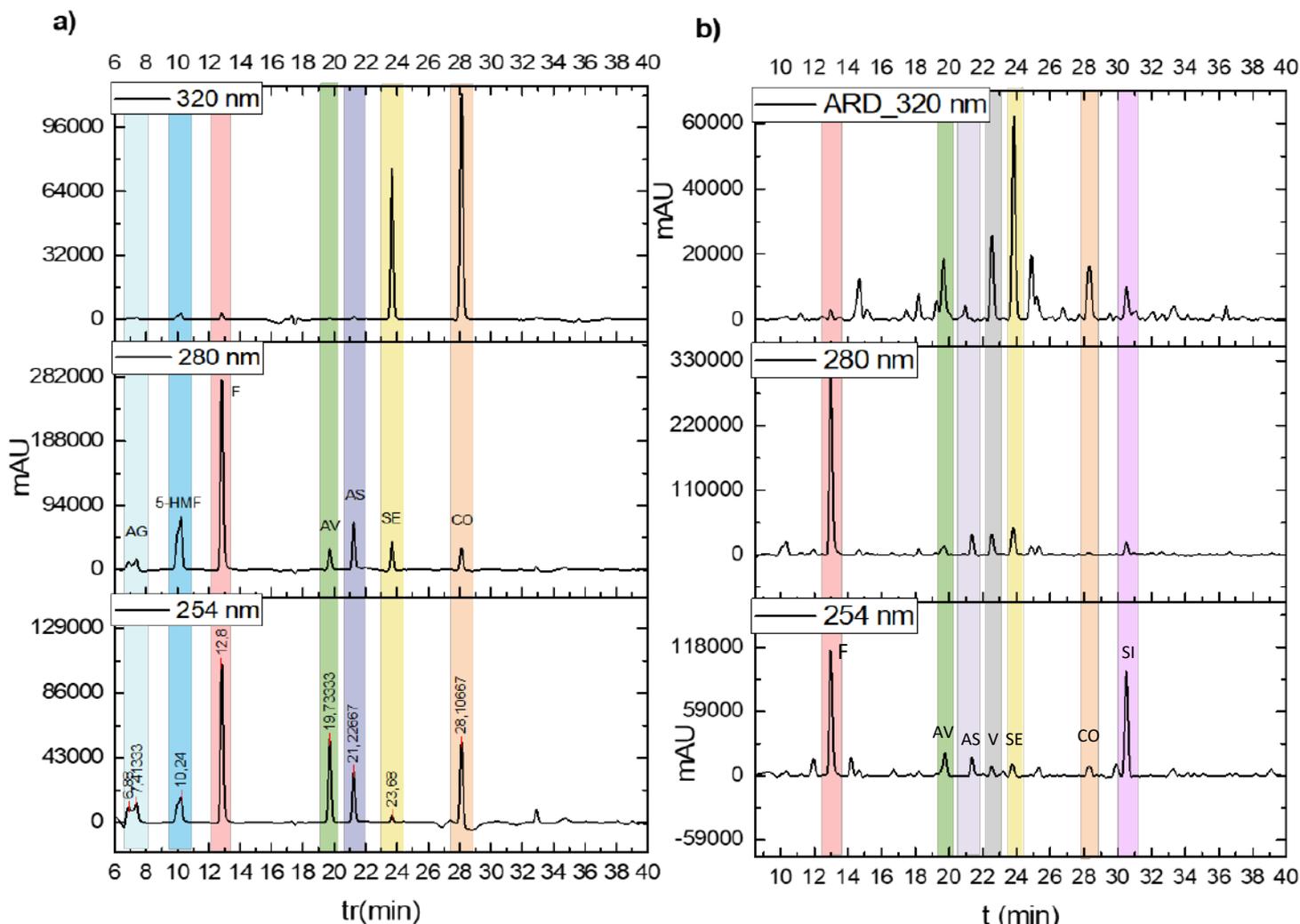


Figura 3.9 - Cromatogramas obtidos pela análise de HPLC da a) mistura dos padrões e b) de uma amostra de uísque (ARD) a 254, 280 e 320 nm. AG - ácido gálico; 5-HMF - 5-hidroximetilfurfural; F - furfural; AV - ácido vanílico; AS - ácido siríngico; V - vanilina; SE - siringaldeído; CO - coniferaldeído; SI - sinapaldeído

Um outro aspeto importante de salientar são as diferenças na forma do espectro UV-vis do pico com  $t_r = 19.8-19.9$  minutos, identificado como sendo devido à eluição do ácido vanílico presente nos uísques, e o espectro UV-vis da solução padrão de AV (ver Figura A.3, em Anexo). A diferença observada pode ser justificada através das diferenças de pH. Uma vez que o meio tem uma influência especialmente forte na especiação de formas proteolíticas, observa-se que em soluções ácidas ( $\text{pH} < 6.7$ ), como são os dos eluentes usados (ver secção 2.5), se forma o catião do ácido vanílico através da

protonação do oxigénio carbonilo. A mudança de pH levou a mudanças não apenas nas posições dos máximos (de 260 e 292 para 290 e 322 nm), mas também nas intensidades das bandas nos espectros de absorção (Anexo A.3) <sup>[14, 15]</sup>.

Diferenças identificadas na forma de alguns picos face às referências/padrões, devem-se ao arraste dos compostos eluídos anteriormente, chamadas barrigas de arraste, fruto da fraca resolução do método para uma mistura tão densa. Além dos picos já identificados, observa-se a presença de um sinal em torno de 25 minutos. No entanto, devido à falta de um composto padrão e à ausência de informações na literatura, não é viável atribuir uma identificação a esse sinal. Tendo em conta que é constante em todas as amostras, pode estar associado ao período de envelhecimento nos barris ou algum aditivo, por exemplo conservante, que não tenha sido reportado. Este é claramente um dos pontos a desenvolver num estudo futuro: identificação de componentes principais em uísques que não tenham ainda atribuição definida.

Tabela 3.4 – Tempos médios de retenção dos compostos analisados nos uísques

Compostos	Tempo de retenção (min) ± desvio		
	254 nm	280 nm	320 nm
<b>Ácido gálico/5-hidroximetilfurfural</b>	10.27 ± 0.16	10.29 ± 0.14	10.25 ± 0.17
<b>Furfural</b>	12.95 ± 0.11	12.95 ± 0.11	12.90 ± 0.18
<b>Ácido Vanílico</b>	19.82 ± 0.13	19.90 ± 0.17	19.86 ± 0.16
<b>Ácido Siríntrico</b>	21.40 ± 0.08	21.39 ± 0.08	21.32 ± 0.21
<b>Vanilina</b>	22.60 ± 0.12	22.60 ± 0.12	22.61 ± 0.12
<b>Siringaldeído</b>	23.82 ± 0.12	23.84 ± 0.12	23.85 ± 0.12
<b>Coniferaldeído</b>	28.46 ± 0.22	28.39 ± 0.22	28.40 ± 0.16
<b>Sinapaldeído</b>	30.62 ± 0.15	30.59 ± 0.17	30.62 ± 0.20

Os uísques possuem uma matriz muito mais complexa do que previsto quando comparados com a mistura de padrões. Da análise dos cromatogramas é possível distinguir os uísques com base nos valores do furfural, uma vez que são superiores aos teores de ácidos e aldeídos fenólicos (ver Tabela 3.6). Tendo em conta que os aldeídos furânicos (furfural e 5-HMF) derivam da degradação da celulose e da hemicelulose em função do tratamento térmico, e são os componentes maioritários da madeira, é de prever que os seus teores sejam mais elevados. Os diferentes níveis de furfural podem indicar variações na intensidade da carbonização do barril <sup>[12]</sup>. As maiores intensidades de

furfural registaram-se para os uísques AMR, ARD, ARM, BS, MT, KU, MOT, TG, SCST e GL. Para além do facto de quase todos terem sido colocados a amadurecer em barris reutilizados implicando, obviamente, uma maior concentração de congéneres, o que na verdade todos têm em comum é o facto de serem uísques de malte, à exceção do SCST. Este último, SCST, é o único do grupo que se sabe ter sido amadurecido em barris de carvalho carbonizado, correspondendo ao já esperado. Este resultado vai de encontro ao já descrito no capítulo 1.6, confirmando que a concentração de furfural é maior em uísques de malte. O TG e o KU sendo ambos *blended*, apresentam-se neste grupo por usarem malte puro como matéria-prima. Ou seja, são uísques cujos componentes são 100 % cevada maltada, resultantes da mistura de vários *single malts* importados de várias destilarias. Sendo permitido por lei a adição de caramelo em alguns países, seria de esperar o aumento do teor de 5-HMF <sup>[16]</sup> porém, fruto da fraca individualização desses picos, tal não é possível aferir.

A maior concentração de polifenóis é teoricamente encontrada em destilados com um envelhecimento mais longo, uma vez que estão intimamente relacionados com os processos que ocorrem ao longo da fermentação e do envelhecimento (degradação da lignina) e muitos outros têm origem nos compostos extraídos da madeira (vanilina, siringaldeído) ou do envelhecimento oxidativo (ácido vanílico, ácido síringico) <sup>[17]</sup>. Podem também advir da queima do barril <sup>[13]</sup>. Apesar dos teores de ácidos e aldeídos fenólicos (ácido vanílico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído) divergirem pouco entre si, verificou-se ser verdade a tendência de existir uma maior concentração de fenóis, principalmente siringaldeído, para a maioria dos uísques acima de 5 anos de maturação, há a exceção do verificado para o Deveron (DV, 18 anos) e o Glenfiddich (GL, 12 anos). Uísques de menor idade que apresentam igual tendência, como é o caso do Stork Club Smoky (SCSM) e do Crown Royal (CR), a origem dos polifenóis pode estar associada à madeira dos barris que estiveram em contacto anteriormente com vinhos, xerez, conhaque <sup>[17]</sup>.

Tabela 3.6 – Tabela com as áreas em percentagem calculadas para cada pico identificado em HPLC-DAD, atribuídos aos compostos analisados nos diferentes uísques

	AG/5 -HMF	F	AV	AS	V	SE	C7	CO	SI	C10	C11	C12	C13
ABA	9.2	14.1	9.8	11.3	9.8	11.3	10.5	12.7	11.3	0.0	0.0	0.0	0.0
AMR	8.8	15.7	9.6	11.0	9.5	11.0	10.2	12.5	11.7	0.0	0.0	0.0	0.0
ARD	8.1	17.0	9.5	10.7	9.0	10.4	9.6	11.8	13.9	0.0	0.0	0.0	0.0
ARM	8.6	16.8	9.3	10.7	9.3	10.7	9.9	13.1	11.4	0.0	0.0	0.0	0.0
BB12	9.1	15.8	9.7	11.0	9.5	11.0	10.2	12.4	11.3	0.0	0.0	0.0	0.0
BB15	9.0	15.3	9.8	11.2	9.6	11.1	10.3	12.4	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0
BL	9.1	14.2	9.8	11.3	9.8	11.3	10.5	12.8	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0
BS	8.7	16.0	9.6	11.0	9.6	11.0	10.3	12.5	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0
CR	9.1	13.7	9.9	11.4	9.8	11.3	10.6	12.8	11.5	0.0	0.0	0.0	0.0
CS	9.2	14.3	9.8	11.3	9.7	11.3	10.5	12.7	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0
DV	9.1	14.5	9.8	11.2	9.7	11.2	10.4	12.7	11.3	0.0	0.0	0.0	0.0
DW	9.2	13.9	9.8	11.3	9.8	11.3	10.5	12.8	11.5	0.0	0.0	0.0	0.0
EW	8.1	14.6	9.2	10.7	8.9	10.2	10.1	12.8	15.3	0.0	0.0	0.0	0.0
FR	8.5	14.7	9.4	10.9	9.2	10.5	10.2	13.2	13.4	0.0	0.0	0.0	0.0
GL	8.9	16.0	9.5	11.0	9.5	10.9	10.1	12.6	11.5	0.0	0.0	0.0	0.0
GT	9.9	14.5	9.7	11.2	9.6	11.0	10.3	12.6	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0
KU	8.8	15.9	9.6	11.1	9.6	11.0	10.3	12.5	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0
KV	8.9	14.5	10.0	11.4	9.5	11.0	10.1	12.3	12.3	0.0	0.0	0.0	0.0
MOT1	9.0	15.2	9.5	11.0	9.5	11.0	10.2	13.6	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MOT2	8.6	16.7	9.2	10.8	9.3	10.5	10.0	14.1	10.8	0.0	0.0	0.0	0.0
MT	8.7	18.3	9.3	10.7	9.3	10.7	9.9	12.2	10.9	0.0	0.0	0.0	0.0
SCSM	9.1	13.8	9.9	11.4	9.8	11.3	10.5	12.9	11.4	0.0	0.0	0.0	0.0
SCST	8.9	16.0	9.5	10.9	9.3	10.8	10.0	13.5	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0
TG	8.5	18.8	9.3	10.7	9.2	10.7	9.9	12.1	10.9	0.0	0.0	0.0	0.0
WCB	9.3	13.8	9.8	11.3	9.8	11.3	10.5	12.8	11.3	0.0	0.0	0.0	0.0
WCS	9.2	14.1	9.8	11.3	9.8	11.3	10.5	12.8	11.3	0.0	0.0	0.0	0.0
WT	8.7	13.6	9.5	12.0	9.5	11.0	10.4	13.2	12.1	0.0	0.0	0.0	0.0
JM	9.6	9.4	22.9	2.3	3.3	4.8	4.8	7.5	6.1	8.6	6.9	7.4	6.5

Portanto, o estudo por HPLC veio confirmar que as diferenças entre os uísques derivam da composição química da madeira, assim como do tratamento térmico aplicado, e dos processos de oxidação e redução que ocorrem durante o envelhecimento. Como

previsto, o Jameson (JM) confirmou ser diferente dos demais segundo o seu perfil de HPLC (Figura 3.10). Este facto não é surpreendente visto ser o único que inclui torrefação de café na sua composição.

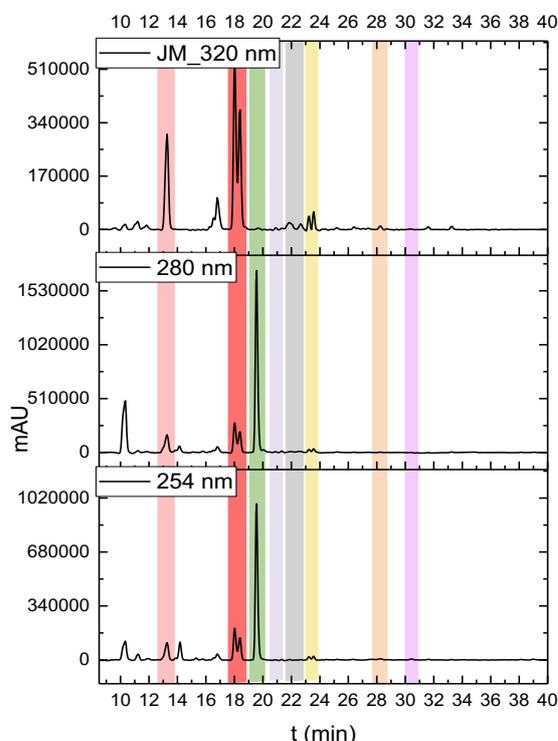


Figura 3.10 – Cromatograma obtido pela análise de HPLC para amostra de uísque Jameson (JM)

### 3.6 Análise Quimiométrica

Os modelos de discriminação foram construídos através dos parâmetros descritos no capítulo II, subcapítulo III (HCA e PCA) e aplicados às amostras de uísques segundo as diferentes técnicas de obtenção de dados. O HCA permite obter a estrutura global dos dados produzindo um dendograma onde os objetos similares, no caso os uísques, se agrupam de acordo com as suas características. A análise PCA permite explicar os agrupamentos em HCA através da posição relativa dos uísques ao longo das componentes principais (PC1 e PC2). Portanto, as duas técnicas fornecem uma análise complementar.

Por questões representativas, nesta secção os uísques aparecem com diferentes abreviaturas relativamente à Tabela 1.2. As novas abreviações (*labels*) permitem simplificar e distinguir entre marcas e país, categoria e idade (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Labels usadas na análise quimiométrica

<i>Amostra (W)</i>	<i>Whiskie_País (W_C)</i>	<i>País (C)*</i>	<i>Categoria</i>	<i>Idade (A)</i>
<b>ABA</b>	AB_MX	MX	AC	2
<b>AMR</b>	AM_IN	IN	SM	3
<b>ARD</b>	AR_GB	GB	SM	12
<b>ARM</b>	AR_FR	FR	SM	3 a 4
<b>BB12</b>	BT_GB	GB	BL	12
<b>BB15</b>	BF_GB	GB	SM	15
<b>BL</b>	BL_GB	GB	BL	15
<b>BS</b>	BS_DE	DE	SM	3
<b>CR</b>	CR_CA	CA	BL	3
<b>CS</b>	CS_GB	GB	BL	3
<b>DV</b>	DV_GB	GB	SM	18
<b>DW</b>	DW_GB	GB	BL	8
<b>EW</b>	EW_US	US	BB	8
<b>FR</b>	FR_US	US	BB	5
<b>GL</b>	GL_GB	GB	SM	12
<b>GT</b>	GT_GB	GB	BL	12
<b>KU</b>	KU_JP	JP	BL	>3
<b>KV</b>	KV_TW	TW	SM	2
<b>MOT1</b>	MO_SE	SE	SM	5
<b>MOT2</b>	MO_SE	SE	SM	5
<b>MT</b>	MT_GB	GB	SM	3
<b>SCSM</b>	SM_DE	DE	RY	2
<b>SCST</b>	SS_DE	DE	RY	2
<b>TG</b>	TG_JP	JP	BL	3 a 9
<b>WCB</b>	WB_IE	IE	BL	>3
<b>WCS</b>	WS_IE	IE	SM	>4
<b>WT</b>	WT_US	US	BB	5 a 8
<b>JM</b>	JM_IE	IE	CB	3

\*MX = México, IN = Índia, GB = Escócia (Grã-Bretanha), FR = França, DE = Alemanha, CA = Canadá, US = Estados Unidos da América, JP = Japão, TW = Taiwan, SE = Suécia, IE = Irlanda.

