

## ELEMENTOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA EM GEL DE «SEPHADEX LH 20» DE AGUARDENTES VELHAS

A. PEDRO BELCHIOR

(Estação Vitivinícola Nacional. Dois Portos. Portugal)

*Com a colaboração técnica de*

ESTRELA C. P. CARVALHO

### RESUMO

Foi estudada a técnica cromatográfica em coluna de gel «Sephadex LH 20», no respeitante ao poder de resolução da mesma com substâncias padrão de fenólicas e, a respectiva relação dos volumes de eluição com os pesos moleculares.

A variação do volume de eluição do último pico cromatográfico de aguardentes velhas, que se verifica na prática, dependerá entre outros factores, do tipo e número de compostos responsáveis por aquele pico e do pH do solvente.

O paralelismo entre o cromatograma a 360 mm e o correspondente perfil das fenólicas totais só se verifica parcialmente.

Constatou-se que o reagente de Folin-Denis conduz a resultados de fenólicas totais de difícil interpretação, em face de apresentar reactividades muito diferentes para os vários compostos fenólicos.

### INTRODUÇÃO

Em continuação do trabalho já publicado (Belchior *et al.*, 1979), sobre o emprego da cromatografia de gel de «Sephadex LH 20», na caracterização de aguardentes envelhecidas, e tal como é referido no final do artigo, foi prosseguido o estudo desta técnica.

Os estudos em curso confirmam as potencialidades desta análise cromatográfica de aguardentes envelhecidas. Contudo, uma melhor explicação e compreensão de factos ocorridos na sua utilização, particularmente, as alterações que surgem nos

volumes de eluição do último pico, bem como a tentativa, para melhor caracterização da separação obtida, de encontrar a relação entre esta separação e o teor em compostos fenólicos, são o objecto deste trabalho.

Assim, estudou-se os volumes de eluição de várias substâncias padrão — correspondentes a compostos fenólicos das aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho — suas misturas e as alterações verificadas nos volumes de eluição do último pico. Com base no fraccionamento, foi estudada a relação entre o perfil pontual deste em fenólicas totais, e o perfil cromatográfico a 360 nm.

### MATERIAL E MÉTODOS

— *Condições cromatográficas*: são em tudo idênticas às indicadas no trabalho já referido (Belchior *et al.*, 1979). A injeção foi aperfeiçoada, com recurso à instalação de um «LV-4» da «Pharmacia Fine Chemicals», o que permite a utilização de agulha e seringa no percurso da entrada do solvente sem qualquer perigo de introdução de ar.

— *Substâncias padrão*: aesculina, escopoletina, aesculetina,  $\beta$ -metil-umbeliferona, umbeliferona, rutina, quercitrina, quercitina, ácido elágico, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido gentísico e ácido gálico — «FLUKA»; Vanilina — «BDH»; salicilaldeído — «CARLO ERBA».

— *Fenólicas totais*: pelo reagente de Folin-Denis. Método de Pro, indicado por Amerine (1960). Composto de referência: ácido gálico.

— *Perfil das fenólicas totais ao longo da corrida cromatográfica*: a fim de se obter uma concentração suficiente de fenólicas num volume tão pequeno quanto possível, foram efectuadas três corridas a partir da mesma aguardente. Após o volume de exclusão da coluna — no caso, 20 ml —, colheram-se fracções consecutivas de 5 ml. A reunião das três fracções de cada ponto, correspondentes às três corridas, foi evaporada, retomada com 1.5 ml de etanol-água (7:3), e em seguida determinadas as fenólicas totais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta técnica cromatográfica, além de morosa, requer condições experimentais muito constantes. Apesar disto, a sua repetitividade, em face dos volumes de eluição (v. e.), para os primeiros picos é boa, o que não acontece com o último pico.

No Quadro I, apresentam-se os valores dos pesos moleculares e dos v. e. dos compostos estudados, sendo estes últimos resultado de injeção da substância padrão pura e de várias misturas das mesmas.

Verifica-se uma resolução cromatográfica bastante boa, apresentando-se na Fig. 1, um exemplo ilustrativo do facto. A simetria é perfeita, quase não havendo arrastamentos («tailings»), e a maior ou menor base dos picos é, em grande parte função do próprio composto, como se vê no exemplo apresentado, embora volumes de eluição maiores provoquem necessariamente um alargamento do respectivo pico.

