

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE  
COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EM  
AGUARDENTES DE CANA POR CG E CG/EM**

**ELIANA APARECIDA NONATO**

UFMG - ICEx/DQ - 00379  
D.256

**ELIANA APARECIDA NONATO**

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EM  
AGUARDENTES DE CANA POR CG E CG/EM**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química- Química Orgânica.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE  
1999**



**Este trabalho foi realizado sob a orientação do Professor Fernando Carazza e co-orientação da Professora Maria das Graças Cardoso nas instalações do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear e Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN-CNEN) e do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC-MG), junto aos Departamentos de Química das Universidades Federais de Minas Gerais e de Lavras.**

**Aos meus pais,  
Celia (*in memoriam*)  
e Valdemar  
e irmãos, Selma, Solange e Wellington.**

## AGRADECIMENTOS

---

---

**À** DEUS, meu amigo e protetor, meu agradecimento mais profundo por ter sempre renovado minhas forças permitindo a conclusão deste trabalho.

**Aos** meus queridos familiares agradeço o carinho, os estímulos e exemplos de persistência e dedicação. Este trabalho é fruto do apoio que sempre tive de vocês.

**Ao** Professor Fernando Carazza agradeço a orientação .

**À** Professora Maria das Graça Cardoso agradeço o fornecimento das aguardentes e material bibliográfico.

**Ao** Roberto Pellacanni agradeço o apoio e as liberações que possibilitaram realização desta dissertação.

**À** Professora Zenilda de Lurdes Cardeal e ao Professor Fernando Carvalho da Silva agradeço a atenção, sugestões e o empréstimo do material para as análises de Microextração em Fase Sólida.

**À** Ciomara Rabelo de Carvalho agradeço por ter permitido o uso das instalações e equipamentos sob sua coordenação no CETEC-MG.

**À** Helena Palmieri e Liliam Leonel agradeço a atenção e todas as contribuições durante a realização deste trabalho.

**À** Marta Avelar e Oliêne dos Reis, profissionais com quem tenho o prazer de trabalhar e aprender, agradeço pela compreensão e apoio durante a realização desta dissertação.

**À** Constantina Maria Braga Torres e Ana Paula Soares Pinto agradeço pelas análises físico-químicas das aguardentes .

**Às** bibliotecárias Lenira Ferreira e Maria de Fátima Coelho agradeço pela ajuda na aquisição de material bibliográfico.

**Aos** colegas de trabalho, Adilson, Abgail, Fabiane, Geraldinho, João Bôsko, Milton, Lúcia Auler, Lúcia Souza, Max e Marcos agradeço a solidariedade.

**À** Paulete Maria Pitangueira Gerken agradeço pela atenção e disponibilidade.

**À** Lucienir Pains Duarte, Rosilene Aparecida de Oliveira, Ênio José Leão Lana e Laerte Santos agradeço a atenção e boa vontade de sempre.

**Ao** Vagner Fernandes Knupp agradeço pelo carinho, atenção e apoio.

**Aos** amigos, Adriana de Castro, Claudinei Rezende, Cristiane de Oliveira, Hállen Daniel, Juliana Batista, Luciane Santos, Nelson Teixeira, Renata Vilela e Sérgio Martins, agradeço a força de sempre.

**Agradeço** ainda, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram e possibilitaram que este trabalho fosse concluído.

***“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o fim. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Eu prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”***

**Martin Luther King**

---

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

---

<b>FIGURA 1</b>	<b>Reações da glicose durante a fermentação.....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURA 2</b>	<b>Vias de formação de álcoois superiores.....</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 3</b>	<b>Estrutura de aldeídos e ácidos fenólicos provenientes da madeira e identificados em aguardentes de cana.....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURA 4</b>	<b>Ilustração do procedimento de MEFS.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 5</b>	<b>Cromatograma da aguardente A sem qualquer tratamento. Modo split 1:15.....</b>	<b>45</b>
<b>FIGURA 6</b>	<b>Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente A. Tempo de extração 30 minutos. Modo split 1:15.....</b>	<b>45</b>
<b>FIGURA 7</b>	<b>Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente A. Tempo de extração 30 minutos. Modo splitless.....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 8</b>	<b>Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente A. Tempo de extração três horas. Modo splitless.....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 9</b>	<b>Variações nas áreas de acetato de etila, 1-propanol e isobutanol em função do tempo de adsorção da fibra de MEFS.....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 10</b>	<b>Variações nas áreas de 1-butanol, álcool isoamílico, álcool amílico e 2-furfuraldeído em função do tempo de adsorção da fibra de MEFS.....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 11</b>	<b>Dessorção da solução de analitos em sete minutos.....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 12</b>	<b>Variações nas áreas de acetato de etila, 1-propanol e isobutanol em função da massa cloreto de sódio adicionada nas soluções extraídas.....</b>	<b>53</b>

<b>FIGURA 13</b>	<b>Variações nas áreas de 1-butanol, álcool isoamílico, álcool amílico e 2-furfuraldeído em função da massa cloreto de sódio adicionada nas soluções extraídas.....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 14</b>	<b>Variações nas áreas de acetato de etila, 1-propanol e isobutanol em função da temperatura de extração.....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 15</b>	<b>Variações nas áreas de 1-butanol, álcool isoamílico, álcool amílico e 2-furfuraldeído em função da temperatura de extração.....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 16</b>	<b>Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente <i>E</i> (ELL).....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 17</b>	<b>Cromatograma da aguardente <i>E</i> extraída por MEFS.....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 18</b>	<b>Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de acetato de etila em aguardentes.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 19</b>	<b>Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de 1-propanol em aguardentes.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 20</b>	<b>Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de isobutanol em aguardentes.....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 21</b>	<b>Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de álcool isoamílico em aguardentes.....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 22</b>	<b>Cromatograma da aguardente <i>B</i> extraída por MEFS.....</b>	<b>63</b>
<b>FIGURA 23</b>	<b>Cromatograma da aguardente <i>G</i> extraída por MEFS.....</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 24</b>	<b>Cromatograma da aguardente <i>I</i> extraída por MEFS.....</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 25</b>	<b>Cromatograma de íons totais da aguardente <i>B</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 26</b>	<b>Fragmentos característicos de álcoois primários e secundários.....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA 27</b>	<b>Rearranjo de McLafferty na fragmentação de ácidos carboxílicos.....</b>	<b>67</b>

<b>FIGURA 28</b>	<b>Rearranjo de Mclafferty na fragmentação de ésteres etílicos.....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURA 29</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o acetato de etila.....</b>	<b>78</b>
<b>FIGURA 30</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o etanol.....</b>	<b>79</b>
<b>FIGURA 31</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o isobutanol.....</b>	<b>80</b>
<b>FIGURA 32</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o álcool isoamílico.....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 33</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o hexanoato de etila.....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURA 34</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-hidroxi-propanoato de etila.....</b>	<b>83</b>
<b>FIGURA 35</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o octanoato de etila.....</b>	<b>84</b>
<b>FIGURA 36</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ácido acético.....</b>	<b>85</b>
<b>FIGURA 37</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-etil-hexanol.....</b>	<b>86</b>
<b>FIGURA 38</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-octanol.....</b>	<b>87</b>
<b>FIGURA 39</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-hidroxi-4-metil-pentanoato de etila.....</b>	<b>88</b>
<b>FIGURA 40</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 1-octanol.....</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 41</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 4-metil-1-isopropil-3-ciclohexen-1-ol.....</b>	<b>90</b>

FIGURA 42	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o decanoato de etila.....	91
FIGURA 43	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o $\beta$ -farnaseno.....	92
FIGURA 44	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o butanoato de dietila.....	93
FIGURA 45	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o $\alpha,\alpha,4$ -trimetil 3-ciclohexeno-1-metanol.....	94
FIGURA 46	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 1-decanol.....	95
FIGURA 47	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o $\beta$ -citronelol.....	96
FIGURA 48	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ciclodeceno.....	97
FIGURA 49	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o dodecanoato de etila.....	98
FIGURA 50	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o decanoato de 3-metilbutila.....	99
FIGURA 51	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-4-metil fenol.....	100
FIGURA 52	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o fenil-etanol.....	101
FIGURA 53	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o nerolidol.....	102
FIGURA 54	Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ácido octanóico.....	103

<b>FIGURA 55</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2,6-dimetil naftaleno.....</b>	<b>104</b>
<b>FIGURA 56</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o pentadecanoato de etila.....</b>	<b>105</b>
<b>FIGURA 57</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ciclododecano.....</b>	<b>106</b>
<b>FIGURA 58</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o <math>\alpha</math>-bisabolol.....</b>	<b>107</b>
<b>FIGURA 59</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o hexadecanoato de etila.....</b>	<b>108</b>
<b>FIGURA 60</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ácido decanóico.....</b>	<b>109</b>
<b>FIGURA 61</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o cis-farnesol.....</b>	<b>110</b>
<b>FIGURA 62</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ciclotetradecano.....</b>	<b>111</b>
<b>FIGURA 63</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ácido dodecanóico.....</b>	<b>112</b>
<b>FIGURA 64</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o linoleato de etila.....</b>	<b>113</b>
<b>FIGURA 65</b>	<b>Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 1,2-benzenodicarboxilato de bis-2-metilpropila.....</b>	<b>114</b>

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

---

<b>TABELA 1</b>	<b>Variações na composição das aguardentes de acordo com o tipo madeira utilizada no barril de armazenamento.....</b>	<b>19</b>
<b>TABELA 2</b>	<b>Composição da água utilizada na elaboração de aguardentes.....</b>	<b>20</b>
<b>TABELA 3</b>	<b>Concentrações máximas de componentes não voláteis na aguardente de cana.....</b>	<b>21</b>
<b>TABELA 4</b>	<b>Classificação da aguardente de cana segundo a relação de álcoois superiores/ésteres.....</b>	<b>22</b>
<b>TABELA 5</b>	<b>Análise físico-químicas das aguardentes.....</b>	<b>43</b>
<b>TABELA 6</b>	<b>Variações das áreas dos analitos em função da proporção dos volumes de aguardente e diclorometano..</b>	<b>47</b>
<b>TABELA 7</b>	<b>Equações das curvas de calibração e coeficientes de correlação para álcoois superiores e acetato de etila (ELL).....</b>	<b>47</b>
<b>TABELA 8</b>	<b>Precisão da análise utilizando o método de extração líquido-líquido.....</b>	<b>48</b>
<b>TABELA 9</b>	<b>Concentrações de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool nas amostras das aguardentes (ELL).....</b>	<b>49</b>
<b>TABELA 10</b>	<b>Comparações das áreas dos analitos nas dessorções realizadas em três e cinco minutos.....</b>	<b>52</b>
<b>TABELA 11</b>	<b>Equações das curvas de calibração e coeficientes de correlação para álcoois superiores e acetato de etila (MEFS).....</b>	<b>56</b>
<b>TABELA 12</b>	<b>Precisão da análise utilizando o método de MEFS.....</b>	<b>56</b>
<b>TABELA 13</b>	<b>Concentrações de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool nas amostras das aguardentes (MEFS).....</b>	<b>58</b>
<b>TABELA 14</b>	<b>Classificação dos compostos identificados na aguardente <i>B</i>.....</b>	<b>66</b>

## ABREVIATURAS E SIGLAS

---

---

**AA** - Álcool Anidro

**ABNT** - Associação Brasileira de Normas Técnicas

**AMPAQ** - Associação Mineira de Produtores de Aguardente de Qualidade

**COV** - Compostos Orgânicos Voláteis

**EFS** - Extração em Fase Sólida

**EFSC** - Extração em Fluido Super Crítico

**ELL** - Extração Líquido-Líquido

**°GL** - Grau Gay-Lussac

**IAA** - Instituto do Açúcar e do Álcool

**INDI** - Instituto de Desenvolvimento Industrial de Minas Gerais

**MARA** - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária

**MEFS** - Microextração em Fase Sólida

**SUMÁRIO**

---

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>XXI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXII</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>I – História da aguardente de cana.....</b>	<b>4</b>
<b>II – Processamento.....</b>	<b>6</b>
<b>1 – Matéria-prima.....</b>	<b>6</b>
<b>2 – Fermentação.....</b>	<b>7</b>
<b>3 – Destilação.....</b>	<b>9</b>
<b>4 – Envelhecimento.....</b>	<b>10</b>
<b>III – Composição da aguardente de cana.....</b>	<b>12</b>
<b>1 – Álcoois.....</b>	<b>13</b>
<b>2 – Ácidos.....</b>	<b>15</b>
<b>3 – Ésteres.....</b>	<b>16</b>
<b>4 - Aldeídos.....</b>	<b>16</b>
<b>5 – Compostos formados durante o envelhecimento.....</b>	<b>17</b>
<b>IV – Padrões de identidade e qualidade em aguardente de cana.....</b>	<b>19</b>
<b>1 – Padrões de identidade.....</b>	<b>19</b>
<b>2 – Padrões de qualidade.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 – Ingredientes básicos.....</b>	<b>20</b>

2.2 – Ingredientes opcionais.....	20
2.2.1 – Água.....	20
2.2.1 – Açúcares.....	21
2.3 – Composição.....	21
2.4 – Critérios de qualidade.....	22
2.5 – Aditivos incidentais.....	22
2.5.1 – Álcool metílico.....	22
2.5.2 – Cobre.....	23
2.6 – Pesos e medidas.....	23
2.7 – Rotulagem.....	23
2.8 – Amostragem e métodos de análise.....	23
2.9 – Disposições gerais.....	23
3 – Aspectos toxicológicos.....	23
3.1 - Metanol.....	23
3.2 – Carbamato de etila.....	24
3.3 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	24
3.4 – Metais.....	24
V – Amostragem e preparação de amostras para análises.....	25
VI - Técnicas de preparação de amostra sem o uso de solventes.....	26
1 - Extração em fase gasosa.....	27
2 - Extração por membrana.....	28
3 - Extração por sorvente.....	29
VII - Microextração em fase sólida.....	29
1 - Extração.....	32

2 - Dessorção.....	33
3 - Análises.....	34
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>I – Análise físico-químicas .....</b>	<b>35</b>
<b>II – Análises das aguardentes utilizando o método de extração líquido-líquido.....</b>	<b>35</b>
1 - Reagentes.....	35
2 – Aparelhagem.....	35
3 – Otimização das condições de extração líquido-líquido.....	36
4 – Determinação da precisão da análise utilizando o método de extração líquido-líquido.....	36
5 – Determinação quantitativa dos álcoois superiores e acetato de etila nas aguardentes po CG utilizando o método de extração líquido-líquido.....	37
<b>III – Análises das aguardentes utilizando o método de microextração em fase sólida (MEFS).....</b>	<b>38</b>
1 - Reagentes e equipamentos.....	38
2 – Aparelhagem.....	38
3 – Procedimento de microextração em fase sólida (MEFS).....	38
4 – Otimização das condições de MEFS.....	39
4.1 – Otimização do tempo de adsorção.....	39
4.2 – Otimização do tempo de dessorção.....	39
4.3 – Otimização da massa de cloreto de sódio adicionada nas soluções a serem extraídas.....	40
4.4 – Otimização da temperatura de extração.....	40

4.5 - Determinação da diluição das amostras de aguardentes.....	40
5 – Determinação da precisão da análises utilizando método de MEFS.....	40
6 – Determinação quantitativa dos álcoois superiores e acetato de etila nas aguardentes por CG utilizando o método MEFS.....	41
IV – Identificação dos compostos secundários das aguardentes através de CG/EM.....	41
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>43</b>
I – Análise físico-químicas das aguardentes.....	43
II – Análises das aguardentes utilizando o método de extração líquido-líquido.....	44
1 – Resultados das análises da aguardente A e de seu extrato em diclorometano.....	44
2 – Quantificação dos álcoois superiores e acetato de etila nas aguardentes por CG utilizando extração líquido-líquido.....	47
2.1 - Curvas de calibração.....	47
2.2 - Resultados da precisão da análise utilizando o método de extração líquido-líquido.....	48
2.3 - Concentrações de álcoois superiores e acetato de etila nas aguardentes (ELL).....	49
III – Análises das aguardentes utilizando o método de microextração em fase sólida.....	50
1 – Resultados da otimização das condições de análise de MEFS.....	50
1.1 – Otimização do tempo de adsorção.....	50

1.2 – Otimização do tempo de dessorção.....	51
1.3 – Otimização da massa de cloreto de sódio adicionada nas soluções a serem extraídas.....	53
1.4 – Otimização da temperatura de extração.....	54
2 – Quantificação de álcoois superiores e acetato de etila nas aguardentes por CG utilizando MEFS.....	55
2.1 - Curvas de calibração.....	55
2.2 - Resultados da precisão da análise utilizando o método de MEFS.....	56
2.3 - Concentrações de álcoois superiores e acetato de etila das aguardentes (MEFS).....	57
IV - Comparações dos métodos de extração nas dosagens de álcoois superiores e acetato de etila nas aguardentes.....	59
V – Compostos identificados por análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	63
5.CONCLUSÕES.....	69
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
7.ANEXO.....	77

## RESUMO

---

---

As aguardentes de cana têm como componentes principais etanol e água. O que as diferencia e confere qualidade é a presença dos compostos secundários, produzidos durante a fermentação, que são os responsáveis pelo aroma e sabor da bebida. O interesse em definir um padrão de qualidade para a aguardente de cana tem mobilizado o meio industrial, acadêmico, associações de produtores e o próprio governo.

Neste contexto, amostras das aguardentes Bocaina, Rainha da Lavoura, Boa Vista e Espírito de Minas tiveram suas propriedades físico-químicas analisadas. Estas aguardentes, juntamente com amostras das aguardentes Germana, Rumo do Poeta, Velho Barreiro, Pirapora, Moeda Velha, Boa Vitória, Barreirinha e Caninha 51 foram submetidas à análises por cromatografia gasosa. As aguardentes foram analisadas sem nenhum tratamento prévio e também tiveram seus compostos minoritários concentrados através de extrações líquido-líquido e microextração em fase sólida antes das análises cromatográficas.

Dentre os compostos secundários foram quantificados 1-propanol, isobutanol, álcool isoamílico e acetato de etila. A precisão das análises foi avaliada pelos coeficientes de variação nas áreas relativas de cada composto para os dois métodos de extração.

A identificação dos demais compostos secundários foi realizada através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) de uma das amostras de aguardente extraída por microextração em fase sólida (MEFS).

A MEFS juntamente com a análise por CG/EM permitiram a identificação de 38 compostos. Para cada um dos compostos identificados foram propostos caminhos de fragmentação.

---

---

## ABSTRACT

---

---

Water and ethanol are the principal components of Brazilian sugar cane spirits. The secondary compounds produced during the fermentation process distinguish one kind from the others, being responsible for the flavor and aroma of this popular Brazilian liquor. The interest in establishing quality standards for this spirits is a driving motive the industrial and academic sectors, as well as producer's associations and the government.

Within this context, samples of the the comercial spirits *Bocaina*, *Rainha da Lavoura*, *Boa Vista* and *Espírito de Minas* had their physical chemistry properties analyzed. These spirits, along with samples of *Germana*, *Rumo do Poeta*, *Velho Barreiro*, *Pirapora*, *Moeda Velha*, *Boa Vitória*, *Barreirinha* e *Caninha 51* were submitted to gas chromatography. Samples were analyzed without any previous treatment and also had their secondary compounds concentrated by means of liquid-liquid extraction and solid-phase micro-extraction processes, before chromatographic analyse.

Among the secondary compounds, n-propyl, isobutyl and isoamyl alcohols and the ethyl acetate were quantified. The precision of the analysis was measured by the relative areas variation coefficients of each compounds for the two extraction methods.

The identification of the remaining secondary compounds was done by means of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) analysis of a sample of sugar cane spirits extracted by solid-phase microextraction (SPME).

The SPME together with GC/MS analysis allowed the identification of 38 compounds. For each of these compounds identified, fragmentation routes are proposed.

## 1.INTRODUÇÃO

---

A exemplo do uísque na Escócia, do conhaque e do vinho na França, do saquê no Japão, da vodca na Rússia e da tequila no México; a aguardente de cana é uma bebida tipicamente brasileira que vem sendo fabricada desde a chegada dos primeiros europeus e africanos.<sup>1</sup>

Em 1996, a aguardente de cana foi apontada como a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, perdendo em indicação, apenas para a cerveja, estimando-se um consumo de 2 bilhões de litros.<sup>2</sup> O faturamento desde mercado é de aproximadamente US\$ 6 bilhões, divididos praticamente entre produtores e indústrias nacionais, para atender basicamente a consumidores brasileiros.<sup>3</sup> Além da importância econômica, a aguardente de cana tem destaque social e histórico por ser uma bebida tipicamente brasileira fabricada desde o início da colonização.<sup>1</sup>

Como todas as bebidas destiladas, a aguardente de cana é uma bebida de composição complexa, composta principalmente de água e álcool etílico em proporções variáveis. O que a diferencia proporcionando aroma e sabor característico são os diversos componentes secundários formados durante a fermentação alcoólica e durante o envelhecimento. O processo de fabricação, a composição do mosto e as condições de fermentação e destilação são capazes de mudar o perfil e o teor dos componentes secundários nas aguardentes; estes compostos embora em pequenas concentrações são os principais responsáveis por suas propriedades organolépticas. Normalmente entre os compostos secundários são encontrados ácidos, aldeídos, ésteres, álcoois superiores, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas, dentre outros.<sup>4</sup>

A produção da aguardente no Estado de Minas Gerais é baseada em uma forte tradição e atrai um grande número de consumidores. Estudos realizados pelo Instituto de Desenvolvimento Industrial de Minas Gerais (INDI) em 1982, identificaram a existência de uma parcela significativa do mercado que valoriza a qualidade da aguardente artesanal produzida em Minas Gerais em detrimento das aguardentes industriais produzidas em grande escala e a preços inferiores. Esta preferência garantiu a sobrevivência da produção artesanal à concorrência com a produção industrial e este fato incentivou mais ainda as atividades de promoção da aguardente artesanal.<sup>5</sup>

A aguardente de cana tem seus padrões de identidade e qualidade definidos pelo decreto Nº 2.314, de 04 de setembro de 1997<sup>6</sup>, e pela Portaria Nº 371 do Ministério da Agricultura, de 18 de setembro de 1974<sup>7</sup>. A metodologia utilizada para análises de aguardentes é descrita pela Portaria Nº 076/86 de 03 de dezembro de 1986<sup>8</sup>. Os métodos oficiais para análise de aguardentes empregam técnicas volumétricas, gravimétricas, espectrometria UV-VIS, dentre outros.<sup>8</sup> Países como a Itália, Estados Unidos e França, têm conseguido caracterizar suas bebidas típicas correlacionando composição e origem geográfica, através de medidas analíticas e sensoriais já devidamente estabelecidas. No Brasil, ainda não atingimos este ponto, a aguardente necessita de mais estudos para um

conhecimento mais detalhado de sua composição.<sup>3</sup> Os métodos de análises estabelecidos pelo Ministério da Agricultura apesar da simplicidade, o que facilita a realização das análises, não possibilitam uma diferenciação qualitativa e quantitativa dos diversos componentes secundários presentes nas aguardentes.

A cromatografia gasosa e líquida e a cromatografia acoplada a espectrometria de massas têm sido amplamente utilizadas para identificar e quantificar os parâmetros de identidade e qualidade para alguns componentes secundários em bebidas destiladas. Vários trabalhos têm sido realizados variando-se as condições cromatográficas (colunas de separação, programações de temperatura, fluxo de gases), como também a etapa de preparação da amostra antes da análise, visando melhores resoluções, sensibilidade e reprodutibilidade na análise de compostos secundários voláteis e semi-voláteis em bebidas. As análises destes compostos por cromatografia têm possibilitado o estabelecimento de correlações entre os principais compostos secundários que vem sendo propostas na caracterização de bebidas.<sup>9,10,11,12,13,14,15</sup>

Embora já exista uma listagem de mais de 1300 componentes secundários em bebidas alcoólicas, a determinação destas substâncias é extremamente exigente.<sup>16</sup> Este problema é devido a complexa composição química da fração volátil e também ao fato destes componentes estarem presentes em variadas proporções (ng/L a g/L) que dificultam bastante a preparação da amostra a ser submetida à análise cromatográfica.<sup>17</sup> Estas dificuldades encontradas nos estudos de bebidas tais como o vinho, o uísque são também comuns em análises de aguardentes.

Com o objetivo de solucionar tal problema, várias estratégias de análise de componentes voláteis em bebidas têm sido propostas. A concentração destes compostos através da extração líquido-líquido apesar de produzir recuperações quantitativas para componentes secundários voláteis com concentração mais alta não é quantitativa para análises dos componentes em menores concentrações. As extrações em espaço confinado (headspace) estático ou dinâmico são mais adequadas para analitos presentes em solução aquosa, o que diminui a eficiência deste método de extração para voláteis em bebidas. A introdução direta da amostra no cromatógrafo gasoso para análise destes compostos não é recomendada pois resulta em alargamento dos picos devido a grande quantidade de amostra injetada, instabilidade no sinal do detetor e possibilidade de danificação da coluna de separação devido a presença de água nas amostras.<sup>17,18,19,20</sup>

A Microextração em Fase Sólida (MEFS) é uma técnica de preparação de amostras, introduzida por Pawliszyn e Belardi em 1989, na qual se faz o uso de fibras de sílica fundida revestidas com finas camadas de um polímero seletivo (que pode ser sólido ou líquido) capaz de extrair compostos orgânicos diretamente ou indiretamente da amostra aquosa para o instrumento de análise. Nesta técnica, após a concentração dos analitos no revestimento da fibra de extração estes são dessorvidos dentro do injetor do cromatógrafo. Várias vantagens, como não usar de solvente orgânico, facilidade e rapidez na concentração dos analitos e consumo de pequena quantidade de amostra têm

difundido cada vez mais o uso da MEFS, aumentando o uso desta técnica para pré-concentração de analitos em matrizes diversas como: água, solo, bebidas e alimentos.<sup>21,22,23</sup>

Buscando contribuir para um melhor conhecimento e controle de qualidade da aguardente, permitindo assim um aprimoramento tanto do processo de produção como do produto, este trabalho teve como objetivos:

- Identificar alguns compostos secundários formados durante a fermentação do mosto, os quais são os responsáveis pelo aroma e sabor da aguardente;
- Comparar as eficiências das técnicas de extração líquido-líquido e microextração em fase sólida em amostragem indireta para a determinação qualitativa dos compostos secundários e quantificação de álcoois superiores e acetato de etila.

Com esta finalidade foram realizadas análises por cromatografia gasosa com detetor de ionização por chama de aguardentes artesanais de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais e aguardentes produzidas em escala industrial, utilizando as técnicas de extração líquido-líquido e microextração em fase sólida. Para identificação dos principais componentes secundários presentes nas aguardentes foi realizada uma análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas utilizando a microextração em fase sólida como forma de concentração dos analitos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### I – HISTÓRIA DA AGUARDENTE DE CANA

Aparentemente as origens da aguardente remontam ao século VIII, quando *Marcus Grecus* teria destilado vinho tinto, usando uma retorta de vidro enterrada num banho de areia aquecida e condensando os vapores num elmo, denominado “älembikos”. Contudo, segundo *Lippmann*, só é possível afirmar que a fabricação da aguardente tornou-se difundida a partir do século XII. A descrição mais antiga da fabricação de “ácqua ardens” parece ser a de *Magister Salenus*, que morreu em 1167. Posteriormente, *Albertus Magnus*, que era bispo de Tegensburg (1193-1290) descreveu em detalhes a obtenção do “espírito do vinho”, recomendando uma série de materiais para a vedação dos destiladores.<sup>24</sup>

Já no século XIII, a tecnologia da destilação do vinho foi aperfeiçoada, em decorrência dos esforços para obtenção da pedra filosofal. Neste sentido, *Raymundus Lullus* (1234-1315), em seu livro “*Secretorum Naturae sue Quintae Essentiae*”, descreveu um processo de dez destilações sucessivas do vinho, que permitiria obter um álcool altamente retificado, o qual supostamente serviria como “Quinta Essentia” para produção da pedra filosofal.<sup>24</sup>

Ao longo dos séculos, a produção de bebidas fermentadas e fermento-destiladas têm-se difundido em todo o mundo, acompanhando, entre outros, os caminhos das missões religiosas. No decorrer da história da humanidade, tanto o processo de obtenção, que incorpora uma “fervura” do mosto à temperatura ambiente, cuja natureza bioquímica só foi esclarecida no século XIX, como a natureza volátil do produto destilado e seus efeitos fisiológicos sobre aqueles que o ingerem, são aspectos que propiciaram, uma forte associação das bebidas fermentadas e destiladas com os rituais religiosos.<sup>24</sup>

No Brasil, a produção da aguardente remonta ao período da colonização. Embora não se disponha de elementos que permitam precisar a data em que foi iniciado o fabrico de aguardente no Brasil, estima-se que sua produção teve início logo após a introdução da cana-de-açúcar na Capitania de São Vicente e a montagem do primeiro engenho de açúcar.<sup>24,25,26</sup>

Inicialmente, produzida-se a cachaça que era a espuma da caldeira em que se purificava o caldo de cana a fogo lento e servia de alimento para porcos, bestas e outros animais. Consta que, certo dia um escravo ingeriu este resíduo e demonstrou maior disposição para o trabalho. A partir daí, os escravos começaram a consumir “o vinho da cana”, que passou a ser servido nas senzalas para aumentar a produtividade<sup>1</sup>.

Reservada, inicialmente aos escravos, a cachaça, com o aprimoramento da produção, atraiu muitos consumidores e passou a ter importância econômica para o Brasil colônia. Este fato tornou-se uma ameaça ao interesses portugueses, pois

a bagaceira, aguardente de bagaço de uva produzida em Portugal, passou a ser consumida em menor escala. Diante desta realidade, a venda da cachaça foi proibida na Bahia em 1635 e em 1639 deu-se a primeira tentativa de se impedir a sua produção e venda. Contudo, durante a transmigração da corte portuguesa em 1808 para o Rio de Janeiro, a cachaça já era considerada como um dos principais produtos da economia brasileira. Em 1819 já se podia dizer que a cachaça era a bebida do país.<sup>27</sup> No final desse mesmo século, por iniciativa do poder público, foram montadas as primeiras usinas de transformação da cana-de-açúcar, isto é, de açúcar e de álcool. A princípio, a produção industrial de derivados de cana-de-açúcar não afetou a produção dos engenhos que continuaram responsáveis pela maior produção de aguardente até o princípio da década de 30. Mas entre as décadas de 30 e 40, o Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA) parece ter adotado uma política protecionista em relação às usinas, causando a desorganização e a perda da importância da produção rural desenvolvida nos engenhos de cana.<sup>28</sup>

Até a Segunda Guerra Mundial, a produção de aguardente era conduzida por um grande número de pequenos engenhos. Os processos utilizados eram artesanais, rústicos e tecnicamente rudimentares. Esses estabelecimentos localizavam-se nas zonas rurais onde a família cuidava da parte agrícola e industrial do processo. A comercialização era feita de forma bastante variada utilizando-se desde vasilhames de vidro de diversos tamanhos, a barris de madeira de 100 a 200 litros. Os produtos eram armazenados em tonéis ou pipas nos engenhos e a comercialização era feita conforme a demanda. Estas formas de processamento, comercialização e armazenagem ainda são muito comuns no Brasil. Com o fim da guerra, os alambiques artesanais instalados em fazendas abriram espaço para os primeiros alambiques industriais com maior capacidade de produção e comercialização.<sup>29</sup>

Em Minas Gerais, a produção de cachaça teve início no século XVIII e também com o objetivo inicial de ajudar os fazendeiros e mineradores a melhorar a adaptação dos escravos às condições de trabalho da época. Durante todo século XX, Minas Gerais foi apontado como o Estado com o maior número de engenhos do Brasil, chegando a ter mais engenhos do que a soma do número de unidades espalhadas pelo resto do país.<sup>30</sup>

## II - PROCESSAMENTO

### 1 – MATÉRIA PRIMA

A matéria-prima para a fabricação da aguardente é a cana-de-açúcar, fator primordial na qualidade do produto e produtividade de uma fábrica de aguardente. Como o vinho, que possui uma classe de variedades de uva consideradas nobres por produzirem uma bebida de melhor qualidade, a cana é essencial para qualidade final da aguardente.<sup>5</sup>

Originária da Ásia, a cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil por volta de 1530, por Martim Afonso de Souza, na Capitania de São Vicente. Os maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar são o Brasil, a Índia e Cuba.<sup>5</sup> No Brasil, São Paulo é o maior produtor nacional enquanto Minas Gerais ocupa o quarto lugar.<sup>31</sup>

Segundo *Stupiello*, a qualidade da cana-de-açúcar está envolvida diretamente com o desempenho das operações de extração, fermentação e destilação, razão fundamental da obtenção de altos ou baixos rendimentos e da qualidade do produto final. Os principais fatores que interferem na qualidade são: a variedade da cana, o meio ambiente, o controle das pragas e doenças e as operações de maturação, colheita, queima, carregamento e transporte. A colheita, o carregamento e o transporte que podem ser manuais ou mecânicos influenciam na qualidade da cana que vai ser processada, uma vez que, durante estas operações podem ocorrer contaminações que levem à deterioração da matéria-prima.<sup>25,32</sup>

A composição da cana madura varia com as condições climáticas, o solo e a variedade da cana. O colmo é constituído de fibras (8-14%) e caldo (86-92%). A fibra, que corresponde ao bagaço lavado e seco, compõe-se essencialmente de 50% de celulose, 25% de pentosanas e 25% lignina. O caldo contém 65-75% de água, o restante sendo constituído de sólidos, que incluem tanto os açúcares como outras substâncias orgânicas e inorgânicas. Dentre os açúcares, a sacarose constitui 11-18% do caldo, a glicose 0,2-1,0% e a frutose 0-0,6%. Fazem ainda parte da sua composição, substâncias nitrogenadas, fosfolipídeos, pectinas e corantes e pequenas quantidades de fosfatos, cloretos, sulfatos, nitratos e silicatos de potássio, sódio, cálcio, magnésio, manganês e ferro.<sup>24</sup>

A principal espécie cultivada no Brasil é a *Saccharum officinarum* e atualmente, segundo *Ribeiro*, as variedades mais indicadas para Minas Gerais são: RB765418, RB739359, RB739735, RB72454 e SP71-1406.<sup>5</sup> É aconselhável o plantio de diferentes variedades de cana-de-açúcar para permitir tempos de maturação diferentes, suprindo, o alambique durante todo o ano.<sup>33,34</sup>

A cana-de-açúcar como matéria-prima é avaliada quanto a sua qualidade por parâmetros, como: brix, pol, pureza, açúcares redutores, pH e acidez total. O grau brix é a medida da concentração dos sólidos solúveis no caldo de cana e serve como uma medida indireta do teor de açúcares presentes no caldo, uma vez que

os açúcares constituem maior parte dos sólidos solúveis. O pol e a pureza servem como parâmetros de variedade, maturação, teor de impurezas presentes na cana e das condições do meio ambiente. Os açúcares redutores dependem muito da variedade e sendo necessário estabelecer o valor referencial para cada situação a fim de medir o grau de deterioração. O pH e acidez total servem como parâmetros de deterioração, embora sejam limitados e dependentes do tipo de substância formada durante o processo de deterioração e do estágio de maturação.<sup>25,29</sup>

## 2 – FERMENTAÇÃO

Tradicionalmente, as bebidas alcoólicas são produzidas por fermentação espontânea pela ação de microrganismos que contaminam o substrato. No caso da aguardente de cana, estes microrganismos são provenientes das manipulações durante a colheita, o transporte e a moagem da cana. O processo de fermentação consiste na transformação dos açúcares fermentáveis presentes no mosto, constituído de caldo de cana e nutrientes, em álcool etílico, gás carbônico e outros compostos secundários. O caldo de cana apresenta meio ácido tendo a média de pH entre 4,8 a 6,0. Estas características fazem do caldo de cana um meio excelente para o desenvolvimento de microrganismos.<sup>35</sup>

A população microbiana natural do caldo de cana é constituída normalmente por leveduras e bactérias. Apesar do processo fermentativo para produção da aguardente ainda ser empírico já foram isoladas e identificadas leveduras pertencentes aos seguintes gêneros: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* e *Rhodotorula*. Entre as bactérias identificadas destacam-se as pertencentes ao grupo das produtoras de ácido láctico como: *Leuconostoc dextranicum*, *L.mesenteroides* e *Streptococcus spp*. A habilidade de converter açúcares em etanol é característica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* e da bactéria *Zymomonas mobilis*. Dentre as leveduras fermentativas, a *Saccharomyces cerevisiae* é a que mais se destaca pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol.<sup>24,34,35</sup>

Para que ocorra uma vigorosa fermentação é necessário que as exigências nutricionais das leveduras sejam supridas, permitindo assim a reprodução e garantindo a viabilidade celular. Dentre os nutrientes requeridos pelas leveduras e freqüentemente presentes na cana, em quantidades insuficientes, encontram-se substâncias minerais e orgânicas.<sup>35</sup>

Os elementos nutritivos minerais mais importantes são o nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio e em menores concentrações manganês, cobalto, zinco, ferro e cobre. O fósforo interfere no controle da síntese dos hidratos de carbono e dos lipídeos, assim como na manutenção da integridade da parede celular. O enxofre é componente essencial de alguns aminoácidos, enzimas e coenzimas. O potássio melhora a tolerância das leveduras aos íons tóxicos e participa do controle do pH intracelular, enquanto o magnésio age como protetor das células contra as modificações do ambiente e ativador da assimilação de

açúcares. Os minerais utilizados em menores concentrações como manganês e cobalto atuam favoravelmente nas atividades vitais das leveduras, enquanto zinco, ferro e cobre agem na estimulação da via metabólica que leva a produção de etanol.<sup>35</sup>