Nas Figuras A.4 a A.6, em Anexo, estão representados os dendrogramas obtidos por análise PCA dos resultados adquiridos pelas diferentes técnicas (HPLC, fs-TA e FLIM), com o objetivo de identificar qual delas possui maior capacidade de

discriminação relativamente à categoria, país de origem e tempo de envelhecimento. De realçar que o uísque JM não foi considerado na análise quimiométrica, dado que de acordo com os resultados anteriores estabeleceu-se ser um *outlier*.

Os dendogramas que estabelecem relações entre a categoria dos uísques e os seus perfis químicos através das diferentes técnicas encontram-se na Figura A.5, em Anexo. Dos dendogramas obtidos, o dendograma relativo às áreas integradas é o que possibilita a melhor discriminação dos grupos de acordo com os seus perfis químicos (Figura 3.11).

Através da Figura 3.11.a. observa-se a divisão em cinco *clusters*. A primeira divisão vai ser analisada tendo por base os uísques com as categorias mais distintas (RY e AC). Da análise do *biplot* (Figura 3.11.b.) concluímos que o AC e o RY se encontram em quadrantes distintos, sendo o furfural o responsável por esta diferença/separação de grupos. Da esquerda para a direita, entre o primeiro e o segundo grupo a separação é devida à elevada percentagem de etanol (50%).

Nos restantes grupos (2, 3, 4 e 5) não se identifica a origem da separação. Estamos, nestes grupos, a referir-nos a categorias que não temos informação para a diferenciação. A sua constituição pode ser diferente (encontrando-se posicionados em grupos separados) ou semelhante, neste caso encontrando-se no mesmo grupo. As diferenças ou semelhanças estarão relacionadas com diferentes fatores, nomeadamente matérias-primas, tempo de envelhecimento e condições de amadurecimento/armazenamento. Estes resultados têm por base a análise das distâncias no dendograma. É visível que todas as categorias referidas anteriormente estão próximas ( $y \approx 0$ ), sugerindo que apresentam características semelhantes. No dendograma também se encontra patente a incapacidade de diferenciação das amostras por país de origem. Relativamente às amostras provenientes da Escócia e da Irlanda, o sabor de um *blended* é o resultado da mistura de uísques de grão com vários uísques de malte, apresentando por isso perfis de sabor semelhantes. Para além disso, ambos os países apresentam terrenos e climas semelhantes [5, 18].



HMF, AV, AS, SE, C7, CO e SI) são explicadas com o mesmo peso pela PC1, representando características intermédias altamente relacionadas. Por outro lado, o furfural apresenta maior poder explicativo na 2ª componente, sendo o composto com maior peso no eixo do y e, deste modo, responsável pela divisão nos dois grupos principais. Na Figura 3.11.b, o SCSM surge como o *outlier* já identificado pelo HCA, localizado no extremo negativo do y para os valores máximos de AG/5-HMF, AS, AV, C7 e SE. Oposto a este encontra-se o GT com áreas muito baixas destes compostos que, por sua vez, é muito diferente do TG que tem o valor máximo de furfural, tal como o ARM. As informações desta análise representam o já observado pelas razões entre as bandas de absorção (Tabela 3.1) e pela análise de HPLC. Portanto, os uísques que caem no quadrante positivo do eixo da PC1 e PC2 são aqueles com maior discriminação, apresentados próximos no dendograma de HCA. Os uísques presentes no quadrante negativo de ambas as componentes (GT, BB15, EW) tem uma área reduzida dos compostos AG/5-HMF, AS, AV, C7 e SE.

Em conjunto, estas representações confirmam o já concluído através do HPLC (secção 3.5), em que a concentração de furfural é maior para os uísques de malte (*single malt*): ARM, AMR, MT, TG e BS, e a concentração de ácidos e fenóis é característica de uísques *blended*.

O dendograma contruído por agrupamento hierárquico sobre o conjunto de dados obtidos por fs-TA mostra a formação de cinco grupos distintos (Figura 3.12).

Aplicando a análise de componentes principais para se examinarem as tendências nos dados, esta sugere que os uísques se dividem em dois grandes grupos (Figura 3.12.b), tal como já se tinha verificado experimentalmente (secção 3.4). Através das duas componentes principais recuperam-se 99.1% da variabilidade total. Sendo que a PC1 tem maior relevância, é a partir desta que se visualizam as distinções entre as amostras. A diferenciação entre os dois grupos principais ocorre através dos valores de  $\tau_3$ . Analisando da esquerda para a direita, os primeiros dois grupos não possuem componente  $\tau_3$ , ou seja, os decaimentos de absorção de transiente foram ajustados só com duas exponenciais (Grupo I da Tabela 3.3). Por exemplo, nos uísques CS\_GB e KU\_JP, que se encontram em grupos distintos, o valor de  $\tau_3$  é inexistente no primeiro sendo que no segundo assume um valor elevado. A diferenciação entre os grupos 1 e 2 do dendograma é explicada essencialmente por diferenças no  $\tau_2$ : os uísques situados no quadrante com valores

positivos de PC1 e PC2 (1º grupo) possuem valores de  $\tau_2$  mais elevados do que os situados no quadrante inferior direito (2º grupo).

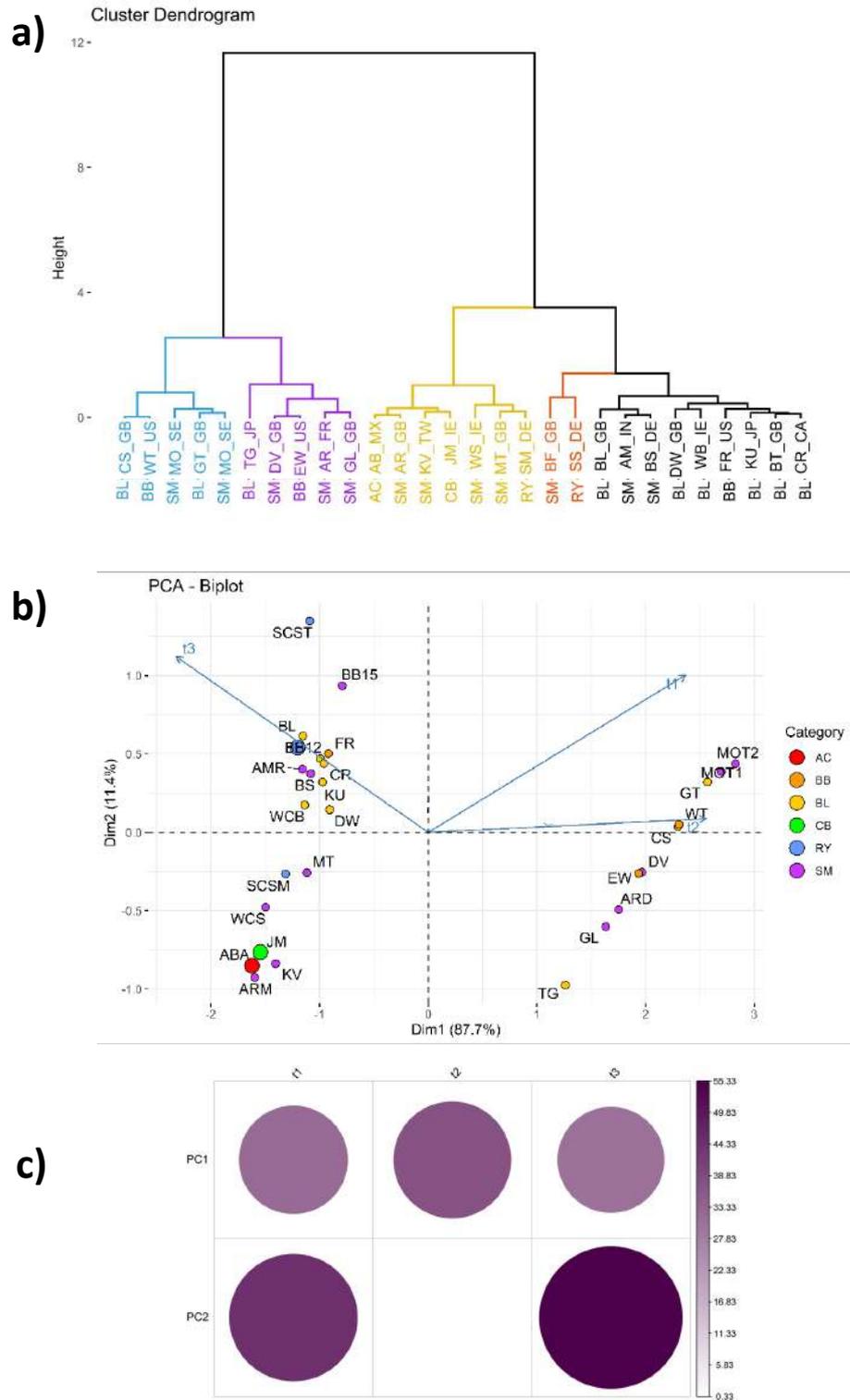


Figura 3.12 - a) Dendrograma da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 28 úisques relativos aos tempos de vida obtidos por fs-TA. As diferentes cores representam os vários grupos formados ( $k=5$ ). b) PCA para os úisques com representação dos scores relativos aos tempos de vida. c) Impacto das variáveis originais nas duas componentes principais

Nos grupos 3, 4 e 5, a diferenciação tem por base a segunda componente, PC2, ou seja, os valores de  $\tau_1$  e  $\tau_3$  são os responsáveis pela distinção. Os uísques com valores de  $\tau_1$  e  $\tau_3$  mais baixos encontram-se no 3º grupo, enquanto que o 5º grupo apresenta as amostras com elevados valores  $\tau_1$  e  $\tau_3$  elevados. O 4º grupo possui apenas dois uísques (BF\_GB e SS\_DE) e caracteriza-se por valores de  $\tau_3$  mais elevados que os restantes.

Os tempos de decaimento  $\tau_1$  e  $\tau_3$  estão associados ao siringaldeído e ao ácido siríngico, respetivamente, ao passo que o  $\tau_2$  corresponde ao ácido gálico e/ou coniferaldeído e ao siringaldeído. Assim, podemos concluir que o ácido siríngico e fenóis encontram-se associados maioritariamente aos uísques *blended*.

Em todas as análises quimiométricas foi observado que o tempo de envelhecimento não justifica o agrupamento por si só, embora também possua um grau de contribuição para o mesmo. Na Figura A7 (em Anexo), podem ser vistos perfis químicos semelhantes entre os uísques ABA e ARD com 2 e 12 anos, respetivamente, como resultado da maturação acelerada devido ao calor sentido na região do México que reduz substancialmente o tempo necessário para um uísque jovem ter características de outros mais velhos.

Foi igualmente realizado este tratamento para os dados de FLIM, considerando como variáveis os tempos de vida. O dendograma formado encontra-se representado na Figura 3.13 e apresenta cinco grupos ( $k=5$ ). A análise do dendograma da esquerda para a direita indica-nos que o  $\tau_3$  é a variável diferenciadora e que promove a formação dos grupos. O primeiro grupo é unitário e caracteriza-se por ter um  $\tau_3$  muito inferior à média. No 2º grupo, o  $\tau_3$  é nulo. O terceiro grupo apresenta o valor de  $\tau_3$  mais elevado. Os restantes 4º e 5º grupos possuem um valor de  $\tau_3$  muito próximo, sendo o seu fracionamento responsável da diminuição do valor de  $\tau_2$ .

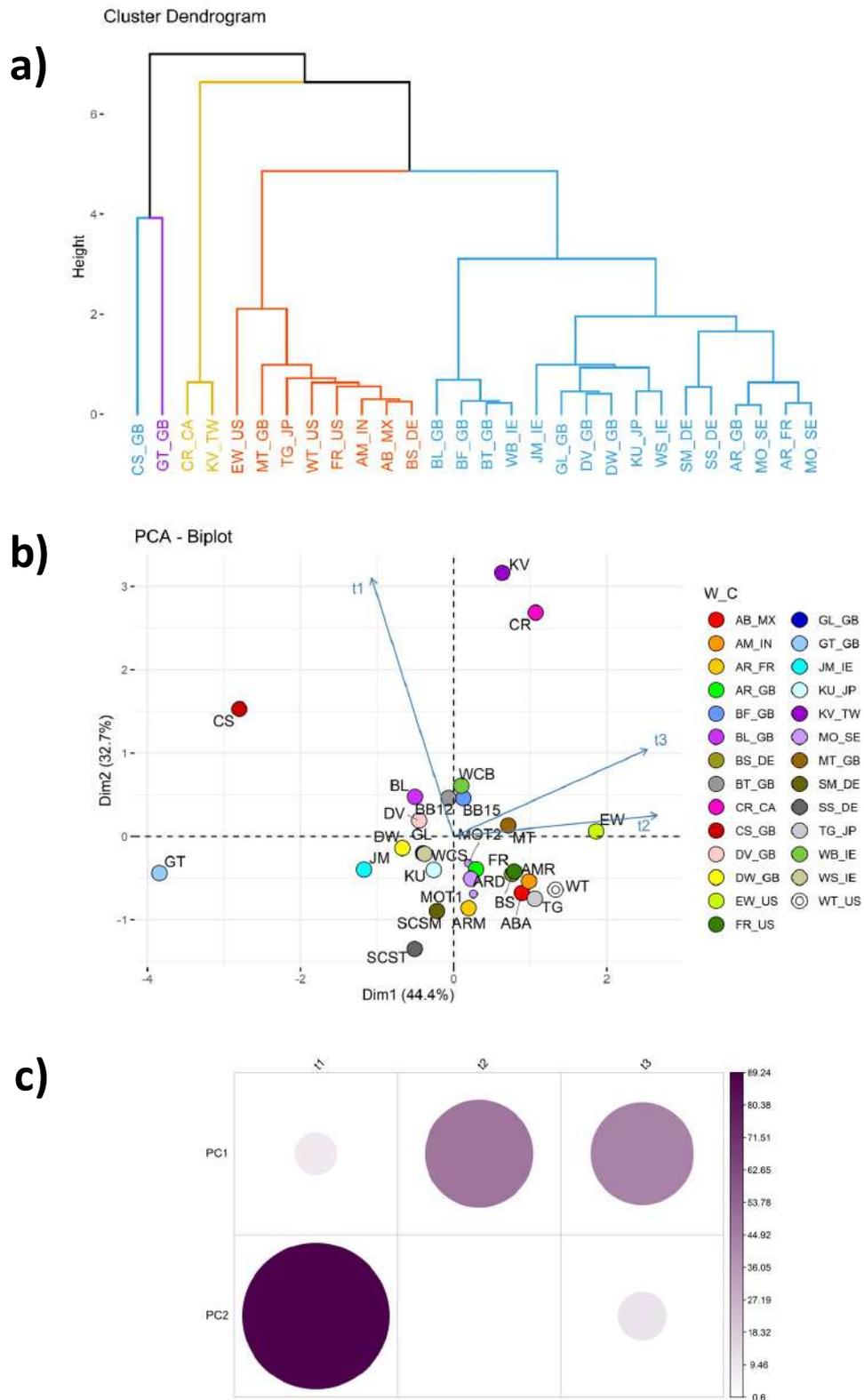


Figura 3.13 -a) Dendrograma da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 27 uísques relativos aos tempos de vida obtidos por FLIM. As diferentes cores representam os vários grupos formados ( $k=5$ ). b) PCA para os uísques com representação dos scores relativos aos tempos de vida. c) Impacto das variáveis principais nas duas componentes principais



## Bibliografia

1. Martins, A.R., Talhavini, M., Vieira, M.L., Zacca, J.J. and Braga, J.W., *Discrimination of whisky brands and counterfeit identification by UV-Vis spectroscopy and multivariate data analysis*. Food Chem, 2017. **229**: p. 142-151.
2. Joshi, I., Truong, V.K., Elbourne, A., Chapman, J. and Cozzolino, D., *Influence of the Scanning Temperature on the Classification of Whisky Samples Analysed by UV-VIS Spectroscopy*. Applied Sciences, 2019. **9**.
3. Fraser, S.E. and M.J. Francis, *Characterisation of single malt Scotch Whisky using low powered ultrasound and UV-Visible spectroscopy*. Journal of the Institute of Brewing, 2021. **127**(1): p. 49-58.
4. Dambergs, R.G., Mercurio, M.D., Kassara, S., Cozzolino, D. and Smith, P. A., *Rapid measurement of methyl cellulose precipitable tannins using ultraviolet spectroscopy with chemometrics: application to red wine and inter-laboratory calibration transfer*. Appl Spectrosc, 2012. **66**: p. 656-64.
5. MacKenzie, W.M. and R.I. Aylott, *Analytical strategies to confirm Scotch whisky authenticity. Part II: Mobile brand authentication*. Analyst, 2004. **129**: p. 607-12.
6. Aylott, R.I. and W.M. MacKenzie, *Analytical Strategies to Confirm the Generic Authenticity of Scotch Whisky*. Journal of the Institute of Brewing, 2010. **116**: p. 215-229.
7. Sádecká, J., Uričková, V. and Jakubíková, M., *Fluorescence Spectroscopy for the Analysis of Spirit Drinks*, in *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences*, , M. Stauffer, Editor. 2016, IntechOpen, : London.
8. Lee, Y., Cho, E., Cha, Y. , *Comparisons of Flavour Ingredients Changes according to Whisky Types and Maturation Period*, in *The Korean Journal of Food and Nutrition* 2011. p. 471-479.
9. Becker, W., Heitz, J. and Bergmann, A., *Ultra-fast Fluorescence Decay in Scottish Whisky*, B. Becker & Hickl GmbH, Germany, Editor.
10. Aquino, F., Rodrigues, S., Nascimento, R. and Casimiro, A., *Phenolic compounds in Imburana (Amburana cearensis) powder extracts*. European Food Research and Technology, 2005. **221**: p. 739-745.
11. Bortoletto, A.M. and A.R. Alcarde, *Aging marker profile incachaçais influenced by toasted oak chips*. Journal of the Institute of Brewing, 2015. **121**: p. 70-77.
12. Cabrita, M.J., C.B. Dias, and A.M.C. Freitas, *Phenolic Acids, Phenolic Aldehydes and Furanic Derivatives in Oak Chips: American vs. French Oaks*. South African Journal of Enology and Viticulture, 2016. **32**.
13. Canas, S., Belchior, A.P., Spranger, M.I. and Bruno-de-Sousa, R., *High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation*. Journal of Separation Science, 2003. **26**: p. 496-502.
14. Vusovich, O.V., Tchaikovskaya, O.N., Sokolova, I.V. and Vasil'eva, N.Y., *Proteolytic Equilibria of Vanillic Acid in the Ground and Excited States*. Journal of Applied Spectroscopy, 2016. **83**: p. 8-11.
15. Vusovich, O., Sultimova, N., Tchaikovskaya, O, Sokolova, I. and Vasilieva, N., *Optical properties of natural phenols in aqueous media*. Proc. of SPIE, 2015. **9680**.