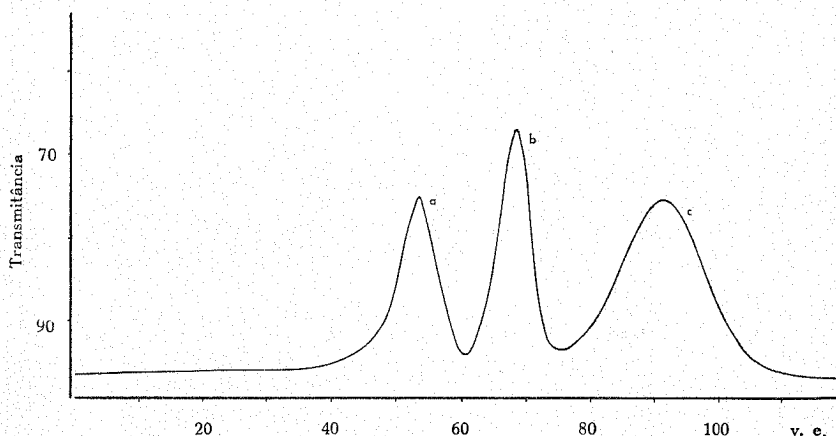


Fig. 1 — Cromatograma da mistura 2, diluída a  $\frac{1}{2}$ : a — Ácido ferúlico;  
b — Aldeído salicílico; c — Quercitrina.

*Chromatogramme de la mélange 2, diluée  $\frac{1}{2}$ : a — Acide férulique;  
b — Aldéhyde salicylique; c — Quercitrine.*

Em virtude das características do gel (Anónimo, 1973), com afinidades particulares para dadas substâncias de constituição aromática em solventes orgânicos, verifica-se (Quadro I), considerando todos os compostos em conjunto, que não existe relação entre os pesos moleculares e os v. e., embora a gama

QUADRO I

Pesos moleculares, volumes de eluição e reação ao reagente de Folin-Denis de padrões de compostos fenólicos

*Poids moléculaires, volumes d'éluition et réaction au réactif de Folin-Denis des composés phénoliques étalons*

Compostos fenólicos	Pesos moleculares	Compostos individualizados	Volumes de eluição em ml					Reação ao Folin-Denis %		
			Mistura 1		Mistura 2		Mistura 3		Mistura 4	Mistura 5
			Diluída a 2/5	Diluída a 1/1	Diluída a 2/5	Diluída a 1/1				
Aesculina . . . . .	367	56.0							21	
Escopoletina . . . . .	192	67.5		70.0	67.5				81	
Aesculetina . . . . .	179	75.0		78.5	74.0		77.0		101	
$\beta$ -Metil-umbeliferona . . . . .	176	70.0							—	
Umbeliferona . . . . .	162	73.0				73.5			5	
Rutina . . . . .	610	68.5							58	
Quercitrina . . . . .	484	93.5							72	
Quercitina . . . . .	339	230.0	93.0	95.0	93.5				87	
Vanilina . . . . .	152	66.5					68.0		55	
Salicilaldeído . . . . .	122	71.0	70.0						2	
Ac. elágico . . . . .	302	110.0						100.0	32	
» sinápico . . . . .	224	51.0						48.0	63	
» ferúlico . . . . .	194	50.0	57.5				45.5		86	
» cafeico . . . . .	180	85.5					62.5		—	
» gentísico . . . . .	154	67.5						56.0	102	
» gálico . . . . .	170	—							100	

de pesos moleculares também seja muito pequena. Olhando porém para grupos de compostos afins, detecta-se no caso dos flavonóis uma certa relação entre os pesos moleculares e os v. e., o que indica alguma influência da semelhança entre compostos, que então passam a ser individualizados, aparentemente também por efeitos de simples filtração. No extremo oposto, encontram-se os ácidos, onde não se verifica qualquer relação entre v. e. e pesos moleculares, o que indica efeitos de adsorção pelo gel, embora diferenciados conforme o composto.

É manifesto que nenhum destes compostos têm v. e. correspondentes ao primeiro e segundo pico dos cromatogramas das aguardentes, o que reforça a hipótese de serem aqueles constituídos por compostos de peso molecular bastante mais elevados.

O efeito da concentração do composto é evidente, aumentando os v. e., particularmente nas misturas de padrões. Estas também influem nos v. e., em especial e de forma importante, no caso dos ácidos. Efectivamente, estes compostos são influenciados quando em conjunto, alterando o seu comportamento em contacto com o gel o que provoca diferentes v. e..