As vitaminas e ácidos graxos insaturados são as substâncias orgânicas requeridas durante a fermentação para atender as necessidades nutricionais das leveduras. A necessidade de um suplemento de vitamina irá depender do fermento utilizado e tem como finalidade aumentar a produtividade. Os ácidos graxos são necessários para favorecer a fisiologia celular. Para atender estas exigências nutricionais são adicionados ao caldo de cana superfosfatos, sulfato de amônio, vitaminas e suplementos naturais como farelos de arroz, farinha de soja e fubá.<sup>35</sup>

A fermentação é iniciada a partir da adição do fermento, também chamado de pé de cuba ou inóculo, ao caldo de cana enriquecido na dorna de fermentação. O inóculo é normalmente preparado segundo técnicas regionais práticas ou observando-se tecnologia apropriada com fermentos selecionados. Entretanto, a técnica mais comum, ainda é o uso do fermento comercial, conhecido como fermento prensado ou de padaria. Mas é possível se preparar o inóculo a partir das leveduras selvagens ou com leveduras selecionadas.<sup>35</sup>

Normalmente, a duração média de um processo fermentativo em mosto de melaço ou caldo de cana é de 24 horas. Em geral a fermentação pode ser conduzida por três sistemas diferentes: o convencional, em batelada, o descontínuo-alimentado ou batelada-alimentada e o contínuo. O método convencional é o comumente adotado pelos produtores de aguardente artesanal e consiste em se colocar o inóculo e todo o meio a ser fermentado juntos na dorna de fermentação. Após 24 horas, o produto é destilado, e a dorna lavada, iniciando-se um novo processo. Este sistema, apesar de muito utilizado, interfere significativamente no metabolismo das leveduras tornando suas células mais sensíveis ao efeito inibidor do etanol. Utilizando baixo teor inicial de substrato e sob condições operacionais adequadas, é possível atingir rendimentos de até 92-94%, mas a produtividade é sempre baixa (dificilmente superior a 5 g etanol/h). No sistema descontínuo-alimentado a dorna é alimentada aos poucos de modo que mantenha um teor de açúcar pré-estabelecido e inferior ao utilizado no sistema de batelada. Esse sistema permite aumentar a produtividade em etanol e também o limite de tolerância das cepas usuais de *Saccharomyces cerevisiae* ao etanol, o rendimento do produto pode chegar a 92%. No processo contínuo alimenta-se a dorna com fluxo contínuo de substrato, em concentração conveniente, e retira-se também de forma contínua parte do líquido a ser destilado. Estes sistemas não são recomendados para produção de aguardente, nem são economicamente viáveis para fermentação alcoólica em pequena escala.<sup>24,35</sup>

O principal critério para avaliar o andamento da fermentação é o acompanhamento da queda do brix do mosto, que deve ser feita a cada uma ou duas horas. Entre os fatores que afetam a fermentação estão o pH, a temperatura, teor de sacarose e presença de oxigênio no mosto.<sup>24,35</sup>

As principais reações envolvidas durante a fermentação são a fosforilação do açúcar, quebra dos açúcares fosforilados em trioses (gliceraldeído fosforado e dehidroxiacetona fosforada), oxiredução das trioses (formação do ácido pirúvico), descarboxilação do ácido pirúvico (formação de acetaldeído e CO<sub>2</sub>) e redução do acetaldeído a etanol, FIG.1 (página 13).<sup>29,36</sup>

### 3 - DESTILAÇÃO

O vinho é o produto resultante da fermentação do mosto e possui uma composição complexa apresentando componentes sólidos, líquidos e gasosos. Alguns destes componentes são provenientes do mosto sem nenhuma modificação, enquanto outros são formados pelas atividades das leveduras e dos contaminantes durante fermentação.<sup>29</sup> Os componentes líquidos são representados por água (80-90%), álcool etílico (6-10%), produtos secundários da fermentação alcoólica (1-3%) e contaminantes (1-3%).<sup>25</sup> Dentre os componentes secundários, estão presentes os ácidos (acético, succínico e láctico), álcoois superiores (propílico, isopropílico, butílico, isobutílico, amílico e isoamílico), glicerol, aldeídos e ésteres.<sup>29</sup>

Os componentes sólidos podem estar em solução ou em suspensão. Os sólidos em solução são representados pelos açúcares não fermentados, sais minerais, substâncias nitrogenadas (aminoácidos, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos), pectinas e outros sólidos solúveis provenientes do mosto. Estes sólidos são formados por células de leveduras e bactérias, bagacilhos e minerais insolúveis como argila. O principal componente gasoso é o gás carbônico embora a maior parte deste tenha sido desprendida durante a fermentação.<sup>29</sup>

Os componentes do vinho são classificados em duas frações: voláteis e não voláteis ou fixas. A fração volátil é constituída por água, etanol, metanol, álcoois superiores, ácido acético, ésteres e gás carbônico; e a fração não volátil ou fixa de sólidos do mosto, células de leveduras e bactérias, minerais e ácidos orgânicos e inorgânicos fixos.<sup>29</sup>

Os componentes voláteis do vinho possuem diferentes graus de volatilidade, sendo possível a separação por processo de destilação. Assim, durante a destilação, os componentes mais voláteis são recolhidos na primeira fração denominada de “cabeça” e os menos voláteis nas frações finais “coração” e “cauda”.<sup>29</sup>

As frações denominadas de “cabeça” e “cauda” comprometem na qualidade da aguardente devendo ser eliminadas. A “cabeça” é a fração que contém a maior parte de produtos tóxicos, dentre eles o metanol. A “cauda” é constituída de compostos de altos pesos moleculares e outros produtos indesejáveis ao processo, além da quase total ausência em álcool etílico. A aguardente é feita basicamente da fração chamada “coração”, nesta predomina-se água e álcool etílico e teores aceitáveis de componentes mistos de ponto de ebulição abaixo e

acima do etanol.<sup>32</sup> A precisão com que são efetuados os cortes entre as frações tem influência na qualidade final da aguardente.<sup>35</sup>

Os aparelhos tradicionais de destilação são construídos de cobre e os destiladores de coluna de aço inoxidável.<sup>29</sup> Na indústria, o cobre também é utilizado como catalisador na produção de acetaldeído a partir da desidrogenação do etanol, processo este que leva a formação de material carbonáceo na superfície do metal. Durante a destilação da aguardente ocorre também a formação de carbonato básico de cobre, o azinhavre, na superfície do metal. Este carbonato é solubilizado pelos vapores ácidos produzidos durante a destilação, e por arraste conduz à contaminação do produto final por íons de cobre.<sup>37</sup>

Vários pesquisadores esforçaram-se no intuito de reduzir a contaminação na aguardente por íons de cobre. Alguns trabalhos já foram feitos com o uso de carvão ativo<sup>38,39</sup> e outras resinas de troca iônica<sup>40</sup> para extração de íons de cobre do destilado. Entretanto, após estes procedimentos o produto final não apresentava suas características típicas em virtude da retenção dos compostos secundários que são fundamentais para o aroma e sabor da bebida.<sup>37</sup>

A utilização de aço inoxidável, no lugar do cobre, na construção dos alambiques foi uma outra alternativa para contornar o problema da contaminação. Esta substituição acabou destacando a importância deste metal na qualidade sensorial da aguardente, pois os destilados obtidos em alambiques de aço inoxidável apresentaram o odor característico de sulfetos. *Nascimento et al*, em trabalhos mais recentes<sup>37</sup> mostraram que as aguardentes destiladas em alambiques de cobre apresentaram teores médios de aldeídos totais e metanol nitidamente superiores aos das destiladas em alambiques de aço inoxidável. Um comportamento inverso é observado quanto aos teores de álcoois superiores e ésteres. As maiores concentrações de aldeídos provavelmente são devidas à reação de desidrogenação dos álcoois a aldeídos<sup>37</sup>. As aguardentes destiladas em alambiques de cobre são as preferidas pelos apreciadores da bebida, em função de seu aroma e sabor.

Normalmente, a destilação das aguardentes é feita normalmente em aparelhos de destilação descontínua e contínua. Os aparelhos descontínuos são os alambiques simples ou de dois ou três corpos e são os mais utilizados na produção de aguardentes artesanais. Os aparelhos contínuos fazem uso de colunas ou torres de destilação e são geralmente utilizados na produção de escala industrial.<sup>35</sup>

#### 4 - ENVELHECIMENTO

A aguardente de cana, assim como o uísque, o rum e o conhaque, para adquirir boas propriedades sensoriais de aroma e paladar, passa por um processo de envelhecimento. Este processo consiste no armazenamento da aguardente em barris de madeira, geralmente carvalho, por um período que pode variar de seis meses que é o tempo mínimo de envelhecimento ou de vários anos.<sup>5,29</sup>

A aguardente recém-destilada é incolor, apresenta um paladar agressivo e levemente amargo, identificador da bebida nova. O envelhecimento, além de melhorar o aroma e o paladar, modifica a coloração, de incolor para amarelada; torna a aguardente uma bebida mais fina e suave. Entretanto, a cor de uma aguardente não é critério seguro para o julgamento da sua idade, pois pela adição de extrato de carvalho uma aguardente recém-destilada adquire a cor característica do envelhecimento.<sup>5</sup> As aguardentes envelhecidas apresentam densidade e extrato seco elevados e grau alcoólico baixo.<sup>41</sup>

Nas aguardentes armazenadas em barris de carvalho por um período de um a dois anos, já se percebe o odor típico, tonalidade mais acentuada e paladar mais adstringente devido aos taninos provenientes do carvalho. Aos cinco anos, o odor da aguardente torna-se mais harmonioso, arredondado; por outro lado já não se distinguem com facilidade as contribuições da fermentação e da madeira, pois já existe uma associação entre os componentes dos mesmos. Aguardentes com mais de cinco anos de envelhecimento, propiciam sensação de suavidade na boca porque encobrem a adstringência dos taninos. Para outros tipos de madeira, as evoluções progressivas da cor, do aroma e do paladar seguem padrões peculiares.<sup>24</sup>

Segundo *Piggott*, inúmeras transformações químicas, como reações de oxidação e esterificação, estão associadas ao processo de maturação e envelhecimento da aguardente. Dentre estas transformações, destacam-se as reações entre os componentes secundários provenientes da destilação; a extração direta dos componentes da madeira; a decomposição de macromoléculas da madeira (lignina, celulose, hemicelulose) e sua incorporação a bebida; as reações dos componentes da madeira com os componentes originados na destilação; a evaporação dos componentes mais voláteis através da madeira do barril e a formação de complexos moleculares estáveis entre os compostos secundários e água e/ou etanol.<sup>5,42</sup>

O envelhecimento em tonéis de madeira é o mais recomendável. Neste caso, não há necessidade de oxigenação ou arejamento, uma vez que a porosidade da madeira permite o fluxo de oxigênio do exterior para o interior do tonel. Os tonéis não devem ficar completamente cheios, de modo a ter em sua parte superior uma camada de ar. A oxigenação, além de necessária nas reações de oxidação, favorece outras reações que permitem eliminar certos aromas desagradáveis, tais como os associados à presença de mercaptans.<sup>5</sup>

Em Minas Gerais é bastante comum o uso de tonéis de carvalho de 200 litros, que chegam ao país através da importação de uísque. São também utilizados tonéis de madeiras nacionais, com tamanhos de até 20.000 litros. As madeiras nacionais mais usadas na preparação destes tonéis são: bálsamo, amburana, cerejeira, jatobá, jequitibá, freijó, vinhático, ipê, peroba, angelim-pedra, amendoim, pereira, garapa e outras, de acordo com as preferências e disponibilidades regionais.<sup>5</sup>

O efeito da madeira na qualidade da aguardente envelhecida tem como base a sua composição química em celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. Durante o envelhecimento, a madeira transfere para a aguardente elementos de

características específicas, provenientes da lignina e dos extrativos, que influenciam na cor, aroma e paladar da bebida. Considerando que o envelhecimento a bebida sofre uma grande influência do tipo de madeira e que o paladar característico das bebidas envelhecidas no carvalho é de conhecimento mundial, julga-se vantajosa a utilização de madeiras nacionais, que dão à aguardente características sensoriais de maior autenticidade para uma bebida genuinamente brasileira. Os caracteres exóticos das madeiras nacionais constituem elemento de grande atração para o comércio da aguardente, especialmente no mercado internacional.<sup>5</sup>

Em relação às condições climáticas, o envelhecimento deve ser realizado em local fresco, a temperaturas na faixa de 15-20<sup>0</sup>C, umidade relativa média na faixa de 70-90% e arejamento adequado. As instalações de envelhecimento devem ter pé direito alto, em torno de cinco metros, paredes externas espessas, para evitar oscilações de temperatura e janelas distribuídas para melhor ventilação.<sup>5</sup>

O tamanho dos tonéis interfere no tempo de envelhecimento. Para um mesmo volume de aguardente, o emprego de vários tonéis menores requer um tempo menor de envelhecimento que em um único tonel. Além do tamanho, o tempo de uso do tonel também é um aspecto relevante devido ao esgotamento progressivo dos componentes ativos extraídos da madeira.<sup>5</sup>

### **III – COMPOSIÇÃO DA AGUARDENTE-DE-CANA**

A aguardente é composta principalmente de água e álcool etílico em proporções variáveis, componentes secundários formados durante a fermentação alcoólica e compostos formados ou extraídos durante o envelhecimento.

No processo de fabricação, a composição do mosto e as condições de fermentação e de destilação são capazes de mudar o perfil e o teor dos componentes secundários na aguardente. A presença destes compostos é de grande importância, uma vez que são os responsáveis pelo “flavour” característico de cada tipo de bebida. Normalmente dentre os compostos secundários são encontradas as seguintes classes químicas: ácidos, aldeídos, ésteres, álcoois superiores, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas, dentre outros.<sup>4</sup>

Durante a fermentação, parte dos açúcares são utilizados em reações paralelas, como na formação de glicerol, ácido succínico, butanodiol e outros, além da formação dos produtos principais, etanol e CO<sub>2</sub>, conforme ilustra a FIG. 1 (página 13).<sup>29</sup>

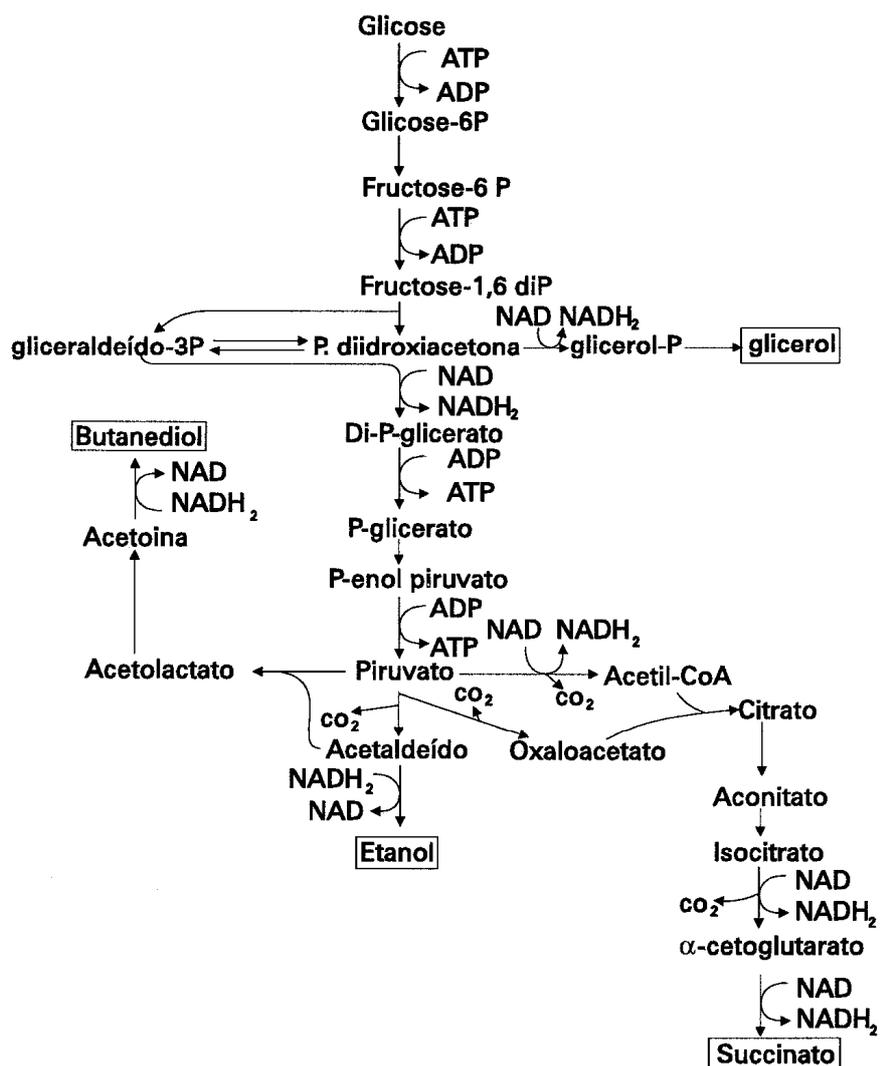


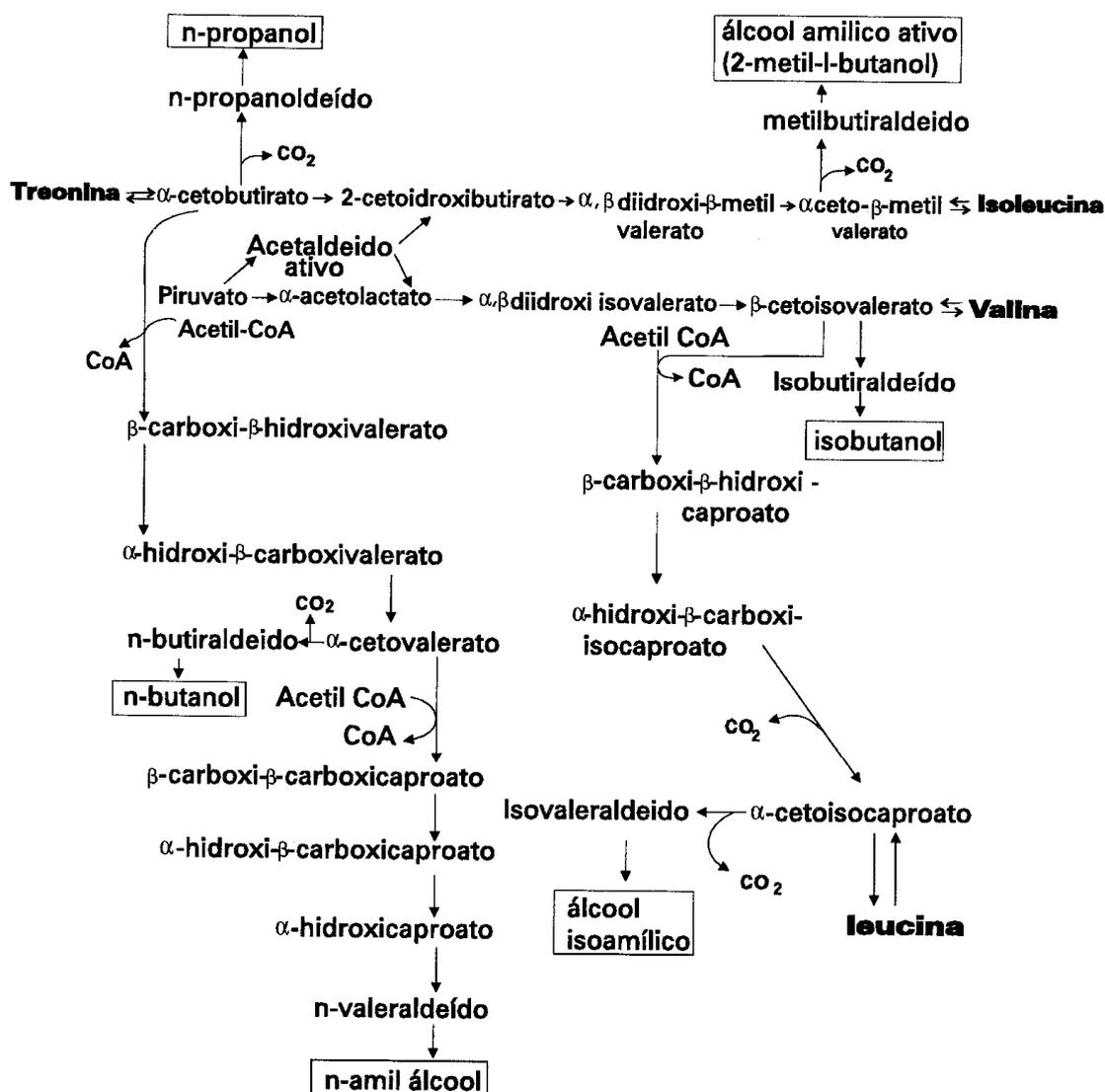
FIGURA 1 – Reações da glicose durante a fermentação<sup>29</sup>

## 1 - ÁLCOOIS

Os álcoois superiores (óleo fúsel) e parte do ácido succínico são resultantes do metabolismo de aminoácidos. Os aminoácidos presentes no mosto originam-se da hidrólise de proteínas das células da cana-de-açúcar e no vinho resultam da hidrólise das células das leveduras. Os aminoácidos podem ser incorporados ao vinho, através do enriquecimento do mosto com produtos como farelo de arroz, extrato de levedura e outro material orgânico rico em proteínas.<sup>29</sup>

A formação de álcoois superiores a partir de aminoácidos é feita através de reações de desaminação e descarboxilação, FIG. 2 (página 14). Os principais álcoois formados são: n-propílico, isopropílico, n-butílico, isobutílico, amílico e

isoamílico, e em menores quantidades álcoois hexílico, heptílico, octílico e outros.<sup>29</sup> A formação de metanol, pode decorrer da decomposição de pectinas, especialmente quando o caldo de cana é acrescido de bagaços ou suco de frutas, o que deve ser evitado.<sup>24,29</sup>



**FIGURA 2** – Vias de formação de álcoois superiores<sup>29</sup>

A aeração do mosto, o pH baixo (3,0 a 4,2) e temperaturas de fermentação mais altas, na faixa de 28-30 °C, favorecem a formação de álcoois superiores. O efeito da aeração sobre a formação de álcoois superiores pode estar relacionado à presença de materiais porosos no mosto que funcionam como fonte de oxigênio. Temperaturas mais altas podem aumentar a produção de óleo fúsel em até 40% e pH baixo em até 80%.<sup>24,43</sup>

O tempo da fermentação é também de grande importância, se o processo for realizado com rapidez, a formação de álcoois superiores termina quando a produção de etanol é finalizada, pois a quebra de aminoácidos é rápida, e 70% destes são consumidos nas primeiras doze horas. Já em fermentações longas, a produção de álcoois superiores é continuada até o fim do processo fermentativo. Durante as primeiras oito horas os álcoois superiores são formados predominantemente a partir de aminoácidos. Após este período, estes passam também a ser produzidos a partir de carboidratos. Depois de terminado o processo fermentativo, o teor dos álcoois superiores atinge um limite e permanece mais ou menos constante por um período de cinco dias.<sup>44,45</sup>

Segundo *Souza & Llistó*, quantidades elevadas de álcoois superiores diminuem o valor comercial e a qualidade das aguardentes.<sup>46</sup> As aguardentes classificadas como de qualidade inferior devido suas características organolépticas apresentam sempre um teor muito elevado de n-propanol,<sup>46,47</sup> além disso, foi observada uma correlação entre a presença de álcool alílico e de certos aromas anormais, definidos como farmacêuticos e acroneleïnados.<sup>48</sup> Os álcoois superiores podem ser reconhecidos pelo seu forte e pungente odor e sabor.<sup>49</sup>

## 2 – ÁCIDOS

Já foram identificados em aguardentes os ácidos carbônico, acético, propiônico, butírico, valeriânico, caprício, enântico, cáprico, pelargônico, laúrico, mirístico, palmítico, láctico e outros ácidos graxos com mais de 16 átomos de carbono, livres ou combinados sob a forma de ésteres.<sup>44,50</sup>

O ácido acético, que é o ácido volátil predominante nas aguardentes, é produzido em maior quantidade, principalmente pelas bactérias acéticas e lácticas e pelas leveduras. As bactérias acéticas podem produzir o ácido acético através da oxidação do etanol. Ele também pode ser produzido nas atividades vitais das células de certos microrganismos ou por reações de Cannizzaro sobre o aldeído acético, favorecida em meio alcalino.<sup>51,52,53,54</sup>

A presença de ácido fórmico em algumas aguardentes é resultante da decomposição da glicose. Os ácidos butírico, caprício, caprílico e pelargônico se originam da atividade enzimática de diversos microrganismos, da ação oxidante do ar, ou do próprio substrato. O ácido láctico se forma devido à presença de fermentos lácticos que atacam os açúcares e os álcoois superiores. A síntese dos ácidos graxos, que dão corpo a bebida, requer a acetil-CoA como iniciador, mas estes também podem ser formados pela oxidação do etanol.<sup>51,52,54,55</sup>

De acordo com a cepa da levedura utilizada, a pureza da fermentação, o tempo e a temperatura de fermentação, e o tempo de espera para destilar o vinho, a acidez das aguardentes de cana pode atingir níveis muito altos.<sup>36,56,57</sup> Mas um controle da acidez na aguardente pode ser feito durante a destilação do mosto.

### 3 – ÉSTERES

Os ésteres são formados em reações entre os ácidos e os álcoois produzidos durante a fermentação alcoólica. Essas reações podem ser catalisadas por enzimas, esterases, produzidas pelas leveduras e bactérias ou podem ser efetuadas quimicamente sem a interferência de enzimas.<sup>29</sup> Os ésteres mais voláteis encontrados em aguardentes são principalmente acetatos, propionatos, butiratos e isobutiratos de etila, propila e amila, bem como enantilatos de etila.<sup>36</sup>

Os ésteres de ácidos graxos são os que mais contribuem para o “flavour” das bebidas em geral.<sup>4</sup> O principal éster da aguardente é o acetato de etila, que em pequenas proporções incorpora um aroma de frutas à bebida, que é desejável e agradável. No entanto, em quantidade excessivas, torna a bebida enjoativa.<sup>24</sup>

A formação dos ésteres é influenciada pela cepa ou linhagem da levedura utilizada e favorecida em temperaturas mais baixas do mosto (10-20<sup>0</sup>C) na etapa final da fermentação.<sup>4,24</sup>

### 4 – ALDEÍDOS

A formação de aldeídos em bebidas alcoólicas se deve principalmente a reações de oxidação de álcoois, degradação de Strecker e autooxidação de ácidos graxos.<sup>49,50</sup> Níveis mais altos de aldeídos são alcançados quando a atividade do fermento é mais vigorosa.<sup>49</sup>

Os principais aldeídos detectados nas aguardentes são o acético, fórmico, e em pequenas quantidades, os homólogos superiores butírico, isobutírico, valérico, paradeído, capróico, além de outros como acroleína, furfural, hidroximetilfurfural, enântico<sup>44,50,51</sup> e o siringaldeído proveniente do processo de envelhecimento para aguardentes armazenadas em barris de determinados tipos de madeira.<sup>58,59</sup>

O aldeído acético, um dos principais aldeídos encontrados nas aguardentes, é formado pela oxidação do etanol por certos microrganismo, oxidação esta que pode também ocorrer pela influência do ar, mesmo a frio, embora lentamente.<sup>56</sup> Há também a sugestão de que o acetaldeído possa também ser formado através da descarboxilação do ácido pirúvico originado da fermentação da hexose.<sup>51</sup>

A composição do meio é importante na formação dos compostos carbonílicos. A deficiência em substâncias nutritivas durante a fermentação aumenta muito a concentração de aldeídos, devido ao atraso na formação de álcool etílico. A concentração total de aldeído tem demonstrado correlação com o tipo de fermento utilizado. Há diferenças marcantes no comportamento da produção de aldeídos durante fermentações, se é feito o uso de fermentos de padaria, selvagem ou aqueles especiais para bebidas. A diferença pode ser explicada pelo fato de que para um dado fermento, a quantidade de acetaldeído produzida é dependente da atividade da piruvato descarboxilase.<sup>49</sup>

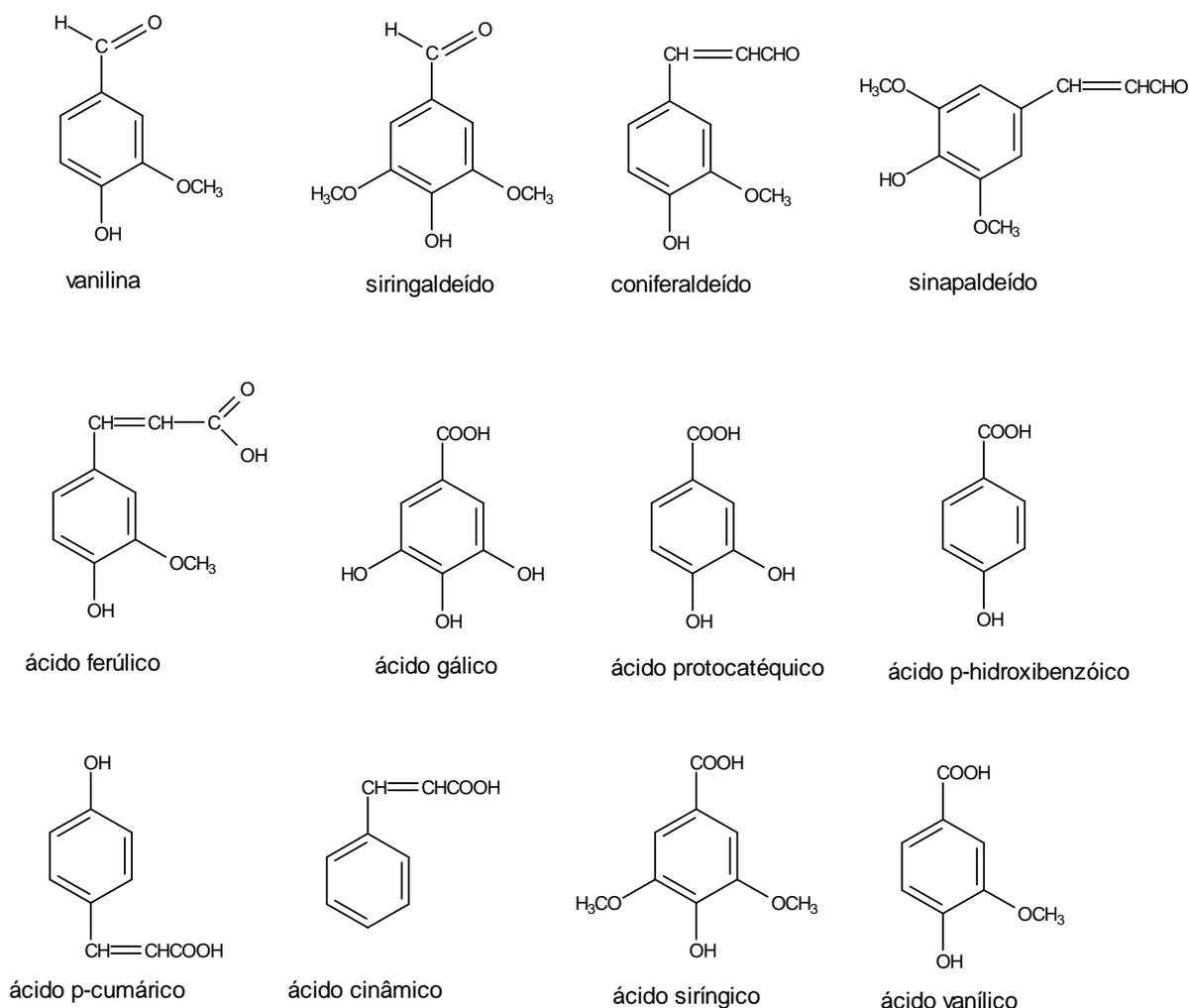
A presença de aldeídos insaturados, como acroleína, na cabeça dos destilados dá à aguardente um odor pungente e lacrimejante. Estes compostos, provavelmente, são produzidos por bactérias a partir do glicerol ou por desidratação nas superfícies quentes das colunas de destilação.<sup>49</sup>

O furfural, um aldeído presente em algumas aguardentes, é resultante da decomposição química de carboidratos. É formado principalmente pela pirólise da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. Nas aguardentes envelhecidas o furfural pode ser originado da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses) e portanto, pode ser, pelo menos em parte, proveniente da madeira usada na construção de tonéis.<sup>29</sup>

O 5-hidroximetil furfural, também presente em algumas aguardentes, é originado da degradação de hexose, preferencialmente a frutose, sob a influência de ácidos orgânicos e inorgânicos. A queima de cana-de-açúcar nos campos antes da colheita provoca degradação da sacarose e um aumento do teor de 5-hidroximetil furfural e conseqüentemente o escurecimento do caldo de cana a ser utilizado na produção de aguardente.<sup>60</sup>

## 5 – COMPOSTOS FORMADOS DURANTE O ENVELHECIMENTO

Durante o envelhecimento de bebidas alcoólicas destiladas em barril de madeira, observa-se um aumento progressivo no teor de extrato seco, em decorrência da incorporação de taninos e compostos fenólicos provenientes da lignina. Em casos de envelhecimento em tonéis de carvalho, esses compostos chegam a cerca de 40% do extrato seco total. Já foram identificados em aguardentes envelhecidas aldeídos tais como a vanilina, o siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído, além de vários ácidos fenólicos.<sup>24</sup> Há uma proposição de que a lignina sofra uma alcoólise ácida à temperatura ambiente, formando siringaldeído, sinapaldeído, vanilina e coniferaldeído. O sinapaldeído converte-se em siringaldeído e o coniferaldeído em vanilina por oxidação da dupla ligação. O coniferaldeído também pode converter-se em ácido ferúlico por oxidação do aldeído.<sup>61</sup> Concentrações de siringaldeído maiores que de vanilina e de compostos siringícos maiores que compostos vanílicos indicam um genuíno envelhecimento em carvalho. Um aumento na concentração de compostos vanílicos em relação ao coniferaldeído, indica que substâncias, como amêndoas, foram adicionadas ao produto.<sup>62</sup> Outros ácidos fenólicos identificados são os ácidos gálico, ferúlico, protocatéquico, p-hidroxibenzóico, p-cumárico, cinâmico, siringíco e vanílico, FIG.3.<sup>24</sup>



**FIGURA 3** – Estrutura de aldeídos e ácidos fenólicos provenientes da madeira e identificados em aguardentes de cana<sup>24</sup>

Os compostos fenólicos de baixo peso molecular, aldeídos e ácidos têm sido considerados indicadores do envelhecimento de vinhos e bebidas alcoólicas. A diminuição do teor de metanol, e o aumento dos teores de acetato de etila, acetaldeído e 1,1-dietoximetano caracterizam aguardentes produzidas a mais de dez anos. São também compostos característicos de envelhecimento 1,1-dietoxietano e 1,1-dietoxiacetona e os ésteres de álcoois superiores como o acetato de isobutila e acetato de isoamila. O envelhecimento pode também levar à formação de metilcetonas a partir dos ácidos graxos livres, por oxidação seguida de uma descarboxilação. Em níveis da ordem de 0,5 mg/mL, esses compostos já permitem justificar eventual evolução para o ranço em aguardentes envelhecidas.<sup>61</sup>

Há variações na composição da aguardente conforme o tipo de madeira utilizada nos barris para envelhecimento. A presença de cumarinas, especialmente as escopoletinas, é considerado um parâmetro do envelhecimento de bebidas em carvalho.<sup>62</sup> Além da diferença na composição da aguardente envelhecida, a

variação no tipo de madeira afeta outras características como cor, gosto, odor, brilho, adstringência e o teor alcoólico.<sup>59</sup>

A TAB. 1, apresenta alguns compostos identificados em aguardentes envelhecidas armazenadas em barris construídos com diferentes tipos de madeira.<sup>59</sup>

**TABELA 1** – Variações na composição das aguardentes de acordo com o tipo de madeira utilizada no barril de armazenamento<sup>59</sup>

<b>COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS APÓS O ENVELHECIMENTO EM DIFERENTES BARRIS DE MADEIRA</b>	
Carvalho	ácido gálico, ácido elágico
Amburana	sinapaldeído, ácido vanílico
Bálsamo	siringaldeído, vanilina, ácido elágico
Jequitibá	ácido vanílico, ácido gálico
Jatobá	siringaldeído, ácido elágico
Ipê	ácido siríngico, ácido vanílico, coniferaldeído

#### **IV – PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE PARA A AGUARDENTE DE CANA**

A aguardente de cana, ou caninha, tem seus padrões de identidade e qualidade definidos pelo decreto N<sup>o</sup> 2.314, de 04 de setembro de 1997, e pela Portaria N<sup>o</sup> 371 do Ministério da Agricultura, de 18 de setembro de 1974. A Portaria N<sup>o</sup> 076/86 de 03 de dezembro de 1986 estabelece os métodos oficiais de análise para aguardente de cana.<sup>6,7</sup>

##### **1 – PADRÕES DE IDENTIDADE**

Aguardente de cana, caninha ou cachaça é a bebida com graduação alcoólica de 38-54 % (v/v), a 20<sup>o</sup>C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar, ou ainda, pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionado até seis gramas de açúcares por litro. A bebida que contiver concentração de açúcares superior a seis e inferior a trinta gramas por litro será denominada aguardente de cana adoçada, caninha adoçada ou cachaça adoçada.<sup>6,7</sup>

A destilação deverá ser efetuada de forma que o destilado apresente aroma e sabor provenientes da matéria-prima utilizada, dos derivados do processo fermentativo e dos formados durante a destilação.<sup>6,7</sup>

O produto denominado aguardente de cana envelhecida, caninha envelhecida ou cachaça envelhecida deve conter no mínimo 50% de aguardente de cana envelhecida, por um período não inferior a um ano, podendo ser adicionada de caramelo para a correção da cor.<sup>6,7</sup>

De acordo com decreto atual, a aguardente de melão é definida como a bebida com graduação alcoólica de 38-54 % (v/v), a 20<sup>o</sup>C, obtida do destilado alcoólico simples de melão, ou ainda, pela destilação do mosto fermentado de melão, podendo ser adicionado até seis gramas de açúcares por litro. E a aguardente de cana composta, definida com a mesma graduação alcoólica, como o produto resultante da adição na aguardente ou no destilado alcoólico simples de substâncias de origem vegetal ou animal, previstas em ato administrativo próprio. A aguardente de cana composta poderá ser colorida por caramelo e adicionada de açúcares, em concentrações inferiores a 30 g/L.<sup>6,7</sup>

## 2 – PADRÕES DE QUALIDADE

### 2.1 – INGREDIENTES BÁSICOS

Destilados naturais obtidos somente do mosto fermentado da matéria-prima mencionada na definição do produto.<sup>6,7</sup>

### 2.2 – INGREDIENTES OPCIONAIS

#### 2.2.1 - Água

A água utilizada na elaboração deste produto será obrigatoriamente água potável, enfatizando-se as características de sua composição apresentadas na TAB. 2.<sup>6,7</sup>

**TABELA 2** – Composição da água utilizada na elaboração de aguardentes <sup>6,7</sup>

PARAMÊTRO	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
Teor máximo de ferro	0,3
Teor máximo de manganês	0,1
Dureza total, teor máximo em carbonato de cálcio	100,0
Oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica	2,0

### 2.2.2 – Açúcares

Sacarose (açúcar refinado ou cristal), que poderá ser substituída total ou parcialmente por açúcar invertido e glicose nas quantidades estabelecidas em Lei.<sup>6,7</sup>

## 2.3 – COMPOSIÇÃO

**2.3.1** – A concentração de congêneres, ou componentes voláteis não-álcool, ou substâncias voláteis não álcool, ou componentes secundários não-álcool, ou impurezas voláteis, expressa pela soma de aldeídos em aldeído acético, ácidos voláteis em ácido acético, ésteres em acetato de etila, furfural e álcoois superiores, não poderá ser inferior a 0,200g e nem superior a 0,650g por 100 mL de álcool anidro (AA).<sup>6,7</sup>

**2.3.2** – Especificamente as impurezas totais “não álcool” deverão obedecer aos limites máximos da TAB. 3.<sup>6,7</sup>

**TABELA 3** – Concentrações máximas de componentes não voláteis na aguardente de cana<sup>6,7</sup>

PARÂMETRO	TEOR MÁXIMO EM ÁLCOOL ANIDRO (mg/100mL)
Acidez volátil em ácido acético	150
Ésteres em acetato de etila	200
Aldeídos em aldeído acético	30
Furfural	5
Álcoois superiores	300

A concentração de álcoois superiores deve acompanhar proporcionalmente a dos ésteres numa aguardente de boa qualidade. Por isto, a relação álcoois superiores/ésteres não deve afastar muito da unidade. Quando a aguardente apresenta concentração de álcoois superiores maior que a de ésteres, quase sempre é resultado de condições inadequadas de preparação, fermentações anormais ou infecciosas e destilações mal controladas. Admite-se também como de qualidade inferior, a aguardente que revelar grande predominância de ésteres em relação aos álcoois superiores, o que leva supor a adição de essências com grande quantidades de ésteres com o objetivo de melhorar o aroma da

aguardente.<sup>41</sup> A classificação da aguardente de cana segundo a relação álcoois superiores/ésteres é apresentada na TAB. 4.