16. Macedo, C., *Desenvolvimento e validação de um método para a caracterização de vinhos por HPLC-DAD*, in *Escola de Ciências*. 2015, Universidade do Minho.
17. Schwarz, M., Rodriguez, M.C., Guillen, D.A. and Barroso, C.G., *Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez*. *J Sep Sci*, 2009. **32**: p. 1782-90.
18. Russell, I., Stewart, G., Anstruther, A., *Whisky. Technology, Production and Marketing*. Elsevier Ltd, 2014. **2nd ed**: p. 1-304.



Capítulo IV

**Conclusões**

O uísque é um produto complexo com muitos perfis de sabor decorrentes de variações nos ingredientes, produção e processos de maturação. A fermentação e a maturação em barril são conhecidas como as etapas chave para o desenvolvimento e variação de congêneres, mas embora as suas diferenças sejam o resultado de variações nos processos e materiais usados, a identificação de um único composto ou um grupo de compostos responsáveis pela diferenciação de sabor é muito difícil devido à complexidade desses produtos. Apesar disso, a sua análise pode potencialmente ser usada para identificar características distintivas e representativas de marcas, destilarias e tipos de uísque.

Foram analisadas 28 amostras de uísques com diferentes características, das quais se pretendeu estudar a influência de três fatores principais: idade, categoria e país de origem. A espectroscopia UV-vis possibilitou a identificação das bandas de absorção características dos uísques. Alguns estudos realizados até à data sugerem a possibilidade de classificar e autenticar uísques com base em espectroscopia UV-vis, no entanto estes envolvem um número relativamente pequeno de amostras e tipologias. Tais abordagens não têm em consideração as variações intra e intermarcas, que são altamente prováveis devido à série de fatores que influenciam o perfil final dos congêneres.

A partir de análises HPLC-DAD, furfural, ácido vanílico, ácido siríngico, siringaldeído e coniferaldeído foram identificados como os compostos presentes em vários dos uísques analisados. Não foram possíveis identificar todos os padrões propostos, pois o método adaptado mostrou-se ineficiente para a separação e quantificação simultânea desses. No entanto, constatou-se que a concentração de furfural é maior para os uísques de malte (*single malt*), ARM, AMR, MT, TG, BS, entre outros, e as concentrações de ácidos e fenóis são características de uísques *blended*. Variações nos cromatogramas são consequências da composição química da madeira, do tratamento térmico e dos processos redox que ocorrem durante o envelhecimento.

Os decaimentos de fluorescência, obtidos por FLIM, e os decaimentos de absorção transiente, obtidos por fs-TA, são multi-exponenciais. Por FLIM, foram identificados três tempos de vida cujas componentes parecem ser influenciadas pelo tempo de envelhecimento. O aumento do tempo de envelhecimento proporciona o aumento da contribuição do tempo de decaimento intermédio. Utilizando a metodologia fs-TA foi possível identificar tempos de decaimentos muito curtos, inferiores a 10 ps. A análise quimiométrica dos resultados obtidos permitiu identificar dois grandes grupos que se distinguem primeiramente pela presença ou ausência de uma terceira componente ( $\tau_3 =$

65.32-117.5 ps). O facto da amostragem possuir muitas variáveis (padrões de produção, armazenamento e processamento, estilo de uísque, idade, entre muitos outros) fez com que as conclusões tiradas das técnicas quimiométricas fossem limitadas relativamente à visualização de padrões de comportamento associados ao tempo de envelhecimento, país e categoria.

O tempo de maturação e categoria do uísque parecem exercer uma grande influência nos tempos de decaimento obtidos pelas duas técnicas. Será necessária a seleção de uma gama mais representativa de uísques com base no seu país de origem, tempo de maturação e categoria para a realização de avaliações e estudos comparativos significativos que permitam identificar e diferenciar a influência de cada um destes fatores. Agrupar uísques por categorias, mas com a mesma idade e origem permitirá explorar as suas semelhanças e diferenças. Por outro lado, selecionando uísques com diferentes tempos de envelhecimento, irá permitir perceber a forma como cada um dos seus constituintes evolui.

Os resultados obtidos indicam que as técnicas resolvidas temporalmente são técnicas promissoras para a caracterização de uísques.