A tentativa de compreensão do facto já referido, das variações dos v. e. do último pico cromatográfico, foi encarada com vários ensaios. Verificou-se que o ácido elágico, único composto identificado dos responsáveis por este pico, apresenta variações assinaláveis do seu v. e., em especial se em mistura com outros compostos (Quadro I). Por outro lado, em três aguardentes com v. e. de 135, 195 e 250 ml, para o pico em apreciação, recolheram-se as respectivas fracções e após concentração e cromatografia bidimensional em papel (Belchior e Carneiro, 1972), evidenciou-se que apresentavam, para além do referido ácido, respectivamente 11, 9 e 6 manchas cromatográficas. Portanto, o v. e. deste pico é efectivamente influenciado por outros compostos, de certo com afinidades diferentes para o gel, e quanto maior o seu número menor o seu v. e.. Ainda se verificou não ser indiferente o pH do eluente com que se efectua a corrida, pois para uma mesma aguardente, duas corridas a pH de 7.05 e 6.05, apresentaram uma alteração do v. e. deste pico, de cerca de 20 ml para mais, no caso do pH mais baixo.

Estes resultados permitem concluir que existem uma série de factores, que concorrem para explicar as variações dos v. e. verificados.

No referente à relação entre o perfil cromatográfico e o teor em fenólicas totais das fracções consecutivas de 5 ml, a Fig. 2, contém o resultado do estudo efectuado, tendo-se utilizado, neste exemplo, uma aguardente velha de ensaio e de boa qualidade, conforme manifesta o seu perfil a 360 nm, de acordo com a prova organoléptica.

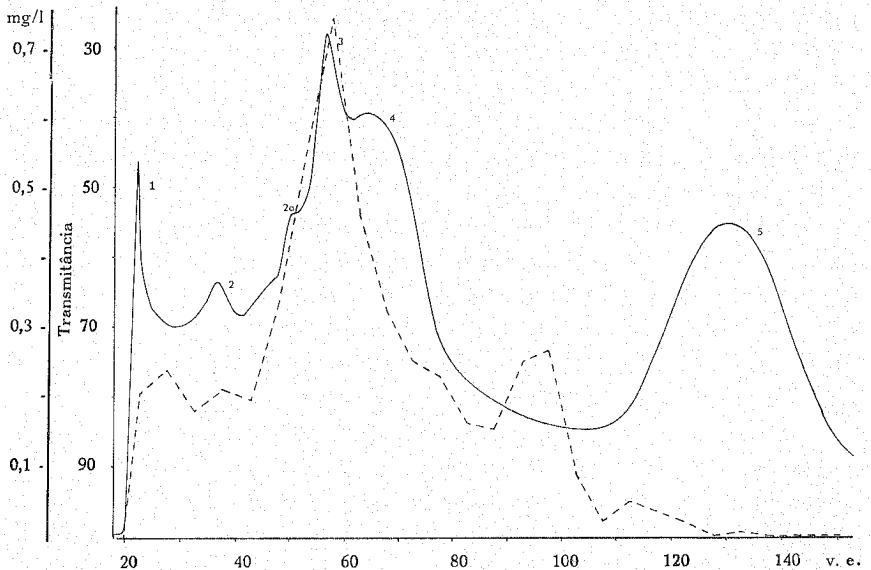


Fig. 2 — Cromatograma de uma aguardente a 360 nm (—), e perfil das fenólicas totais em mg/l (---).

*Chromatogramme d'une eau-de-vie à 360 nm (—), et profil des phénoliques totaux en mg/l (---).*

É evidente a pouca importância das fenólicas totais, relativamente ao método de determinação utilizado, dos compostos responsáveis pelos picos 1, 4 e 5. Por outro lado, aparece no perfil das fenólicas totais um pico, entre o 4 e 5 do cromatograma a 360 nm, o qual se refere pelo menos ao ácido gálico, que sai nessa zona e não tem qualquer absorção àquele comprimento de onda. O pico 3, característico de qualidade de uma boa aguardente envelhecida, surge como constituído por substâncias com a maior sensibilidade à reacção com o reagente de Folin-Denis.