**TABELA 4** – Classificação da aguardente de cana segundo a relação de álcoois superiores/ ésteres<sup>41</sup>

<b>RELAÇÃO ÁLCOOIS SUPERIORES/ÉSTERES</b>	<b>QUALIDADE DA AGUARDENTE DE CANA</b>
<0,5	Inferior
0,5-0,7	Boa
0,7-0,9	Muito boa
0,9-1,1	Ótima
1,1-1,3	Muito boa
1,3-1,5	Boa
>1,5	Inferior

Várias outras relações numéricas baseadas no teor de álcoois superiores tem sido propostas na caracterização de bebidas. As proporções entre isopentanol/isobutanol e n-propanol/isobutanol são distintas e típicas para cada bebida.<sup>16</sup> A relação de 2-metil-1-butanol/3-metil-1-butanol é particularmente característica. O conhaque de boa qualidade apresenta relação de 0,19-0,24.<sup>4</sup>

## **2.4 – CRITÉRIOS DE QUALIDADE**

Conforme a legislação vigente, é permitido o corte com destilados de igual natureza unicamente na proporção necessária para conduzir o teor de impurezas, “não álcool”, até os limites admitidos.<sup>6,7</sup>

Um aspecto incorreto nas legislações vigentes é o emprego da denominação impurezas para referir-se aos produtos secundários; uma vez que, esses componentes, além de associados ao processo produtivo, são responsáveis pelo aroma e sabor da aguardente.<sup>5</sup>

## **2.5 – ADITIVOS INCIDENTAIS**

### **2.5.1 –Álcool metílico**

O produto não poderá conter álcool metílico em quantidade superior a 0,25 mL por 100 mL de álcool anidro.<sup>6,7</sup>

### **2.5.2 – Cobre**

O produto não poderá conter cobre em quantidade superior a 5 mg/L.<sup>6,7</sup>

## **2.6 – PESOS E MEDIDAS**

Será obedecida a legislação federal específica em vigor.<sup>6,7</sup>

## **2.7 – ROTULAGEM**

Deverão ser obedecidas as normas estabelecidas pelo Decreto Nº 2.314, 04 de setembro de 1997 e a legislação complementar.<sup>6,7</sup>

## **2.8 – AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE ANÁLISES**

**2.8.1** – Os métodos oficiais de amostragem são aqueles estabelecidos Decreto Nº 2.314, 04 de setembro de 1997.<sup>6,7</sup>

**2.8.2** – Os métodos oficiais de análises serão estabelecidos em Atos Administrativos do Ministério da Agricultura.<sup>6,7</sup>

## **2.9 – DISPOSIÇÕES GERAIS**

Os casos omissos serão resolvidos por Atos Administrativos do Ministério da Agricultura.<sup>6,7</sup>

## **3 – ASPECTOS TOXICOLÓGICOS**

Para se garantir uma aguardente de qualidade é essencial a eliminação ou estabelecimento de limites mínimos para algumas substâncias químicas e metais nocivos ao homem.

### **3.1 – Metanol**

Encontrado em maior proporção na “cabeça” do destilado, o que torna de grande importância uma correta separação desta fração da parte do destilado comercializada, não possui importância para o “flavour” da bebida.<sup>49,63</sup> A presença de metanol nas bebidas causa agressividade olfativa, além de ser prejudicial a saúde. O governo francês estabelece o limite de 0,1 g/L de metanol nos runs de Martinica.<sup>64</sup>

### 3.2 – Carbamato de etila

Sua formação ocorre em presença de cobre e a atividade microbiológica faz parte integrante deste processo. Estudos realizados no processamento de uísques demonstraram que, superaquecimentos localizados nos alambiques, a presença de compostos ureídicos ou glicosídeos cianogênicos e o cobre, são fatores determinados na formação de carbamato de etila.<sup>65,66,67</sup> A presença de etanol, cianeto e diacetil nas bebidas alcoólicas e a exposição à luz são responsáveis pela formação de carbamato de etila durante o seu armazenamento.<sup>68</sup> Segundo *Kodoma et al*, existe uma correlação positiva entre os teores de uréia no mosto e a presença de carbamato de etila em vinhos. Derivados ácidos da urease vem sendo utilizados na redução de uréia nos mostos com a finalidade de reduzir os níveis de carbamato de etila.<sup>69</sup>

Têm-se sugerido a ação carcinogênica de carbamato de etila em ratos, onde doses diárias de 100 µg/kg de peso corpóreo acarretam um aparente aumento na incidência de tumores malignos, leucemia e mortes.<sup>65,66,68</sup>

A legislação brasileira não apresenta padrões de qualidade para carbamato de etila. Não existem dados sobre a presença de carbamato de etila em bebidas alcoólicas produzidas e consumidas no Brasil.<sup>4</sup>

### 3.3 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Hidrocarbonetos policíclicos, benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, fenantreno e naftaleno vem sendo encontrados em aguardentes de cana no Brasil numa concentração de 0,27-0,5 ppb. A presença de destes compostos é atribuída a queima dos canaviais e a contaminação de cana antes da colheita. Os hidrocarbonetos policíclicos, especialmente, os benzo(a)pireno, tem atividade comprovadamente carcinogênica em ratos de laboratório.<sup>70</sup>

Países como Alemanha, Áustria e Polônia estabeleceram um limite de 1,0 ppb para estes produtos em alimentos cárneos. No Brasil, não foram estabelecidos limites para presença destes compostos em bebidas e alimentos.<sup>70</sup>

### 3.4 – Metais

A presença de metais em bebidas é atribuída ao uso de aparelhos de destilação construídos de sucata ou recuperados com solda<sup>16</sup>. O cobre é o principal contaminante na aguardente, mas já foram também detectadas as presenças de ferro, zinco, cádmio e chumbo.

A presença de níveis elevados de cobre traz como , lesões em vasos capilares, no fígado e nos rins, além da “doença de Wilson” que é causada pelo acúmulo de

cobre nos tecidos. Os níveis de cobre devem ser reduzidos ao mínimo ou eliminados da aguardente.<sup>16,71,72</sup> A presença de cobre de até 5 mg/L (limite máximo tolerado em aguardente de cana) não deve constituir um fator de alarde para os que consomem até 120 mL de aguardente diariamente (4 doses), pois o organismo humano necessita de cobre em pequenas quantidades. Entretanto, outras fontes de cobre na dieta diária devem ser levadas em consideração para que não haja um excedente de cobre no organismo.<sup>4</sup>

A presença de cobre na aguardente, mesmo dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (5 mg/L), é um fator que dificulta a sua exportação<sup>73</sup>, pois a legislação de alguns países não tolera mais que 2 mg/L nos destilados alcoólicos.<sup>74</sup>

## **V – AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES**

Os procedimentos analíticos são geralmente constituídos de várias etapas: amostragem, preparação da amostra, separação, quantificação, avaliação estatística e decisão; sendo cada uma destas etapas crítica para obtenção de dados corretos.<sup>21</sup>

A amostragem inclui a decisão do lugar onde coletar amostras que definam o objetivo ou problema a ser caracterizado e a escolha do método adequado para obtenção de amostras em quantidade suficiente para realização das análises. A etapa de preparação da amostra é necessária para isolar os compostos de interesse presentes na matriz e concentrar os analitos em níveis adequados para se realizar análises.<sup>21</sup>

Na etapa de separação, a mistura isolada da amostra matriz contendo os analitos de interesse é dividida em seus constituintes, normalmente por técnicas cromatográficas ou eletroforéticas. A identificação de compostos desconhecidos em cromatografia é baseada na comparação do tempo de retenção dos compostos de interesse com o de padrões nas mesmas condições. Porém, é necessário cautela neste procedimento, uma vez que, compostos diferentes podem ser co-eluídos e apresentar o mesmo tempo de retenção. Nestes casos, a confirmação deve ser feita por espectrometria de massa para evitar a possibilidade de erros. A etapa de avaliação estatística dos resultados fornece uma estimativa da concentração dos compostos na amostra para decisões na avaliação do procedimento analítico.<sup>21</sup>

É importante enfatizar que estas etapas analíticas são sucessivas e erros cometidos em qualquer uma das etapas deverão resultar em uma má execução do procedimento. A velocidade de todo procedimento analítico é determinada pela etapa mais lenta e aumentar a velocidade de uma única etapa isoladamente pode não resultar em um aumento significativo da velocidade do processo. Todas as etapas devem ser consideradas para se conseguir um aumento de velocidade da análise.<sup>21</sup>

Um instrumento ideal para análises seria aquele em que todas as etapas analíticas fossem realizadas sem a intervenção humana e de preferência diretamente no local de amostragem. Embora tais aparelhagens ainda não tenham sido construídas, instrumentos atualmente utilizados como os cromatógrafos gasosos acoplados à espectrômetros de massa já se aproximam desta realidade, podendo separar e quantificar misturas complexas e automaticamente aplicar métodos quimiométricos para avaliação estatística dos resultados.<sup>21</sup>

Apesar dos avanços nas técnicas de separação e quantificação, algumas amostragens e práticas de preparação de amostras realizadas ainda hoje, são baseadas em tecnologias do século XIX, como o método de extração por Soxhlet. Os métodos tradicionais de preparação são trabalhosos e envolvem várias etapas que resultam muitas vezes em perdas do analito. Estes procedimentos além de consumir solventes orgânicos tóxicos geralmente representam um gasto de 80% em relação ao tempo total para se realizar as análises e impedem o refinamento e a automação das análises.<sup>21</sup>

Uma melhoria substancial nesta área deverá proporcionar economias de tempo e mudanças convenientes que levem a diminuição do uso de solventes orgânicos. Estas mudanças devem começar com a conscientização dos riscos causados pelo uso de determinados solventes, incluindo a destruição da camada de ozônio e efeitos carcinogênicos.<sup>21</sup>

Esta é uma oportunidade para a comunidade científica corrigir os problemas causados pelos métodos atuais de preparação de amostra e formular práticas novas e alternativas em que os solventes orgânicos não sejam utilizados. Um novo método de preparação de amostra, deve ter eficiência, seletividade, aplicabilidade a vários compostos e matrizes. Deve ainda, permitir simples automatização e realização de análises de campo. Uma técnica de preparação de amostra ideal deve ser de uso fácil, baixo custo e compatível com uma grande variedade de instrumentos analíticos.<sup>21</sup>

## **VI - TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRA SEM O USO DE SOLVENTES**

O princípio de operação de qualquer método de preparação é a partição do analito entre a amostra matriz e uma fase de extração. Algumas técnicas de preparação de amostra que utilizam pouco ou nenhum solvente orgânico têm estado disponíveis há algum tempo. Estas técnicas podem ser classificadas de acordo com a fase de extração, que pode ser gasosa, por membrana ou com algum material capaz de reter os compostos de interesse (sorvente).<sup>21,22</sup>

## 1 – EXTRAÇÃO EM FASE GASOSA

Os métodos de preparação de amostra em fase gasosa, tais como amostragem em espaço confinado (headspace) e extrações “purge e trap” e em fluido supercrítico, tem como característica comum a partição do analito entre a amostra matriz e uma fase gasosa. Durante a partição, os compostos voláteis são separados dos compostos de alto peso molecular, favorecendo o uso do método na análise dos analitos mais voláteis.<sup>21,22</sup>

A amostragem em espaço confinado tem sido largamente utilizada para análise de compostos voláteis porque a fase de extração (ar, hélio ou nitrogênio) é compatível com a maioria dos instrumentos analíticos, como os cromatógrafos gasosos. No procedimento de amostragem em espaço confinado estático, a amostra é equilibrada com sua fase gasosa e então um volume pequeno e definido desta fase é injetado diretamente em um cromatógrafo gasoso. Assumindo que há um equilíbrio de partição entre o espaço confinado e a amostra, a quantidade de analito transferida para o instrumento é proporcional ao volume da fase gasosa, à constante de Henry, e à concentração do analito na amostra. A técnica de amostragem em espaço confinado estático é provavelmente a mais simples e a mais freqüentemente aplicada em métodos de preparação sem o uso de solvente, particularmente em análises de campo.<sup>21,22</sup>

A amostragem em espaço confinado estático, vem sendo utilizada há várias décadas para análise de compostos orgânicos voláteis (COV) em alimentos, bebidas, análises clínicas, monitoramento ambiental ou outros tipos de análise. Entretanto, a amostragem em espaço confinado apresenta a desvantagem de não permitir a realização de extrações exaustivas, exceto em casos de gases muito voláteis, requerendo cuidadosa calibração.<sup>21,22,23</sup>

A extração em espaço confinado dinâmico permite remoção quantitativa dos COV. A técnica “purge e trap”, uma das formas de extração em espaço confinado dinâmico, permite a análise de COV em matrizes aquosas. Nesta técnica, primeiramente um gás é passado através da amostra para remover os COV da matriz. Em seguida, os compostos são coletados quantitativamente através de um trap resfriado ou sorvente. A formação de espuma, as contaminações com analitos de análises anteriores e as velocidades de fluxo que são incompatíveis com a operação são fatores que dificultam o desempenho deste método.<sup>21,22,23</sup>

Para superar a limitação dos métodos de separação em espaço confinado em análises de COV, estes podem ser utilizados em matrizes aquecidas o que permite a dessorção térmica de compostos orgânicos menos voláteis e análises de matrizes sólidas. O aquecimento é particularmente importante em análises de amostras contendo sólidos, que podem impedir a extração dos analitos orgânicos por retenção. Entretanto, analitos termicamente instáveis e a alta umidade contida na mistura do gás dessorvido freqüentemente impedem o uso da dessorção térmica.<sup>21,22,23</sup>

A Extração em Fluido Super Crítico (EFSC), utiliza líquidos como dióxido de carbono à alta pressão como uma fase de extração o que possibilita a remoção de compostos menos voláteis à temperatura ambiente. Esta técnica possui algumas características atrativas porque o líquido utilizado como extrator nesta condição adquire propriedades físico-químicas intermediárias entre os gases e líquidos. Entretanto, a EFSC requer um sistema de alta pressão e uma larga quantidade de dióxido de carbono purificado aumentando o custo do método. Como a EFSC permite a extração de compostos não voláteis à temperatura ambiente, ela é útil para análise de analitos e matrizes termicamente instáveis, como gêneros alimentícios.<sup>21,22</sup>

## 2 - EXTRAÇÃO POR MEMBRANA

O método de extração por membrana é constituído de dois processos seqüenciais. Inicialmente os analitos são extraídos da amostra matriz para o material polimérico da membrana e em seguida são extraídos da membrana por uma fase extratora. Este método vem sendo desenvolvido nas últimas três décadas para aplicação em espectroscopia de massa, mas poucas informações são disponíveis no seu uso para preparação de amostra para cromatografia. No passado, o gás nitrogênio foi utilizado como gás extrator para transferir os analitos permeados na superfície de uma membrana polimérica plana para uma camada de carvão ativado, sendo depois dessorvidos em um cromatógrafo gasoso. Embora tenha sido feito o uso de membranas em lâminas no início do desenvolvimento desta técnica, os trabalhos mais recentes de extração por membrana fazem o uso de fibras ocas. Estas fibras são facilmente utilizadas porque as fibras ocas são o próprio suporte, uma vez que são construídas com o material polimérico extrator dispensando assim o uso do suporte. Em comparação com métodos de extração por membranas em lâminas e em espaço confinado, as fibras ocas apresentam uma maior área de superfície de contato para um volume de gás extrator, o que permite uma maior eficiência na extração. A extração por membrana pode ser combinada diretamente a um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa para monitoramento contínuo.<sup>21,22</sup>

Há vários modelos de membranas que podem ser utilizados em análises de ar, água e espaço confinado de solos. O transporte dos analitos através da membrana torna o processo de preparação da amostra mais seletivo e, como no método em espaço confinado, protege a coluna cromatográfica de compostos com altos pesos moleculares, com a vantagem adicional de concentração dos compostos de interesse em um material sorvente.<sup>21,22</sup>

A extração por membrana não é limitada apenas a análises de compostos voláteis. A extração de compostos de alto peso molecular pode ser realizado utilizando temperaturas mais altas ou com membranas microporosas. A técnica também pode ser aplicada análises de compostos semivoláteis com o uso de um gás à alta pressão como fase extratora.<sup>21,22</sup>

O método de extração por membrana apresenta como desvantagens respostas lentas da membrana para mudanças de concentração e uma limitada capacidade para análise de compostos polares devido a falta de disponibilidade comercial de membranas porosas polares. Esta situação deve ser contornada nos próximos anos devido ao rápido progresso nas pesquisas em materiais poliméricos.<sup>21,22</sup>

### **3 - EXTRAÇÃO POR SORVENTE**

A utilização de materiais adsorventes para extração de traços de compostos orgânicos de soluções aquosas vem sendo desenvolvida há bastante tempo e sua aplicação tem sido extensivamente revisada. Atualmente os sorventes podem ser utilizados para extrair compostos orgânicos de água, ar e mesmo de solos. Sorventes com forte afinidade a um determinado composto orgânico podem reter e concentrar este composto de soluções aquosas ou gasosas bastante diluídas. Muitos sorventes são especificamente adequados para extração de diferentes grupos de compostos orgânicos com vários graus de seletividade.<sup>21,22</sup>

A Extração em Fase Sólida (EFS) é uma das técnicas de extração por sorvente mais comumente utilizada. Nesta técnica os analitos são extraídos junto com os compostos interferentes através da passagem da matriz aquosa por um cartucho de plástico ou a superfície de uma membrana contendo o sorvente adequado dispersado em um suporte particulado. Em seguida, um solvente seletivo é utilizado para remover primeiro as interferências, e então, um outro solvente é escolhido para lavar e remover os analitos de interesse. A EFS possui características atrativas, como simplicidade, baixo custo e uso de pequena quantidade de solvente comparada com as tradicionais técnicas de extração.<sup>21,22</sup>

Apesar de suas vantagens, a EFS possui algumas limitações, como baixa recuperação que resulta de interações entre a amostra matriz e analitos, além de entupimento dos cartuchos ou bloqueamento dos poros do sorvente por compostos sólidos ou oleosos que resultam em baixo fluxo e em baixa capacidade. A EFS é ainda limitada para compostos semivoláteis com temperaturas de ebulição pouco acima dos solventes.<sup>21,22</sup>

Uma das soluções para estas limitações seria a melhoria na geometria da fase extratora que pode ser conseguida pelo revestimento de finas hastes como fibras de sílica fundida ou feitas de material apropriado, com o material sorvente. A adoção desta nova geometria do suporte do material sorvente resultou na técnica de Microextração em Fase Sólida (MEFS).<sup>21,22</sup>

### **VII - MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

A Microextração em Fase Sólida (MEFS) é uma técnica de preparação de amostras, introduzida por Pawliszyn e Belardi a partir de 1989, em que se faz o uso de fibras finas de sílica fundida revestidas com finas camadas de um polímero

seletivo (que pode ser sólido ou líquido) capaz de extrair compostos orgânicos diretamente ou indiretamente da amostra aquosa para o instrumento de análise.<sup>21,22,23</sup>

O transporte dos analitos da amostra matriz para o revestimento da fibra começa tão logo a fibra é colocada em contato com a amostra. Considera-se que a extração está completa quando há um equilíbrio de distribuição entre a amostra matriz e o revestimento da fibra. Na prática, isto significa que quando o equilíbrio é alcançado a quantidade de analitos extraída é constante, dentro dos limites dos erros experimentais, e é independente do aumento do tempo de extração. A velocidade de extração é controlada pela massa do analito transportada da amostra matriz ao revestimento da fibra.<sup>21,22,23</sup>

As condições de equilíbrio podem ser descritas pela Equação 1:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

onde  $n$  é massa do analito retida no revestimento da fibra;  $V_f$  e  $V_s$  são os volumes do revestimento e da amostra;  $K_{fs}$  é o coeficiente de partição do analito entre o revestimento e a amostra matriz e  $C_0$  é a concentração inicial do analito na amostra.<sup>21,22,23</sup>

A Equação 1 indica uma relação linear entre a quantidade de analito absorvida pelo revestimento da fibra e a concentração inicial deste analito na amostra. Esta é a base para quantificação do analito. Entretanto, como a MEFS é uma técnica de equilíbrio de extração, os analitos não são extraídos exaustivamente, eles são removidos em quantidades tão pequenas, que provavelmente não resulta em grandes distúrbios. Extrações completas podem ser realizadas para pequenos volumes de amostra quando as constantes de distribuição são razoavelmente altas, o que é vantajoso se extrações exaustivas são requeridas. O uso de pequenos volumes de amostra na etapa de preparação é a principal vantagem da MEFS, quando comparada aos métodos tradicionais de extração.<sup>21,22,23</sup>

A amostragem da MEFS pode ser realizada através de extrações direta, indireta no espaço confinado e direta com proteção de membrana. Na extração direta, a fibra revestida é inserida diretamente na amostra e os analitos são transportados diretamente da amostra matriz para a fase extratora. Para facilitar o processo de extração, deve-se utilizar agitação para favorecer o transporte dos analitos da solução para as vizinhanças da fibra. Nas amostras gasosas, as convecções naturais de ar são suficientes para facilitar o equilíbrio rápido. Já nas matrizes aquosas, técnicas mais eficientes como o uso de ultra-som são necessárias.<sup>21,22,23</sup>

O tempo de extração pode ser substancialmente reduzido através da amostragem indireta realizada no espaço confinado acima da amostra, no lugar da amostragem direta da solução aquosa, uma vez que a difusão do analito em fase gasosa é maior que em fase aquosa.

Esta condição pode ser descrita através da Equação 2:

$$n = \frac{C_0 V_1 V_2 K_1 K_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad (2)$$

onde  $n$  é a massa do analito retida no revestimento da fibra;  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  são os volumes do revestimento, da solução aquosa e do espaço confinado respectivamente;  $K_1$  o coeficiente de partição do revestimento e o espaço confinado e  $K_2$  o coeficiente de partição do espaço confinado e a solução aquosa. Na MEFS em espaço confinado, a transferência de massa do analito presente na solução aquosa pode ser feita mais rapidamente por agitação contínua da solução. A agitação de soluções aquosas não faz muita diferença no tempo de equilíbrio de compostos com altos valores de  $K_2$  e pequenos de  $K_1$ , ou seja, compostos mais voláteis.<sup>21,22,23</sup>

A grande vantagem deste modo de extração é a proteção do revestimento da fibra de compostos com altos pesos moleculares e outros compostos interferentes presentes na amostra matriz, como materiais húmicos e proteínas. A extração em espaço confinado também permite modificações da matriz, como mudanças de pH e adição de sais sem o risco de danificar a fibra.<sup>21,22,23</sup>

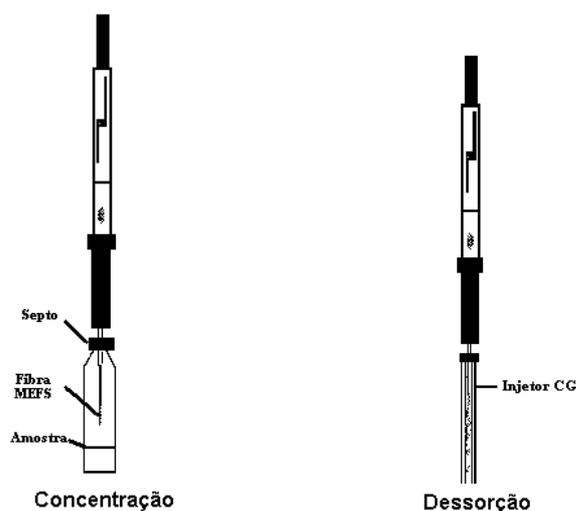
A temperatura tem um efeito significativo na cinética do processo determinando a pressão de vapor dos analitos. O tempo de equilíbrio para voláteis é menor em amostragens em espaço confinado do que em amostragens diretas em condições semelhantes de agitação. Isso acontece porque uma porção substancial dos analitos já está presente na fase gasosa antes do início da extração e também, porque o coeficiente de difusão em fase gasosa é normalmente quatro vezes maior do que em meio líquido. Já para os compostos semivoláteis, que possuem uma concentração muito pequena em fase gasosa na temperatura ambiente, a velocidade de transferência de massa é bem menor, necessitando de tempos de extração maiores. Este problema pode ser contornado com a utilização de agitações eficientes ou aumentando a temperatura de extração, uma vez que, com o aumento da temperatura, mais analitos vão passar da matriz para o espaço confinado, num processo que resulta em alta concentração do analito no espaço confinado e favorece o processo de extração. O aquecimento com microondas, pode também produzir correntes convectivas na amostra que melhoram o transporte do analito da matriz para o revestimento. Entretanto, a altas temperaturas, o coeficiente de partição do revestimento da fibra e o espaço confinado decresce, uma vez que o processo de adsorção ou absorção dos analitos no filme da fibra é exotérmico e, portanto, favorecido em temperaturas mais baixas.<sup>21,22,23</sup>

Como modo alternativo de extração, a extração direta com proteção de membrana tem o propósito de proteção da fibra, como nas amostragens em espaço confinado, quando amostras muito sujas (complexas) são analisadas. A proteção por membrana é vantajosa para determinação de analitos não muito voláteis que não permitam amostragens em espaço confinado. Em adição, a membrana pode ser feita de material apropriado que permita um certo grau de seletividade no processo de extração. A cinética de extração com proteção de membrana é

substancialmente mais lenta do que nas extrações diretas, porque os analitos precisam primeiro atravessar a membrana antes de chegar ao revestimento da fibra. O uso de membranas finas e o aumento da temperatura de extração deve resultar em menores tempos de extração.<sup>21,22,23</sup>

## 1 – EXTRAÇÃO

Os parâmetros experimentais mais importantes como a velocidade, a sensibilidade, a exatidão e precisão da técnica de MEFS são determinados basicamente durante a extração que é feita através da exposição direta ou indireta do filme polimérico que reveste a fibra adaptada a uma seringa, conforme é demonstrado pela FIG. 4<sup>22,75</sup>.



**FIGURA 4** – Ilustração do procedimento de MEFS<sup>76</sup>

Como matriz e revestimento estão competindo pelo analito, a afinidade do revestimento para com o analito alvo é muito importante na amostragem. Para os compostos orgânicos, o princípio básico de “semelhante dissolve semelhante” é aplicado. Uma variedade de sorventes tem sido utilizados na MSFS, os revestimentos polares como poliacrilato e carbowax são efetivos na extração de compostos polares como fenóis e ácidos carboxílicos, enquanto revestimentos apolares como polimetilsiloxano são mais adequados para extração de hidrocarbonetos.<sup>22,75</sup>

A sensibilidade do método é determinada por fatores que influenciam a quantidade do analito extraída, como: o volume do revestimento, as características físico-químicas do revestimento, a derivatização do analito alvo, a modificação das matrizes, o aquecimento da amostra e o resfriamento da fibra. A sensibilidade é melhorada com o aumento do volume do revestimento da fibra, que pode ser feita através do aumento de sua espessura ou pelo aumento do comprimento da fibra, ou ambos. Em geral, fases mais espessas mostram maior capacidade de extrair os compostos orgânicos. Entretanto, a redução da

espessura do filme de revestimento produz uma fase retida mais estável a altas temperaturas e permite a análise de compostos com maiores pontos de ebulição. Para compostos orgânicos não polares ou moderadamente polares, os revestimentos convencionais são capazes de extrair os analitos da amostra a nível de picogramas.<sup>22,75</sup>

A derivatização pode ser empregada para facilitar o processo de extração, aumentando o coeficiente de partição entre a solução que contém o analito e o revestimento através da redução de polaridade. A derivatização de compostos como fenóis e ácidos carboxílicos, aumenta o coeficiente de partição e ainda melhora a separação cromatográfica. A derivatização do analito pode ser feita em sua matriz aquosa ou pela dopagem da fibra com reagente apropriado para a derivatização.<sup>22,75</sup>

A natureza da matriz pode ser modificada para influenciar o coeficiente de partição revestimento/matriz. Através da adição de um sal como cloreto de sódio ou sulfato de sódio na amostra aquosa, a força iônica da solução aquosa pode ser aumentada, aumentando a partição dos compostos orgânicos não iônicos no polímero do revestimento. As formas neutras dos analitos são mais eficientemente extraídas por revestimentos poliméricos não iônicos, nestes casos o pH da amostra aquosa deve ser ajustado para prevenir a ionização do analito.<sup>22,75</sup>

A velocidade da extração dos analitos menos voláteis é determinada pela eficiência com que a amostra é agitada. Para métodos de agitação mais práticos, como agitação magnética, o tempo de equilíbrio é de 2-60 minutos, dependendo da velocidade de agitação e do coeficiente de partição. Com o uso de ultra-som o tempo de equilíbrio pode ser reduzida para aproximadamente um minuto. No equilíbrio, o método de amostragem de MEFS tem o máximo de sensibilidade, mas em termos práticos, o tempo de extração pode ser encurtado dependendo da sensibilidade requerida na análise.<sup>22,75</sup>

## 2 – DESSORÇÃO

O procedimento de dessorção tem grande influência na qualidade dos dados obtidos e a utilização de todo potencial da MEFS, uma vez que a dessorção dos analitos no injetor, está muito relacionada com a eficiência da separação cromatográfica e a precisão da quantificação.<sup>22</sup>

A dessorção térmica do analito sorvido pelo revestimento da fibra na maioria dos casos é bastante efetiva. Esta facilidade de dessorção se deve ao fato de que em temperaturas mais altas o coeficiente de partição revestimento/gás decresce e a habilidade do revestimento de reter os analitos diminui rapidamente. O fluxo do gás de arraste dentro do injetor do cromatógrafo também facilita a remoção do analito do revestimento. Para compostos voláteis e semi-voláteis, os analitos podem ser dessorvidos do revestimento em temperaturas entre 150-240<sup>o</sup>C em frações de segundo, concentrando-se no início da coluna cromatográfica. A dessorção de compostos com maiores pesos moleculares pode ser um problema,

uma vez que o revestimento da fibra não pode ser aquecido à temperaturas maiores que 300°C.<sup>22</sup>

### **3 – ANÁLISES**

Como a quantidade de analito extraída de um amostra em condições semelhantes deve ser diretamente proporcional a sua concentração na amostra, é esperada uma resposta linear para as análises de MEFS. O procedimento de calibração é realizado através de padrões dos analitos de interesse em matriz semelhante a da amostra. Como a MEFS depende fortemente de alguns parâmetros básicos, como pH e concentração de sais, é necessário um estudo prévio para otimização de tais parâmetros, incluindo também determinações dos melhores tempos de adsorção e dessorção. Caso os efeitos de matriz não sejam totalmente reprodutíveis é recomendado o uso de um padrão interno.<sup>75</sup>

## **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

### **I – ANÁLISE FÍSICO- QUÍMICAS**

Neste trabalho foram analisadas amostras de aguardentes artesanais, produzidas no interior de Minas Gerais, nas cidades de Lavras, São João Del Rey, Nova União, Betim, Brumadinho, Abre Campo, Pirapora e aguardentes industriais produzidas em São Paulo. As referências a cada aguardente serão feitas através de códigos nas citações de amostras e dos resultados em todo trabalho.

### **II - ANÁLISES DAS AGUARDENTES UTILIZANDO O MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

#### **1 – REAGENTES**

Foram utilizados como reagentes: diclorometano (QM 99,5%), pentano (Synth 99%), acetato de etila (Merck 99,5%), 1-propanol (Polyscience 99%), isobutanol (Merck 99%), 1-butanol (Polyscience 99%), álcool isoamílico (Merck 99%), etanol (Merck 99%), cloreto de sódio (Merck 99,5%) e sulfato de sódio anidro (Merck 99%). A água utilizada no preparo das soluções foi purificada pelo sistema MILLI-Q Waters.

#### **2 - APARELHAGEM**

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo Hewlett Packard 5890 série II, equipado com um injetor split/splitless e um detetor de ionização por chama. As primeiras análises foram feitas nas seguintes condições: coluna cromatográfica capilar de sílica fundida HP-FFAP (25m x 0,2mm x 0,33 $\mu$ m), hidrogênio com fluxo de (0,7mL/min), temperaturas do injetor de 150 °C e do detetor de 250 °C. As injeções foram feitas em modo split 1:15 e splitless com purga fechada por 1,5 minutos e o volume de injeção foi de 1,0  $\mu$ L. As programações de temperatura da coluna foram: 60 °C (5 min), 1 °C/min até 100 °C (3 min) e 15 °C/min até 180 °C(3 min) e 60 °C (10 min) e 10 °C/min até 190 °C.

Para as análises de quantificação foi utilizada a coluna capilar de sílica fundida HP-INNOWAX (50m x 0,2mm x 0,4 $\mu$ m). A programação de temperatura na coluna para estas análises foi de 40 °C (5 min), 5 °C/min até 100 °C, 10 °C/min até 240 °C (20 min). As temperaturas do injetor e detetor foram respectivamente de 240 e 280 °C. As injeções foram feitas sem divisão de fluxo (splitless) e com

purga fechada por três minutos. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 0,66 mL/min.

### **3 – OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

Inicialmente foram realizadas algumas análises cromatográficas das aguardentes em injeção direta sem nenhuma preparação. Entretanto, a injeção direta da aguardente não é muito recomendada pois pode danificar a fase estacionária da coluna devido a grande quantidade de água na bebida.

Com base na literatura foram testadas misturas de pentano e diclorometano para extração dos compostos secundários da aguardente<sup>3</sup>. As aguardentes foram submetidas à extração com misturas de pentano e diclorometano nas proporções 1:2, 2:1, 1:1; a 5% e 20% de pentano em diclorometano e com diclorometano puro. Foram testadas também as proporções 3:1, 4:1 e 5:1 entre os volumes de aguardente e diclorometano.

As extrações foram realizadas com adição de cloreto de sódio suficiente para saturação. O tempo de extração também foi variado em 30 minutos e três horas a título de comparação.