## Anexos

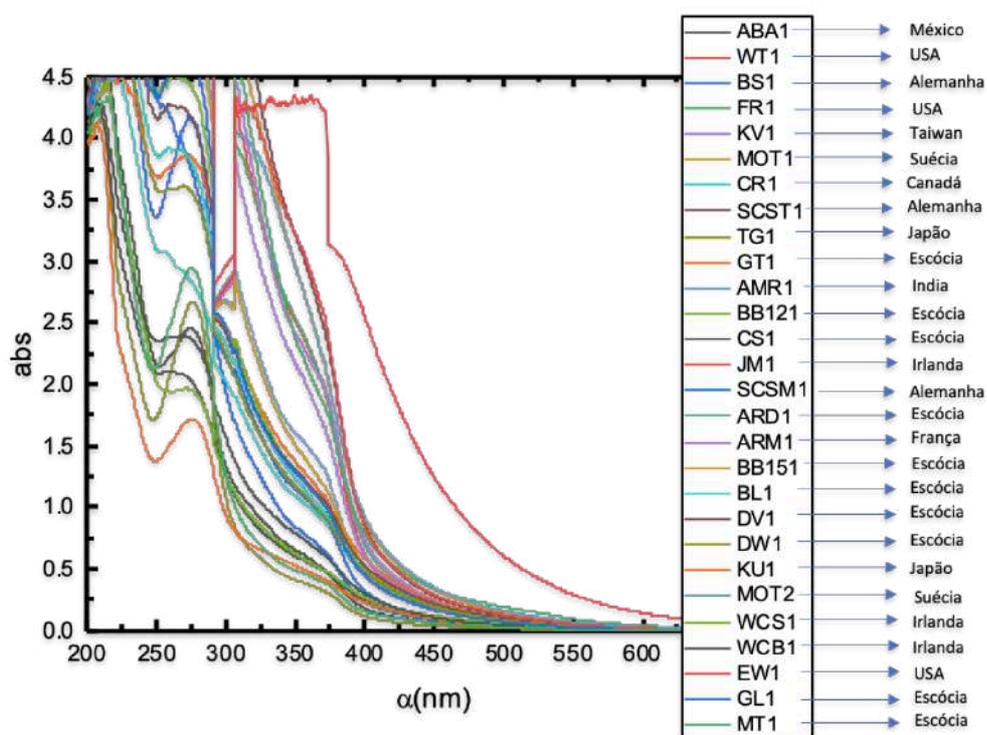
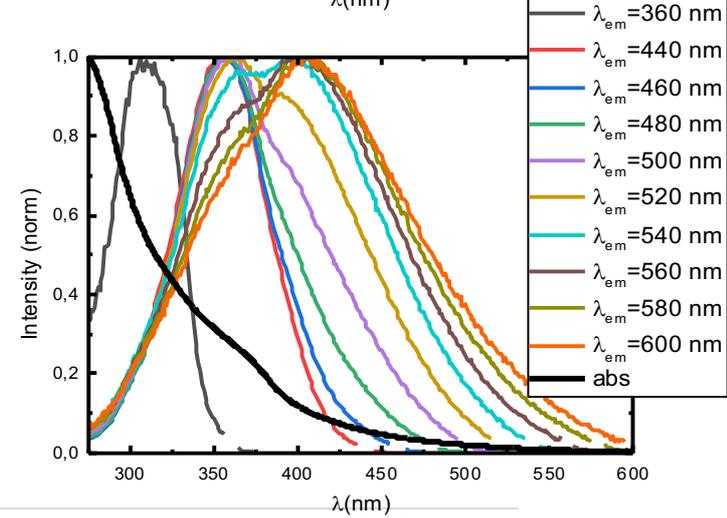
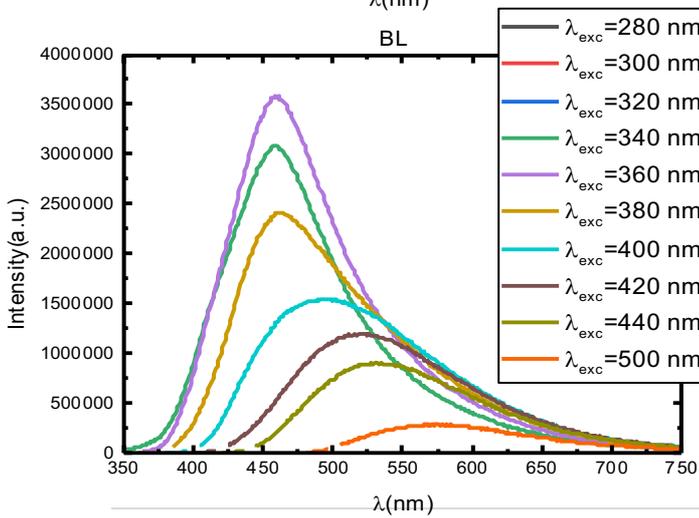
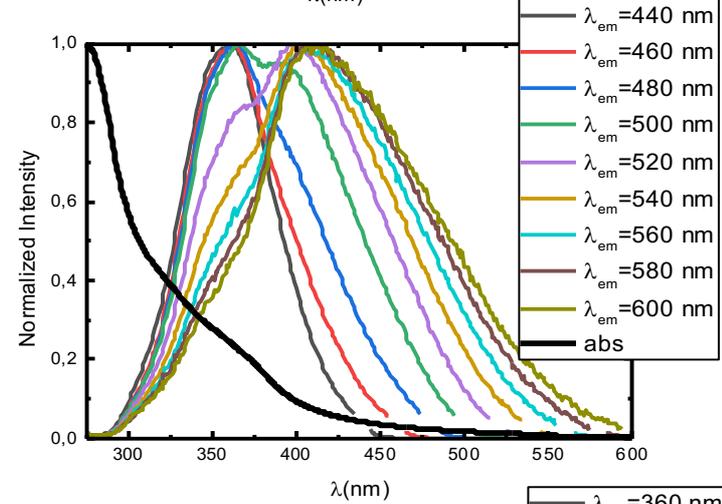
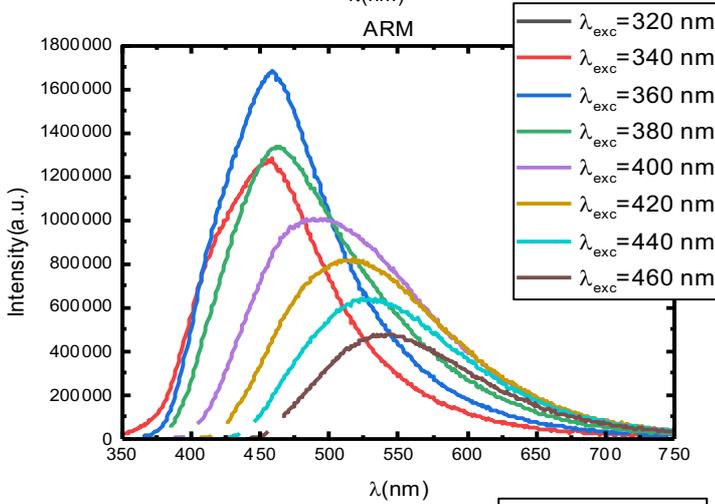
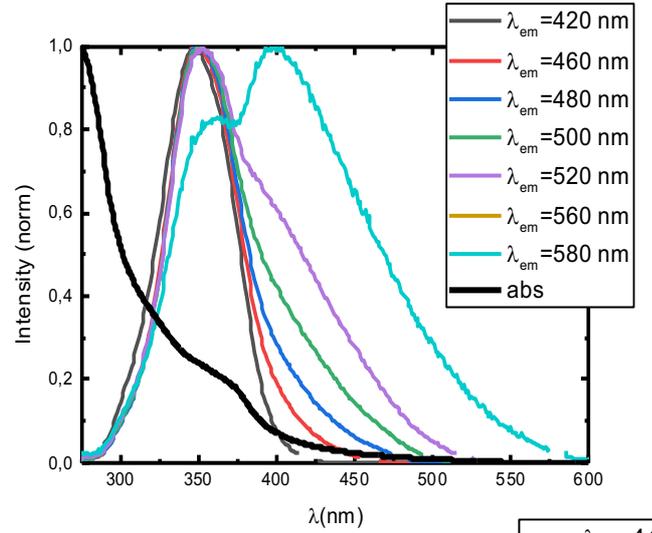
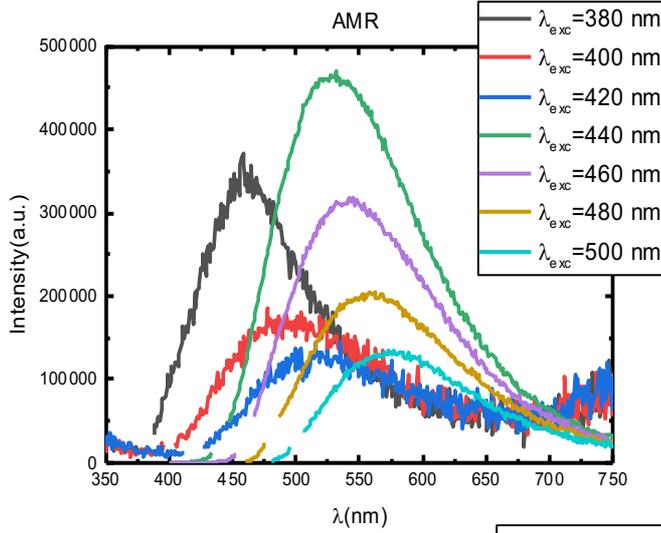
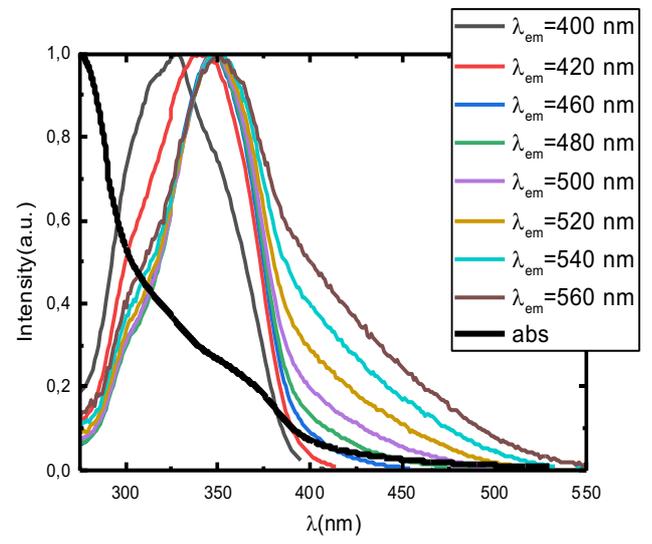
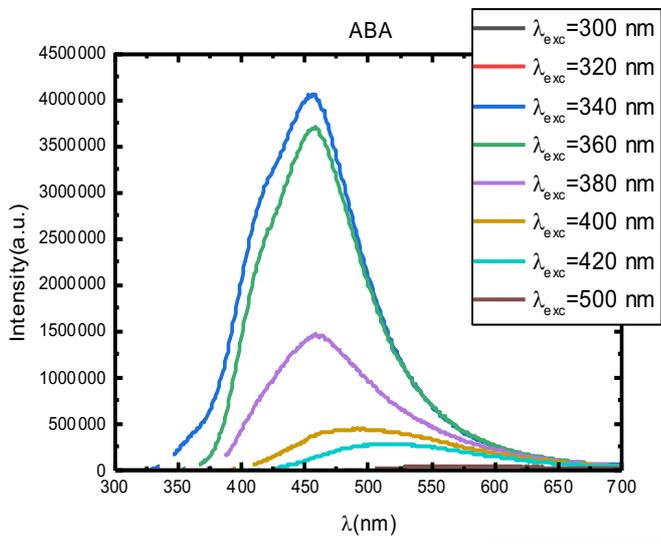
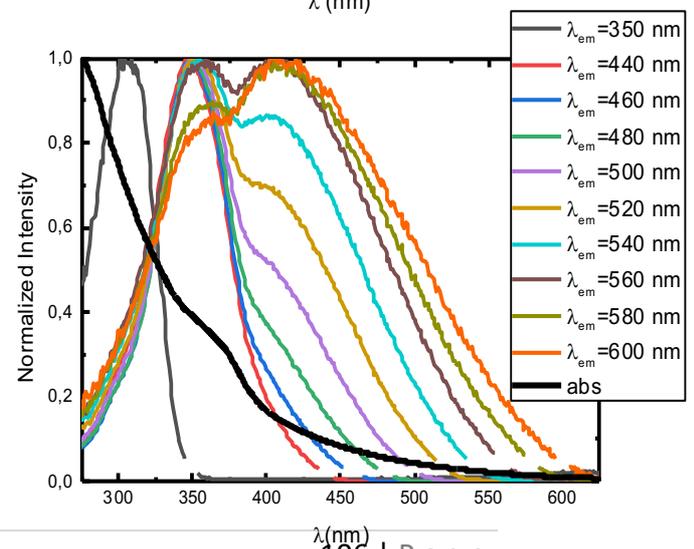
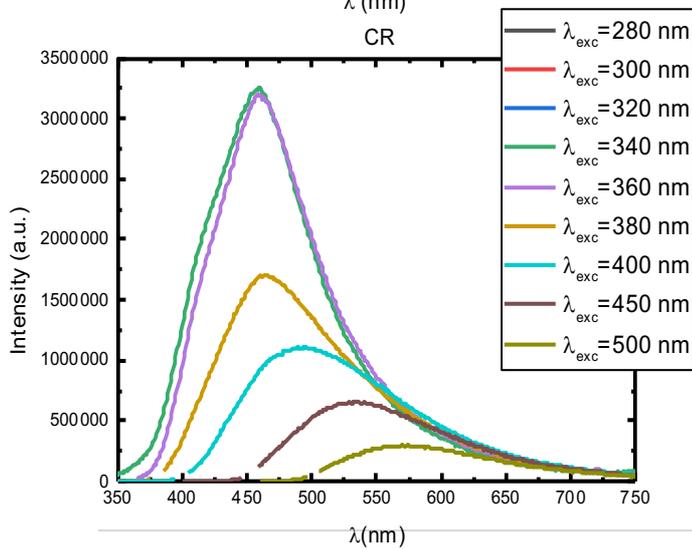
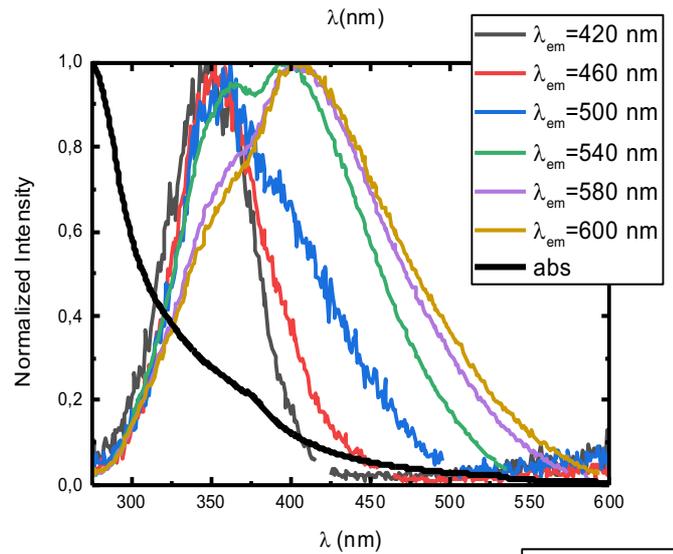
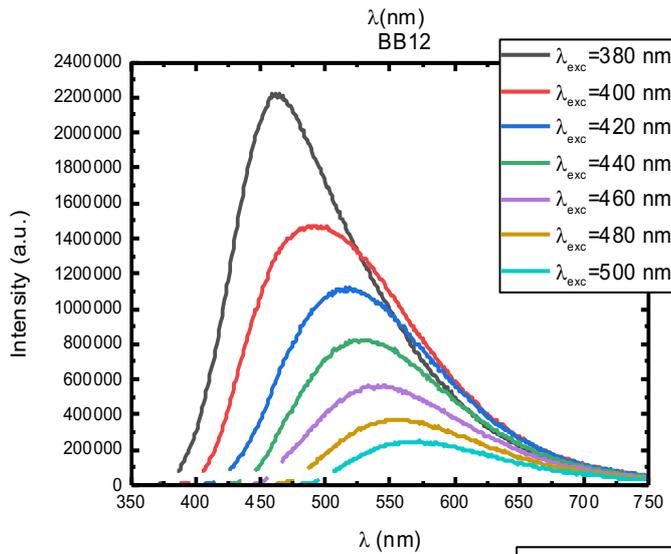
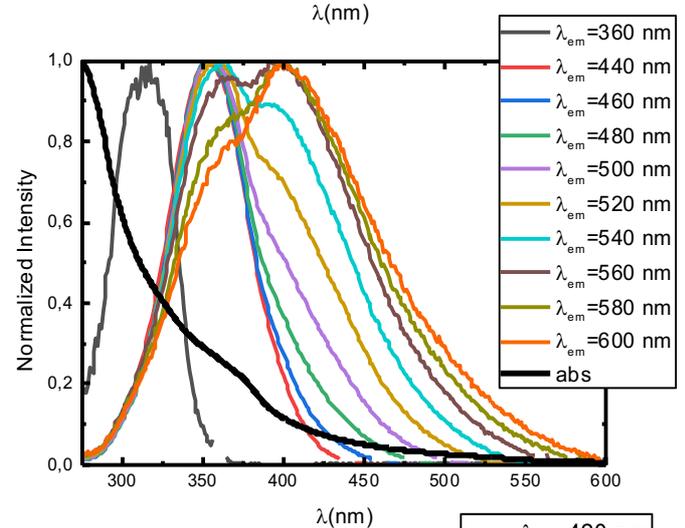
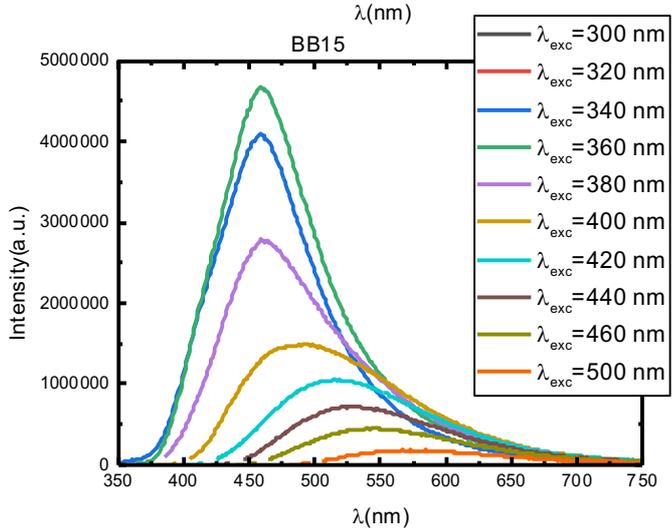
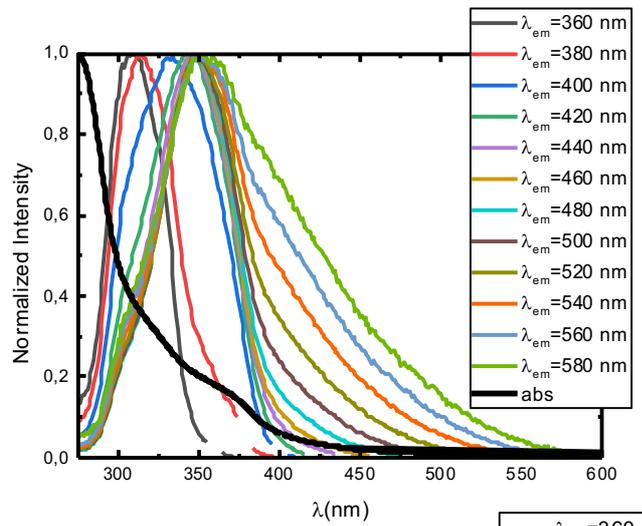
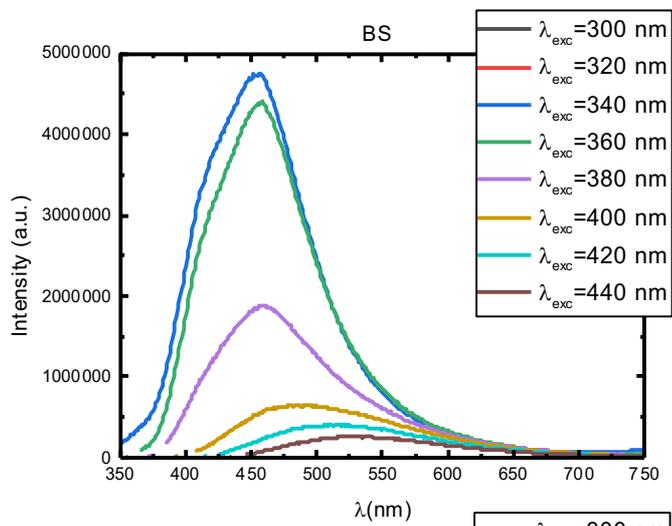
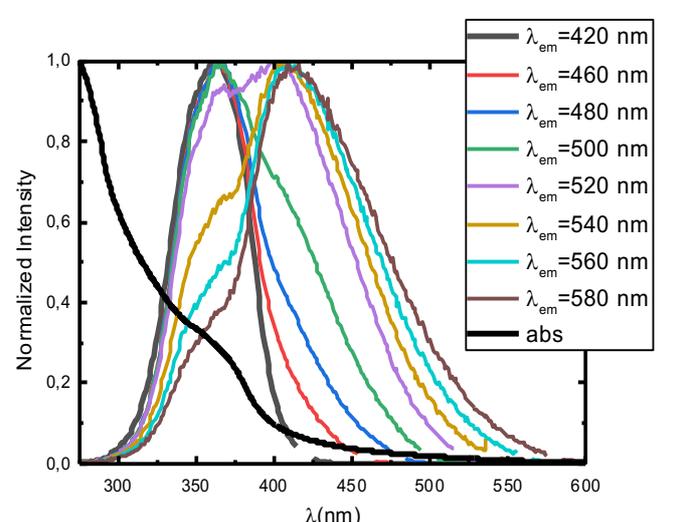
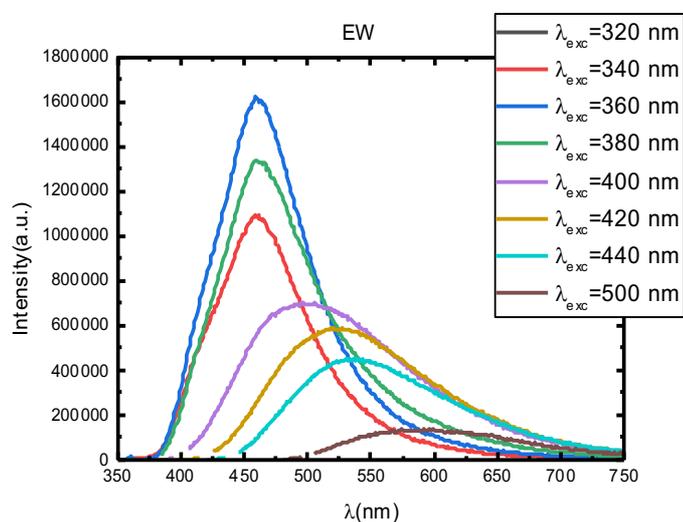
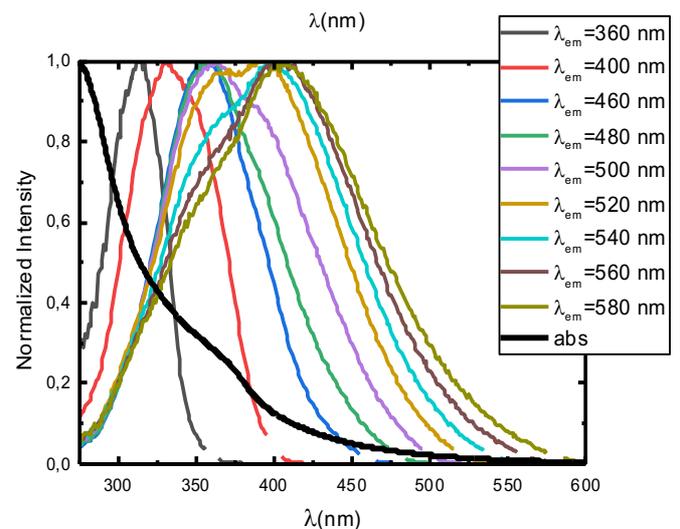
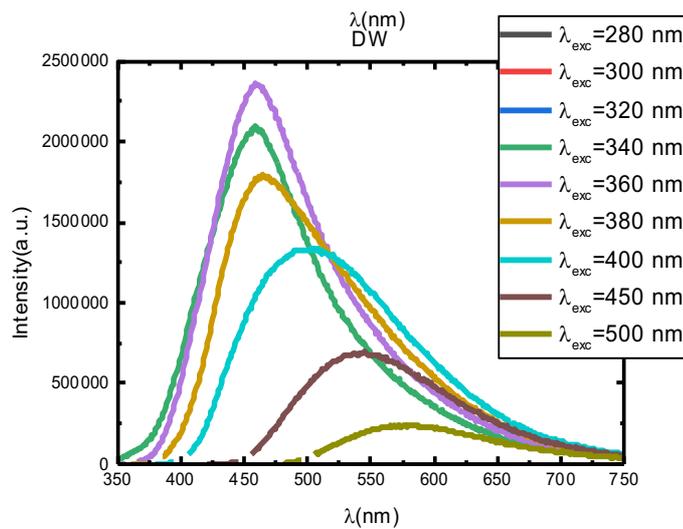
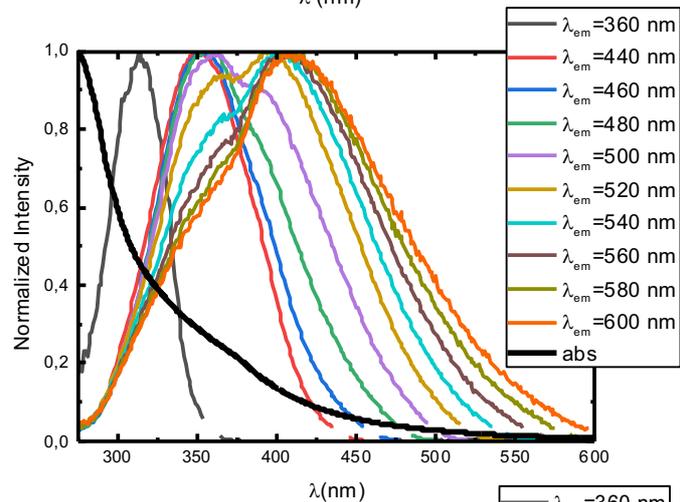
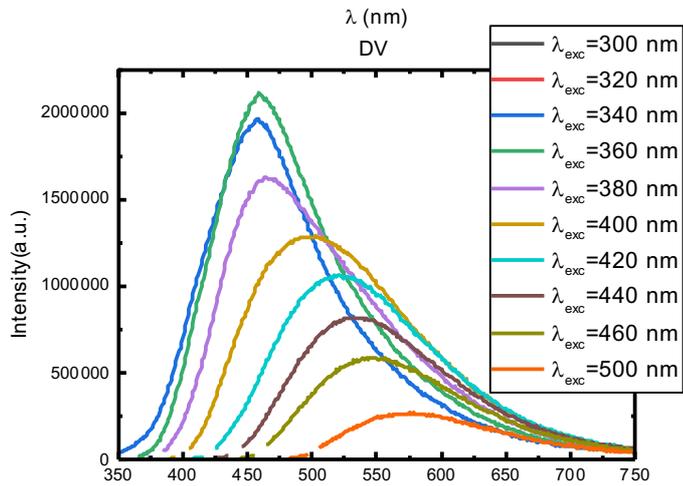
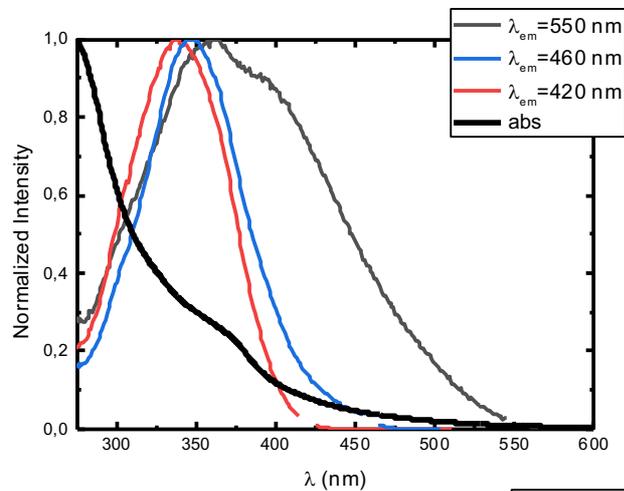
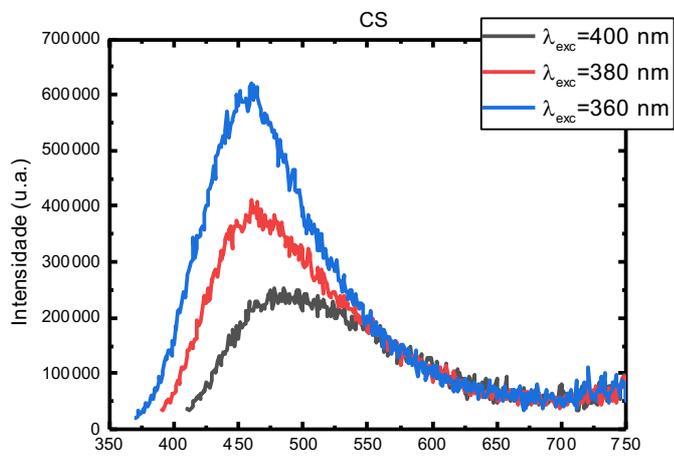
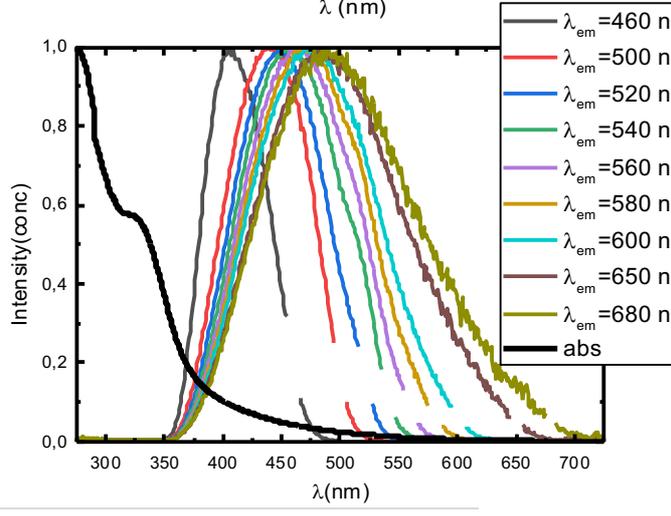
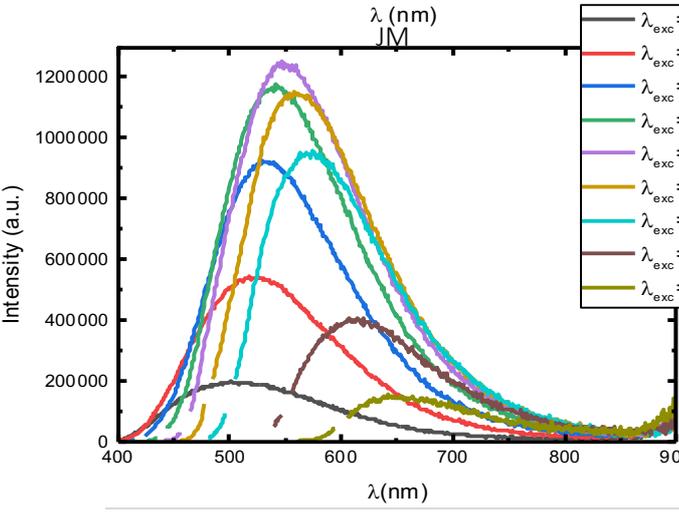
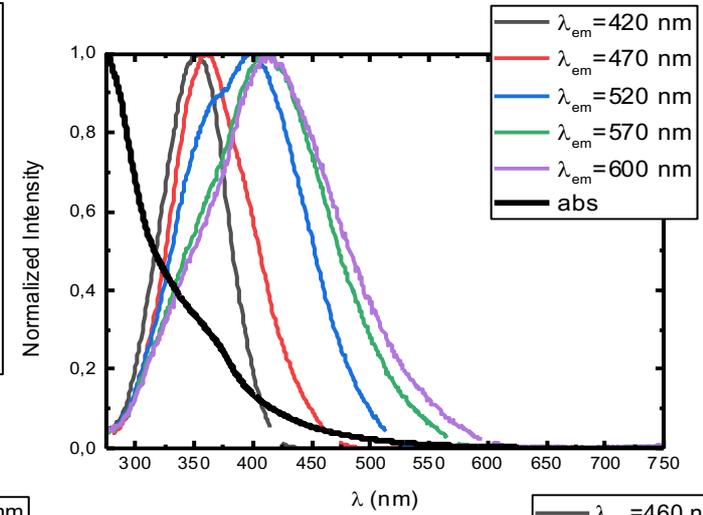
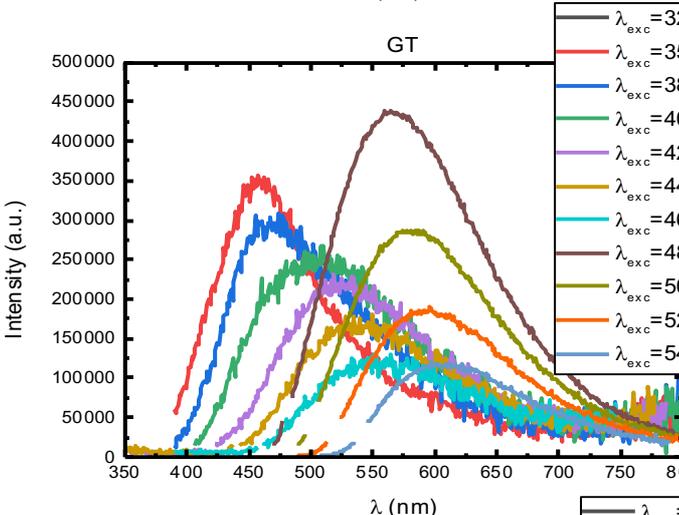
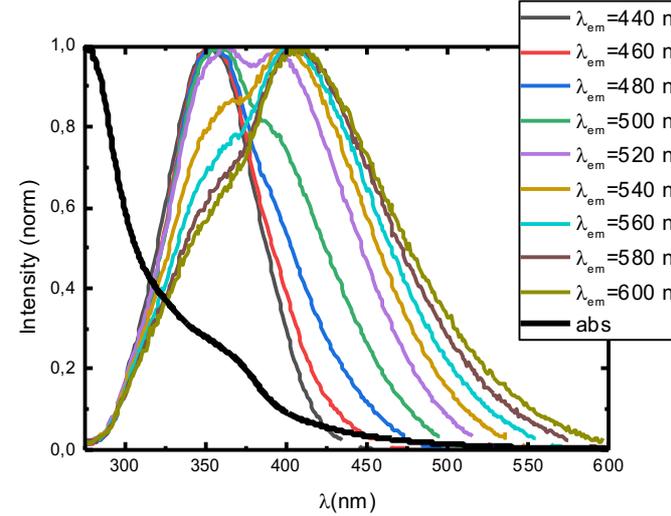
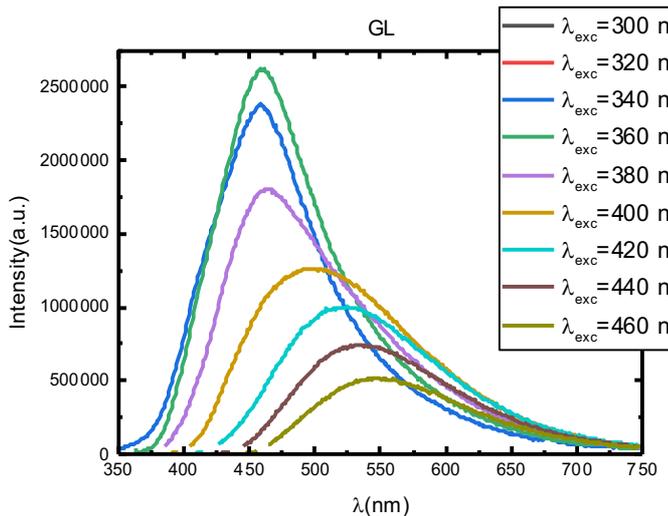
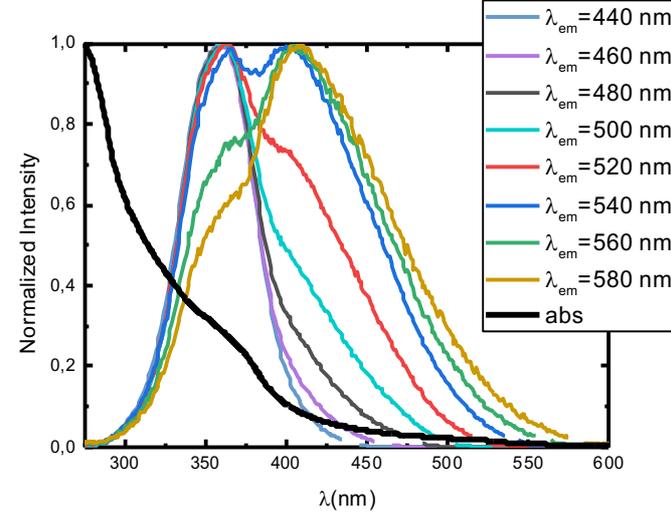
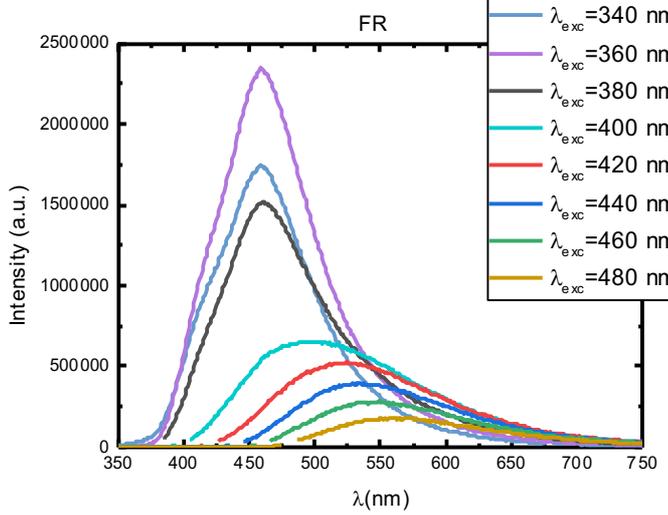