Para a interpretação destes factos é de interesse o conhecimento da reactividade do reagente de Folin-Denis para os diversos compostos fenólicos. Já Singleton e Rossi (1965), referem a diferente reactividade de vários compostos fenólicos, aos reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, comparativamente ao ácido gálico, sendo ainda o menos reactivo o primeiro. Do ensaio efectuado na EVN-Dois Portos, com substâncias padrão de concentração conhecida, e referente ao ácido gálico, verifica-se também pelo Quadro I, a diferente reacção destas substâncias. Vê-se assim, ser muito problemático a avaliação dos teores em fenólicas totais, pela dependência da fenólica e respectivas concentrações, que podem induzir em erro na interpretação daqueles teores. Por exemplo, as substâncias que são responsáveis pelo pico 4, são pouco reactivas ao reagente de Folin-Denis e como se sabe (Belchior *et al.*, 1979), nelas estão englobadas a vanilina e outros aldeídos fenólicos importantes no envelhecimento e qualidade das aguardentes. Igualmente quanto ao ácido elágico, também pelo Quadro I fica explicado o perfil das fenólicas totais da Fig. 2.

Assim, o facto de o decréscimo relativo do pico 4, que se verifica paralelamente ao acréscimo da qualidade e consequente aumento do 3, embora possa corresponder a um aumento em teores de fenólicas totais determinados, não significa necessariamente um aumento em teor fenólico real, talvez sim uma transformação em compostos mais reactivos.

### CONCLUSÕES

A técnica em questão permite uma boa resolução das substâncias padrão estudadas.

Como consequência das características próprias deste gel, verificou-se não existir relação entre os pesos moleculares e os v. e. das substâncias padrão ensaiadas e vistas no seu conjunto. Porém, apreciando os resultados por grupos de compostos afins, detecta-se nos flavonóis uma certa relação, sendo os ácidos fenólicos os que manifestam ausência de qualquer relação donde uma possível maior adsorção ao nível do gel.

O v. e. do pico 5, varia em função do tipo e número de compostos que o constituem, assim como, com o pH do eluente utilizado.

É muito deficiente o paralelismo entre o cromatograma a 360 nm e o perfil das fenólicas totais, só se verificando para o pico 3, o pico da qualidade.

Em face de ser muito diferente a reactividade dos vários compostos fenólicos ao reagente de Folin-Denis, a determinação das fenólicas totais com base neste, acarreta evidentemente, dificuldades de interpretação dos seus resultados.

### RÉSUMÉ

#### Des éléments pour la caractérisation de la chromatographie sur gel de «Sephadex LH 20» des eaux-de-vie de vin vieilles

On a étudié la technique chromatographique sur gel de «Sephadex LH 20», dans ce qui concerne son pouvoir de résolution avec des composés phénoliques étalons, et la respectif relation de les volumes d'éluition avec les poids moléculaires.

La variation du volume d'éluition du dernier pic chromatographique des eaux-de-vie vieilles, qu'on vérifie dans la pratique, dépendra parmi d'autres facteurs, du type et du nombre de composés phénoliques responsables par ce pic e du pH du solvant.

Le parallélisme entre le chromatogramme à 360 nm, et le correspondant profil des phénoliques totaux, est seulement partial.

On a constaté que le réactif de Folin-Denis, conduit a des résultats de phénoliques totaux de difficile interpretation, une fois que ses reactivités son très différentes pour les divers composés phénoliques.

### SUMMARY

#### Some elements for the chromatography on gel Sephadex LH 20 characterization of aged brandies

The chromatographic technique on gel Sephadex LH 20 column, was studied regarding its resolution with phenolics standards, and also the respective relation of elution volumes to the molecular weights.

The elution volume variation of the last chromatographic peak of aged brandies which can, in practice, be verified, will depend on the kind and number of the compounds which originate that peak, and on the solvent pH, as well as on other factors.

The parallelism between the chromatogram at 360 nm, and the corresponding phenolics profile, is only partially verifiable. It was observed that the Folin-Denis reagent leads to difficult interpreting results of total phenolics, as it shows very different reactivities to the various phenolics compounds.



BIBLIOGRAFIA

Amerine, M. A.

- 1960 *Laboratory procedures for enologists*. Department of viticulture and enology—University of California. Davis.

Anónimo

- 1973 *Sephadex. Gel filtration in theory and practice* Pharmacia fine chemicals. Upsalla.

Belchior, A. P. e L. C. Carneiro

- 1972 Identification de substances extraites du bois neuf de chêne du limousin par des eaux-de-vie de vin. *Conn. vigne vin*, 6 (4): 365-372.

Belchior, A. P., P. Climaco e J. M. Soares Franco

- 1979 Emprego da cromatografia em coluna de gel de «Sephadex LH 20» na caracterização de aguardentes vnicas envelhecidas. *Vin. Port. Doc.*, série II, 9 (1): 1-8.

Singleton, V. L. e J. A. Rossi Jr.

- 1965 Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic—phosphotungstic acid reagents. *Am. Journ. Enol. Vitic.*, 16 (3): 144-158.