### **4 - DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO DA ANÁLISE UTILIZANDO O MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

A precisão da análise utilizando o método de ELL foi avaliada pelo coeficiente de variação ou desvio padrão relativo das áreas relativas ao ponto médio da curva de calibração. Assim, foram feitas extrações e injeções por sete vezes consecutivas da solução correspondente ao ponto médio da curva de calibração.

Os resultados deste procedimento estão apresentados na página 48, TAB. 7.

## 5 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILA NAS AGUARDENTES POR CG UTILIZANDO O MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Buscando a quantificação de alguns componentes secundários, os álcoois 1-propanol, isobutanol e isoamílico e o éster acetato de etila foram identificados nas amostras através da comparação dos tempos de retenção dos padrões desses compostos com os tempos de retenção dos componentes das aguardentes.

Foram preparadas uma solução estoque constituída de acetato de etila 447,8 ppm, 1-propanol 652,7 ppm, isobutanol 396,0 ppm e álcool amílico 1283,0 ppm e uma outra solução estoque do padrão interno, 1-butanol<sup>10</sup>, 1137,9 ppm. Para o preparo da primeira solução foram adicionados 50,00 µL de acetato de etila, 82,00 µL de 1-propanol, 50,00 µL de isobutanol e 160,00 µL de álcool isoamílico em solução aquosa de etanol 50% em um balão volumétrico de 100,00 mL e para a segunda 70,00 µL de 1-butanol em solução aquosa de etanol 50% em balão volumétrico de 50,00 mL. A utilização do 1-butanol como padrão interno foi feita após a confirmação da não existência desse álcool nas amostras de aguardentes.

As curvas de calibração foram construídas com as áreas em função das concentração de cada analito. Para construção da curva de calibração foram preparadas soluções com alíquotas de 1,00; 5,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mL da solução estoque e 3,00 mL da solução do padrão interno em solução aquosa de etanol a 50%. O volume de solução aquosa de etanol adicionado em cada uma destas soluções foi o necessário para manter constante a proporção de 4:1 entre o volume das soluções padrões e o volume de diclorometano, sendo mantido constante em 28,00 mL em todos os casos. Em todas soluções foi adicionado 3,0 g de cloreto sódio. As amostras foram agitadas em um multi-agitador magnético em frascos de 50 mL devidamente fechados por 30 minutos e para separação das fases orgânicas e aquosas foram utilizados funis de decantação de 50 mL. Após a separação, a fase orgânica foi armazenada em frasco de 50 mL sendo adicionado de 1,0 g de sulfato de sódio anidro para eliminação de água. As análises cromatográficas foram realizadas com 1,00 µL da fase orgânica.

O mesmo procedimento de extração foi utilizado no preparo dos extratos das aguardentes.

As soluções utilizadas para construção da curva de calibração e as amostras foram extraídas e analisadas em duplicata. A concentração de álcoois superiores e acetato de etila foram determinados nas aguardentes a partir da curva de calibração; sendo também calculados para as correspondentes curvas, as equações de regressão e coeficientes de correlação de cada analito. Os resultados deste procedimento estão apresentados na página 49, TAB. 8.

### **III - ANÁLISES DAS AGUARDENTES UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MEFS)**

#### **1 – REAGENTES E EQUIPAMENTOS**

Todos os reagentes utilizados nas análises cromatográficas anteriores foram novamente utilizados, acrescentando o uso de álcool amílico (Merck 99%) e 2-furfuraldeído (Aldrich 99%). Para realização da microextração foi necessário o uso da seringa manual (Supelco) apropriada para adaptação da fibra de extração. A fibra utilizada foi a de fase de poliacrilato com 85 µm de espessura de filme (Supelco). Para aquecimento das amostras e soluções padrão foi utilizado um tarugo de alumínio revestido com uma fita de aquecimento com temperatura controlada por um termostato. As extrações foram realizadas em frascos apropriados para análises em espaço confinado (Supelco).

#### **2 - APARELHAGEM**

O equipamento, a coluna cromatográfica, a programação de temperatura na coluna e as temperaturas do injetor e detector foram as mesmas utilizadas nas análises cromatográficas de quantificação através de ELL. As injeções foram feitas sem divisão de fluxo (splitless) e com purga fechada por três minutos. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 0,66 mL/min, o fluxo split foi de 30 mL/min e a pressão na cabeça da coluna de 25 psi.

#### **3 - PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MEFS)**

As análises foram realizadas em frascos apropriados para análises em espaço confinado de 20 mL com septos de borracha butílica faceados com teflon e fechados com tampas metálicas. A fibra utilizada foi devidamente adaptada à seringa manual para MEFS e condicionada no injetor do cromatógrafo a 300 °C durante cinco horas antes da primeira extração. O tempo de condicionamento da fibra para extrações posteriores foi de 30 minutos.

A extração e pré-concentração dos padrões e amostras foram realizadas utilizando o procedimento de amostragem em espaço confinado estático, seguida de dessorção térmica dentro do injetor, FIG. 4 (página 32).

Para otimização das condições de análises de MEFS foi preparada uma única solução estoque constituída de acetato de etila 895,5 ppm, 1-propanol 636,8 ppm, isobutanol 316,8 ppm, 1-butanol 325,1 ppm, álcool isoamílico 200,5 ppm, álcool amílico 200,5 ppm e 2-furfuraldeído 103,4 ppm. Para o preparo desta

solução foram adicionados 50,00  $\mu\text{L}$  de acetato de etila, 40,00  $\mu\text{L}$  de 1-propanol, 20,00  $\mu\text{L}$  de isobutanol, 20,00  $\mu\text{L}$  de 1-butanol, 12,50  $\mu\text{L}$  de álcool isoamílico, 12,50  $\mu\text{L}$  de álcool amílico e 4,50  $\mu\text{L}$  de 2-furfuraldeído em solução aquosa de etanol 50% em balão volumétrico de 50,00 mL. A solução de padrões utilizada nas análises foi preparada com uma alíquota de 3,75 mL desta solução estoque diluída em água para balão volumétrico de 50,00 mL. Nas extrações foram tomados 10,00 mL desta solução diluída e a este volume foi acrescentado 2,5 g de cloreto de sódio.

Os padrões, álcool amílico e 2-furfuraldeído, foram acrescentados na otimização das condições de análise da MEFS pois acreditava-se na maior capacidade de extração destes compostos pela fibra caso estivessem presentes nas aguardentes.

#### **4 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MEFS**

Para uma maior eficiência da MEFS, foram otimizados os tempos de adsorção e dessorção da fibra, a massa de cloreto de sódio adicionada para facilitar a extração e a temperatura de extração.

##### **4.1 - OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE ADSORÇÃO**

Foram tomadas alíquotas de 10,00 mL da solução diluída e acrescentados 2,5 g de cloreto de sódio em cada alíquota. Cada alíquota deixada em contato indireto com a fibra para concentração dos padrões por 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A temperatura de extração foi mantida constante a 60  $^{\circ}\text{C}$  e o tempo de dessorção no injetor foi de três minutos. Este procedimento foi realizado em triplicata. Os resultados deste procedimento estão apresentados nas páginas 50-51, FIG. 9 e FIG. 10.

##### **4.2 - OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO**

Como no procedimento de adsorção, foram tomadas alíquotas de 10,00 mL da solução diluída e acrescentados 2,5 g de cloreto de sódio. Foram mantidos fixos o tempo de adsorção em 25 minutos e a temperatura de extração a 60  $^{\circ}\text{C}$ . As dessorções no injetor foram feitas por um, três, cinco, sete e dez minutos. Cada dessorção foi realizada em triplicata. Os resultados deste procedimento estão apresentados na página 52, TAB. 9 e FIG. 11.

#### **4.3 - OTIMIZAÇÃO DA MASSA DE CLORETO DE SÓDIO ADICIONADA NAS SOLUÇÕES A SEREM EXTRAÍDAS**

À alíquota de 10,00 mL da solução diluída foram acrescentados 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 g de cloreto de sódio. As extrações foram realizadas com tempos de adsorção e dessorção fixados em 25 e três minutos, respectivamente e a temperatura de extração foi mantida em 60 °C. Este procedimento foi também realizado em triplicata. Os resultados deste procedimento estão apresentados na página 53, FIG. 12 e FIG. 13.

#### **4.4 - OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO**

Soluções preparadas como no procedimento de adsorção e dessorção foram extraídas em tempos fixos de adsorção de 25 minutos e dessorvidas no injetor durante três minutos. As extrações foram feitas a 50, 60, 70 e 80 °C em triplicata para cada temperatura. Os resultados deste procedimento estão apresentados nas páginas 54-55, FIG. 14 e FIG. 15.

#### **4.5 – DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE AGUARDENTES**

As condições otimizadas para a microextração foram: tempos de adsorção e dessorção de 25 e três minutos, respectivamente, 2,5 g cloreto de sódio nas soluções a serem extraídas e temperatura de extração de 60 °C.

Inicialmente as amostras dos diferentes tipos de aguardentes foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas utilizadas no procedimento de otimização para a MEFS. Entretanto, foi necessário testar diluições diferentes com as amostras estas amostras devido a alta capacidade de concentração da fibra. A diluição mais adequada para as amostras foi a preparada com 4,00 mL de aguardente diluídos em água para balão volumétrico de 50,00 mL.

#### **5 - DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO DA ANÁLISE UTILIZANDO O MÉTODO DE MEFS**

A precisão da análise utilizando o método de MEFS foi avaliada pelo coeficiente de variação ou desvio padrão relativo das áreas relativas ao ponto médio da curva de calibração. Assim foram realizadas, extrações e injeções por sete vezes consecutivas da solução correspondente ao ponto médio da curva de calibração.

Os resultados deste procedimento estão apresentados na página 56, TAB. 11.

## **6 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILA NAS AGUARDENTES POR CG UTILIZANDO O MÉTODO DE MEFS**

Foram preparadas uma solução estoque constituída de acetato de etila 501,5 ppm, 1-propanol 652,7 ppm, isobutanol 320,0 ppm e álcool amílico 641,5 ppm em etanol 50% e uma outra solução estoque do padrão interno, 1-butanol<sup>3</sup>, 1001,4 ppm em etanol 50%. Para o preparo da primeira solução foram adicionados 28,00 µL de acetato de etila, 41,00 µL de 1-propanol, 20,20 µL de isobutanol e 40,00 µL de álcool isoamílico em solução aquosa de etanol 50% em balão volumétrico de 50,00 mL e da segunda 30,80 µL de 1-butanol em solução aquosa de etanol 50% em balão volumétrico de 50,00 mL.

As curvas de calibração foram construídas com as áreas em função da concentração de cada analito. As soluções utilizadas para construção da curva de calibração foram preparadas a partir de alíquotas de 1,00; 2,00; 3,00; 4,50 e 7,00 mL da solução estoque e 1,00 mL da solução do padrão interno diluídos em água para balão volumétrico de 50,00 mL. Para cada solução diluída foi tomada uma alíquota de 10,00 mL e acrescidos 2,5 g de cloreto de sódio antes da extração. As soluções das aguardentes foram preparadas com 4,00 mL de cada amostra e 1,00 mL da solução de 1-butanol diluídos em água para balão volumétrico de 50,00 mL. As extrações das aguardentes foram realizadas em alíquotas de 10,00 mL de suas soluções com adição de 2,5 g de cloreto de sódio.

As soluções utilizadas para construção da curva de calibração e as amostras foram extraídas e analisadas em duplicata. A concentração de álcoois superiores e acetato de etila foram determinadas nas aguardentes a partir da curva de calibração; sendo também calculados para as correspondentes curvas, as equações de regressão e coeficientes de correlação de cada analito.

Os resultados deste procedimento estão apresentados na página 58, TAB. 12.

## **IV - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS NAS AGUARDENTES ATRAVÉS DE CG/EM**

A análise para identificação dos constituintes das aguardentes foi realizada em um cromatógrafo a gás HP5890 série II equipado com detector seletivo de massas 5951. A temperatura da interface foi de 280°C e o tempo de não ionização de 9,9 minutos. As injeções foram feitas sem divisão de fluxo e com purga fechada por três minutos. O hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 0,7 mL/min, o fluxo split foi de 30 mL/min e a pressão na cabeça da coluna de 28 psi. A coluna cromatográfica e sua programação de temperatura

foram as mesmas utilizadas nas análises de quantificação de álcoois superiores e acetato de etila. Foram também utilizadas às mesmas condições otimizadas de temperatura de extração, tempos de adsorção e dessorção e concentração de cloreto sódio nas soluções diluídas.

A aguardente **B** foi escolhida para análise de identificação por apresentar uma maior concentração de componentes secundários e mesma composição em relação as outras aguardentes. A solução desta aguardente foi preparada através da diluição de 8,00 mL da amostra em água para balão de 50,00 mL. Para extração, foram pipetados 10,00 mL desta solução e acrescidos 2,5 g de cloreto de sódio.

Os resultados deste procedimento estão apresentados nas páginas 65-66, FIG. 25 e TAB. 13, e no ANEXO, páginas 78-114.

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÕES

### I – ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICAS DAS AGUARDENTES

Na fase inicial do trabalho, as aguardentes **A**, **B**, **C** e **D** tiveram suas propriedades físico-químicas analisadas no Laboratório de Análises Físico-químicas de Aguardentes da UFLA. Os resultados destas análises estão apresentados abaixo, na TAB. 5.

**TABELA 5** - Análise físico-químicas das aguardentes

ANÁLISES	A	B	C	D
Organoléptica	normal	normal	normal	normal
Densidade a 20°C (g/mL)	0,94475	0,94645	0,94811	0,93943
Extrato seco a 100°C	0,1213	0,176	0,0680	0,0068
Cobre (mg/L)	2,00	1,91	2,10	0,79
Grau alcoólico real à 20°C (°GL)	43,00	42,0	41,0	46,0
Acidez volátil em ácido acético (g/100mL de AA)	0,123	0,055	0,088	0,072
Alcoois superiores (g/100 mL de AA)	0,112	0,264	0,180	0,203
Furfuraldeído (g/100 mL de AA)	*ND	ND	ND	ND
Aldeídos (g/100 mL de AA)	0,028	0,007	0,006	0,010
Ésteres (g/100 mL de AA)	0,062	0,064	0,064	0,069
Soma dos componentes secundários (g/100 mL de AA)	0,325	0,390	0,338	0,354
Álcool metílico (mL/100 mL de AA)	ND	0,022	0,016	ND

\*ND = não detectado

As aguardentes apresentaram soma de componentes secundários dentro dos limites estabelecidos pela legislação e propriedades organolépticas normais. Apesar da concentrações de metanol apresentadas pelas amostras das aguardentes **B** e **C** estarem abaixo do limite máximo estabelecido (0,25 mL/100 mL AA) esta contaminação é indesejável, pois desvaloriza o produto principalmente quanto à exportação. O metanol pode ser eliminado com um controle mais cuidadoso no corte entre as frações durante a destilação.

## II – ANÁLISES DAS AGUARDENTES POR CG UTILIZANDO O MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO

### 1 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DA AGUARDENTE A E DE SEU EXTRATO EM DICLOROMETANO

As aguardentes, sendo um produto de destilação, podem ser adequadamente analisadas por CG. Entretanto, como os constituintes que as diferenciam dando aroma e sabor característicos estão em concentrações baixas foram necessários tratamentos prévios das amostras para concentração destes constituintes. Na página 45, são apresentados cromatogramas de uma amostra da aguardente **A** sem qualquer tratamento para concentração dos componentes minoritários, FIG. 5, e de seu extrato preparado em diclorometano, FIG. 6. O modo de injeção utilizado nestas análises foi split 1:15.

Embora, a literatura sugira o uso da mistura de pentano-diclorometano 2:1<sup>3</sup> para extração dos compostos secundários das aguardentes, as extrações feitas com o uso de diclorometano puro apresentaram a mesma eficiência desta mistura.

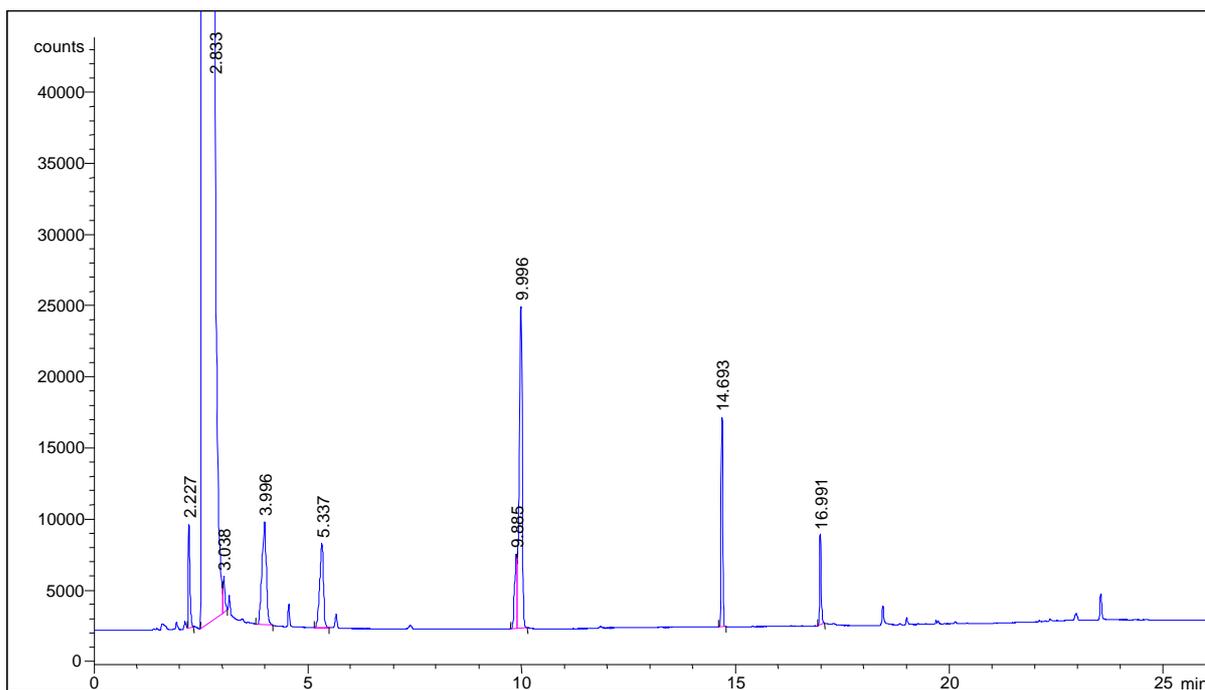
A adição de cloreto de sódio foi feita em todas as extrações para aumentar a força iônica do meio e assim permitir a extração em diclorometano dos compostos presentes na solução aquosa.

A proporção entre os volumes da aguardente e do solvente extrator escolhida foi de 4:1 por ser mais eficiente do que a proporção 3:1 e apresentar a mesma eficiência da proporção 5:1 nas extrações.

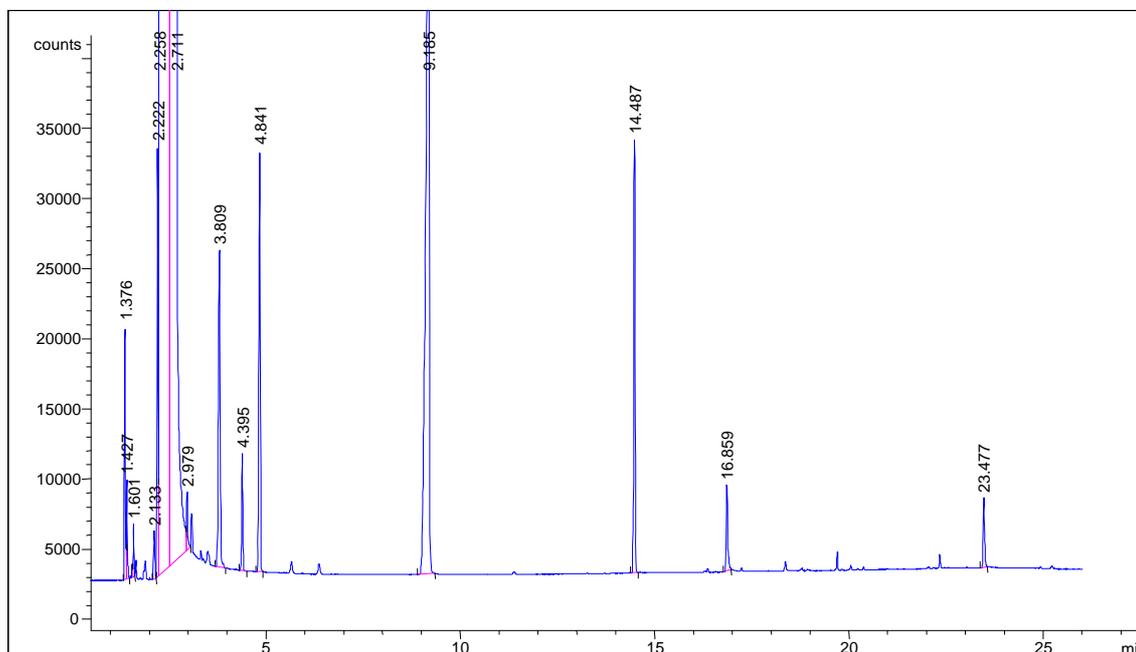
Nos cromatogramas do extrato da aguardente em modo split 1:15 (FIG. 6) pode-se observar um maior número de compostos, principalmente os mais voláteis, em relação ao cromatograma da aguardente sem qualquer tratamento nas mesmas condições (FIG. 5). As análises do mesmo extrato em modo splitless permitiram a detecção de compostos mais pesados, mas apresentaram a desvantagem da sobreposição dos picos dos compostos secundários mais voláteis pelos picos do solvente e do etanol.

As FIG. 7 e FIG. 8 apresentam cromatogramas dos extratos em diclorometano preparados em tempos diferentes de extração e injetados em modo splitless. Pode-se observar que não existem muitas diferenças entre os extratos preparados em 30 minutos e três horas de extração, o que permitiu uma diminuição no tempo de extração sem comprometimento da análise.

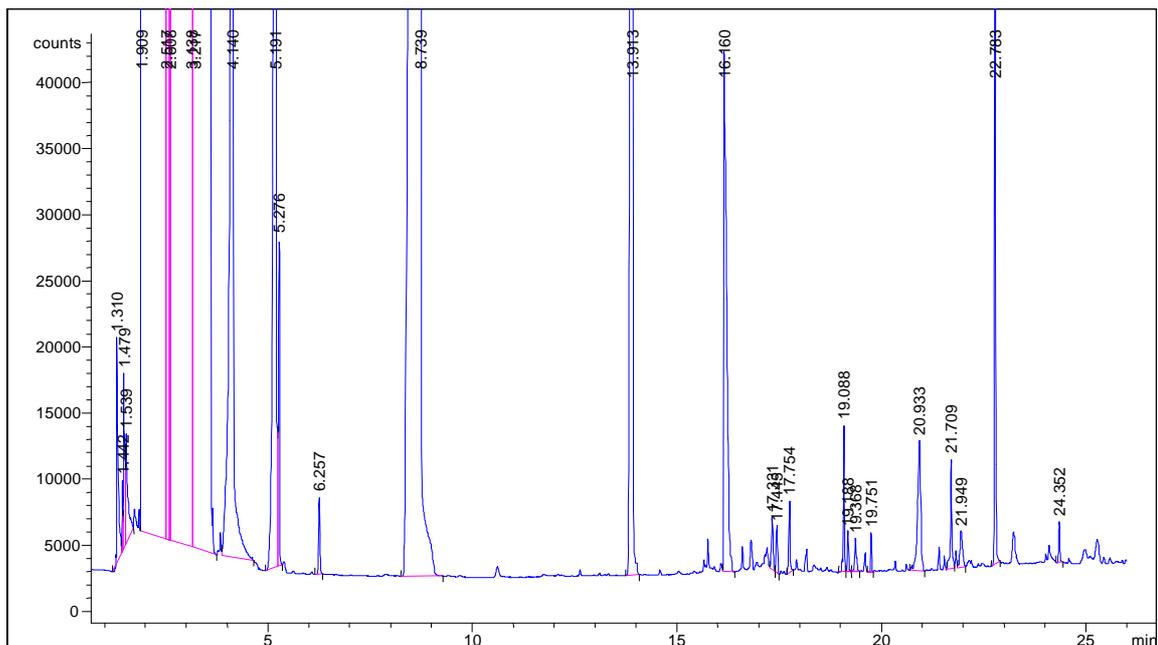
Através da comparação dos cromatogramas apresentados nas FIG. 6 e FIG. 7 pode-se concluir que a injeção feita em modo splitless foi mais eficiente para detecção dos compostos minoritários.



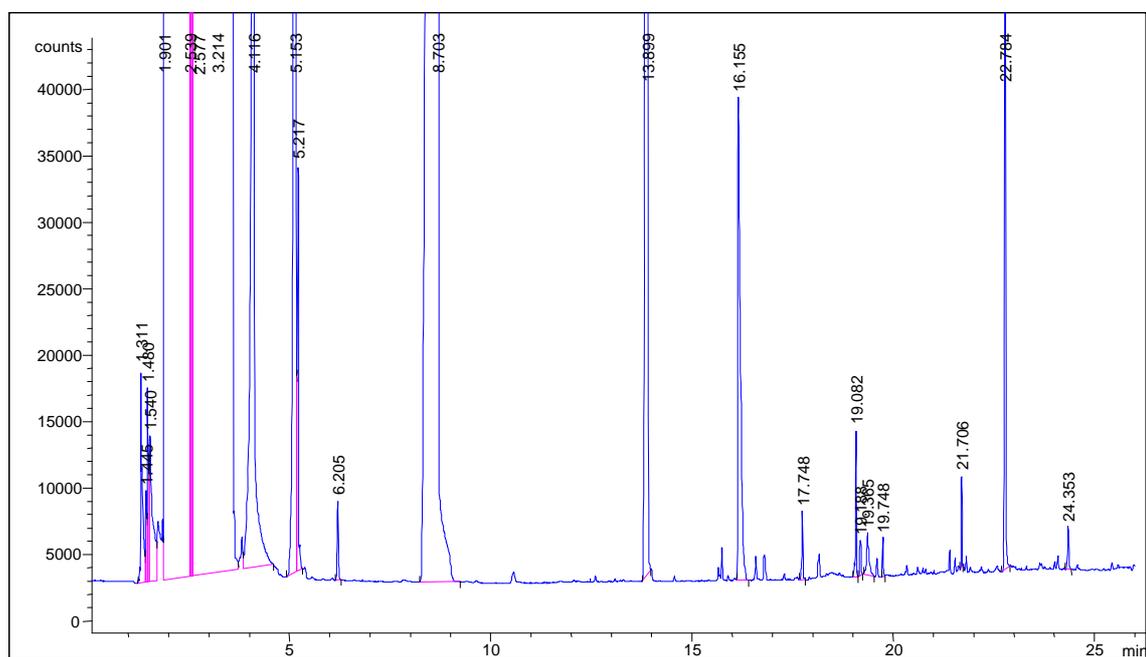
**FIGURA 5** – Cromatograma da aguardente **A** sem qualquer tratamento.  
Modo split 1:15.



**FIGURA 6** – Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente **A**.  
Tempo de extração 30 minutos. Modo split 1:15



**FIGURA 7 –** Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente A.  
**Tempo de extração 30 minutos. Modo splitless**



**FIGURA 8 –** Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente A.  
**Tempo de extração 3 horas. Modo splitless**

## 2 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILA POR CG UTILIZANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os ésteres e os álcoois superiores são os principais responsáveis pelo aroma característico da aguardente. Numa aguardente de ótima qualidade, os álcoois superiores e os ésteres devem estar presentes numa proporção de 0,9-1,1 (página 22, TAB. 4)<sup>23</sup>; isto torna importante a necessidade do estabelecimento de novos métodos para análise destes compostos em aguardentes.

### 2.1 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As soluções dos padrões foram analisadas em duplicata, sendo utilizados na construção das curvas os valores de concentração e correspondentes áreas de cada analito divididos pela concentração e área do padrão interno. A linearidade das curvas obtidas foi avaliada pelo coeficiente de correlação das curvas que foram próximos a 1. As equações das retas e coeficientes de correlação estão apresentados na TAB. 6.

**TABELA 6** – Equações das curvas de calibração e coeficientes de correlação para álcoois superiores e acetato de etila (ELL)

Analito	Equação de regressão	Coeficiente de correlação ( $r^2$ )
Acetato de etila	$Y = 0,571x+0,0042$	0,9999
1-Propanol	$Y = 0,838x+0,0278$	0,9996
Isobutanol	$Y = 1,08x+0,0103$	0,9999
Isoamílico	$Y = 1,10x+0,232$	1,000

## 2.2 - RESULTADOS DA PRECISÃO DA ANÁLISE UTILIZANDO O MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A precisão da análise utilizando o método de ELL foi avaliada pelo desvio padrão relativo das áreas relativas ao ponto médio da curva de calibração em sete extrações seguidas de injeção. Para os compostos analisados este desvio variou entre 10,3-11,7 % (TAB. 7). Possíveis perdas dos analitos durante a extração e a alta volatilidade do solvente utilizado como extrator foram os fatores que mais contribuíram para a obtenção dos coeficientes de variação nesta ordem de grandeza.

**TABELA 7** – Precisão da análise utilizando o método de extração líquido-líquido (ELL)

<b>*ÁREA<sub>A</sub>/ ÁREA<sub>PI</sub></b>	<b>ACETATO DE ETILA/ 1-BUTANOL</b>	<b>1-PROPANOL/ 1-BUTANOL</b>	<b>ISOBUTANOL/ 1-BUTANOL</b>	<b>ÁLCOOL ISOAMÍLICO/ 1-BUTANOL</b>
<b>1</b>	0,538	1,357	0,993	3,297
<b>2</b>	0,416	1,043	0,769	2,572
<b>3</b>	0,429	1,011	0,778	2,586
<b>4</b>	0,412	1,046	0,770	2,565
<b>5</b>	0,418	0,995	0,773	2,570
<b>6</b>	0,406	1,043	0,771	2,571
<b>7</b>	0,403	1,031	0,763	2,563
<b>Média</b>	0,432	1,075	0,803	2,675
<b>Desvio padrão</b>	0,0475	0,1255	0,0843	0,2745
<b>Desvio padrão relativo (%)</b>	11,0	11,7	10,5	10,3

\*ÁREA<sub>A</sub>/ÁREA<sub>PI</sub>= Área do analito/ área do padrão interno

### 2.3 – CONCENTRAÇÕES DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILA NAS AGUARDENTES (ELL)

As soluções das amostras de aguardentes também foram analisadas em duplicata e as concentrações de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico foram determinadas a partir das respectivas curvas de calibração geradas pelos padrões. Os desvios padrão na medida das concentrações dos analitos nas amostras de aguardentes foram calculados com base na precisão determinada para a análise utilizando a ELL. Os resultados das concentrações dos compostos analisados estão na TAB. 8.

**TABELA 8** – Concentrações de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico nas amostras das aguardentes (ELL) em mg/100mL de solução

AGUARDENTES	ACETATO DE ETILA (mg/100mL)	1-PROPANOL (mg/100mL)	ISOBUTANOL (mg/100mL)	ÁLCOOL ISOAMÍLICO (mg/100mL)
A	62±7	23±3	10±1	30±3
B	15±2	11±1	13±1	47±5
C	7±1	18±2	10±1	49±5
D	13±1	10±1	25±3	62±6
E	30±3	30±4	17±2	64±7
F	140±20	12±1	13±1	47±5
G	4,9±0,5	22±3	23±2	79±8
H	12±1	31±4	16±2	67±7
I	33±4	100±10	15±2	44±5
J	100±10	190±20	10±1	32±3
K-1	29±3	20±2	17±2	74±8
K-2	110±10	18±2	8±1	36±4
L	5±1	19±2	19±2	64±7

\* A denominação K-1 e K-2 é referente à amostras de aguardentes de mesma marca, mas de diferentes lotes.

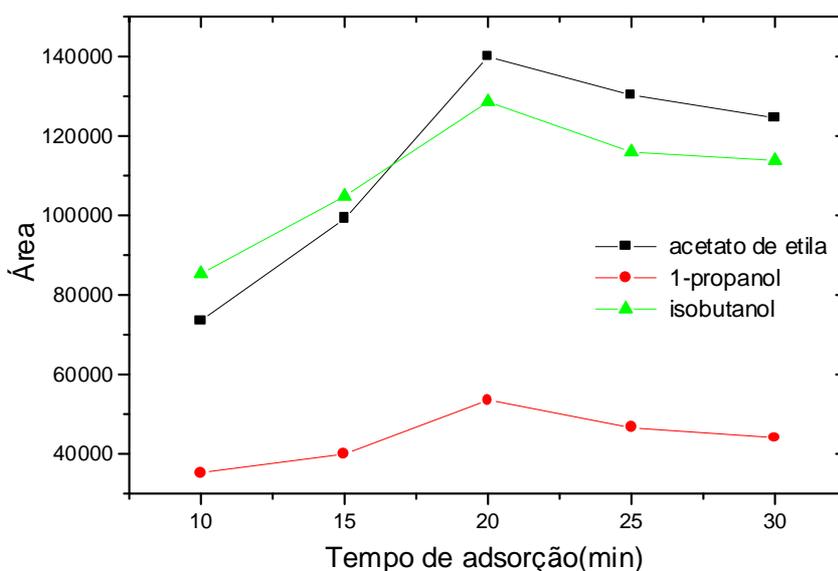
### III – ANÁLISES DAS AGUARDENTES POR CG UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A microextração em fase sólida é um método analítico de extração de compostos minoritários em amostras de matrizes variadas. Com base neste princípio, resolveu-se estudar a eficiência da aplicação deste método para concentração dos compostos secundários presentes nas amostras de aguardentes. Para se ter uma boa eficiência da capacidade de extração do revestimento da fibra utilizada na MEFS, as condições de extração e dessorção desta fibra devem ser otimizadas. Desta forma para as análises dos compostos secundários nas aguardentes os tempos de adsorção e dessorção da fibra, a massa de cloreto de sódio adicionada na solução a serem extraídas e a temperatura de extração foram otimizados.

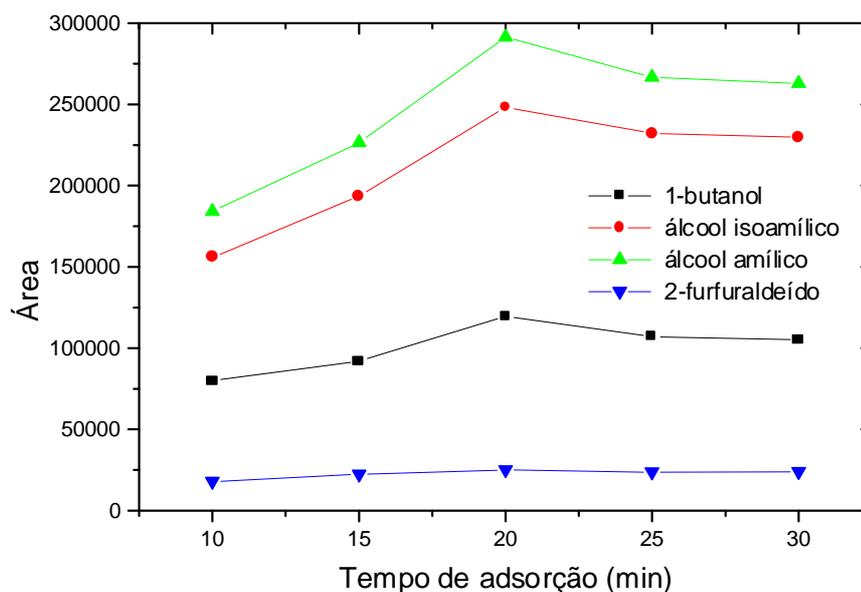
#### 1 – RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE DE MEFS

##### 1.1– OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE ADSORÇÃO

As FIG. 9 e 10 apresentam a variação da capacidade de adsorção do revestimento da fibra com a variação do tempo.



**FIGURA 9** – Variações nas áreas de acetato de etila, 1-propanol e isobutanol em função do tempo de adsorção da fibra de MEFS



**FIGURA 10** – Variações nas áreas de 1-butanol, álcool isoamílico, álcool amílico e 2-furfuraldeído em função do tempo de adsorção da fibra de MEFS

Embora a capacidade de extração da fibra em 20 minutos tenha sido maior do que em 25 minutos (FIG. 9 e 10), o equilíbrio de partição dos analitos entre a fase aquosa, o espaço confinado e a fase polimérica da fibra ocorreu somente após 20 minutos, o que pode ser comprovado pelas pequenas variações nas áreas dos analitos nas curvas de adsorção após este tempo. Com base nestas observações o tempo de 25 minutos foi fixado para adsorção dos compostos.