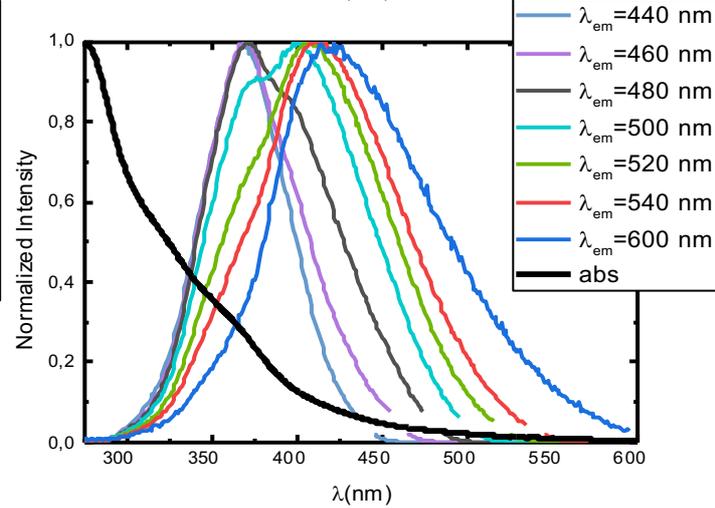
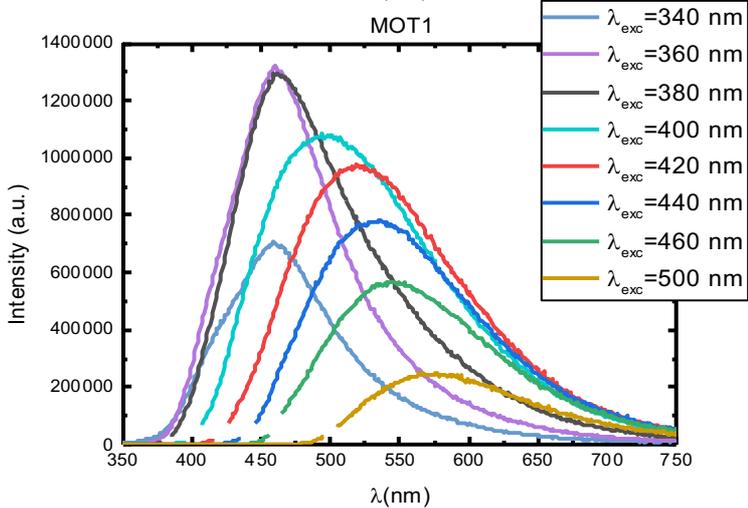
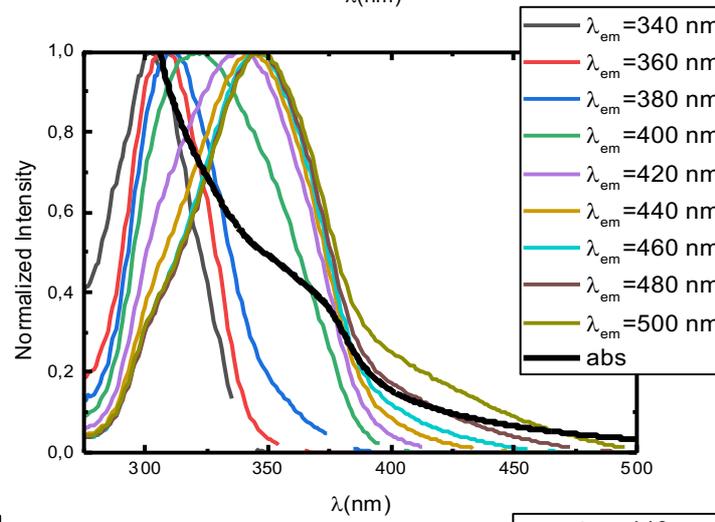
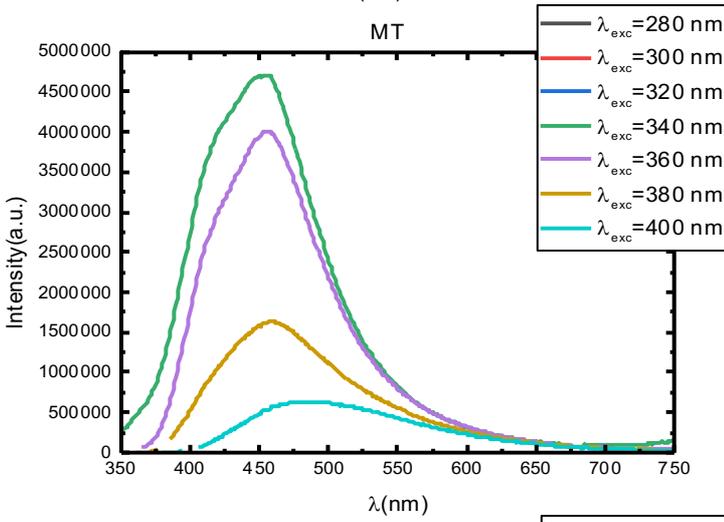
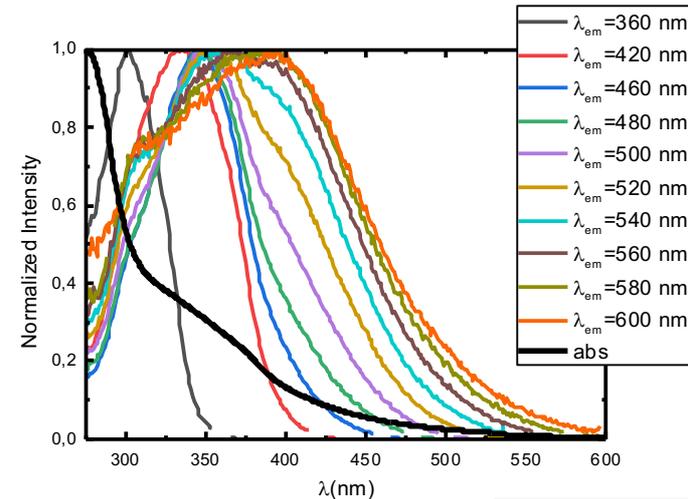
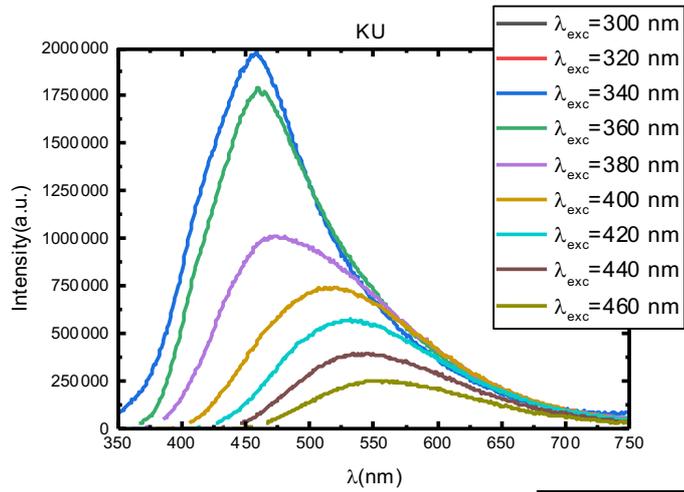
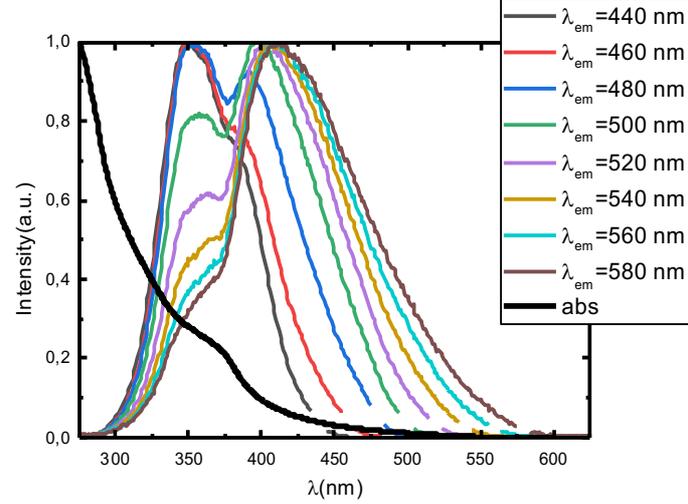
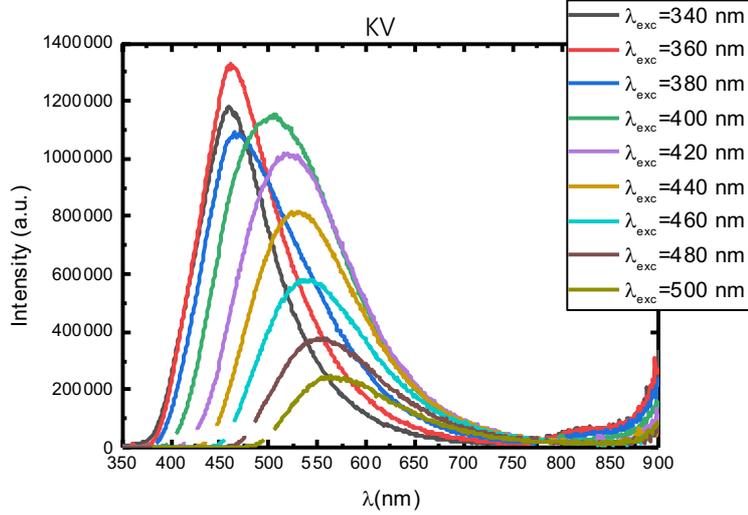
Figura A.1: Espectros de absorção dos 28 uísques estudados, com indicação da respetiva localização geográfica