## 1.2 – OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE DESSORÇÃO

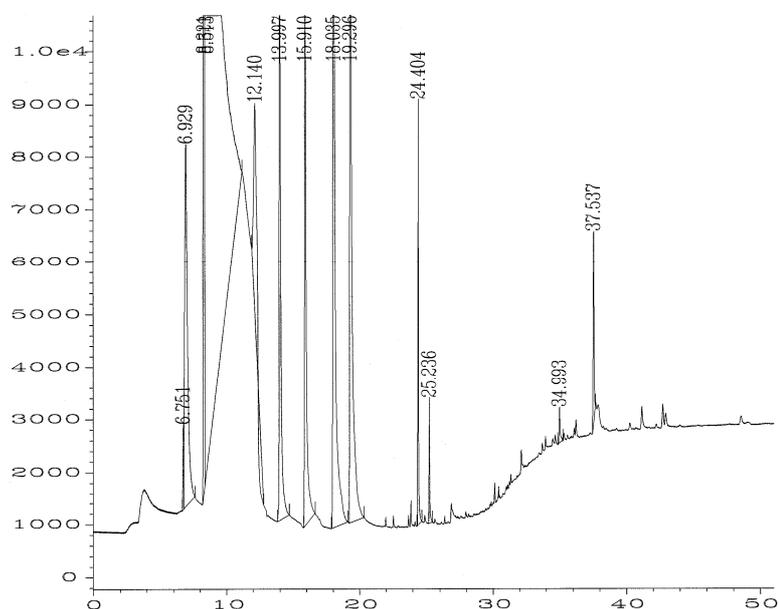
A partir dos resultados das áreas dos analitos para as dessorções realizadas nos tempos propostos, observou-se que as áreas médias nas dessorções em três minutos apresentaram valores maiores que nas dessorções em cinco minutos (TAB.9). Já os cromatogramas referentes aos tempos de dessorção de sete e dez minutos apresentaram picos largos de etanol, que sobrepujam aos picos mais próximos; isso devido ao fato dessas dessorções favorecerem mais a concentração de etanol, o solvente das soluções dos analitos, na cabeça da coluna (FIG.11). O tempo de dessorção de um minuto não foi suficiente para dessorção de todos compostos da fibra, uma vez que, o branco feito com a fibra após este tempo de dessorção apresentou efeito memória, ou seja, picos de analitos que ainda não tinham sido dessorvidos em análises consecutivas.

A dessorção em três minutos foi utilizada em todas as análises, pois apresentou áreas maiores para todos os analitos em comparação com a dessorção realizada em cinco minutos e não apresentou a interferência do pico do etanol em relação aos picos dos analitos com tempo de retenção mais próximos (FIG. 16, página 60).

**TABELA 9** – Comparações das áreas dos analitos nas dessorções de realizadas em três e cinco minutos

Composição da solução de analitos	Dessorção 3 minutos (Áreas <sub>médias</sub> )*	Dessorção 5 minutos (Áreas <sub>médias</sub> )
Acetato de etila	109576	95909
1-propanol	41260	35815
Isobutanol	112317	96029
1-Butanol	98439	89014
Álcool isoamílico	224472	205022
Álcool amílico	252886	228818
2-Furfuraldeído	23347	20080

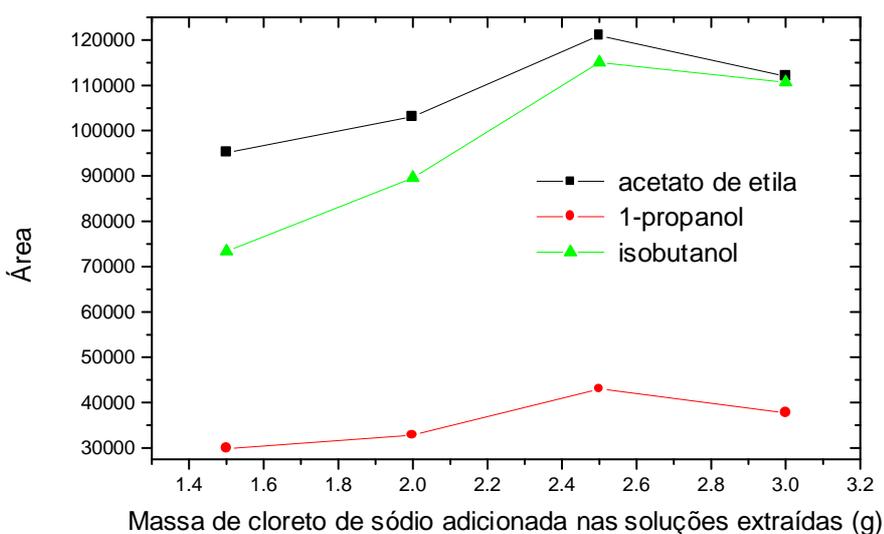
\*número de medidas (n)=3



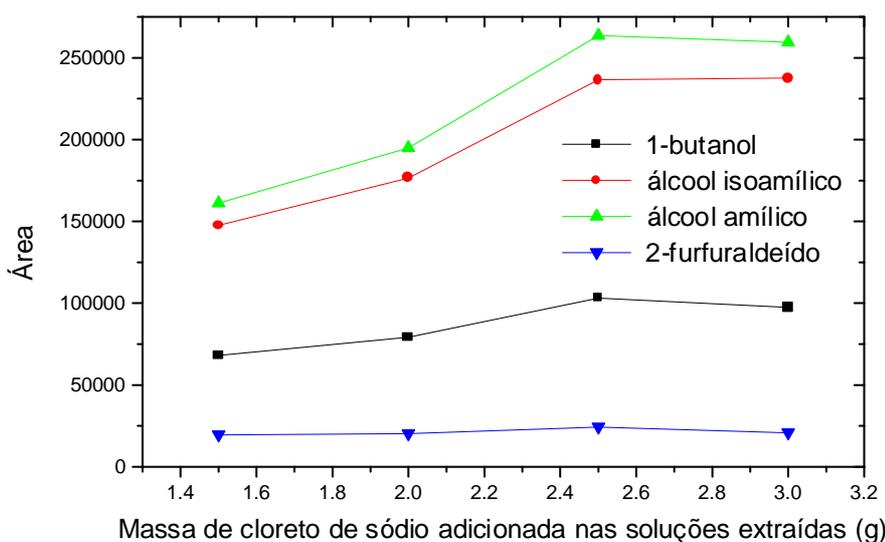
**FIGURA 11** – Dessorção da solução de analitos em sete minutos

### 1.3 – OTIMIZAÇÃO DA MASSA DE CLORETO DE SÓDIO ADICIONADA NAS SOLUÇÕES A SEREM EXTRAÍDAS

A adição de cloreto de sódio nas soluções a serem extraídas teve como finalidade aumentar a força iônica do meio, diminuindo a solubilidade dos compostos solúveis em água, facilitando a extração e concentração destes compostos no revestimento da fibra. Foram testadas a variação da capacidade de extração com a variação da massa adicionada de cloreto de sódio, FIG. 12 e 13.



**FIGURA 12**– Variações nas áreas de acetato de etila, 1-propanol e isobutanol em função da massa de cloreto de sódio adicionada nas soluções extraídas



**FIGURA 13** – Variações nas áreas de 1-butanol, álcool isoamílico, álcool amílico e 2-furfuraldeído em função da massa de cloreto de sódio adicionada nas soluções extraídas

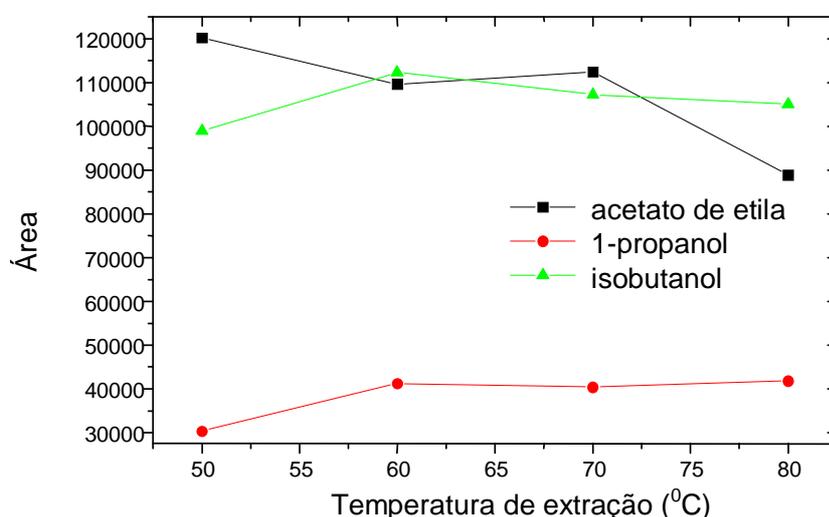
A adição de 2,5 g de cloreto de sódio foi escolhida como a melhor, uma vez que a concentração de cloreto de sódio resultante nas soluções foi a que mostrou maior eficiência na extração de acetato de etila, 1-propanol e isobutanol (FIG. 12), e foi tão eficiente quanto a adição de 3,0 g para a extração de 1-butanol, álcool isoamílico, álcool amílico e 2-furfuraldeído pelo revestimento da fibra (FIG. 13).

#### 1.4 – OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

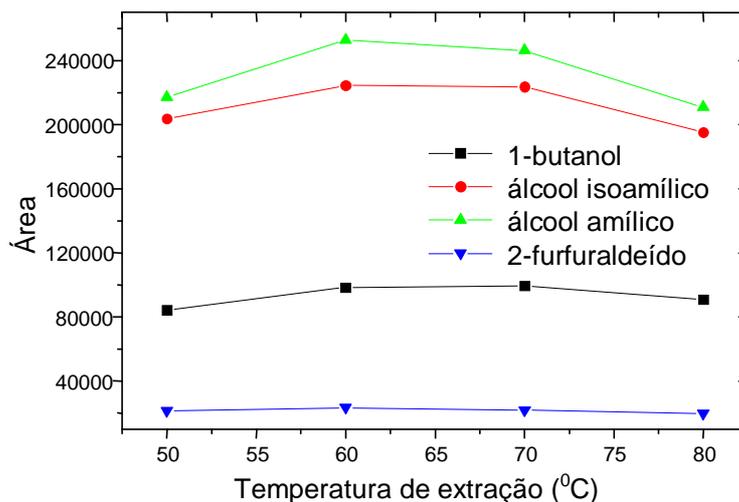
Embora o aquecimento favoreça a concentração dos analitos no espaço confinado, ele deve ser controlado, uma vez que o processo de extração dos compostos pelo revestimento da fibra é exotérmico.

Para se determinar a temperatura na qual a eficiência de concentração dos analitos pelo revestimento da fibra é a melhor, várias temperaturas de extração foram testadas.

Com base nos resultados (FIG. 14 e 15), pode-se observar que as extrações apresentaram poucas diferenças na eficiência na faixa de temperatura entre 60 a 70°C. A temperatura de 60°C foi escolhida como a mais adequada para o procedimento de extração por favorecer o processo exotérmico de extração dos compostos pelo revestimento da fibra em comparação com a temperatura de 70°C.



**FIGURA 14** – Variações nas áreas de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol em função da temperatura de extração



**FIGURA 15** – Variações nas áreas de 1-butanol, álcool isoamílico, álcool amílico e 2-furfuraldeído em função da temperatura de extração

## 2 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETADO DE ETILA NAS AGUARDENTES POR CG UTILIZANDO MEFS

### 2.1 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As soluções dos padrões foram analisadas em duplicata, sendo utilizados na construção das curvas os valores de concentração e correspondentes áreas de cada analito divididos pela concentração e área do padrão interno. A linearidade das curvas obtidas foi avaliada pelo coeficiente de correlação das curvas de cada analito que foram bem próximos a 1. As equações das retas e respectivos coeficientes de correlação estão apresentados na TAB. 10.

Os padrões de álcool amílico e 2-furfuraldeído não foram adicionadas a solução dos padrões, uma vez que, estes compostos não foram identificados nas aguardentes por comparação de tempos de retenção.

**TABELA 10** – Equações das curvas de calibração e coeficientes de correlação para álcoois superiores e acetato de etila (MEFS)

Analito	Equação de regressão	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )
Acetato de etila	$Y = 0,496x - 0,0198$	0,9981
1-Propanol	$Y = 0,218x - 0,0402$	0,9966
Isobutanol	$Y = 1,05x - 0,0149$	0,9998
Isoamílico	$Y = 3,58x + 0,263$	0,9988

## 2.2- RESULTADOS DA PRECISÃO DA ANÁLISE UTILIZANDO O MÉTODO DE MEFS

Como na quantificação utilizando a técnica de ELL, a precisão da análise utilizando a MEFS foi avaliada pelo desvio padrão relativo das áreas relativas ao ponto médio da curva de calibração em sete extrações seguidas de injeção. Para os compostos analisados este desvio variou entre 1,8-3,9 % (TAB. 11). Acredita-se que o principal fator que contribuiu para variação das áreas dos analitos foram possíveis alterações na temperatura de extração.

**TABELA 11** –Precisão da análise utilizando o método de MEFS

*ÁREA <sub>A</sub> / ÁREA <sub>PI</sub>	ACETATO DE ETILA/ 1-BUTANOL	1-PROPANOL/ 1-BUTANOL	ISOBUTANOL/ 1-BUTANOL	ÁLCOOL ISOAMÍLICO/ 1-BUTANOL
1	0,807	0,375	1,3020	9,318
2	0,822	0,393	1,252	9,486
3	0,849	0,366	1,238	9,435
4	0,834	0,394	1,196	9,064
5	0,844	0,364	1,184	8,874
6	0,850	0,385	1,167	8,721
7	0,835	0,382	1,227	8,593
Média	0,834	0,379	1,223	9,070
Desvio padrão	0,0154	0,0119	0,0460	0,3548
Desvio padrão relativo (%)	1,8	3,1	3,9	3,9

ÁREA<sub>A</sub>/ÁREA<sub>PI</sub>= Área do analito/ área do padrão interno

Ao se fazer uma comparação da precisão da análise utilizando os métodos de extração ELL e MEFS, pode-se observar que os desvios padrão relativo para a análise com o uso da MEFS (1,8-3,9%-TAB.7) foram menores que os coeficientes de variação para a análise com o uso da ELL (10,3-11,7%-TAB.11) nas medidas de concentração dos analitos. Com base nestes desvios, pode-se dizer que o método de MEFS possibilitou uma menor variação nas medidas de concentração, provavelmente devido a menores variações na capacidade de extração dos analitos pelo revestimento da fibra e menores possibilidades de perda dos analitos antes da injeção ou dessorção no cromatógrafo.

A melhor precisão das análises com o uso do método de MEFS é uma das vantagens e está relacionada ao menor número de etapas para concentração dos analitos, apenas extração do analito e dessorção no cromatógrafo. Enquanto no método de ELL são necessários, cuidadosa extração para evitar perdas do solvente, adição  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para eliminação de água em alguns casos e filtração antes da injeção no cromatógrafo.

### **2.3 – CONCENTRAÇÕES DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILA NAS AGUARDENTES (MEFS)**

As soluções das amostras de aguardentes também foram analisadas em duplicata e as concentrações de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico foram determinadas a partir das respectivas curvas de calibração geradas pelos padrões. Os desvios padrão na medida das concentrações dos analitos nas amostras de aguardentes foram calculados com base na precisão determinada para a análise utilizando a MEFS.

**TABELA 12** – Concentrações de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico nas amostras das aguardentes (MEFS) em mg/100mL de solução

<b>AGUARDENTES</b>	<b>ACETATO DE ETILA (mg/100mL)</b>	<b>1-PROPANOL (mg/100mL)</b>	<b>ISOBUTANOL (mg/100mL)</b>	<b>ÁLCOOL ISOAMÍLICO (mg/100mL)</b>
<b>A</b>	61±1	29,8±0,9	12,2±0,5	35±15
<b>B</b>	15,9±0,3	17,6±0,5	15,0±0,6	49±2
<b>C</b>	11,4±0,2	23,4±0,7	12,9±0,5	58±28
<b>D</b>	16,0±0,3	15,3±0,5	28±1	64±3
<b>E</b>	33,3±0,6	32±1	21,5±0,8	72±3
<b>F</b>	158±3	17,8±0,6	18,7±0,7	49±2
<b>G</b>	11,8±0,2	24,6±0,8	22,3±0,9	74±3
<b>H</b>	15,3±0,3	34±1	18,8±0,7	67±3
<b>I</b>	35,5±0,6	107±37	15,8±0,6	40±2
<b>J</b>	125±2	227±77	13,6±0,5	31±1
<b>K-1</b>	35,4±0,6	26,6±0,8	20,4±0,8	84±3
<b>K-2</b>	117±2	22,5±0,7	9,1±0,4	33±1
<b>L</b>	10,8±0,2	22,6±0,7	21,9±0,8	69±3

\* A denominação K-1 e K-2 é referente às amostras de aguardentes de mesma marca, mas de diferentes lotes.

#### IV – COMPARAÇÕES DOS RESULTADOS NAS DOSAGENS DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ACETATO DE ETILA NAS AGUARDENTES

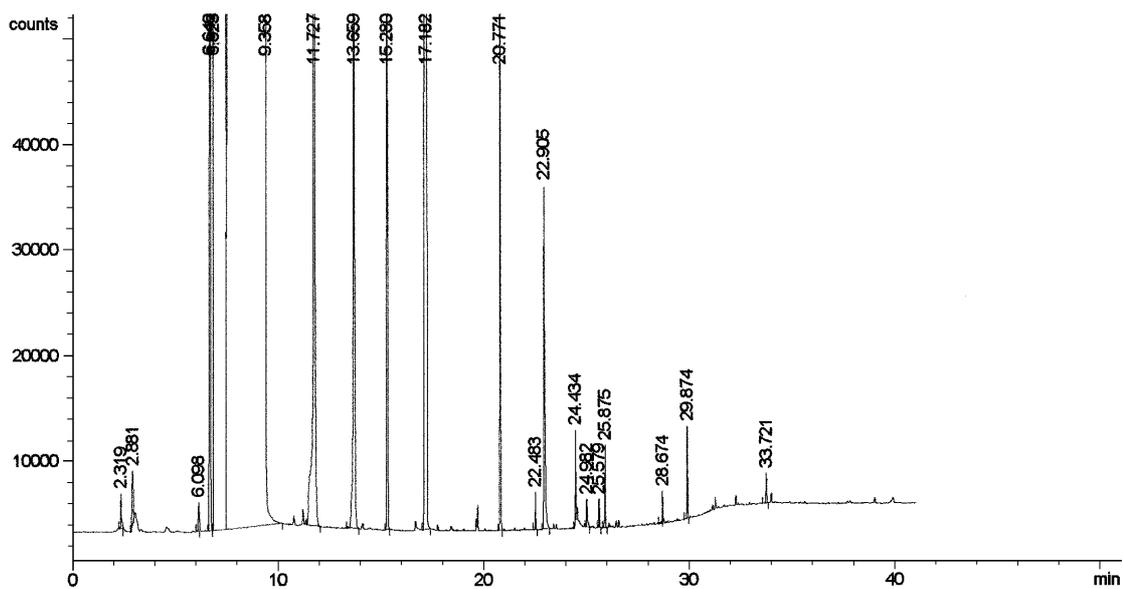
Ao se fazer uma comparação dos cromatogramas dos extratos das aguardente **E**, preparados por ELL e MEFS (FIG. 16 e 17), pode-se observar, na análise feita com o uso do método de MEFS, a presença de um maior número de compostos e maior intensidade em suas áreas comprovando a maior eficiência de extração da segunda técnica. A maior capacidade de extração dos compostos secundários mais pesados pela técnica de MEFS é atribuída a maior afinidade desses compostos e o revestimento de poliacrilato da fibra, o que não aconteceu no caso da ELL, em que o diclorometano não se mostrou tão eficiente para a extração dos mesmos. A MEFS apresentou a vantagem adicional de requerer menor volume da amostra na extração e o não usar solvente orgânico.

Fazendo-se uma comparação entre as duas técnicas de extração na quantificação dos álcoois superiores e acetato de etila, pode-se observar pelas TAB. 8 e 12 e FIG. 18-21 que as concentrações apresentaram variações, sendo maiores, com poucas exceções, nas análises feitas com o uso da MEFS. Não é possível uma comparação entre os resultados das concentrações de acetato de etila e álcoois superiores dosados pelos métodos propostos pela legislação vigente (TAB. 5) e os resultados encontrados nas análises cromatográficas com o uso das técnicas de ELL e MEFS (TAB. 8 e TAB. 12) para as amostras de aguardentes **A**, **B**, **C** e **D**, pois são resultados de aguardentes de diferentes lotes.

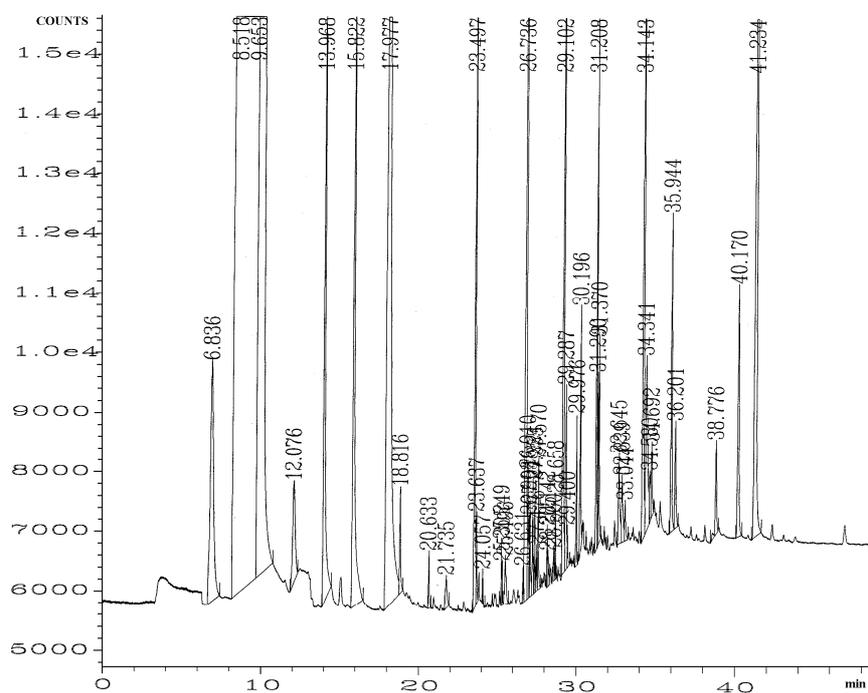
Comparando-se os resultados da quantificação de álcoois superiores e acetato de etila entre as amostras de aguardentes (TAB. 8 e 12), pode-se observar variações na concentração de acetato de etila e álcoois superiores para amostras de aguardentes da mesma região, como no caso das aguardentes **A**, **B**, **C** e até para amostras de mesma marca, como no caso da **K**.

As concentrações de acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico nas amostras das aguardentes industriais, **G** e **L**, não apresentaram grandes variações que as destacassem entre todas as outras amostras das aguardentes artesanais.

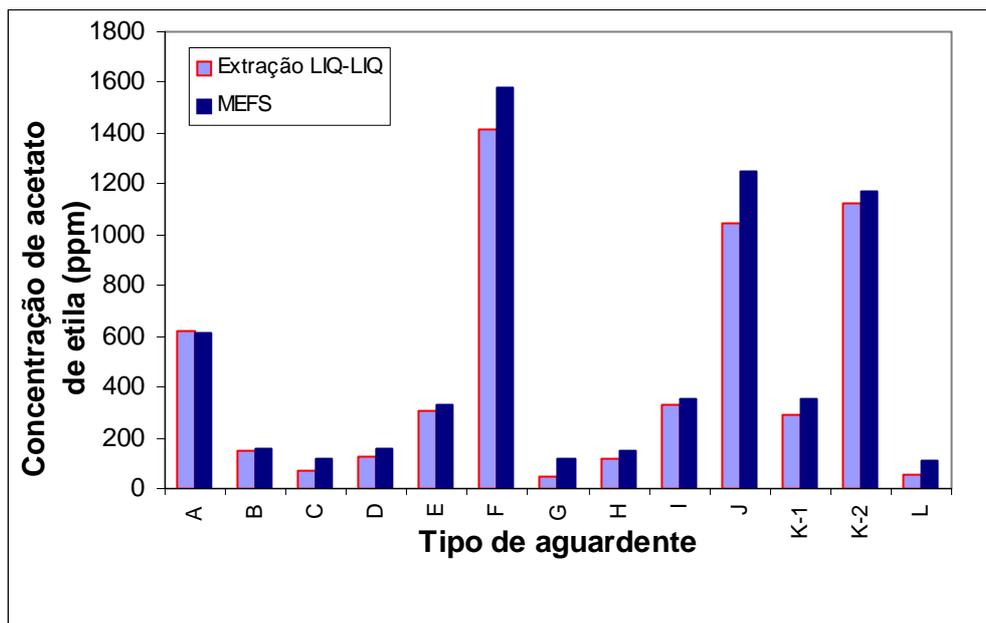
As concentrações de todos os compostos dosados foram variadas em todas as aguardentes. O álcool isoamílico foi o álcool superior encontrado em maior concentração em todas as amostras.



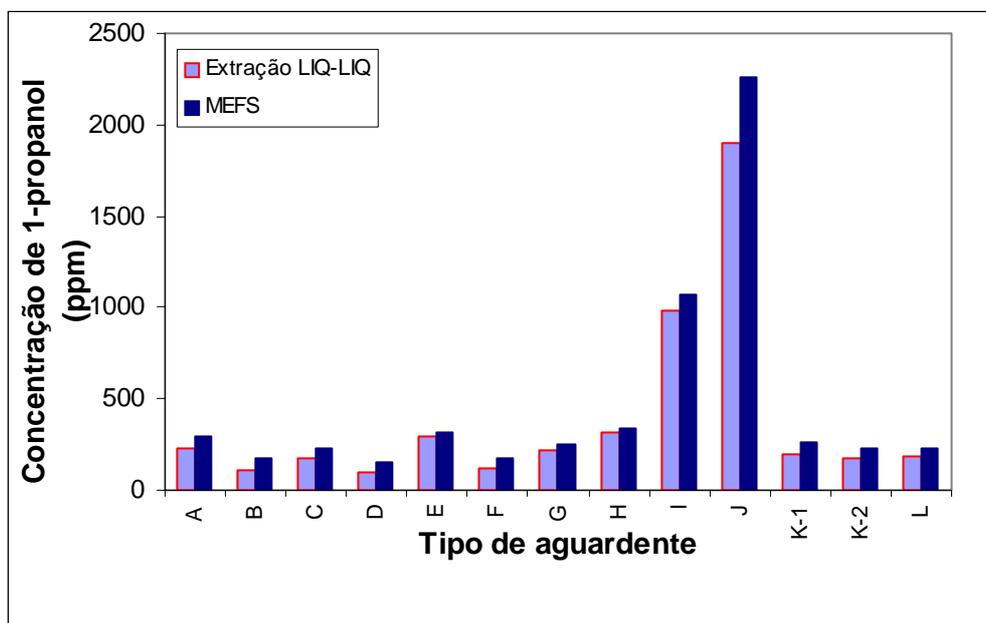
**FIGURA 16 - Cromatograma do extrato em diclorometano da aguardente E (ELL)**



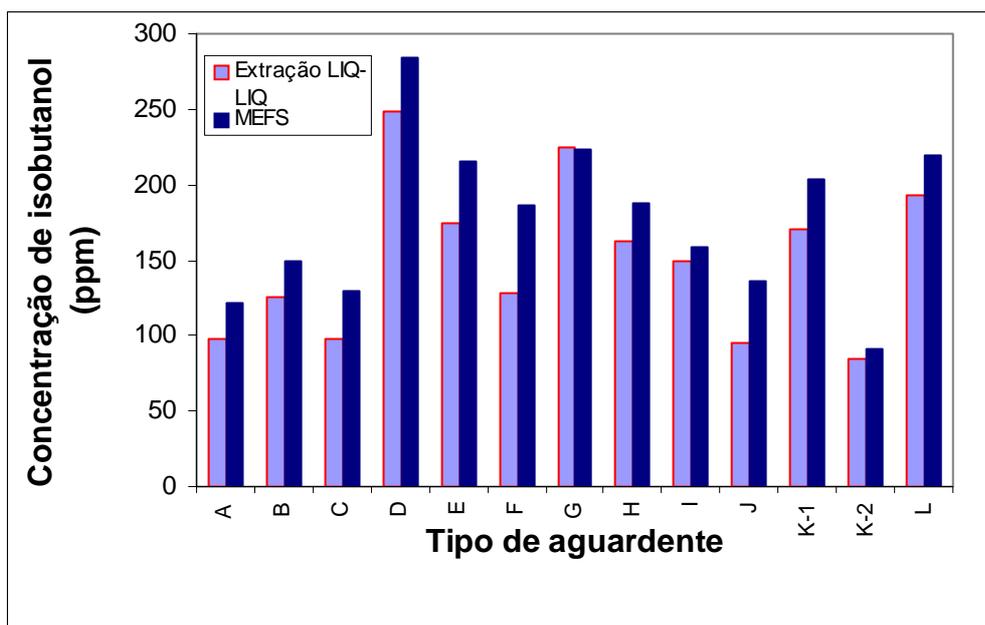
**FIGURA 17 - Cromatograma da aguardente E extraída por MEFS**



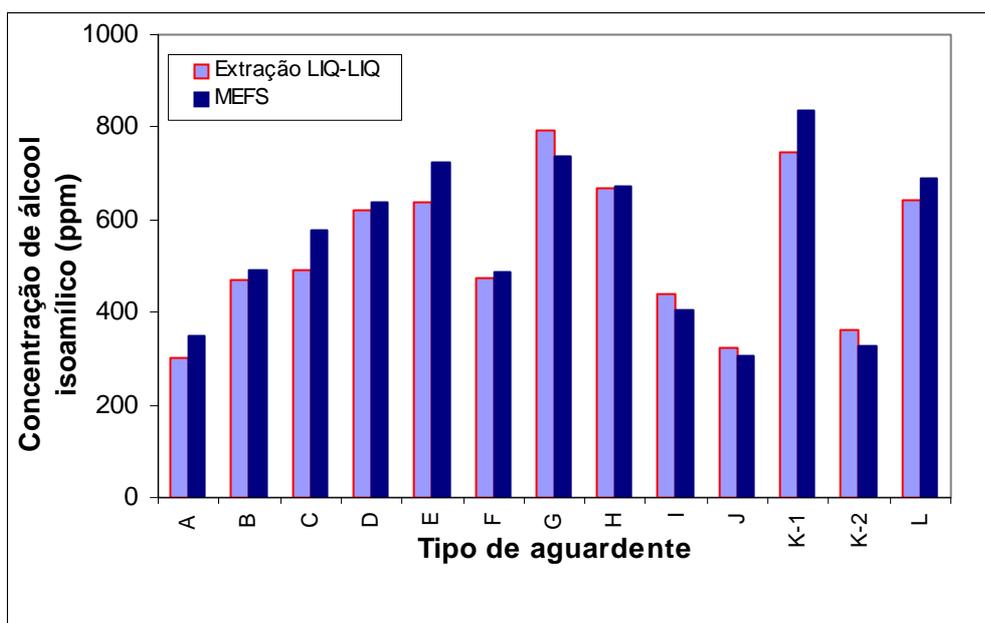
**FIGURA 18** – Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de acetato de etila em aguardentes



**FIGURA 19** – Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de 1-propanol em aguardentes



**FIGURA 20** – Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de isobutanol em aguardentes



**FIGURA 21** – Comparação dos métodos de ELL e MEFS na dosagem de álcool isoamílico em aguardentes

## V – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

A CG/MS destaca-se como a técnica mais eficiente para separação, detecção e caracterização dos componentes de misturas orgânicas complexas. Considerando de maneira simplista o espectrômetro de massas é um aparelho capaz de produzir íons e medir a massa dos íons produzidos. No caso das moléculas orgânicas, a massa e a abundância relativa dos íons molecular ( $M^{+•}$ ) e pseudomolecular  $(M+H)^+$  e dos fragmentos destes íons são uma reflexão direta da estrutura molecular. Assim, a espectrometria de massas permite sem auxílio de outras técnicas o estabelecimento da estrutura dos compostos analisados. Embora, a confirmação desta estrutura deva ser sempre realizada com comparações com espectros de padrões ou de bibliotecas de computadores.<sup>77,78,79,80</sup>

Antes de se proceder a análise por CG/MS foi feita uma comparação entre os cromatogramas das amostras de todas as aguardentes. Para ilustração, apresentamos o cromatograma das aguardentes **B** (FIG. 22), **G** (FIG. 23) e **I** (FIG. 24) extraídas por MEFS. Pode-se observar que as aguardentes não se diferenciam quanto composição de compostos secundários, sendo que a semelhança encontrada na comparação destes cromatogramas pode ser estendida para todas as outras aguardentes analisadas.

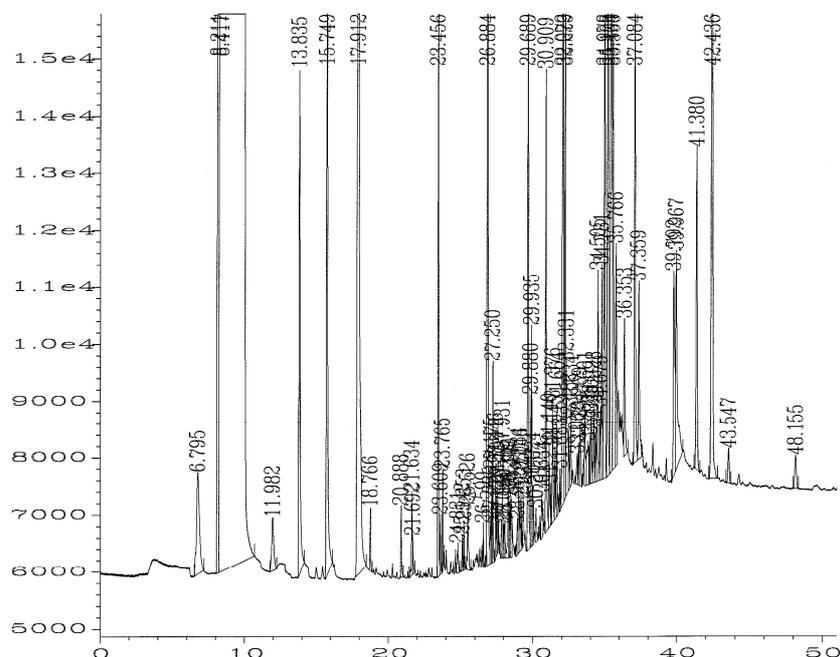


FIGURA 22 – Cromatograma da aguardente **B** extraída por MEFS

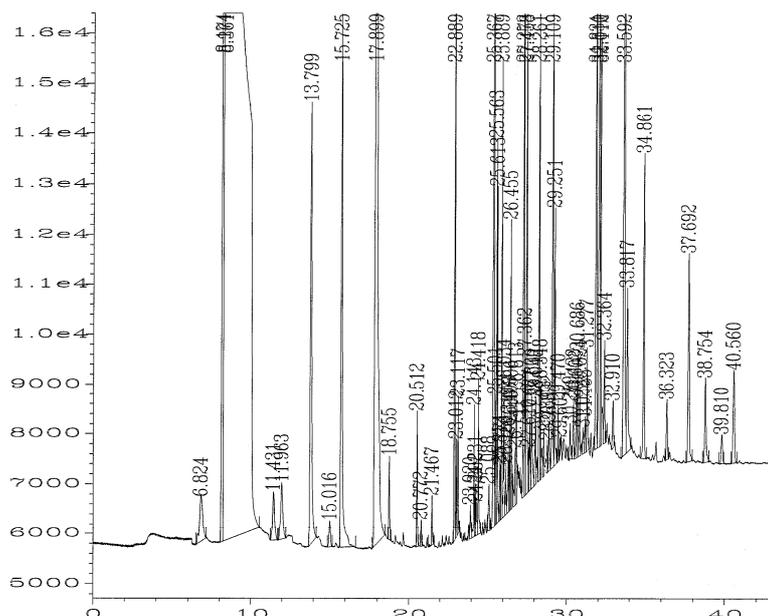
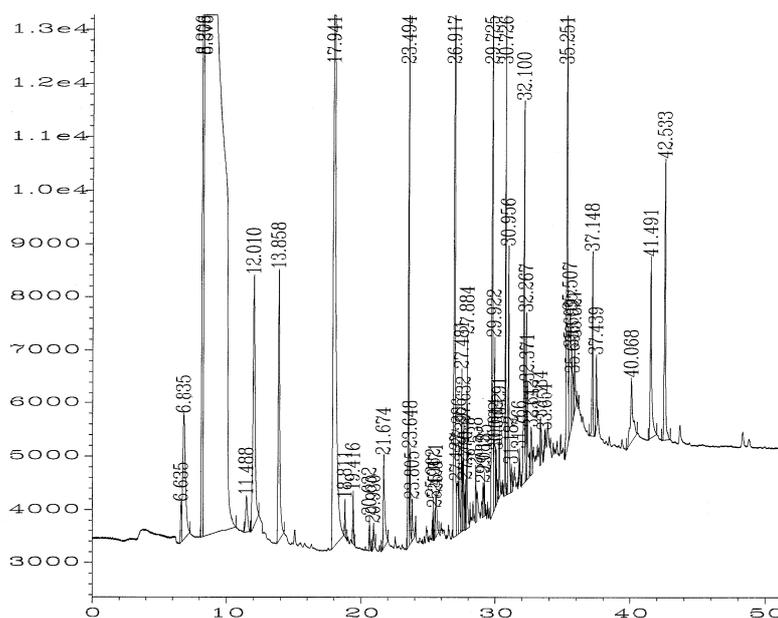
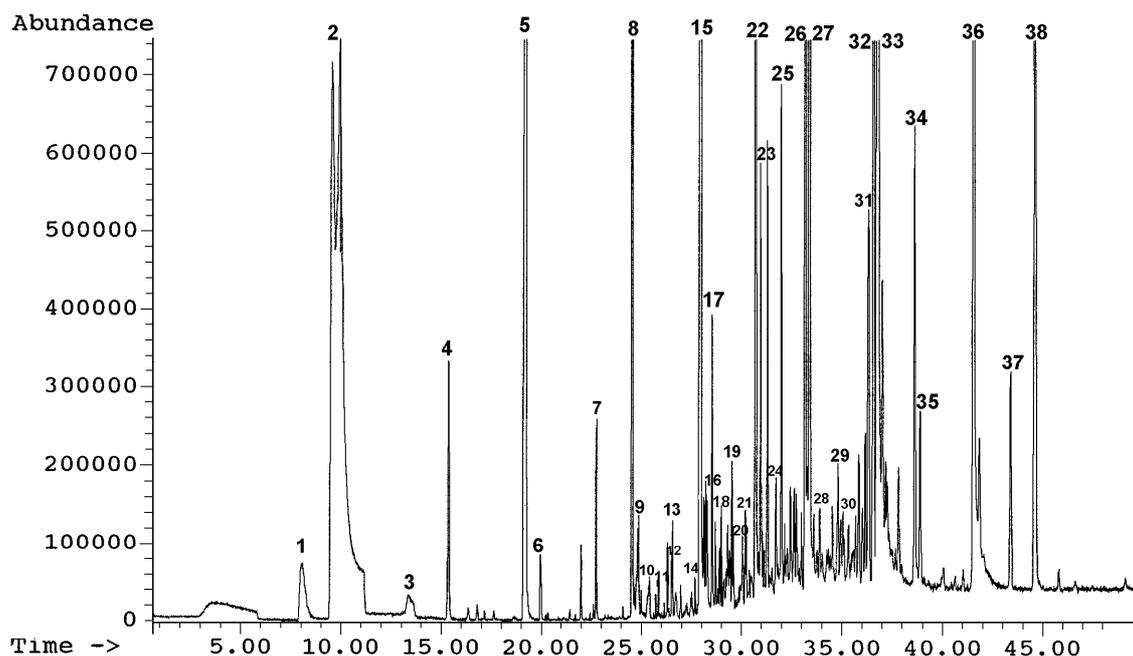


FIGURA 23 – Cromatograma da aguardente G extraída por MEFS





**FIGURA 25 - Cromatograma de íons totais da aguardente B**

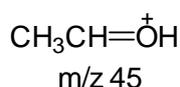
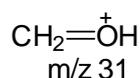
- |   |   |
|---|---|
| <b>1</b> – acetato de etila                                     | <b>19</b> – 1-decanol                                       |
| <b>2</b> – etanol   | <b>20</b> – $\beta$ -citronelol                             |
| <b>3</b> – 1-propanol   | <b>21</b> – ciclodeceno                                     |
| <b>4</b> – isobutanol   | <b>22</b> – dodecanoato de etila                            |
| <b>5</b> – álcool isoamílico                                    | <b>23</b> – decanoato de 3-metil-butila                     |
| <b>6</b> – hexanoato de etila                                   | <b>24</b> – 2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol          |
| <b>7</b> – 2-hidroxi-propanoato de etila                        | <b>25</b> – fenil-etanol                                    |
| <b>8</b> – octanoato de etila                                   | <b>26</b> – nerolidol                                       |
| <b>9</b> – ácido acético  | <b>27</b> – ácido octanóico                                 |
| <b>10</b> – 2-etil-1-hexanol                                    | <b>28</b> – 2,6-dimetilnaftaleno                            |
| <b>11</b> – 2-octanol   | <b>29</b> – pentadecanoato de etila                         |
| <b>12</b> – 2-hidroxi-4-metilpentanoato de etila                | <b>30</b> – ciclododecano                                   |
| <b>13</b> – 1-octanol   | <b>31</b> – $\alpha$ -bisabolol                             |
| <b>14</b> – 4-metil-1-(1-metiletil) 3-ciclohexen-1-ol           | <b>32</b> – hexadecanoato de etila                          |
| <b>15</b> – decanoato de etila                                  | <b>33</b> – ácido decanóico                                 |
| <b>16</b> – $\beta$ -farnaseno                                  | <b>34</b> – cis-farnesol                                    |
| <b>17</b> – butanoato de dietila                                | <b>35</b> – ciclotetradecano                                |
| <b>18</b> – $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-ciclohexeno-1-metanol | <b>36</b> – ácido dodecanóico                               |
|   | <b>37</b> – linoleato de etila                              |
|   | <b>38</b> – 1,2-benzenodicarboxilato de bis-2-metil-propila |

**TABELA 13 – Classificação dos compostos identificados na aguardente B**

CLASSE	COMPOSTOS IDENTIFICADOS
<b>ÁLCOOIS</b>	etanol, 1-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, 2-etil-1-hexanol, 2-octanol, 1-octanol, 4-metil-1-isopropil-3-ciclohexen-1-ol, $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-ciclohexeno-1-metanol, 1-decanol, $\beta$ -citronelol, nerolidol, $\alpha$ -bisabolol, cis-farnesol
<b>ÁCIDOS</b>	ácido acético, ácido octanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico
<b>ÉSTERES</b>	acetato de etila, hexanoato de etila, 2-hidroxiopropanoato de etila, octanoato de etila, 2-hidroxi-4-metilpentanoato de etila, decanoato de etila, butanoato de dietila, dodecanoato de etila, decanoato de 3-metil-butila, pentadecanoato de etila, hexadecanoato de etila, linoleato de etila, benzenodicarboxilato de bis-2-metilpropila1,2-
<b>HIDROCARBONETOS CÍCLICOS</b>	ciclodeceno, ciclododecano, ciclotetradecano, $\beta$ -farnaseno
<b>HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS</b>	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol, fenil-etanol ,2,6-dimetilnaftaleno

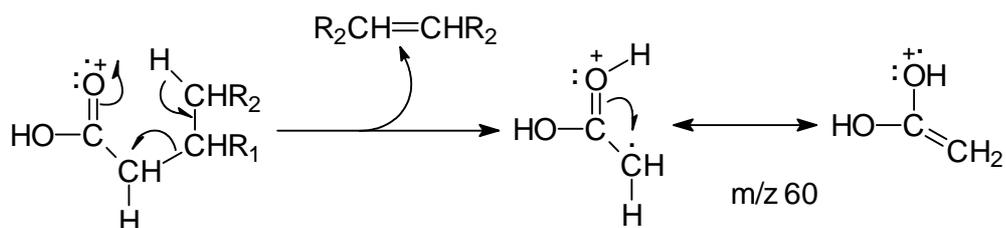
Pelas FIG.25 e TAB. 12 pode-se observar que vários compostos de classes diferenciadas foram identificados na aguardente **B**. A presença dos aldeídos que é muito comum em aguardentes não pode ser constatada pois a análise cromatográfica destes compostos deve ser feita por derivatização com 2,4-dinitrofenilidrazina<sup>37</sup> ou derivatização para formação de suas respectivas oximas.

Os álcoois primários e secundários de cadeia alifática foram caracterizados principalmente pelos picos em m/z 31 e m/z 45 , referentes aos íons da FIG. 26:

**FIGURA 26 – Fragmentos característicos de álcoois primários e secundários**

Os picos em M-18, associados a perda de água, também foram característicos para os álcoois identificados. Os demais picos encontrados nos espectros foram associados a quebra de ligações C-C próximas ou mais afastadas ao átomo de oxigênio.<sup>77,78,79,80</sup>

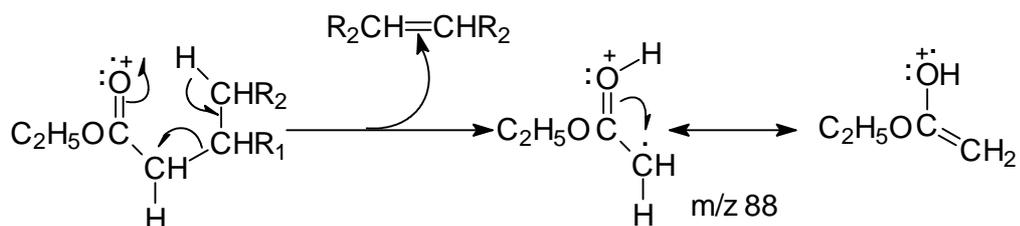
Os ácidos, com exceção do ácido acético, apresentaram o pico do íon molecular de baixa intensidade. Para os ácidos de cadeia longa, o pico mais característico ocorreu em m/z 60, proveniente de uma quebra justificada através do rearranjo de Mc Lafferty:



**FIGURA 27** – Rearranjo McLafferty na fragmentação de ácidos carboxílicos

Os demais picos observados nos espectros de massa dos ácidos (ANEXO) foram justificados por quebras de ligação C-C, com retenção de carga no fragmento contendo oxigênio e fragmentos alquila. A caracterização do ácido acético, único ácido carboxílico de cadeia curta observado, foi feita pelos picos referentes a M-OH e M-CH<sub>3</sub>.<sup>77,78,79,80</sup>

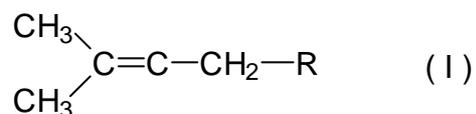
Para os ésteres, o pico do íon molecular foi observado em apenas alguns casos. Para todos os ésteres etílicos o pico base foi em m/z 88, também atribuído a uma quebra justificada através do rearranjo de McLafferty.



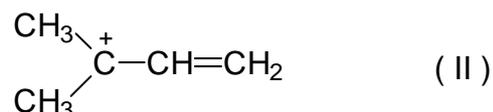
**FIGURA 28** – Rearranjo de McLafferty na fragmentação de ésteres etílicos

Os demais picos observados nos espectros de massa dos ésteres foram justificados pela saída do radical  $\cdot\text{OR}$ , quebras de ligações C-C com retenção de carga no fragmento contendo oxigênio e pelo fragmentos alquila. O éster ftálico encontrado, 1,2-benzenodicarboxilato de bis-2-metilpropila, foi caracterizado pelo pico em m/z 149 proveniente de quebras da ligação éster (FIG. 67).<sup>77,78,79,80</sup>

Os compostos como cis-farnesol,  $\alpha$ -bisabolol,  $\beta$ -farnaseno,  $\beta$ -citronelol e nerolidol, que apresentaram em suas cadeias o fragmento de estrutura I :



Apresentaram pico característico em m/z 69 referente ao íon II:



Todos os hidrocarbonetos cíclicos apresentaram em seus espectros de massa a presença do íon molecular. Os demais picos destes compostos foram associados a eliminação de radicais alquila. Já o ciclodeceno, além da eliminação de radicais alquila, mostrou fragmentos resultantes de eliminações de etileno e acetileno.<sup>77,78,79,80</sup>

Os hidrocarbonetos aromáticos apresentaram em seus espectros de massa a presença do íon molecular. A caracterização do fenil etanol foi feita com base na presença do pico base em m/z 91 referente a  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^+$ . Para os compostos, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol e 2,6-dimetilnaftaleno os picos foram associados a eliminações de radicais de substituintes do anel e rearranjos com eliminações de etileno e acetileno.<sup>77,78,79,80</sup>

Para todos os compostos identificados foram propostos caminhos de fragmentação que são apresentados em ANEXO (páginas 75-113).

## 5. CONCLUSÕES

---

---

A análise dos compostos secundários presentes nas aguardentes pode ser feita por CG e CG/EM através da concentração destes por ELL utilizando diclorometano como extrator ou pela adsorção em fibra de poliacrilato (MEFS).

A extração feita em fibra de poliacrilato se mostrou mais eficiente na extração dos compostos secundários. Esta eficiência foi comprovada em sua maior sensibilidade na extração destes, uma vez que compostos antes não extraídos através de ELL foram detectados nas análises cromatográficas das mesmas amostras de aguardentes extraídas por MEFS.

As análises cromatográficas com o uso da MEFS apresentaram menores desvios padrão, ou seja, melhor precisão para dosagens de 1-propanol, isobutanol, álcool isoamílico e acetato de etila. A MEFS apresentou as vantagens de não utilizar solvente orgânico, facilidade e rapidez de extração e consumo de pequena quantidade de amostra. Além de ser uma técnica mais econômica, uma vez que, a mesma fibra de extração pode ser utilizada em várias extrações. A ELL apresentou as desvantagens de produzir rejeitos de solvente orgânico e exigir cuidadosa elaboração do extrato para minimizar perdas de solvente por evaporação.

A MEFS juntamente com a análises por CG/EM permitiram a identificação de 38 compostos em uma amostra de aguardente. Dentre eles álcoois, ácidos, ésteres, terpenos, cicloalcanos e hidrocarbonetos aromáticos. Os ésteres e álcoois foram os que mais se destacaram em número de compostos na amostra de aguardente analisada. Comprovando a grande importância dessas classes de compostos no aroma e sabor da aguardente de cana.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- [1] PASTOR, M., Cachaça vira roteiro turístico em Minas. *Jornal da Pampulha* Belo Horizonte, 07-13 março, 1998, Caderno Turismo.
- [2] LOPES, M., Minas quer exportar cachaça. *Jornal Hoje em Dia*. Belo Horizonte, 25 maio, 1998, Caderno de economia.
- [3] BEZERRA, C.W.B., Caracterização Química da Aguardente de Cana-de-açúcar: Determinação de álcoois, ésteres e dos íons  $\text{Li}^{+1}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Hg}^{+2}$ . Instituto de Química de São Carlos. São Carlos, SP. 1995. 53p. (Dissertação de mestrado).
- [4] VARGAS, E.A., Qualidade da Aguardente de Cana Produzida, Engarrafada e/ou Comercializada em Minas Gerais. Faculdade de Farmácia UFMG. Belo Horizonte, MG. 1995.88p.(Dissertação de Mestrado).
- [5] RIBEIRO, J.C.G.M., Fabricação Artesanal da Cachaça Mineira. Belo Horizonte, MG. 1997. 162p.
- [6] Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto N<sup>o</sup> 2.314 de 04 de setembro de 1997.
- [7] Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Complementação dos padrões de identidade e qualidade para destilados alcoólicos, Portaria N<sup>o</sup> 371 de 18 de setembro de 1974.
- [8] Ministério da agricultura e do Abastecimento. Portaria N<sup>o</sup> 076/86 de 03 de dezembro de 1986.
- [9] BECZE, G.I., SMITH, H.F; VAUGHN, T.E. Use of Gas Chromatography in Distillery Research and Control. *Journal of the A .O :A .C.* v.50, n.2, p.311-319, 1967.
- [10] KAHN, J.H.; BLESSINGER, E.T. Collaborative Study of the Quantitative Gas-Liquid Chromatographic Determination of Fusel Oil and Other Components in Whisky. *Journal of the A .O :A .C.* v.55, n.3, p.549-556, 1972.
- [11] MARTIN, G.E. et al. Gas-Liquid Chromatographic Determination of Congeners in Alcoholic Products with Confirmation by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* v.64, n.1, p.186-190, 1981.

- [12] LEHTONEN, M. Gas-Liquid Chromatographic Determination of Volatile Phenols in Matured Distilled Alcoholic Beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* v.66, n.1, p.62-70, 1983.
- [13] LEHTONEN, M. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Nonvolatile Phenolic Compounds in Matured Distilled Alcoholic Beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* v.66, n.1, p.71-77, 1983.
- [14] WILSON, L.A ., DING, J.H., WOODS A .E. Gas Chromatographic Determination and Pattern Recognition Recognition Analysis of Methanol and Fusel Oil Concentrations in Whiskeys. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* v.74, n.2, p.248-257, 1991.
- [15] GONZÁLEZ, L.M., González-Lara, R. A selective separation of alcoholic beverages and distilled wines by gas chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, v.32,p-195-198, may 1994.
- [16] SIMPKINS, W. Detection of illicit spirits. In: LINSKENS, H.F., JACKSON, J.F. *Modern Methods of Plant Analysis*. Berlin: Springer-verlag, v.6, p.317-338, 1988.
- [17] FERREIRA V.;SHARMAN M.; CACHOJ.F.; DENNIS J. New and efficient microextraction/ solid-phase extraction method for the gas chromatographic analysis of wine volatiles. *J. Chromatography A*, 731 (1996), 247-259.
- [18] STANSHENKO E.E.;FERREIRA M.C. et al. Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatography A*, 779 (1997), 360-369.
- [19] MARTIN et al; *Official Methods of Analysis ; A .O .A .C.*; v.64, n.1,1998.
- [20] ETIEVANT, P., MAARSE, H. et al. Wine Analysis: Study and Comparison of Techniques Developed for the Study of Volatile Constituents. *Chromatographia*, v.21, n.7, p.379-386, July 1986.
- [21] PAUWLISZYN, J.. Solid phase microextraction: theory and practise/ Janusz Pawliszyn. WILEY - VCH. Canada (1997).
- [22] ZHANG Z., YANG M.J. AND PAWLISZYN J., "Solid Phase Microextraction". *Anal. Chem.* 66,844 (1994).
- [23] ZHANG Z., YANG M.J. AND PAWLISZYN J., "Headspace Solid Phase Microextraction". *Anal. Chem.* 65,1843 (1993).

- [24] Maia, A . B. et al. *2º Curso de Tecnologia para Produção de Aguardente de Qualidade*. Departamento de Engenharia Química. Belo Horizonte, MG, maio, 1994. 75p.
- [25] LIMA, U.A ., Produção nacional de aguardente e potencialidade dos mercados externos e internos. In: MUTTON, M.J.R., MUTTON, M.A . *Aguardente de Cana – Produção e Qualidade*. FUNEP – Jaboticabal,SP, 1992, p.151-163.
- [26] MATTOS, ,A .R. *Açúcar e Álcool no Brasil*. São Paulo: Editora Nacional, 1942. 221p.
- [27] Disponível em: <<http://www.muca.com.br/historia.htm>>. Acesso em: 20 out. 1998.
- [28] GODOY, M. M., PAIVA, C.A . *Economia Canavieira: 300 anos de História e Cultura em Minas*. Sabará: UFMG/FACE/CEDEPLAR, dezembro,1993.32p. (Trabalho apresentado no I Encontro Técnico Pró-Cachaça).
- [29] YOKOYA, F., *Fabricação da Aguardente de Cana – Série Fermentações Industriais, nº 2*. Campinas, SP: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”,1995.87p.
- [30] CHEREM, C.E. Envelhecimento precoce cria a cachaça ideal. *Jornal Estado de Minas*. Belo Horizonte,05 novembro,1997. Caderno Agropecuário.
- [31] INDI – INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL – *Aguardente em Minas Gerais – Estudo Setorial*. Belo Horizonte, 1982. 82p.
- [32] FILHO, O.G. *Aguardente de Caldo de Cana-de-açúcar: Aspectos teóricos e práticos associados a tradição e qualidade*. Lavras, MG. 1997.33p.
- [33] TEIXEIRA, L.G. Instruções para fabricação de aguardente. *Boletim do Instituto Agrônomo*. Campinas, SP.v.49,1957.12p.
- [34] VALSECHI, O . *Aguardente de Cana*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1960, 119p.
- [35] SCHWAN R.F., CASTRO H.A . *Produção Artesanal de Aguardente*. UFLA/FAEPE. Lavras, MG. P.77-90, 1996.
- [36] FARKAS, J. *Technology and Biochemistry of Wine*. Montreaux: Gordon and Breach Science Publishers, v.1, 1988. 389p.

- [37] NASCIMENTO, R.F. et al. A Influência do Material do Alambique na Composição Química das Aguardentes de Cana-de-açúcar. *Química Nova*. v.21, n.6, p. 735-739p. 1998.
- [38] LUCENA, V. G., Componentes secundários das aguardentes. Métodos de determinação. Resultados analisados e algumas considerações. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v.49, n.2, p.2-4, 1957.
- [39] RANKINE, B. C., Formation de higher alcohols by wine yeasts. *Journal of Science of Food and Agriculture*. v.18, p.583-589. 1967.
- [40] OLIVEIRA, A .J., Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Piracicaba, SP, 1970. (Tese de doutorado).
- [41] ALMEIDA, J. R., VALSECHI, O ., NOVAES, R.F. Envelhecimento das Aguardentes.. *Anais da Escola Superior de Agricultura de Luís de Queiroz*, Piracicaba, v.4, n.56, p11-83,1947.
- [42] PIGGOTT, J.R. (Ed.). *Sensory Analysis of Foods*. Elsevier Applied Science Publishers, London, England, 1984.
- [43] MAIA, A .B.R.A ., PEREIRA, A .M., LIMA, L.A ., CARVALHO, J.S., RINCON, R.G., CARVALHO, P.D., NELSON, D.L. Fermentação alcoólica semi-contínua destinada à produção de aguardente. *Boletim da SBCTA*, Campinas, v.25, n.1, p33-36, 1991.
- [44] BRAU, H.M. Review on the origin and composition of fusel oil. *Tech. Paper 17*, Universidade de Puerto Rico, Agric.Exp. Sta., Rio Piedras, p.5-30,1957.
- [45] REAZIN, G. SCALES, H., ANDREASEN, A . Mechanism of major congeners formation in alcoholic grain fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, Easton, v.18, n.4, p.585-589,1970.
- [46] SOUZA, L.G., LLISTÓ, A .M.S.M. Alguns componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana. Determinação por cromatografia gasosa. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v.91, n.3, p.13-16, 1978.
- [47] ALMEIDA, M.E.W., BARRETO, H.H.C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia em fase gasosa. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v.31, p.117-124,1972.
- [48] SMEDT, P., LIDDLE, P. A .P. Présence d'alcool allylique (propéne-2-01-1) et dérivés dans les eaux de vie. *Industries Alimentaires Agricoles*, Paris, v.93, n.1, p.41-43, 1976.
- [49] NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Americ. J. Enol. Vitic., Reedley*, v.37, n.1, p. 84-96, 1986.

- [50] BOTELHO, J. Impurezas do álcool. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v.25, n.6, p.99-101,1945.
- [51] BOBBIO, P.A . Sub-produtos da fermentação alcoólica do açúcar por levedura. In: *Curso sobre fermentação alcoólica*. Piracicaba: ESALQ-USP, v.2, p.227-233,1960.
- [52] ALMEIDA, J. R., VALSECHI, O ., NOVAES, R. F. Envelhecimento das aguardentes. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz*, Piracicaba, v.4, n.56, p.11-83,1947.
- [53] ALLEN, H.W. *White wines and cognacs*. London: Constable, 1952, 246p. apud LIMA, U.A . *Estudos dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana*. Piracicaba: Escola Superior Luís de Queiroz da USP, 1964 (Tese, concurso efetivo ao cargo de professor catedrático - ESALQ).
- [54] UIA - Universidade Internacional das Aguardentes. *Les differents Rhums*. Curso sobre Runs, Segongag, França, 1994.
- [55] GUILLAUME, J.G.A . Le rhum; sa fabrication et sa chimie, 1939, apud LIMA, U.A . *Estudos dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana*. Piracicaba: Escola Superior Luís de Queiroz da USP, 1964 (Tese, concurso efetivo ao cargo de professor catedrático - ESALQ).
- [56] LIMA, U.A . *Estudo dos Principais Fatores que Afetam os Componentes do Coeficiente não-Álcool das Aguardentes de cana*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz da USP,1964, 137p. (Tese, concurso efetivo ao cargo de professor catedrático – ESALQ).
- [57] VARGAS, E A. ., GLÓRIA, M.B.A . Qualidade da aguardente de cana (*Saccharum officinarum* L.) produzida, engarrafada e/ou comercializada no Estado de Minas Gerais. *Boletim da SBCTA*, v.15, n.1, p.43-46, 1995.
- [58] LEUHTONEN, M., JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOT, J.R. *Flavour of Distilled Beverages: origin and development*. Deerfield Beach: Verlag Chemie International, Inc.,1983.279p.
- [59] DIAS, S.M.B.C., *Efeito de Diferentes Tipos de Madeira sobre Composição Química da Aguardente de Cana Envelhecida*. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG. 1997. (Dissertação de mestrado).

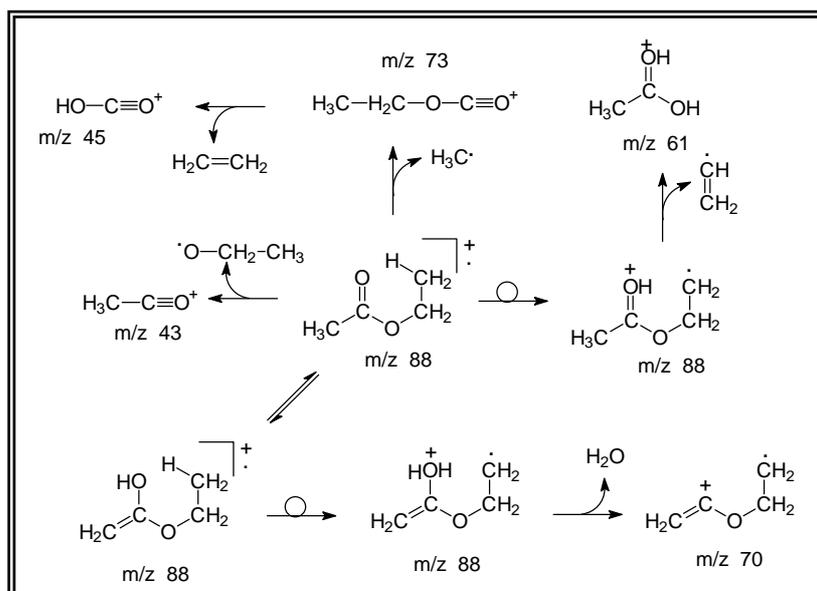
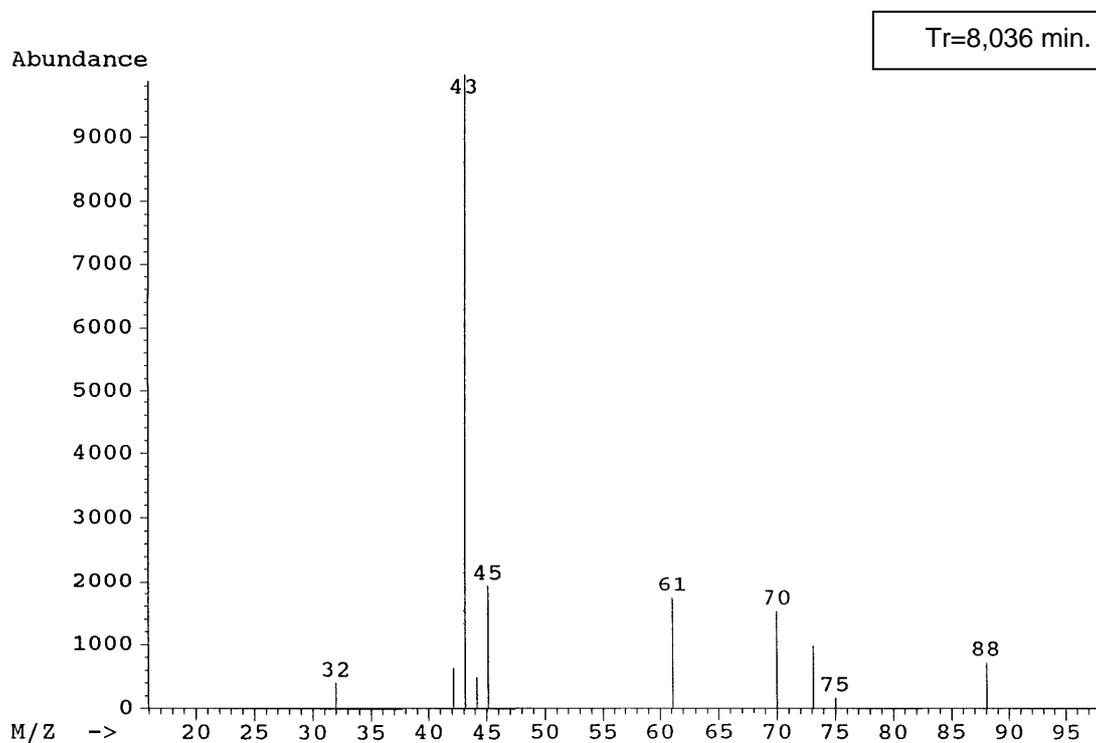
- [60] KULKARNI, A .D., MODAK, H.M., JADHAV, S.J. Study of 5-hidroxyethyl furfural (HMF) in juice from burnt sugar cane. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v.90, n.1078, p.185-188, 1988.
- [61] PUECH, J.L. *et alli*. Vieillessement du Cognac. *Science Aliments*. v.4, n.1, p.66-80, 1983.
- [62] DELGADO, T., GOMEZ-CORDOVÉS,C., VILLARROYA, B. *Relationship between phenolic compounds of low molecular weight as indicators of the ageing conditions and quality of brandies*. *Americ. J. Enol. Vitic.*, Reedley, v.41, n.4, p.342-345,1990.
- [63] VALAER, P. Brandy. *Ind. Eng. Chem.*, Washington, v.31, n.3, p.339-352, 1939.
- [64] FRANÇA. Décret 8.841622 avril, 1988. *Journal Officiel de la République Française*. França, 1988. P.5461.
- [65] RIFKIN, H.L., WILSON, R., HOWIE, D., MULLER, S.B. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. *J. Inst. Brew.*, Londres, v.95,p.115-119, 1989.
- [66] COOK, R., MCCAIG, N., McMILLAN, J.M.B., LUMSDEN, W.B. Ethylcarbamate formation in grain based spirits.III. The primary source. *J.Inst. Brew.*, Londres, v.96, n.4, p.233-244, 1990.
- [67] OUGH, C.S. Influence of nitrogen compounds in grapes on ethylcarbamate formation in wines. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and wines*. Seattle, Washington: The American Society for Enology and Viticulture, 18-19 June, 1991.
- [68] BATAGLIA, R., CONACHER, H.B.S., PAGE, B.D. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food additives and contaminants*, London, v.7, n.4, p.477-496, 1990.
- [69] KODOMA, S.,SUZUKI, T., FUJINAWA, S., DEL LA TEJA, P., YOTSUZUKA, F. Prevention of ethyl carbamate formation in wine by urea degradation using acid urease. *Proceedings of International Symposium on Nitrogen in Grapes and wines*. Seattle, Washington: The American Society for Enology and Viniculture, 18-19 June, 1991.
- [70] PUPPIN, A .M., TOLEDO, M.C.F., SERRA, G.E. Contamination os sugar cane juice and its products by polycyclic aromatic hydrocarbons. CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 9, agosto, 1995, Budapest, Hungry. *Abstracts*. Budapest:1995. 77p. Resumo.
- [71] GOYER, A . *The basic science of poison*. 3ed. New York: Macmillan, 1986. 974p.

- [72] FRANCO, D.W., LIMA NETO, B.S., BEZERRA.C.W.B., POLASTRO, L.R., CAMPOS, P., NASCIMENTO, R.N., FURUYA, S.M.B. O cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle. *Ofício nº32/94*, GEQPD. Pirassununga, junho, 1994.
- [73] SOUZA, L.G., LIMA, L.A ., MISCHAN, M.M. Ocorrência de cobre nas aguardentes.. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v.53, n.6, p.406-410, 1977.
- [74] LIMA NETO, B. S., BEZERRA C.W.B. et al. *Química Nova*. v.17, p.220.1994.
- [75] EISERT R., LEVSEN K., "Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. *J Chromatogr. A* 733, 143 (1996).
- [76] SILVA, F. C., CARDEL, Z. L. et al, *21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Poços de Caldas, 25-28 de maio, 1998.
- [77] SILVERSTEIN R. M., BASSLER G. C., MORRILL, T. C., *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro, RJ. Editora Guanabara Dois S.A . 1979. 299p.
- [78] BUDZIKIEWICZ, H.,DJERASSI, C., WILLIAMS D. H., *Interpretation of mass spectra of organic compounds*. San Francisco, EUA. Holden-Day, INC. January, 1964.271p.
- [79] BUDZIKIEWICZ, H.,DJERASSI, C., WILLIAMS D. H., *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry: steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes*. San Francisco, EUA. Holden-Day, INC. v.2, July, 1964.305p.
- [80] GOTTLIEB, O .R. *Introdução à espectrometria de massa das substâncias orgânicas*. Rio de Janeiro, RJ. 1968.175p.

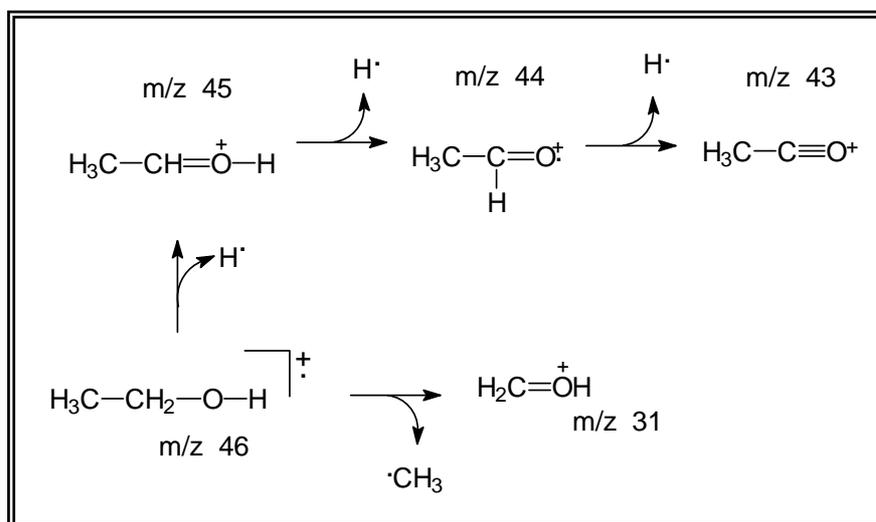
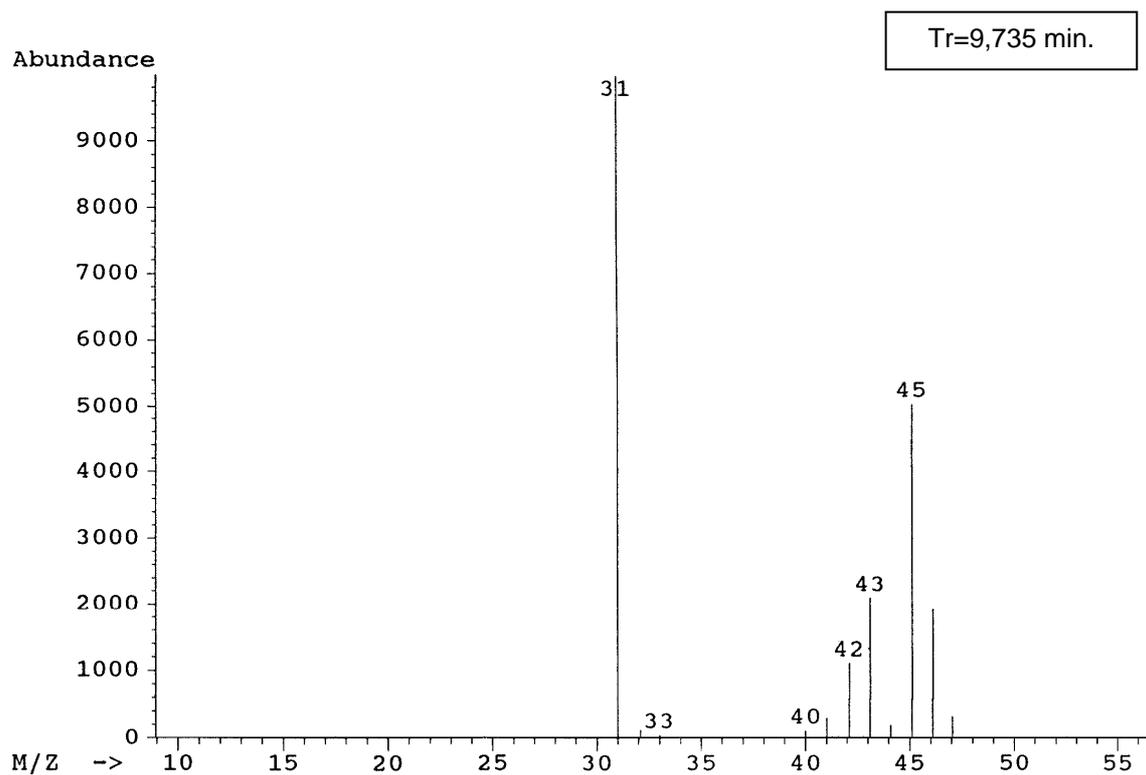
## **7.ANEXO**