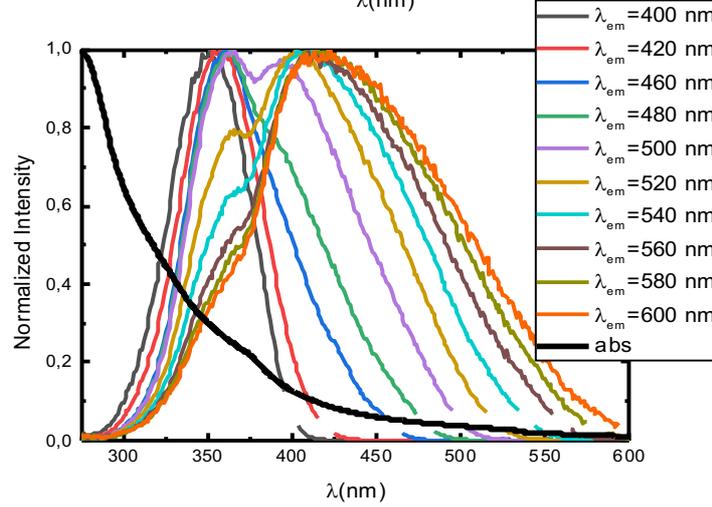
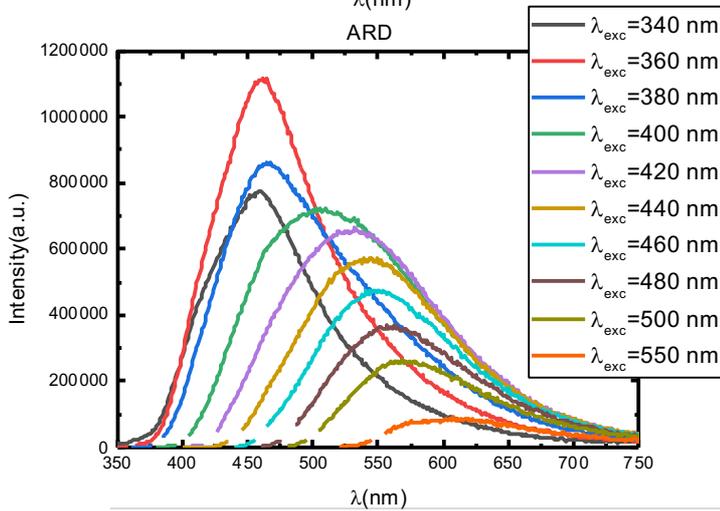
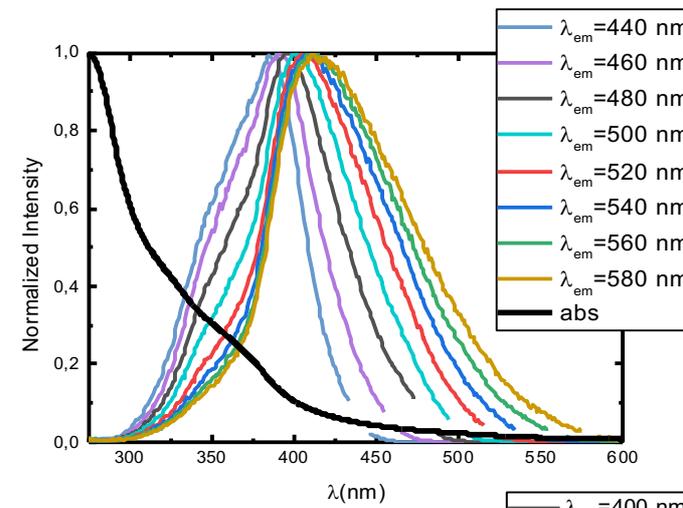
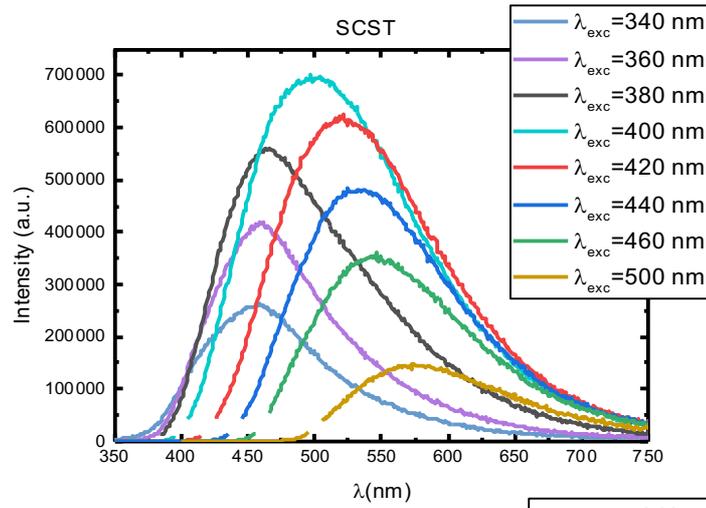
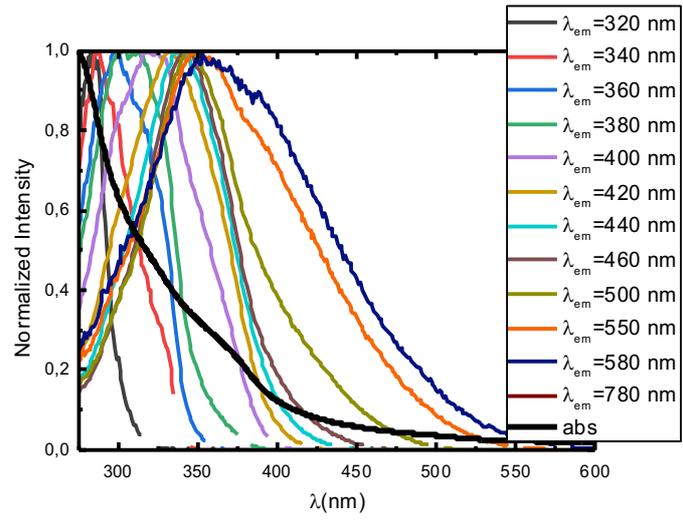
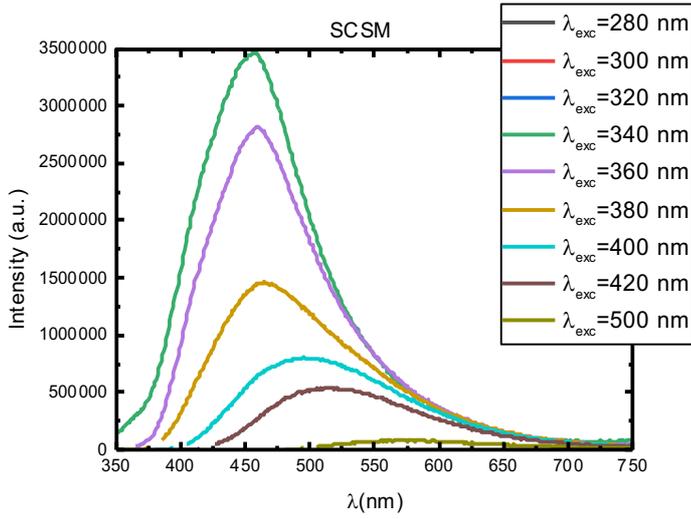
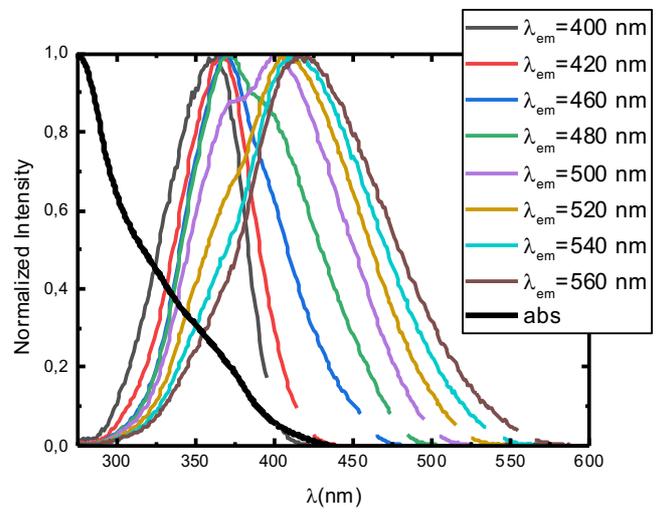
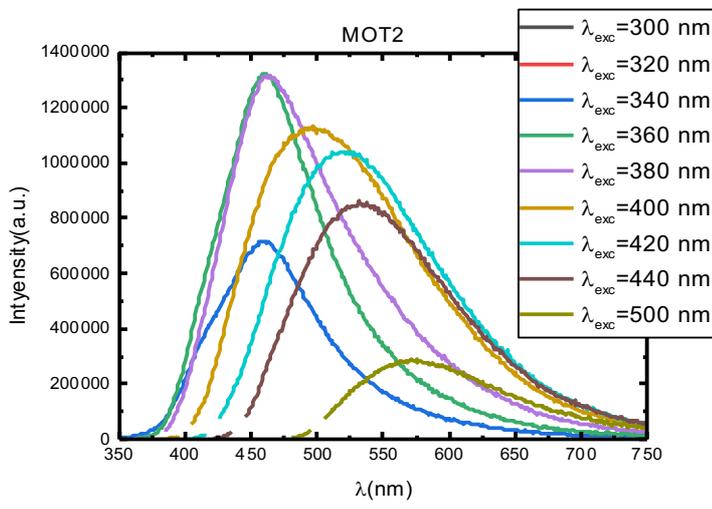


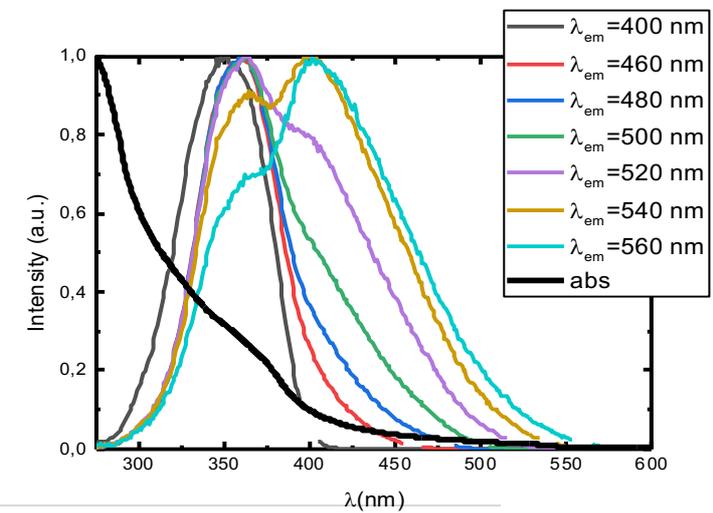
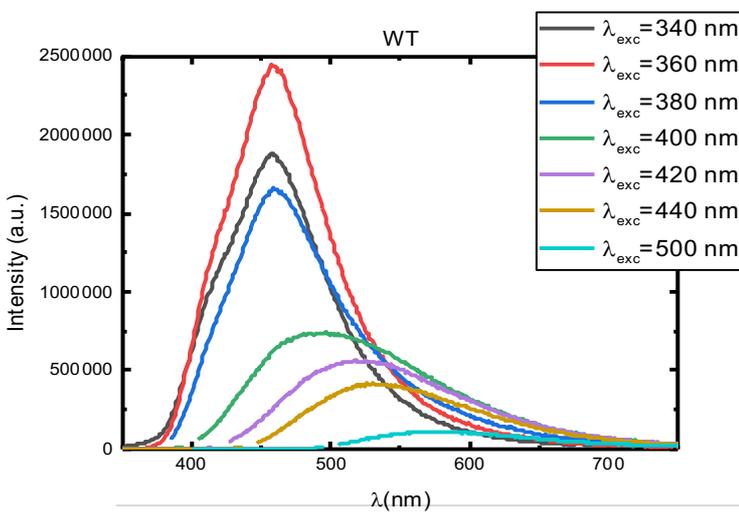
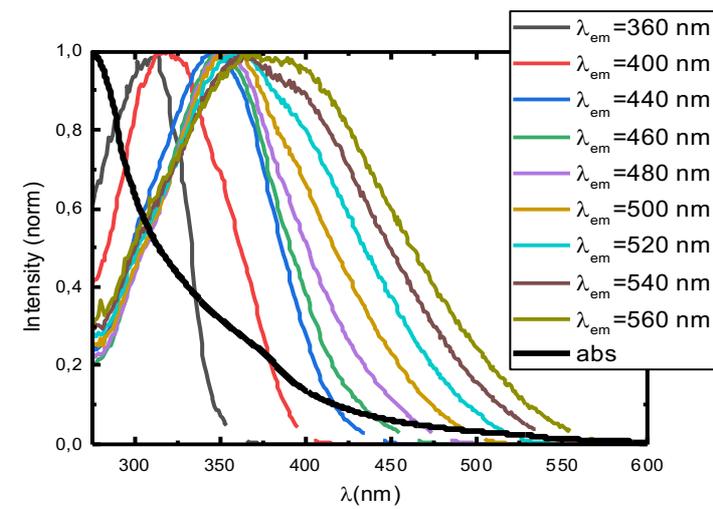
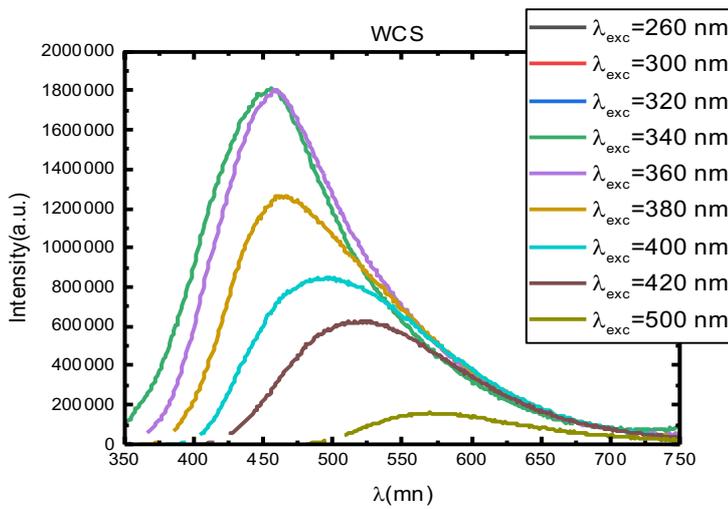
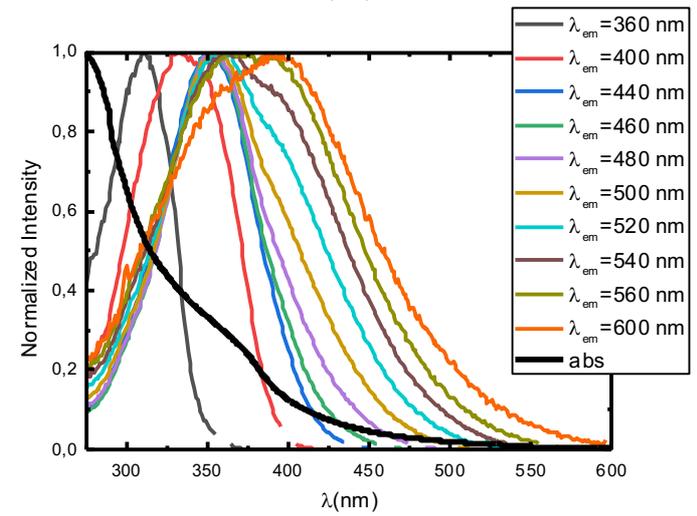
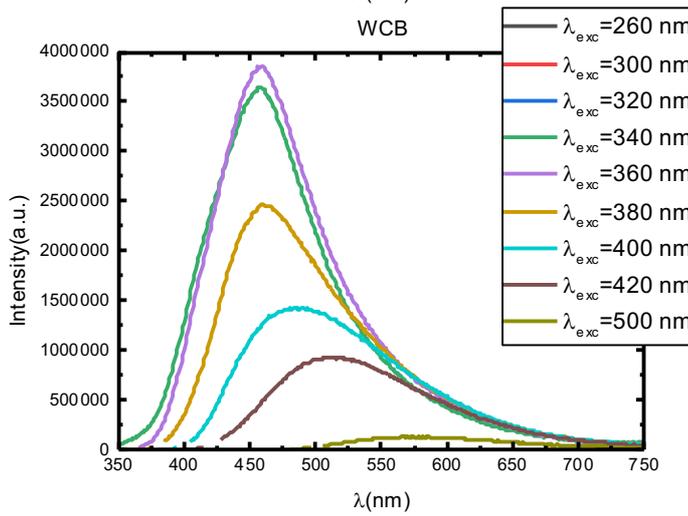
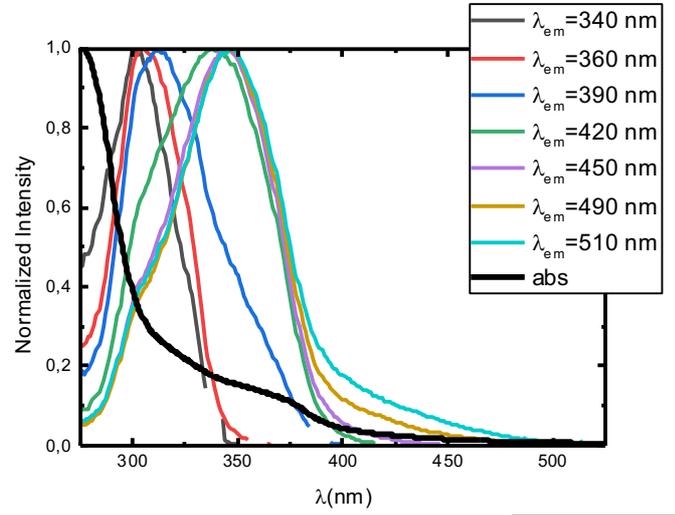
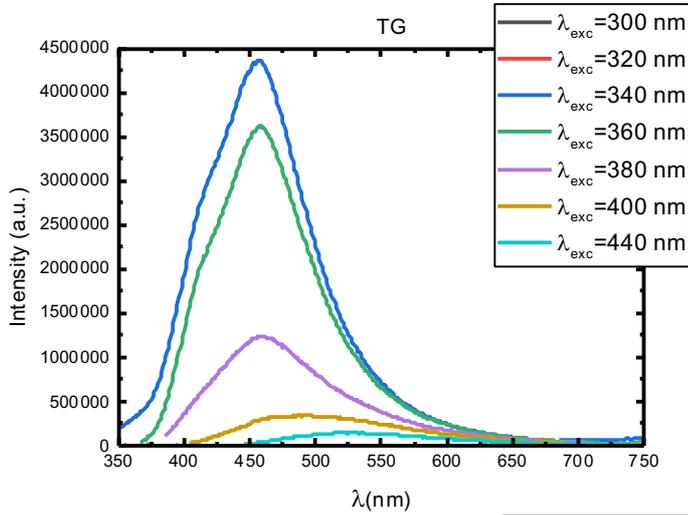