---

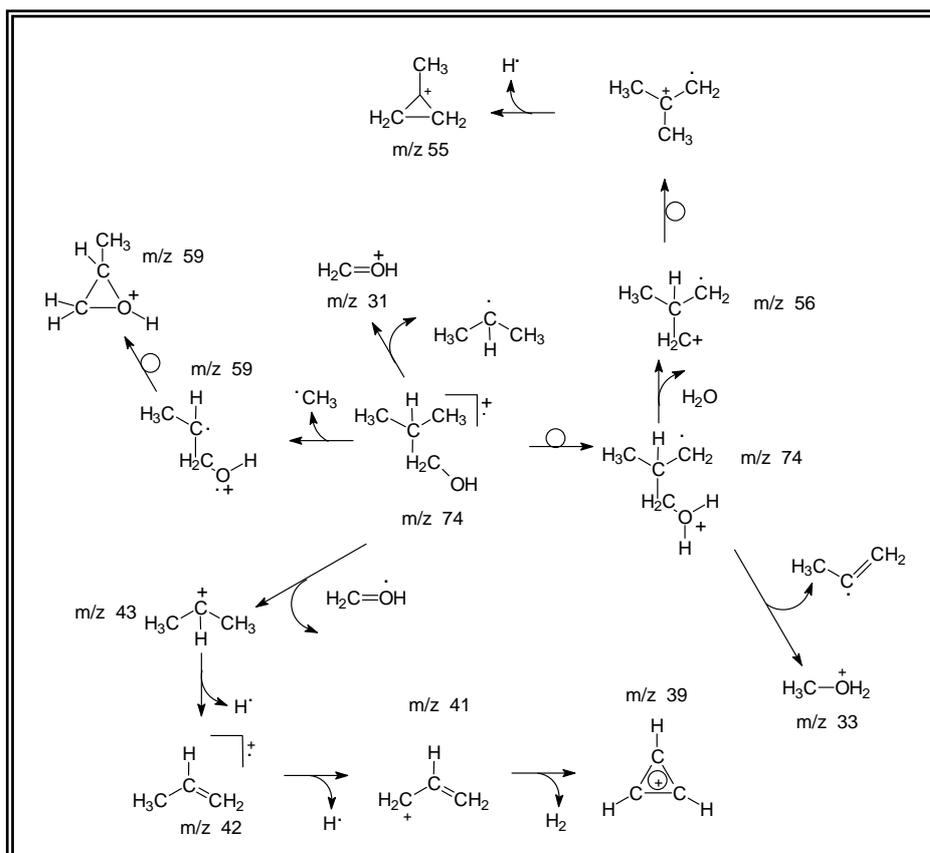
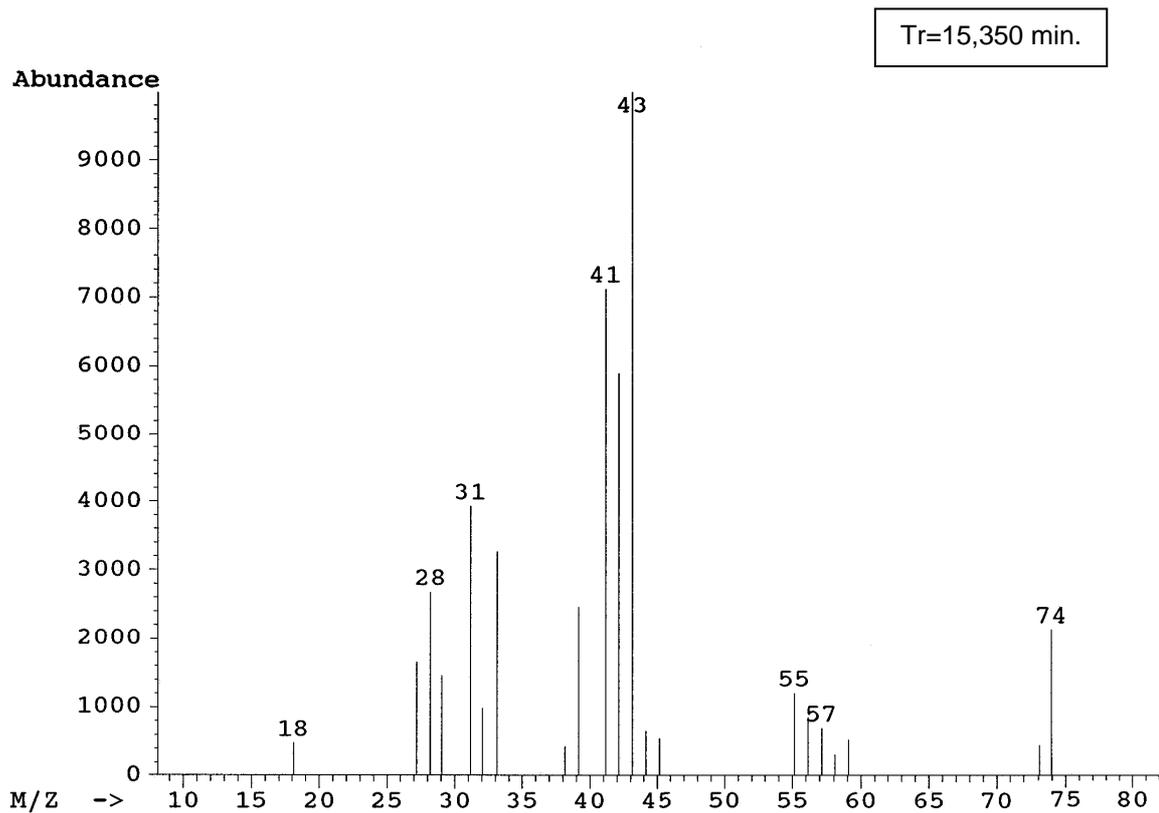
---



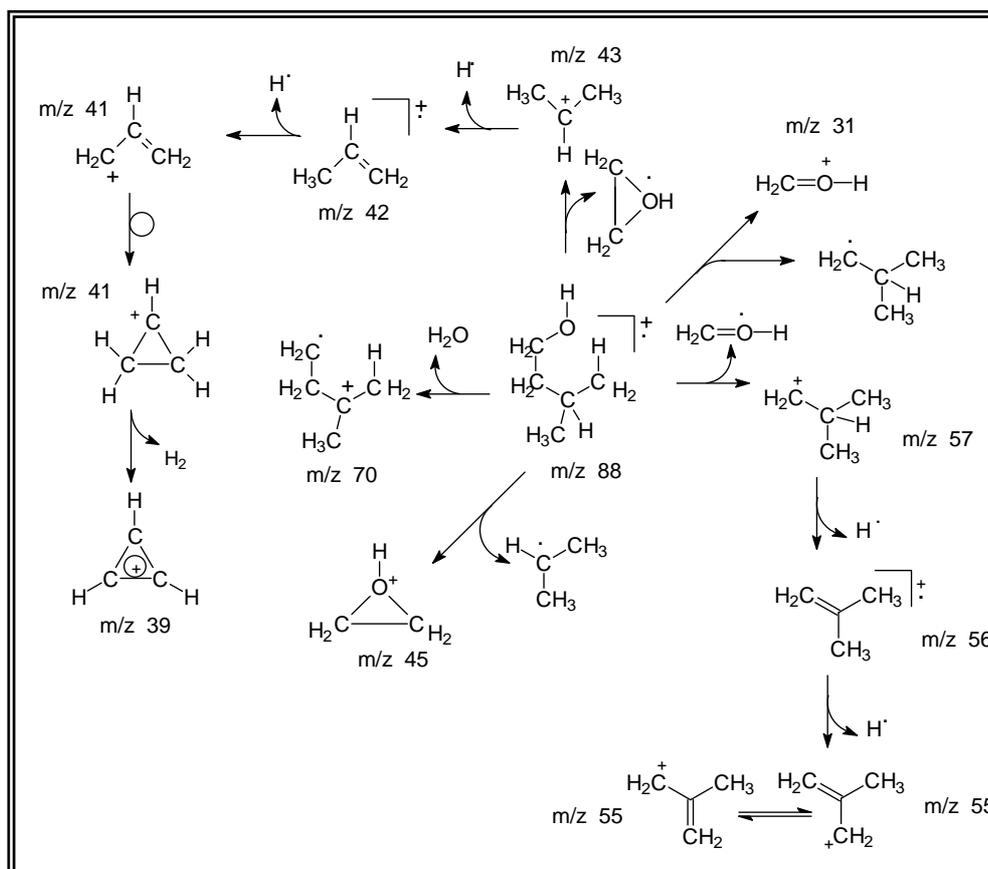
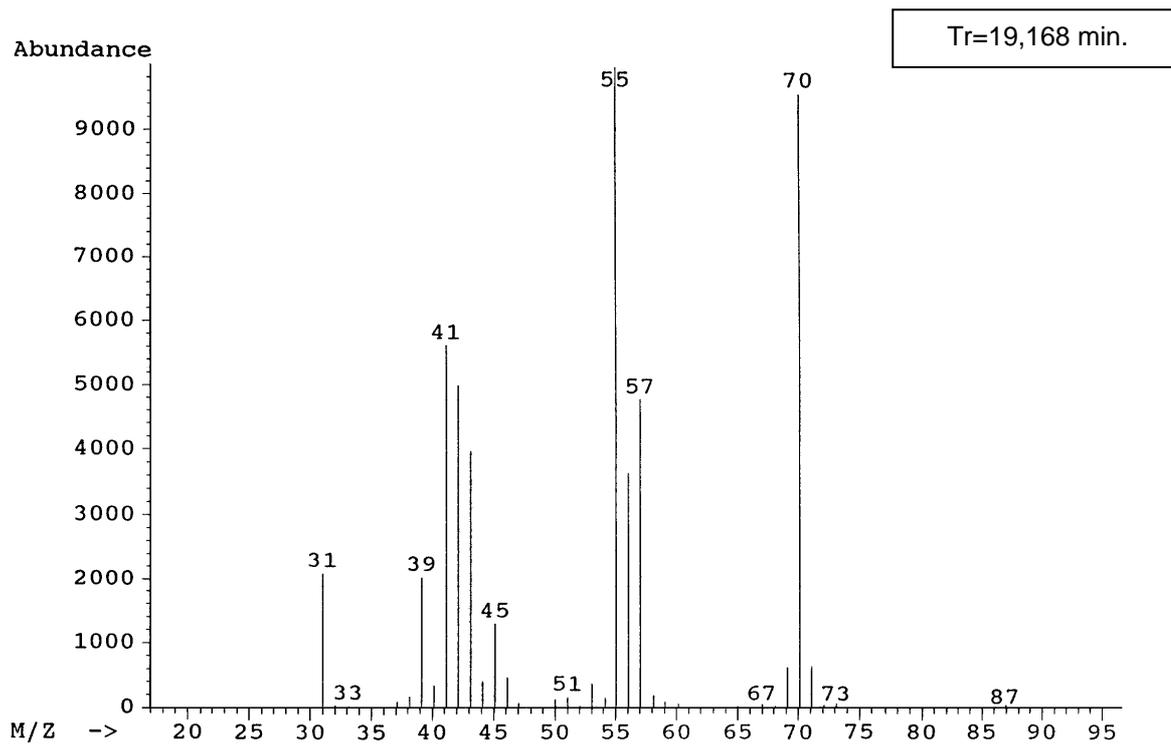
**FIGURA 29** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o acetato de etila



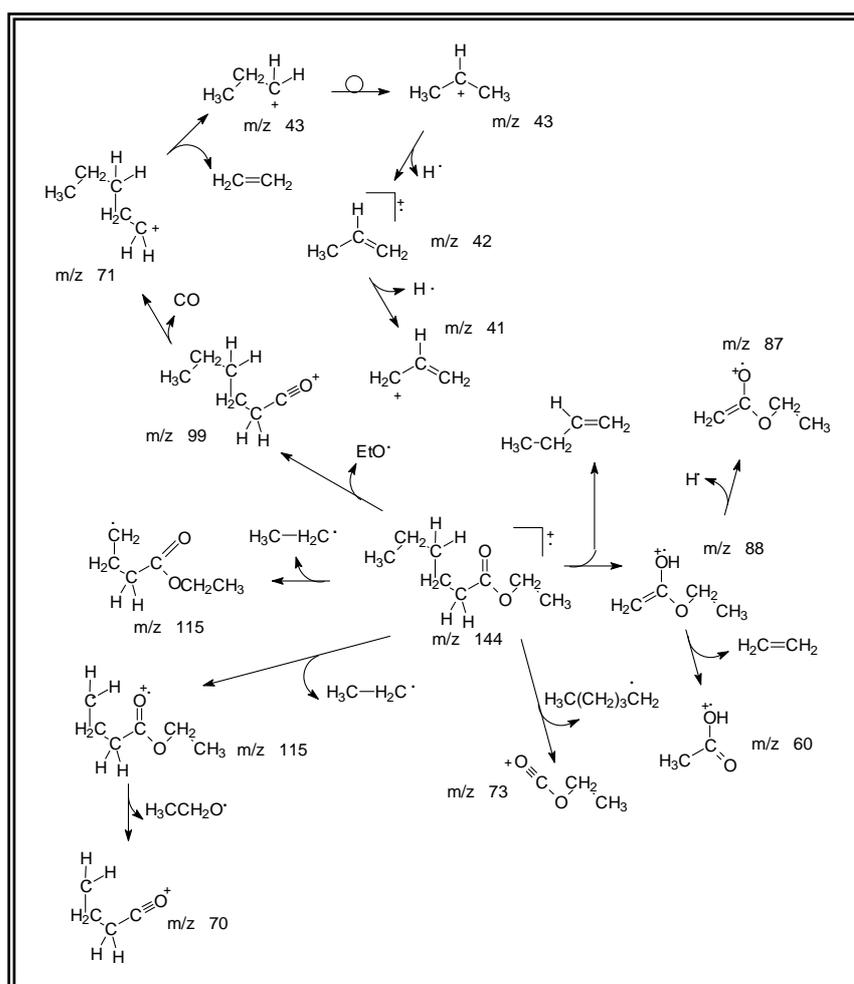
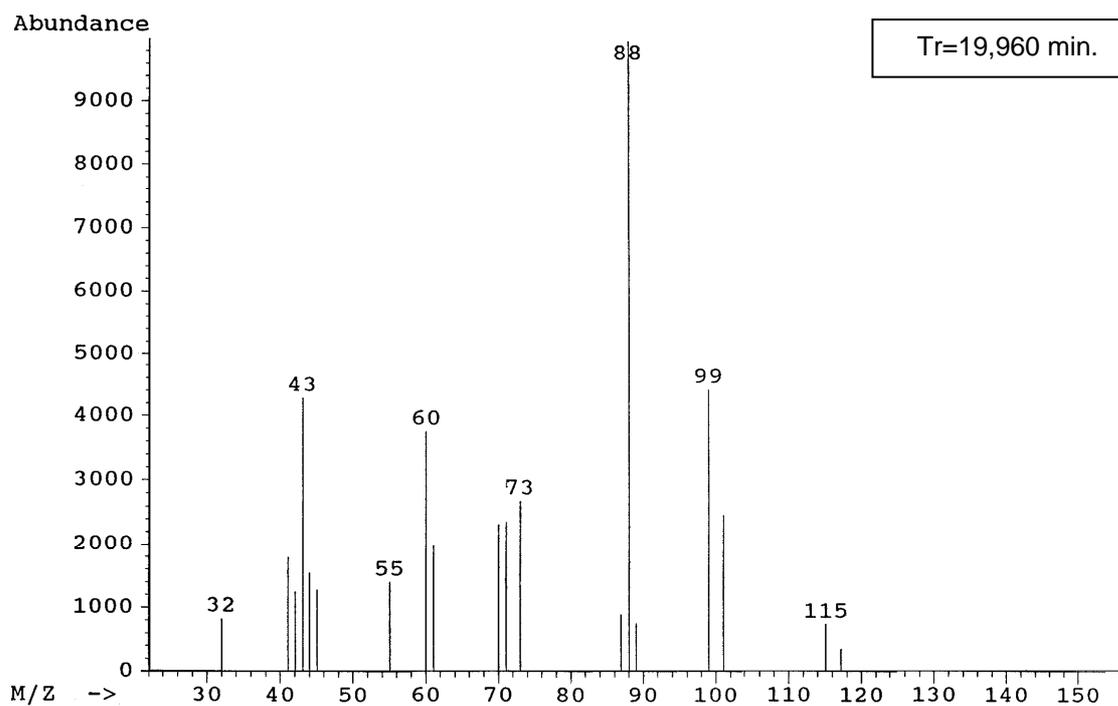
**FIGURA 30** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o etanol



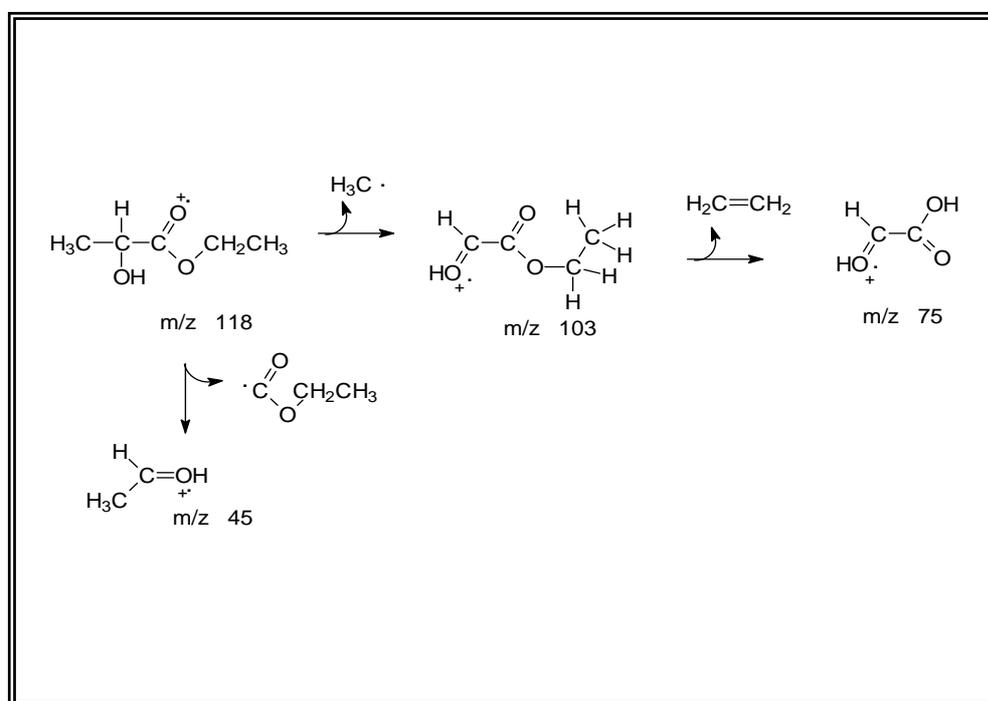
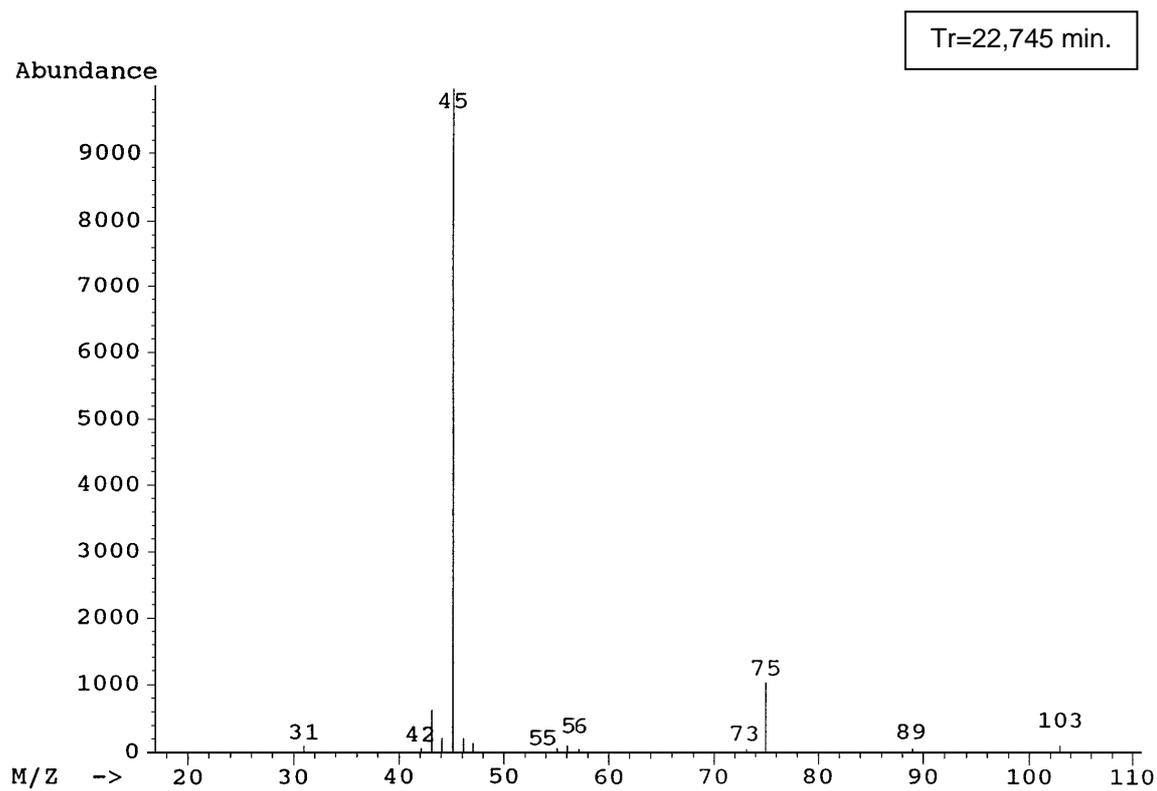
**FIGURA 31** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o isobutanol



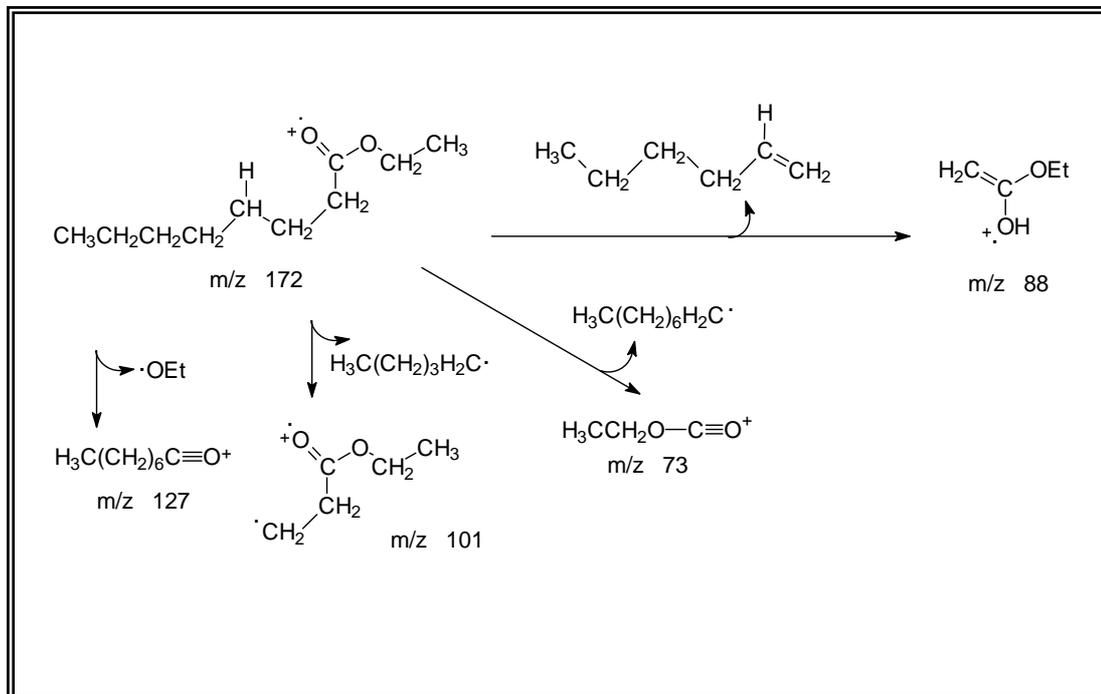
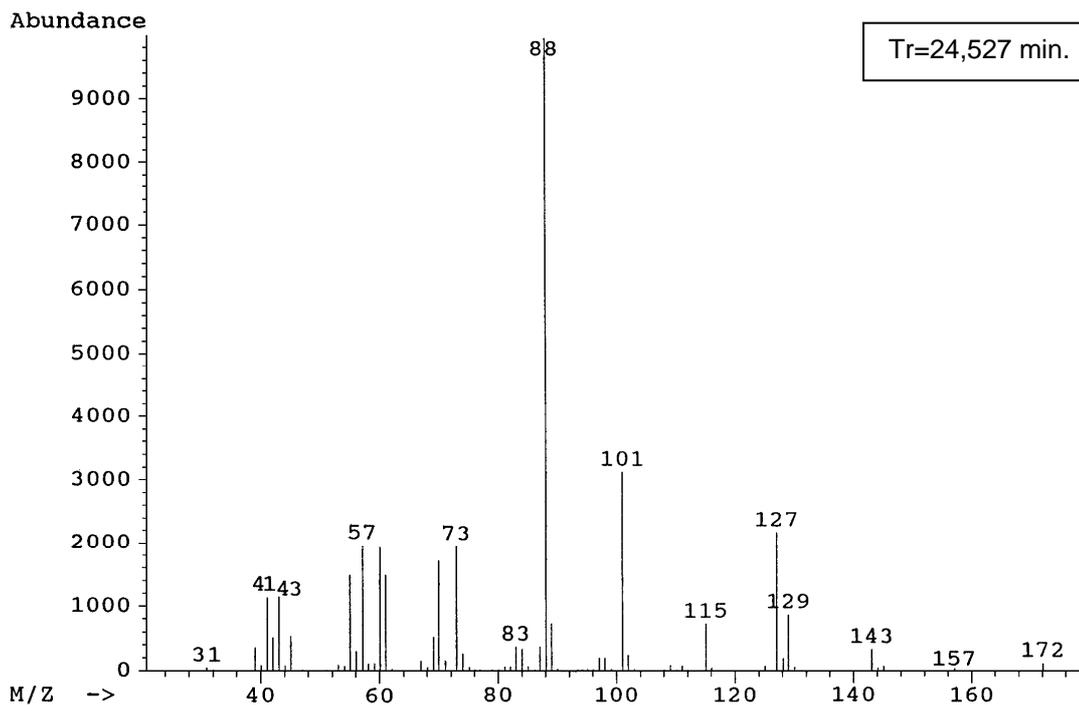
**FIGURA 32** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o álcool isoamílico



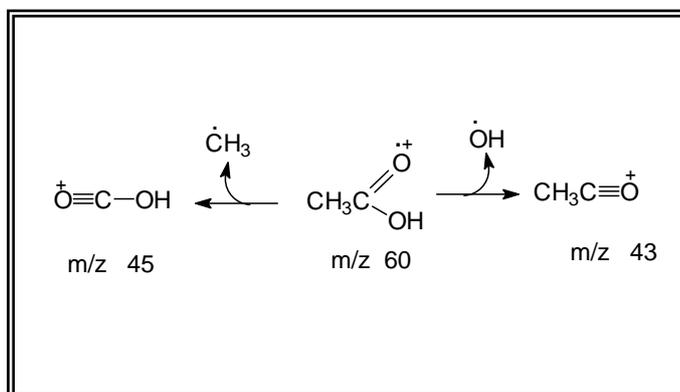
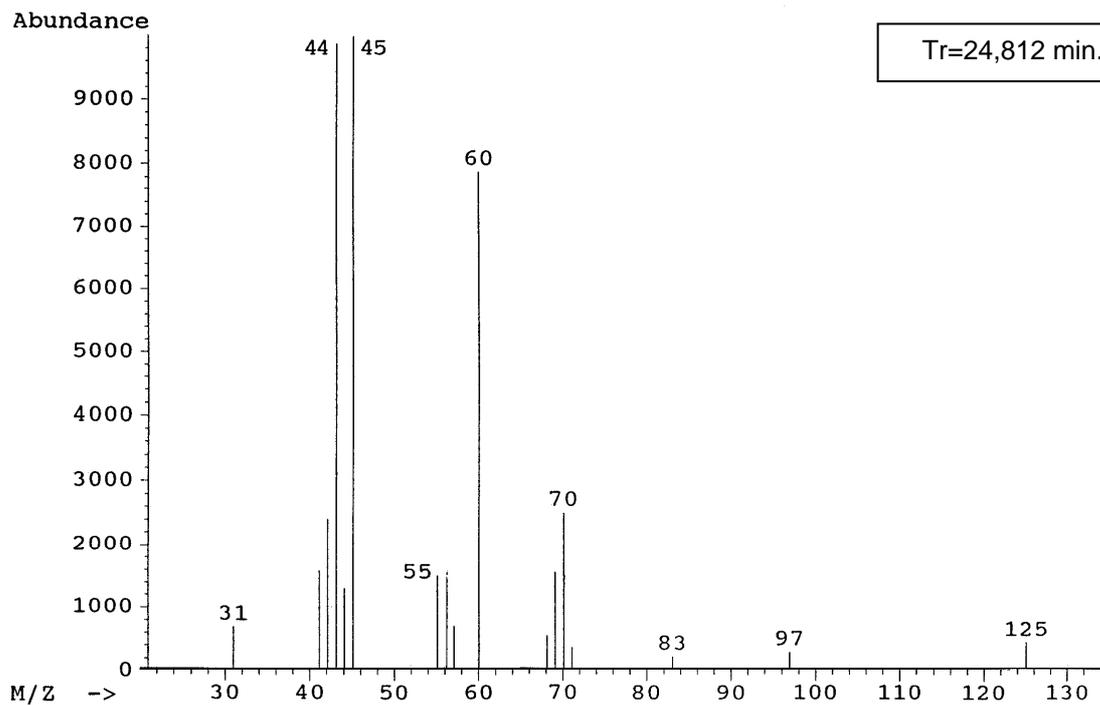
**FIGURA 33** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o hexanoato de etila



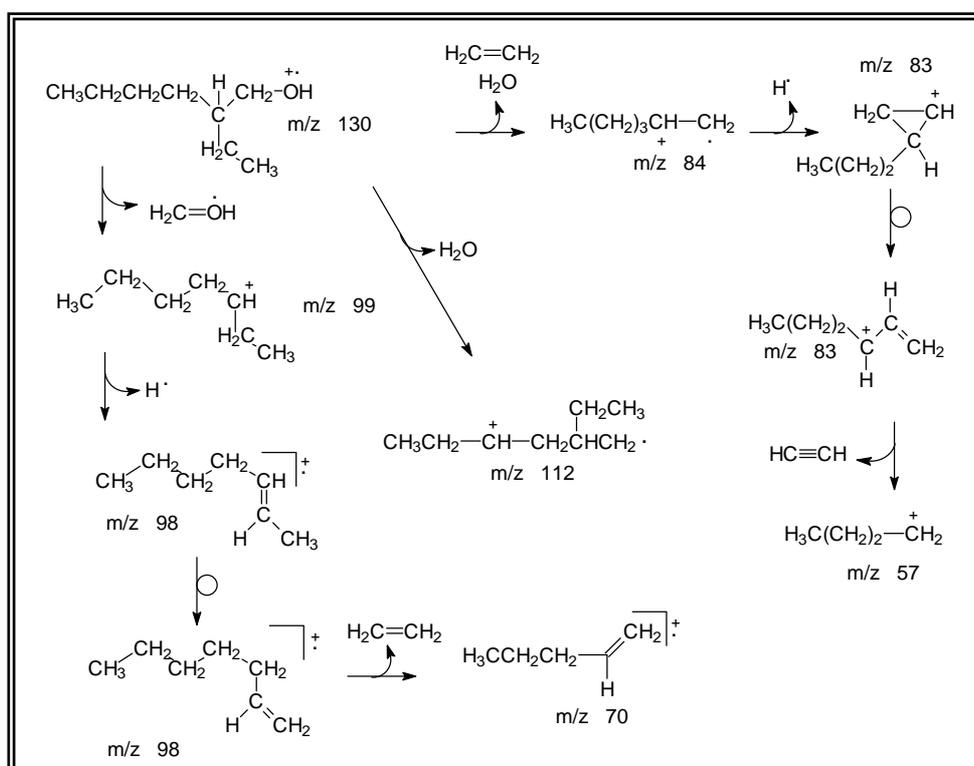
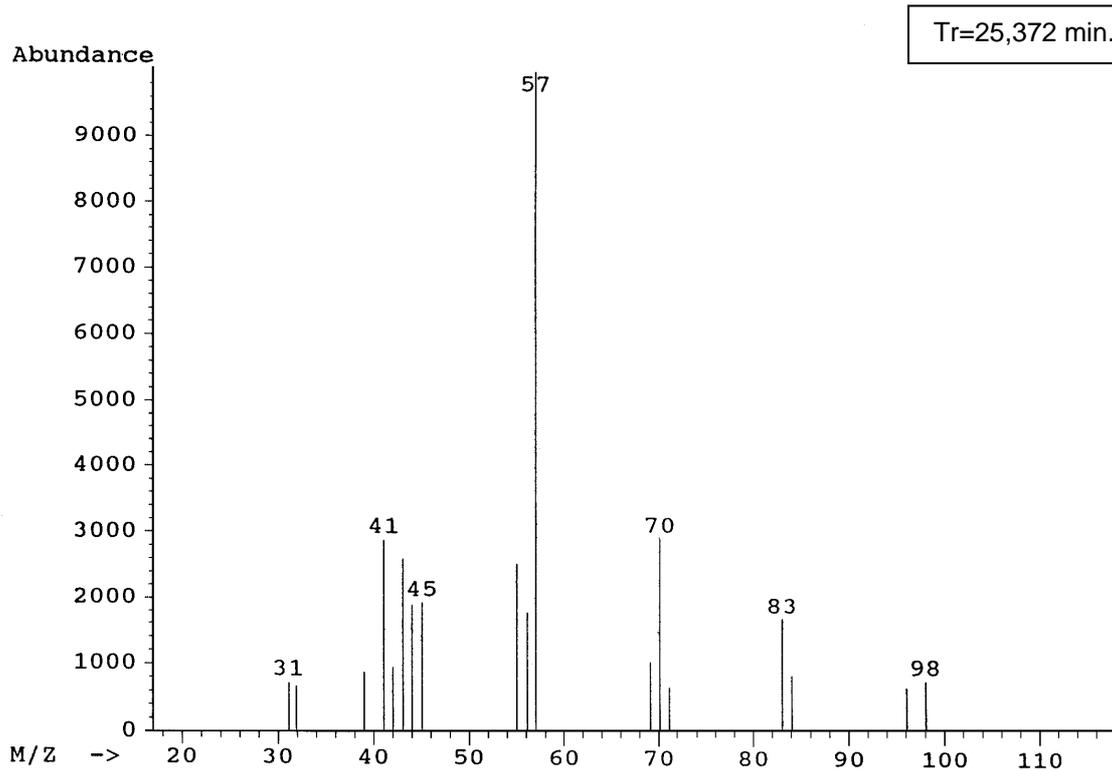
**FIGURA 34** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-hidroxi-propanoato de etila



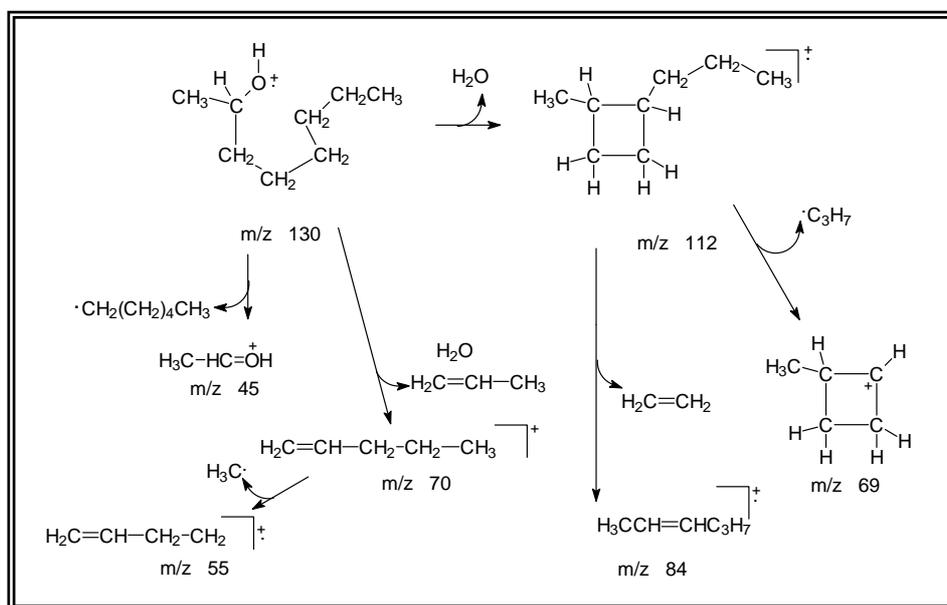
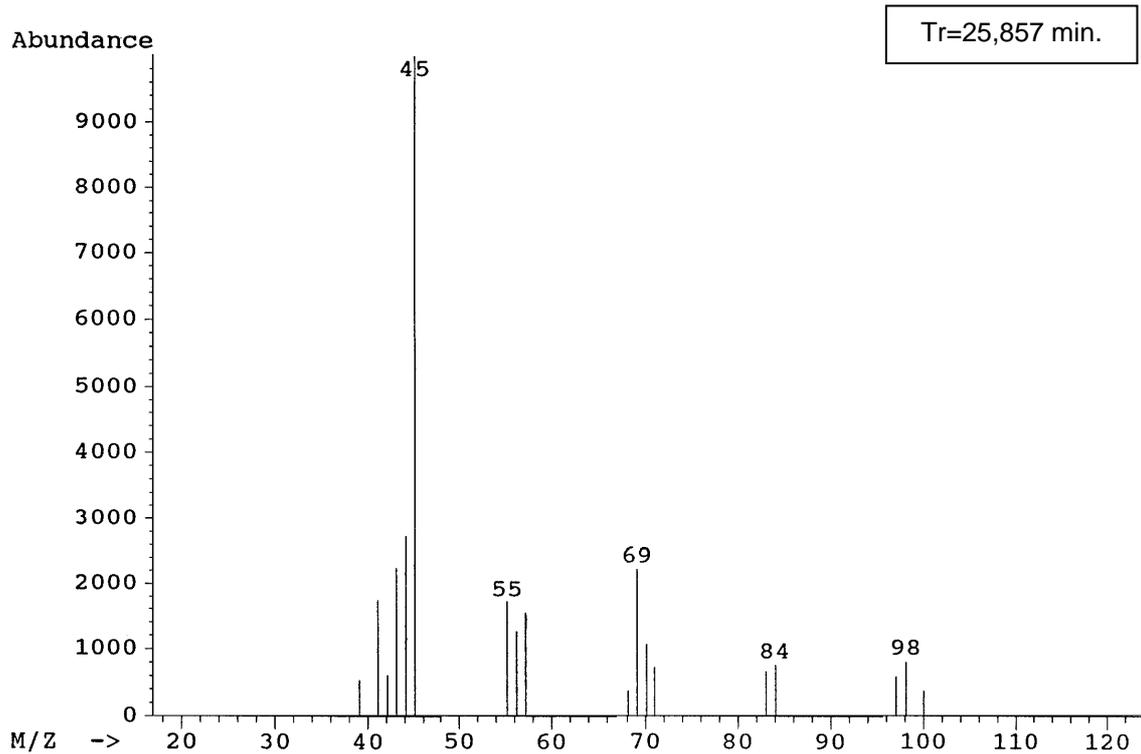
**FIGURA 35** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o octanoato de etila