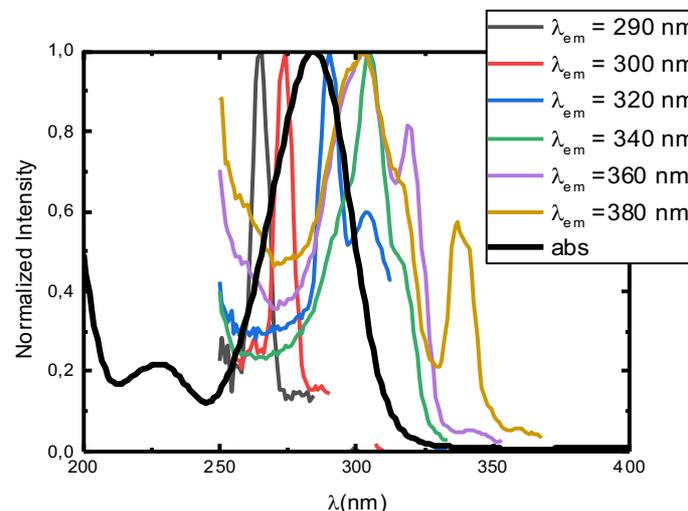
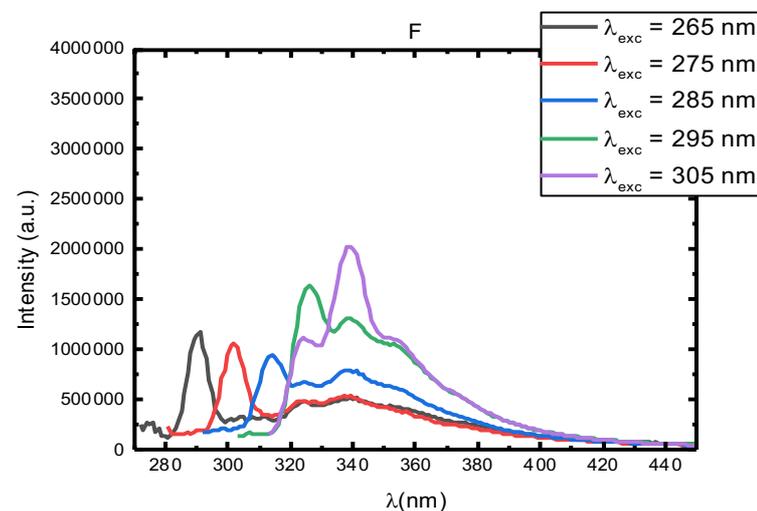
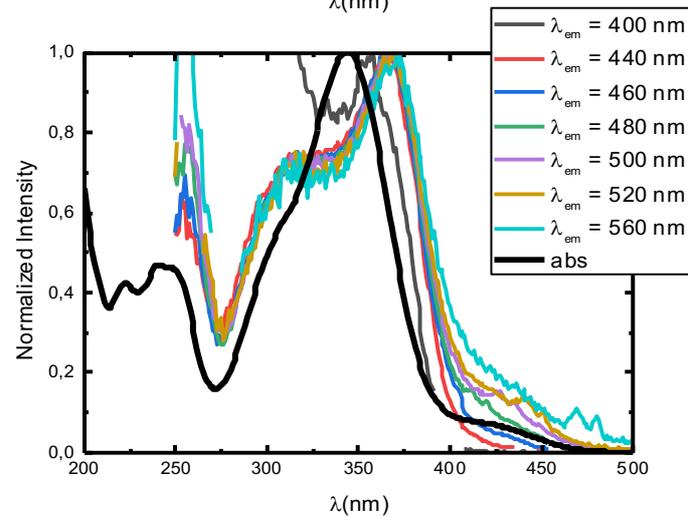
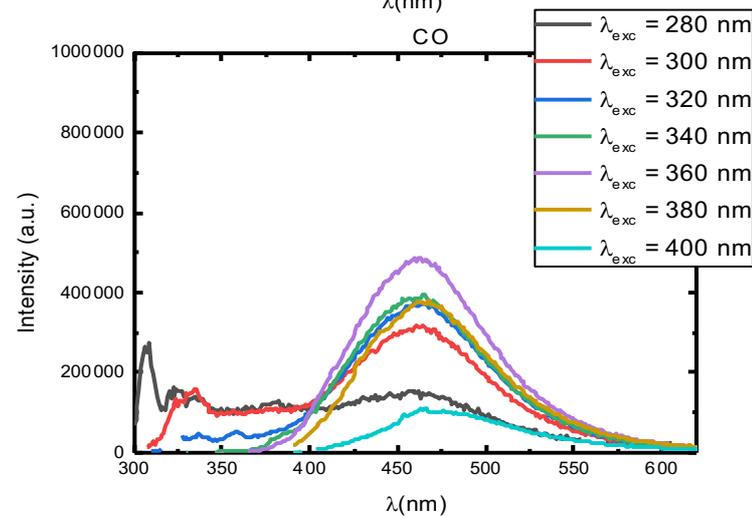
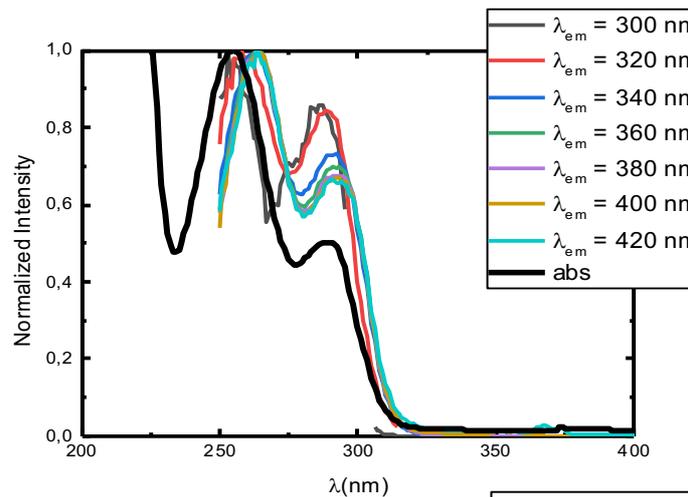
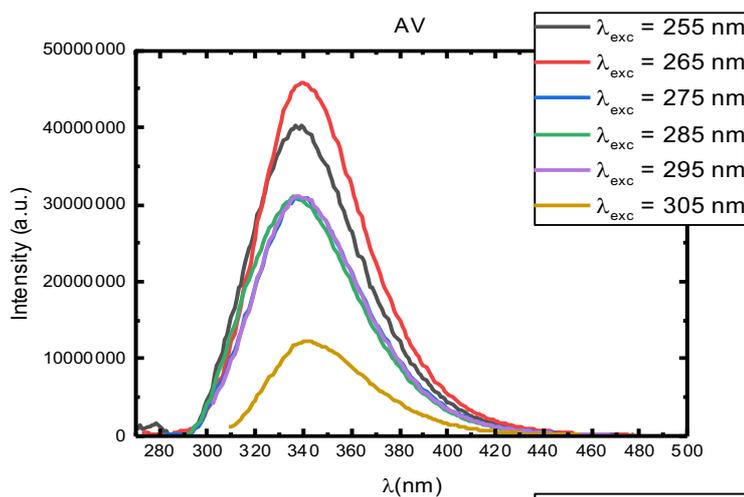
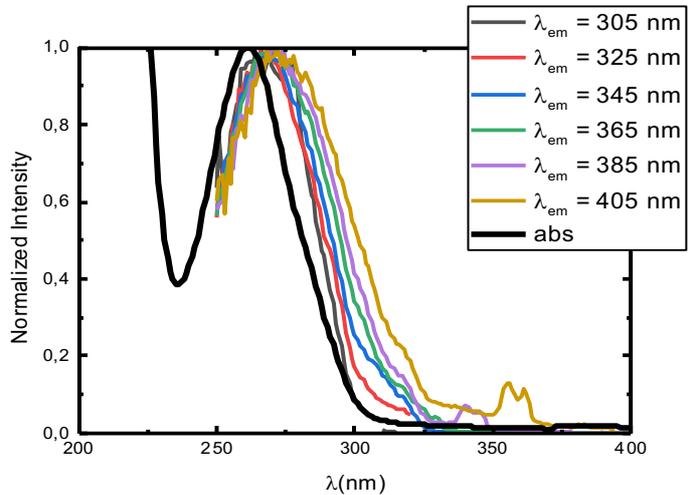
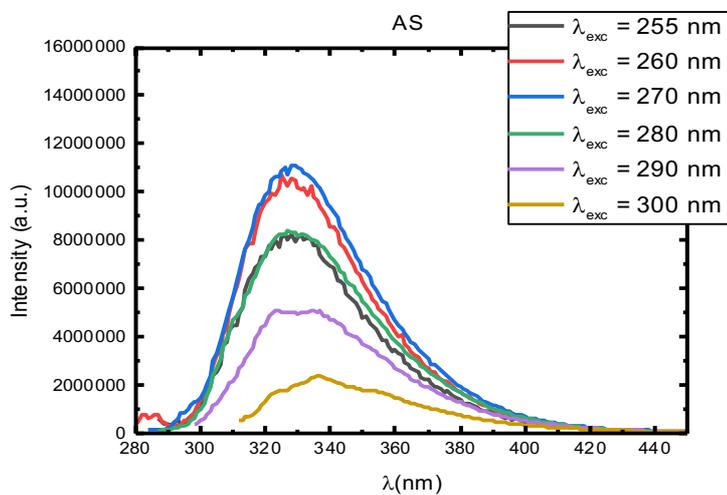












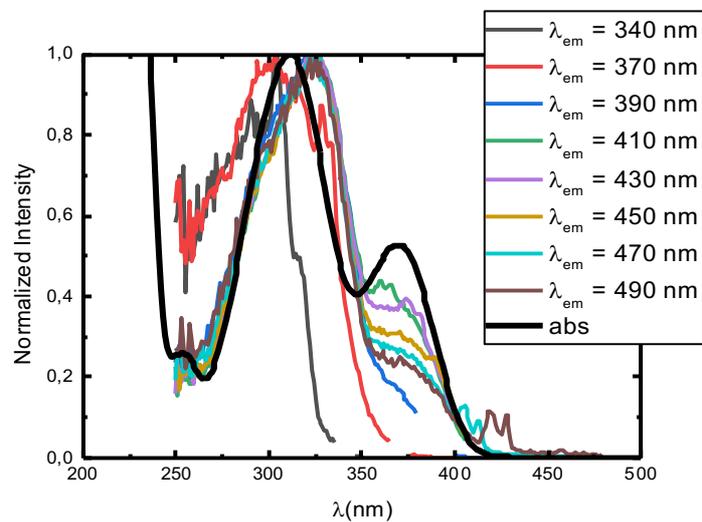
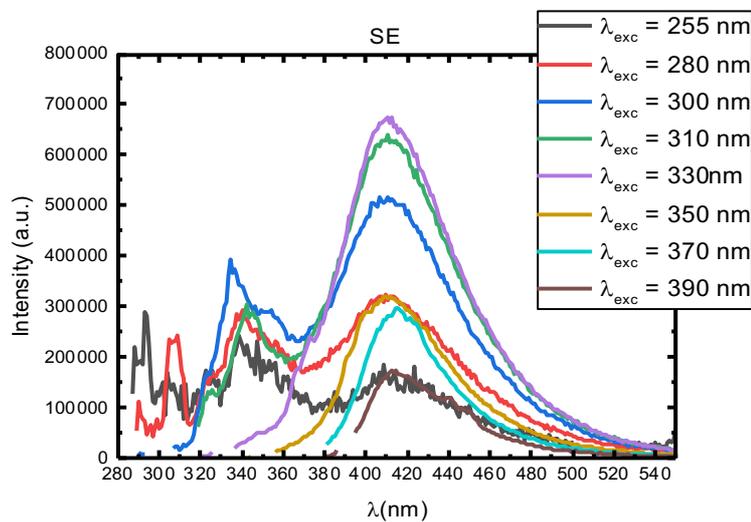
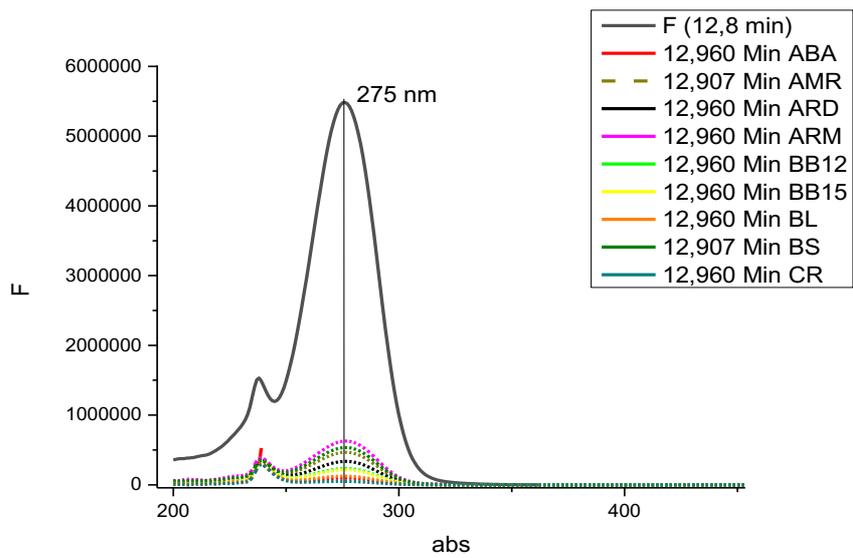
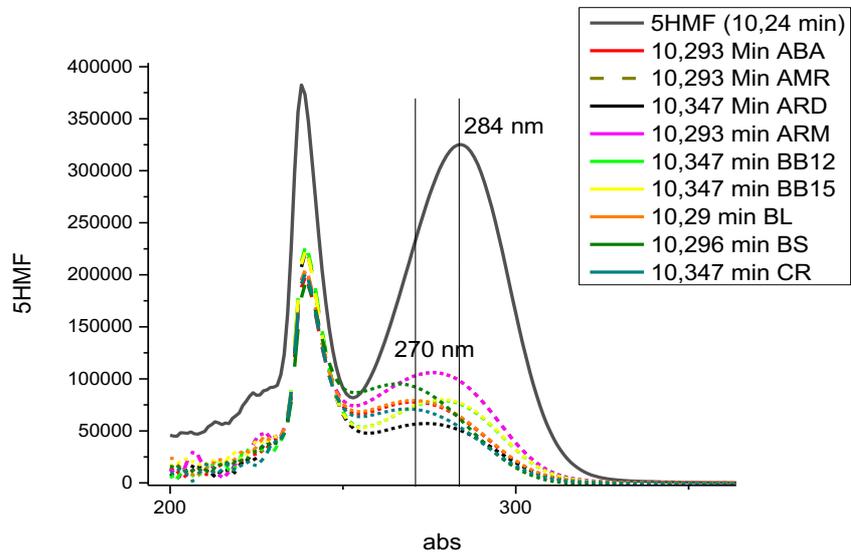
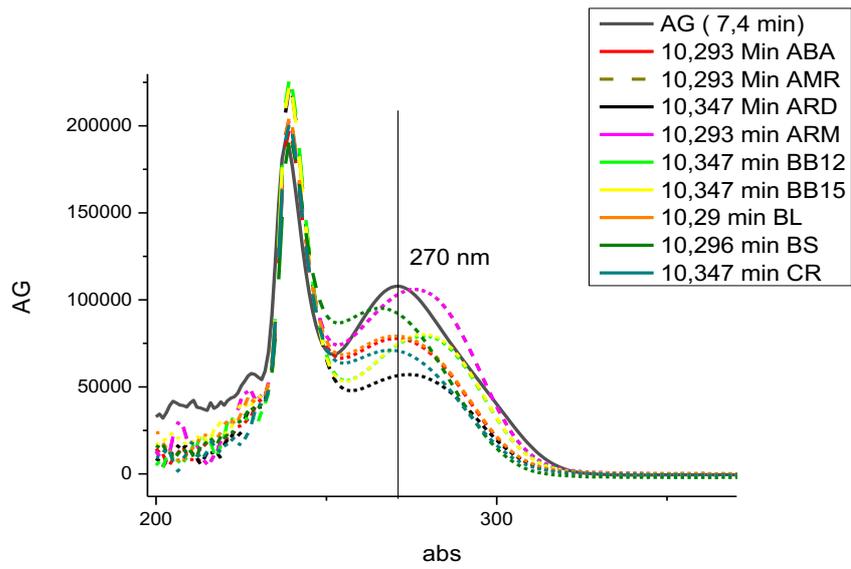
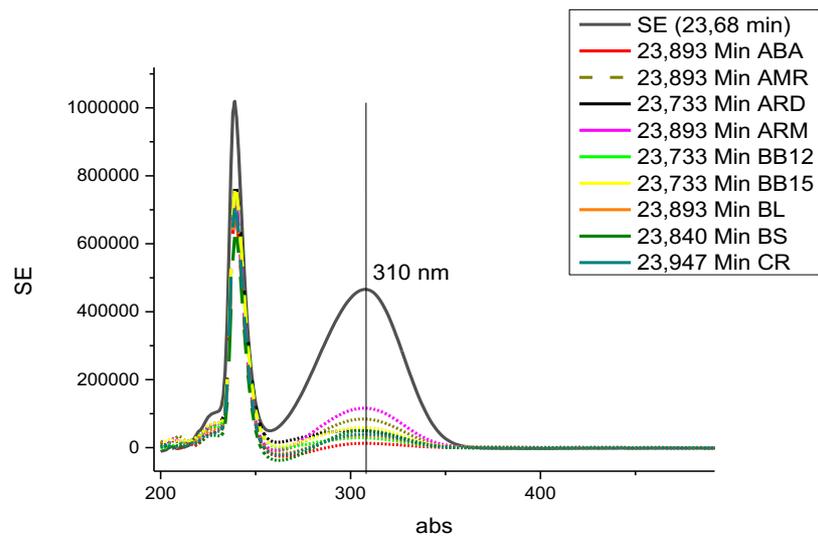
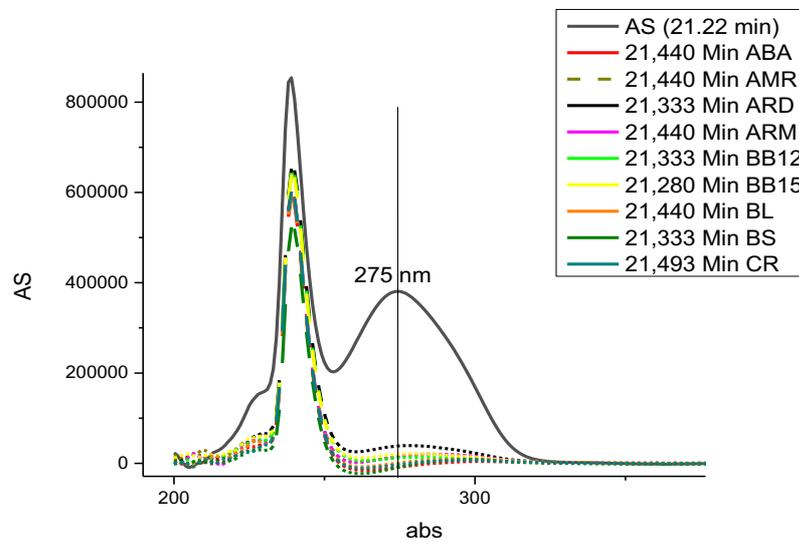
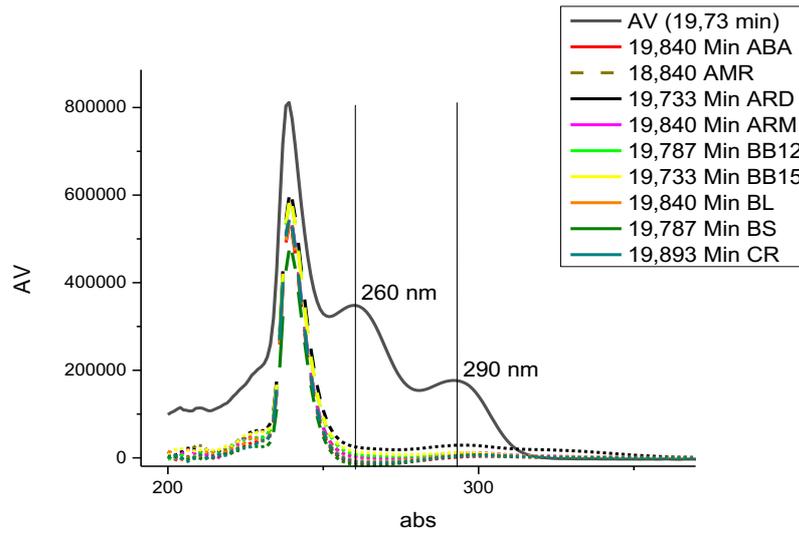


Figura A.2: Espectros de fluorescência de emissão e excitação dos 28 uísques estudados, bem como dos padrões





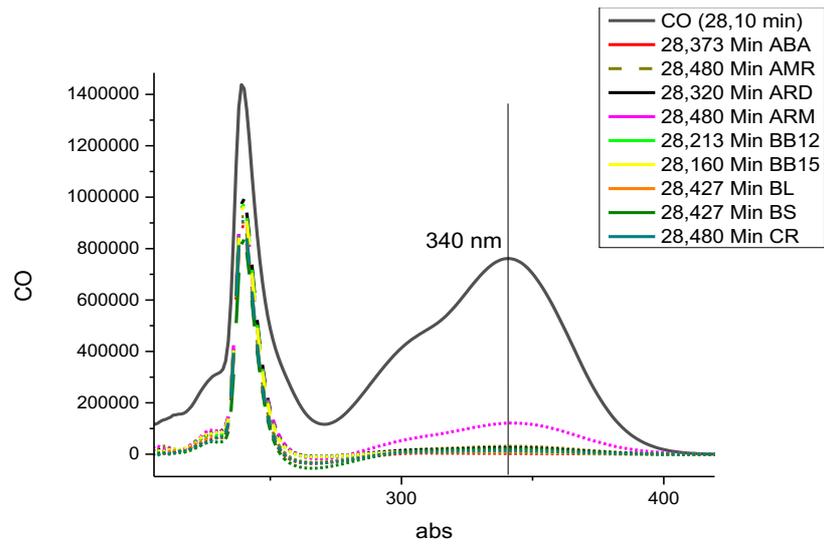
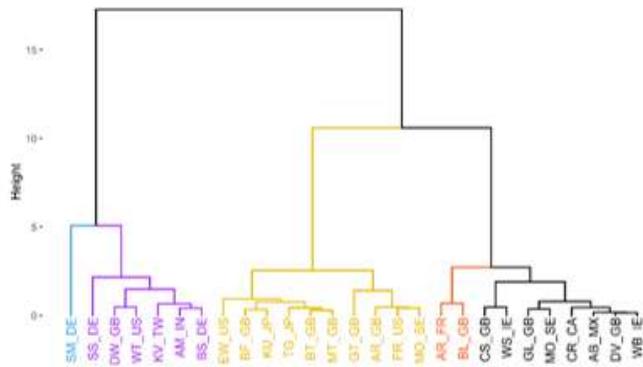


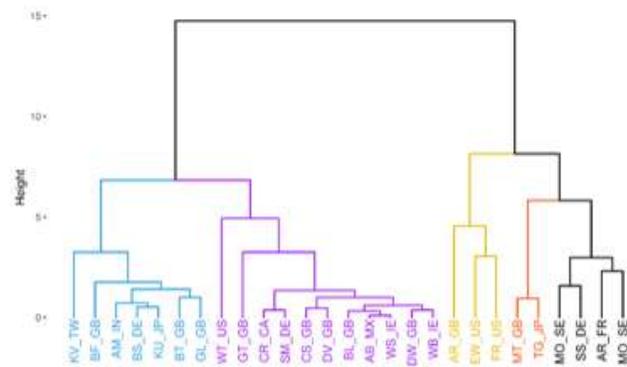
Figura A.3: Espectros de absorção em HPLC-DAD dos 7 padrões e da mistura comparados com os tempos de retenção associados a cada composto

# PAÍS

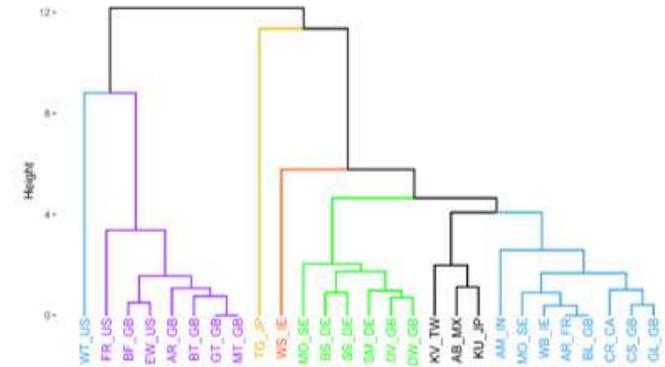
## HPLC - Áreas



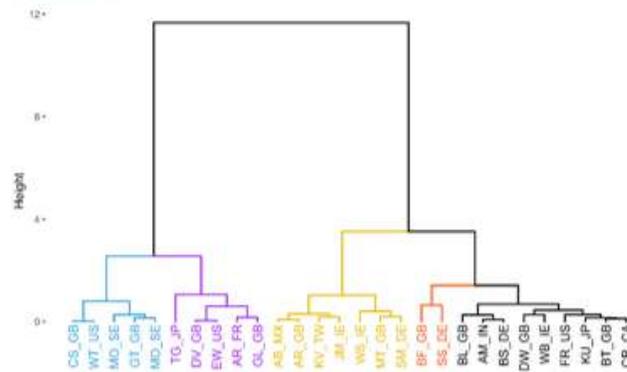
## HPLC - Áreas (%)



## HPLC - t<sub>r</sub>



## fs-TA



## FLIM

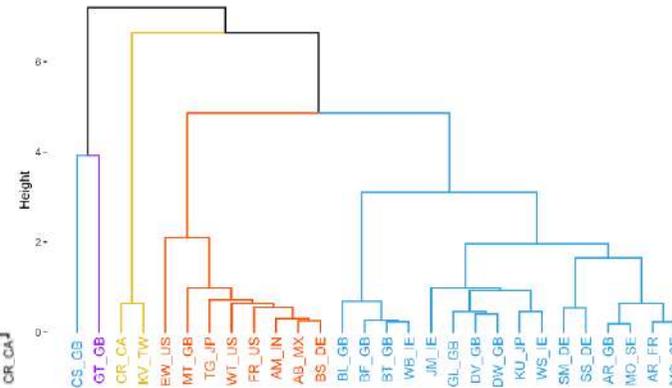
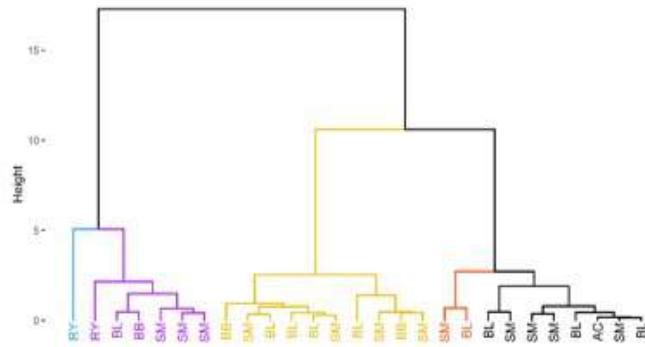


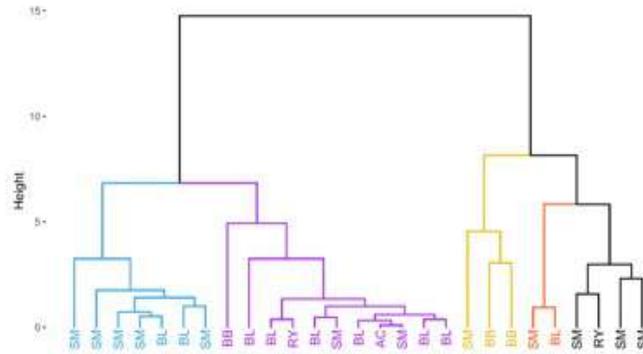
Figura A.4: Dendrogramas da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 28 úisques relativos ao país de origem, obtidos através de diferentes técnicas: HPLC (área dos picos, % de área e tempo de retenção), fs-TA e FLIM.

# CATEGORIA

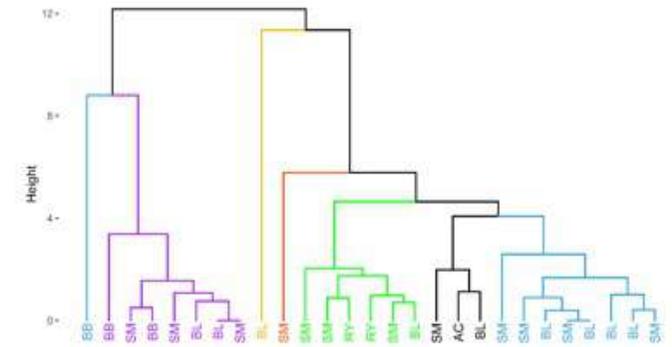
HPLC - Áreas



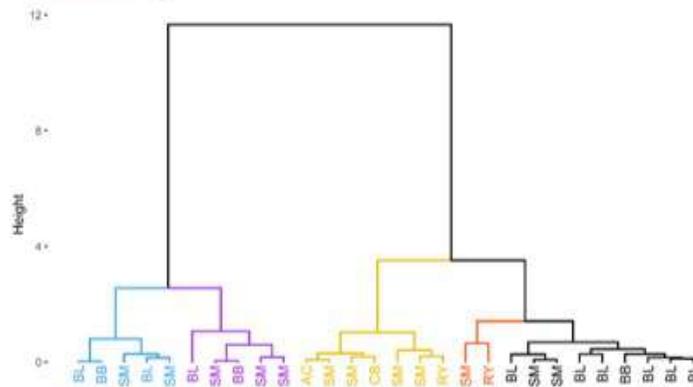
HPLC - Áreas (%)



HPLC -  $t_r$



fs-TA



FLIM

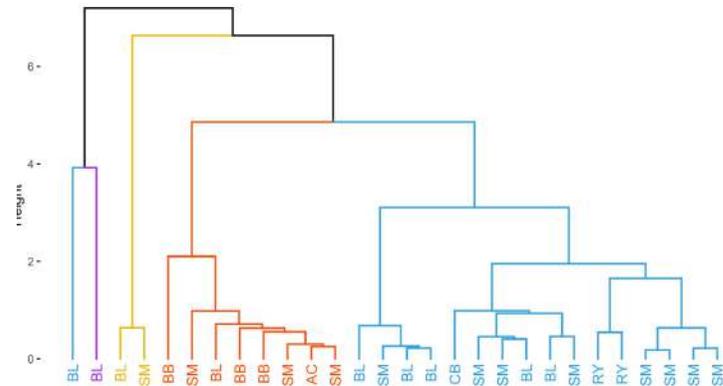


Figura A.5: Dendogramas da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 28 uísques relativos à categoria, obtidos através de diferentes técnicas: HPLC (área dos picos, % de área e tempo de retenção), fs-TA e FLIM.



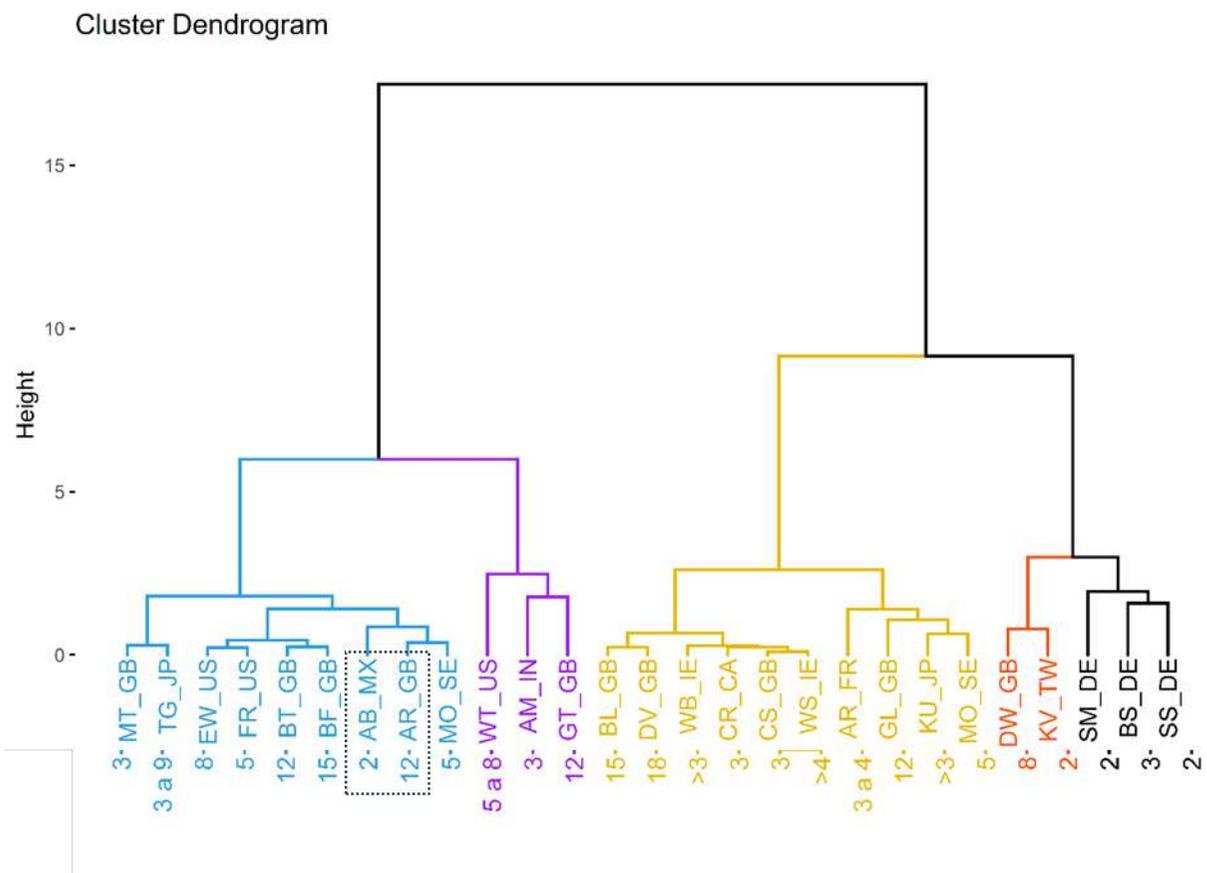


Figura A.7: Dendograma da análise hierárquica de agrupamentos representado as similaridades entre os 27 uísques relativos ao tempo de envelhecimento, obtidos através de HPLC (área dos picos a 280 nm).

	nm	Chi <sup>2</sup>	tm (ps)	t1	t2	t3	a1	a2	a3	A1	A2	A3
<b>WT1</b>	410	1,05	699,95	280,00	2340,00	5170,00	0,814	0,173	0,013	0,326	0,578	0,096
	460	1,04	2299,92	280,00	2340,00	5170,00	0,536	0,088	0,376	0,065	0,090	0,845
	530	1,05	1348,89	280,00	2340,00	5170,00	0,760	0,037	0,203	0,158	0,064	0,778
<b>CS1</b>	460	1,22	3164,28	700,00	3030,00	7480,00	0,374	0,400	0,226	0,083	0,383	0,534
	550	1,22	2261,55	700,00	3030,00	7480,00	0,580	0,289	0,131	0,180	0,387	0,433
<b>TG1</b>	440	1,04	2060,70	400,00	2550,00	5440,00	0,464	0,362	0,175	0,090	0,448	0,462
	460	1,24	2619,16	400,00	2550,00	5440,00	0,484	0,132	0,384	0,074	0,129	0,798
	500	0,93	2335,06	400,00	2550,00	5440,00	0,577	0,070	0,354	0,099	0,076	0,825
<b>FR</b>	410	1,24	1623,80	480,00	2500,00	4520,00	0,469	0,498	0,034	0,139	0,767	0,095
	440	1,15	2154,58	480,00	2500,00	4520,00	0,485	0,201	0,314	0,108	0,233	0,659
	530	1,29	1579,14	480,00	2500,00	4520,00	0,684	-0,071	0,316	0,208	-0,112	0,904

Tabela A.1: Tempos de decaimento  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  e  $\tau_3$  e respectivos pré-exponenciais  $a_1$ ,  $a_2$  e  $a_3$  e contribuições A1, A2 e A3 obtidos para os 4 úsques medidos com ns-TCSPC, excitação a 373 nm.