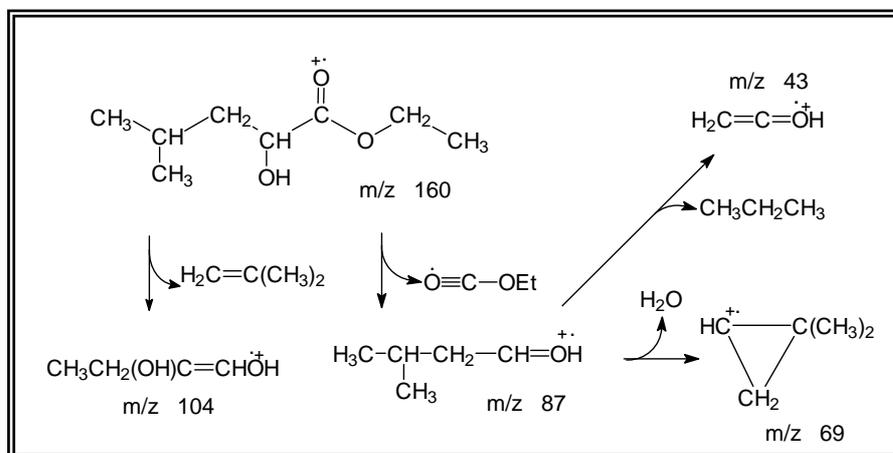
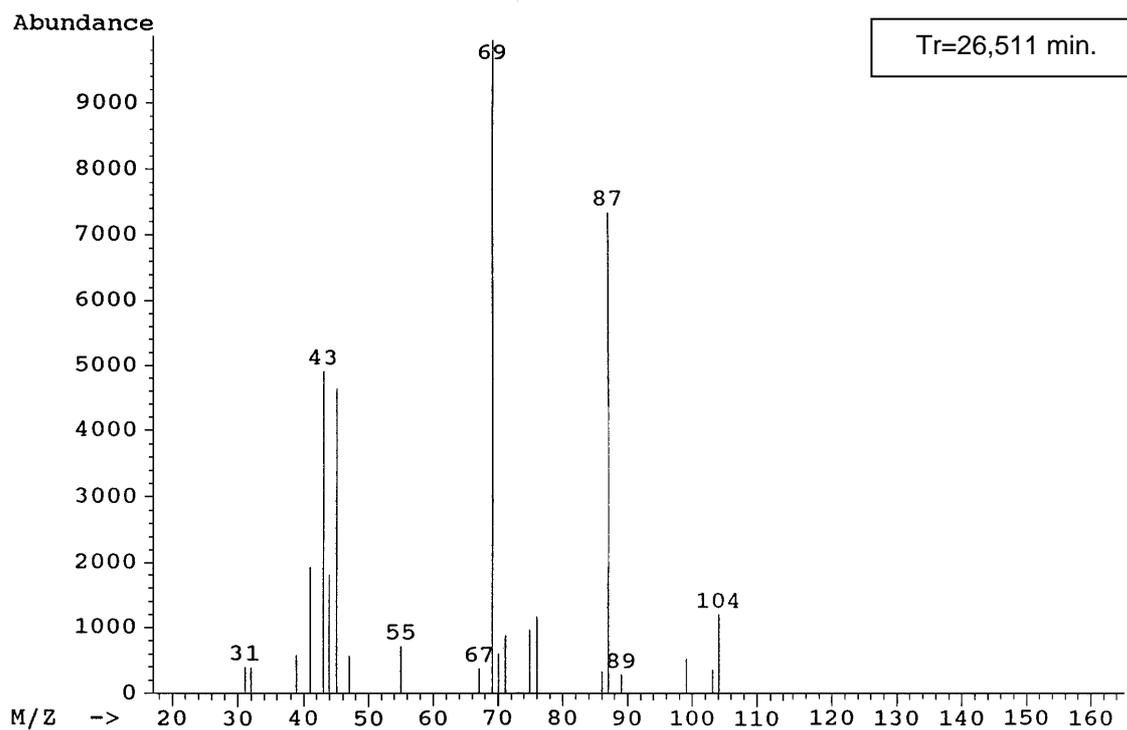
**FIGURA 36** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ácido acético



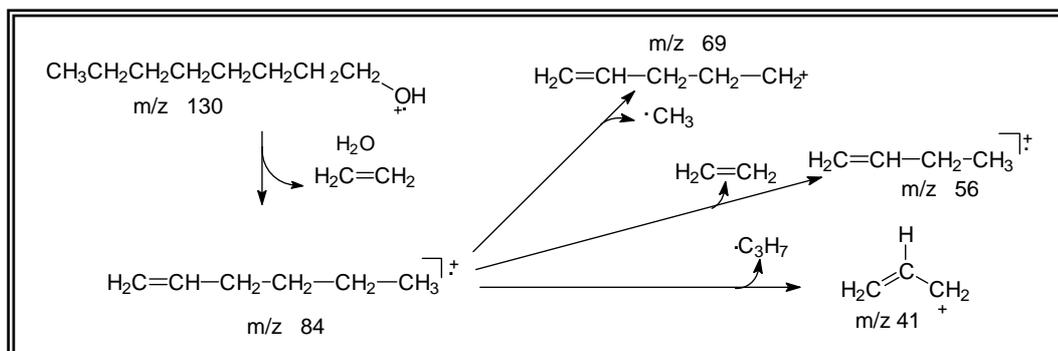
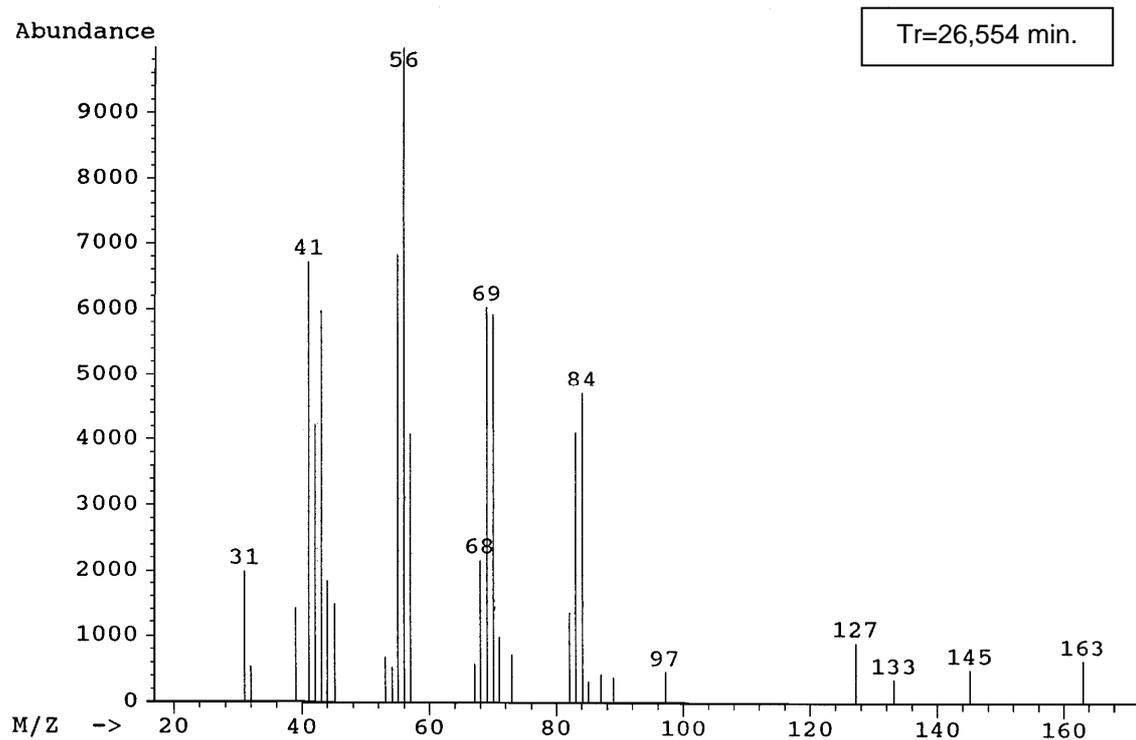
**FIGURA 37** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-etil-hexanol



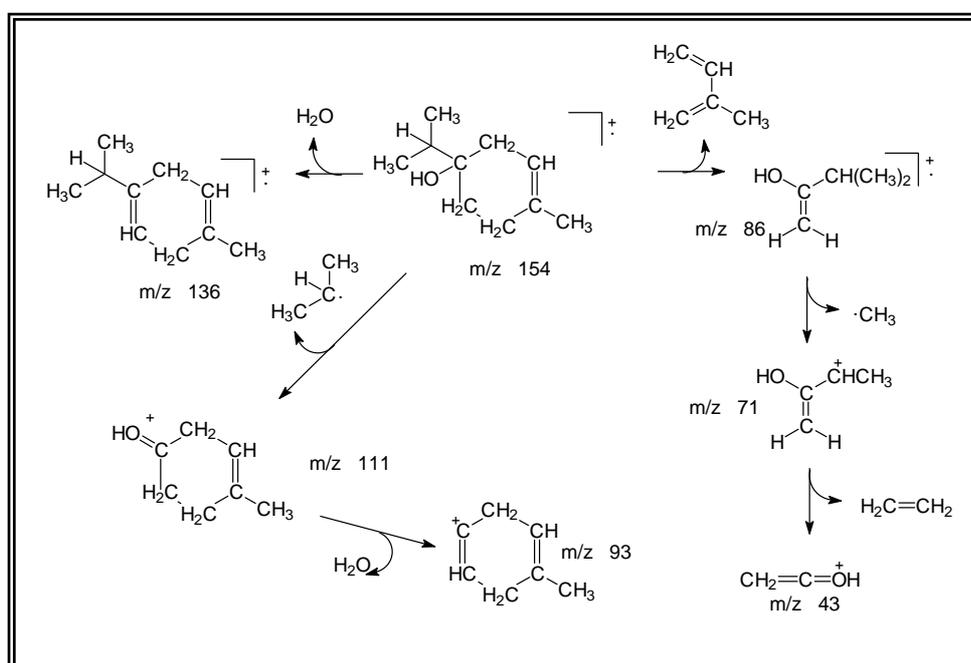
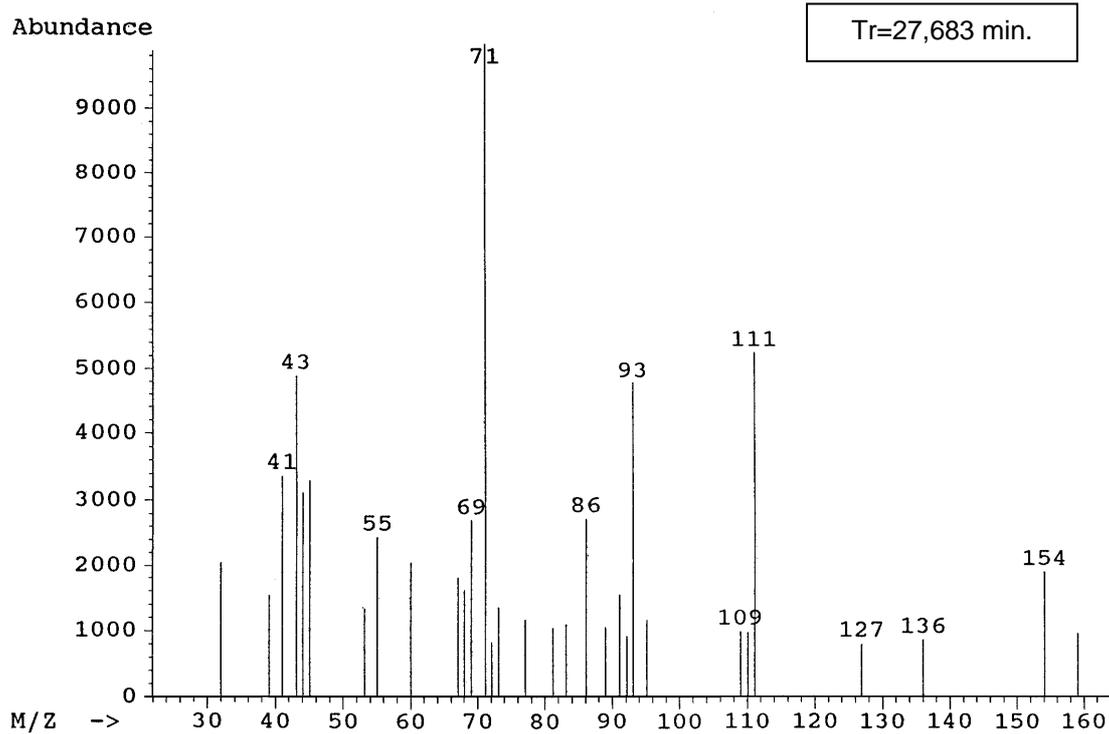
**FIGURA 38** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-octanol



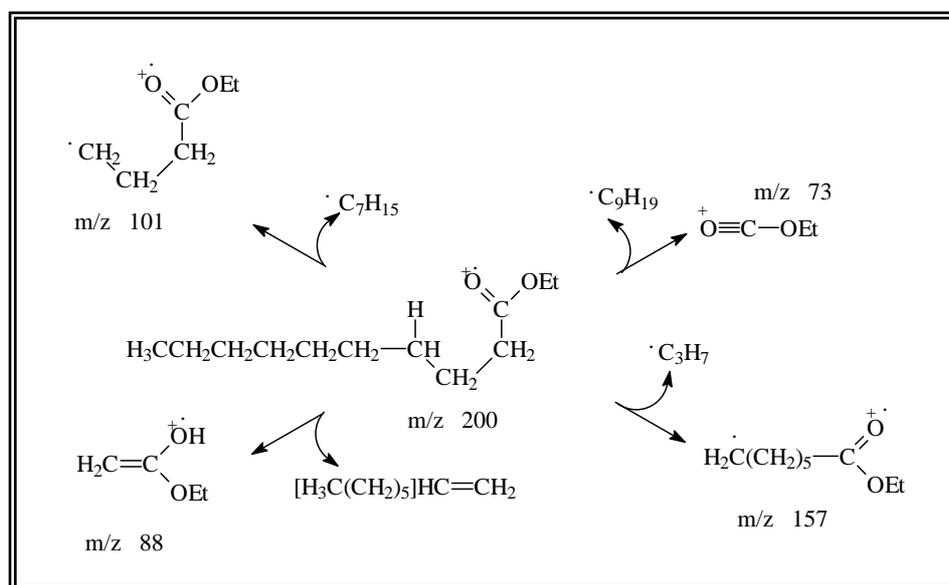
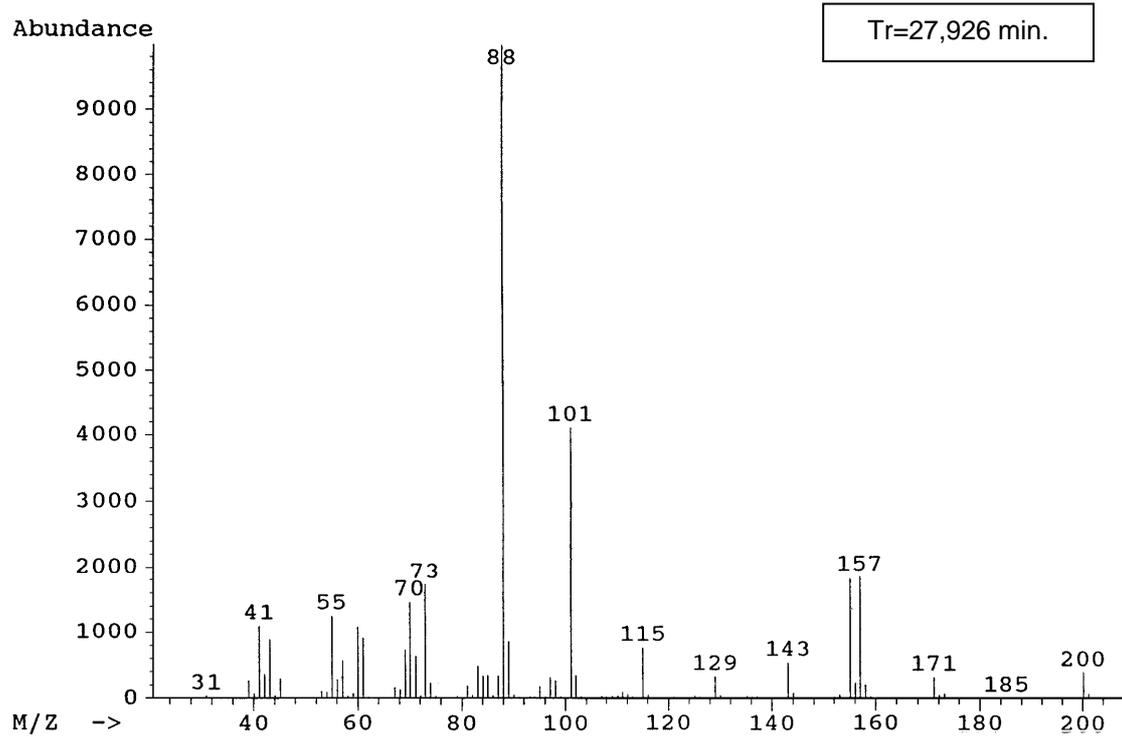
**FIGURA 39** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2-hidroxi-4-metil-pentanoato de etila



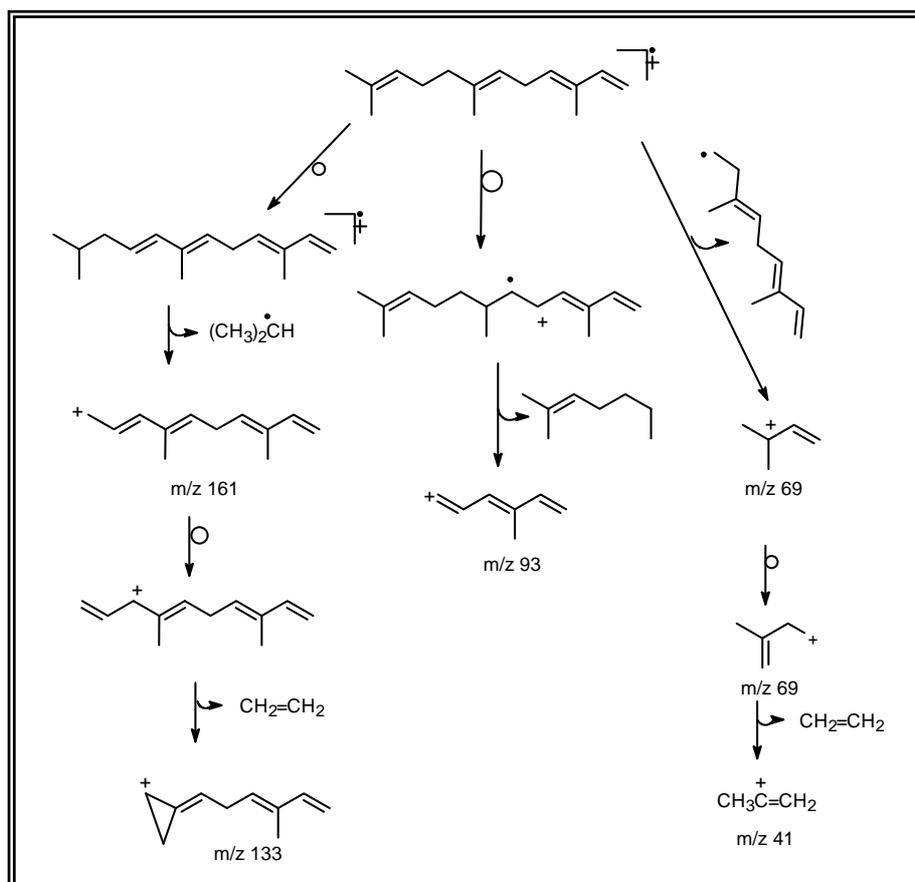
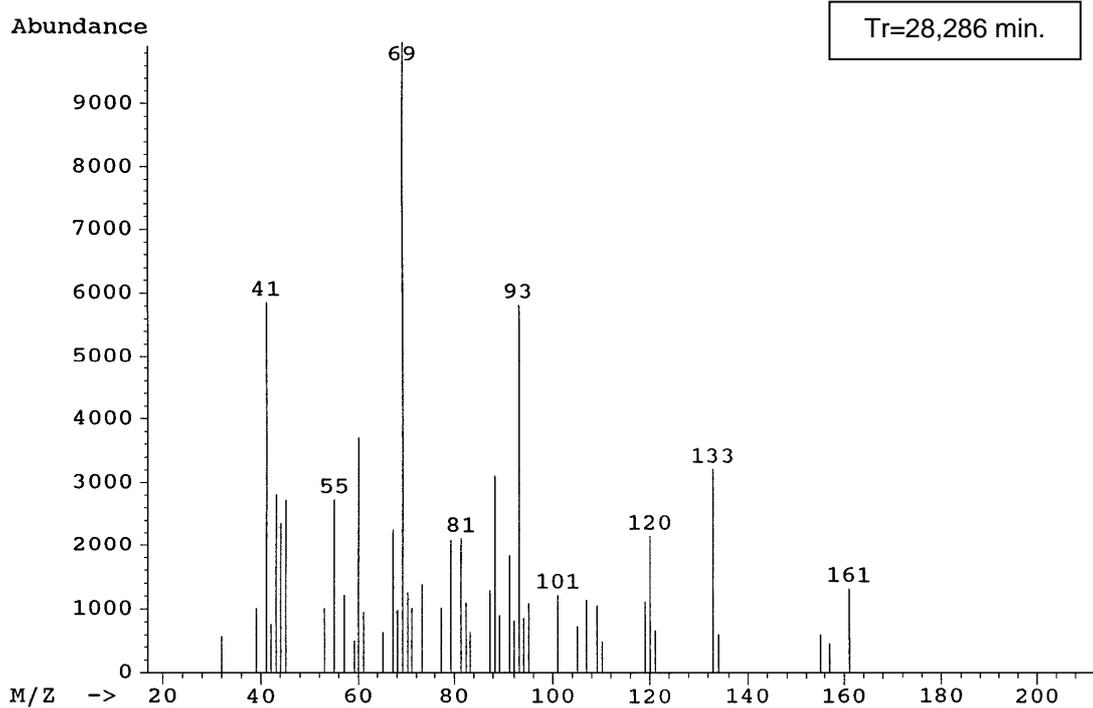
**FIGURA 40** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 1-octanol



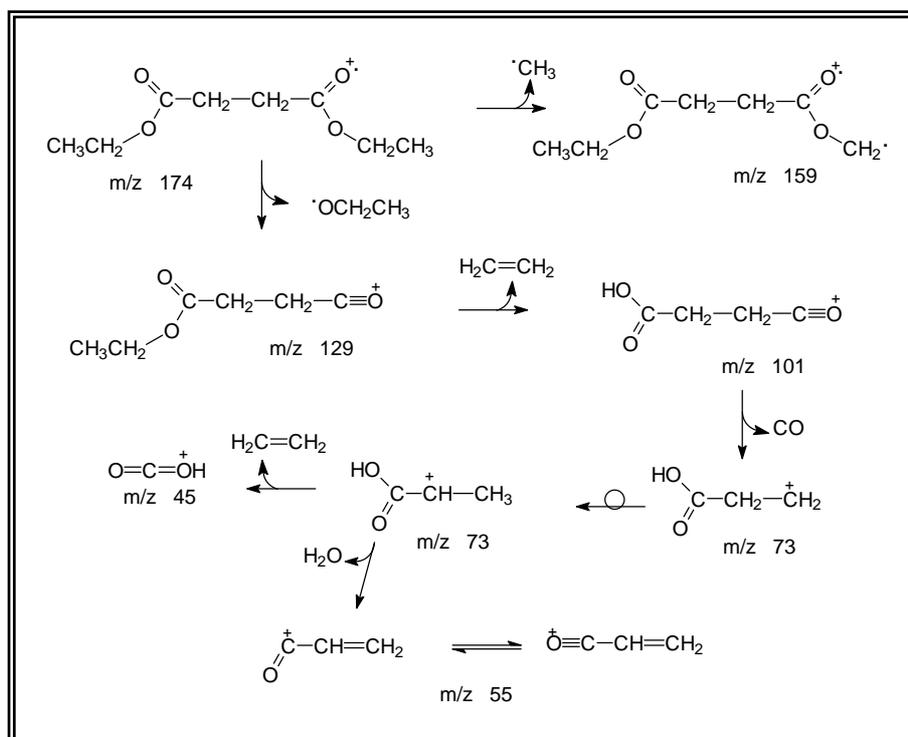
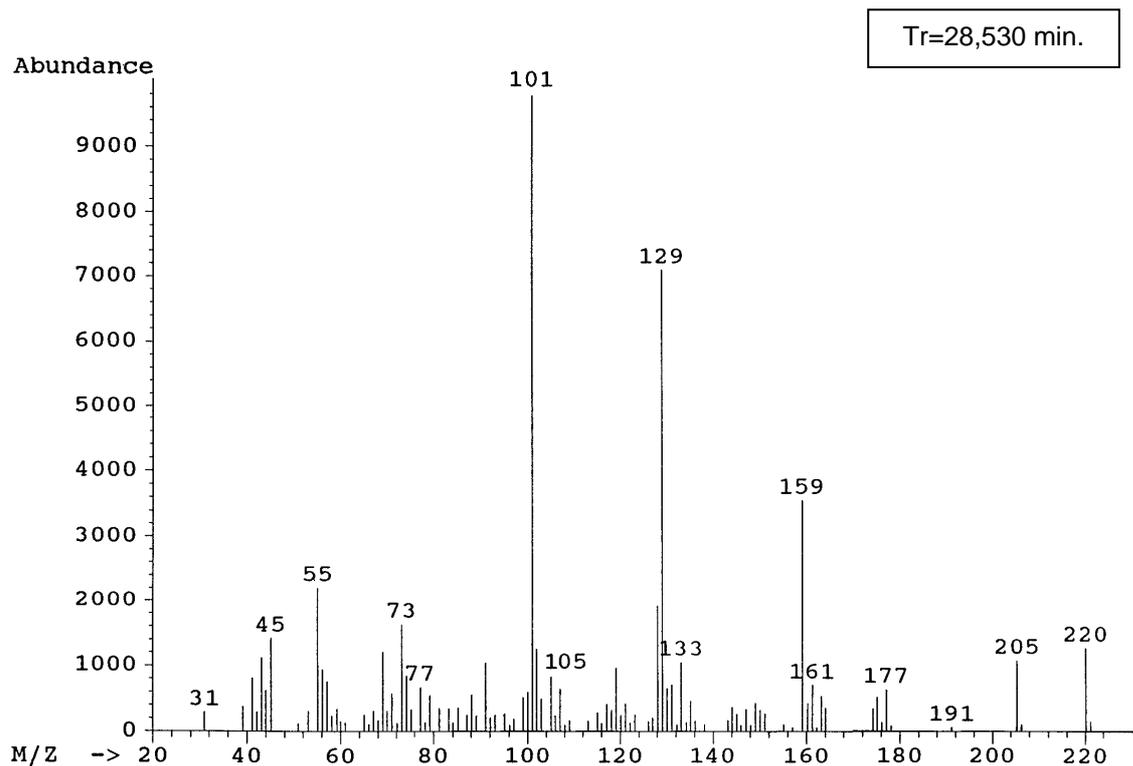
**FIGURA 41** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 4-metil-1-isopropil-3-ciclohexen-1-ol



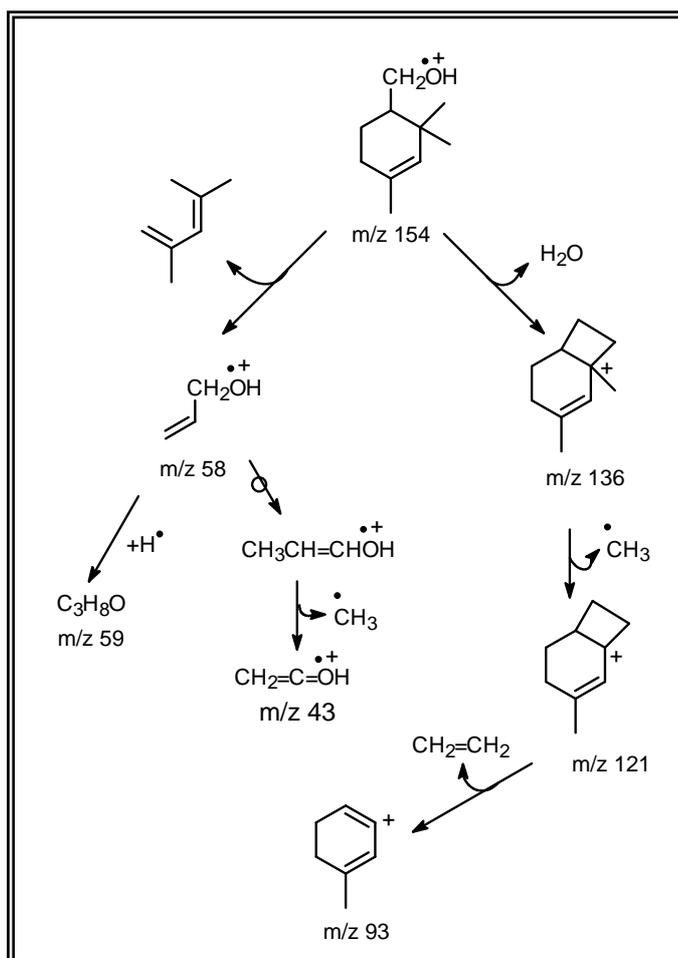
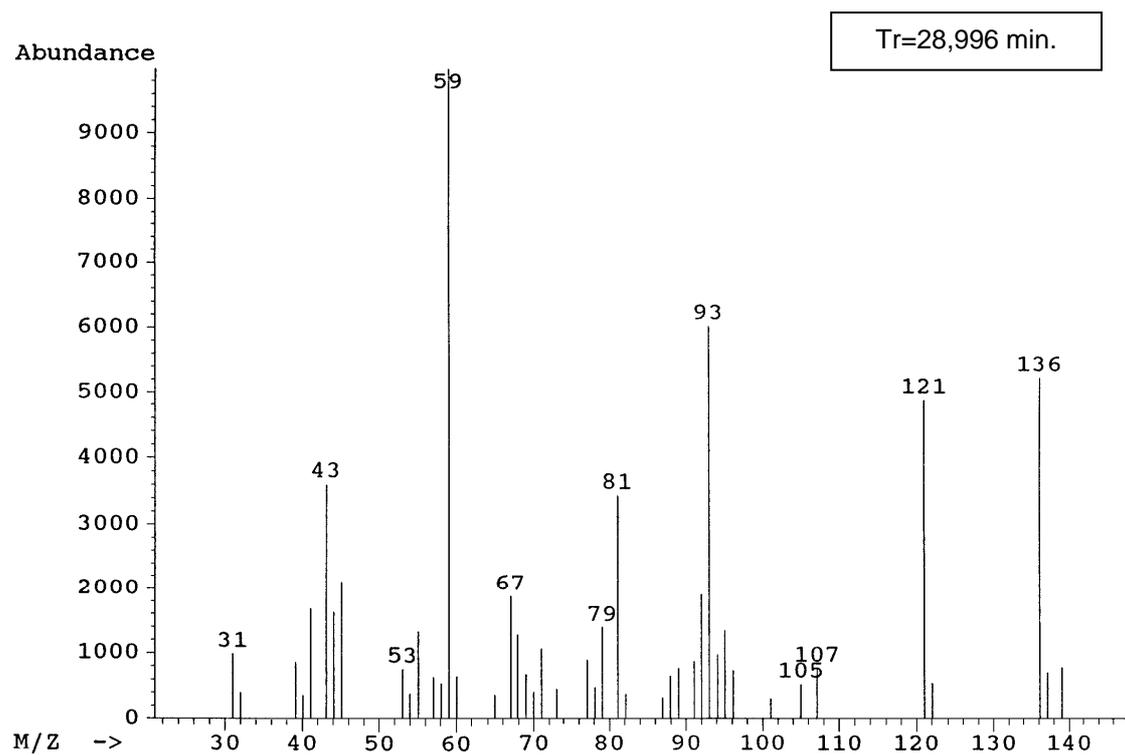
**FIGURA 42** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o decanoato de etila



**FIGURA 43** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o  $\beta$ -farneseno



**FIGURA 44** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o butanoato de dietila



**FIGURA 45** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o  $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-ciclohexeno-1-metanol

Tr=29,536 min.

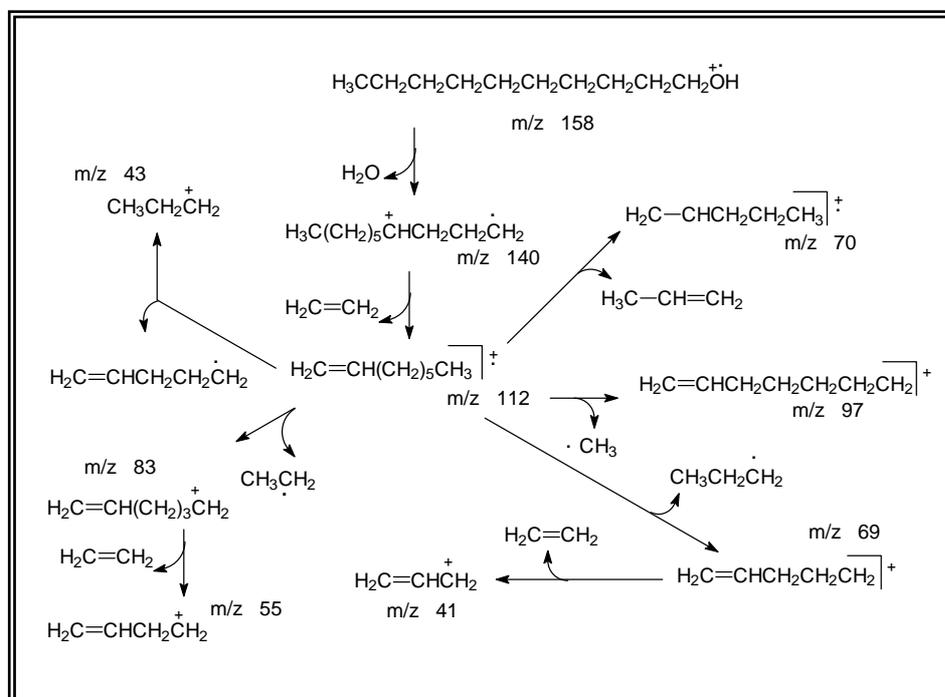
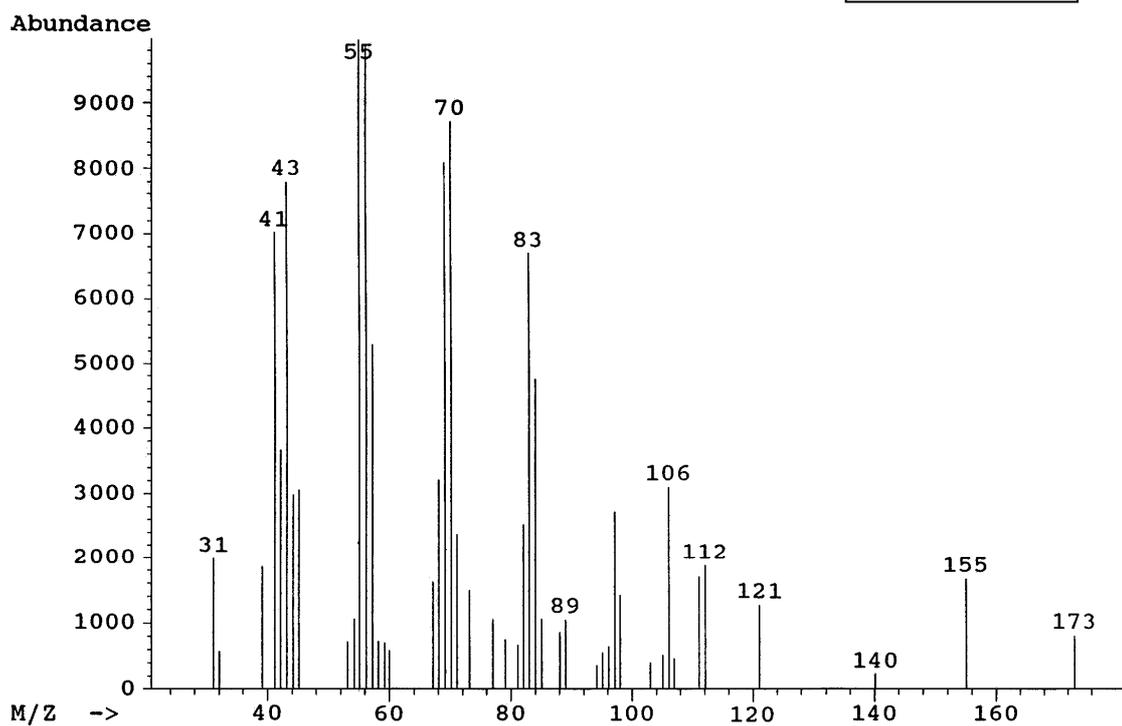
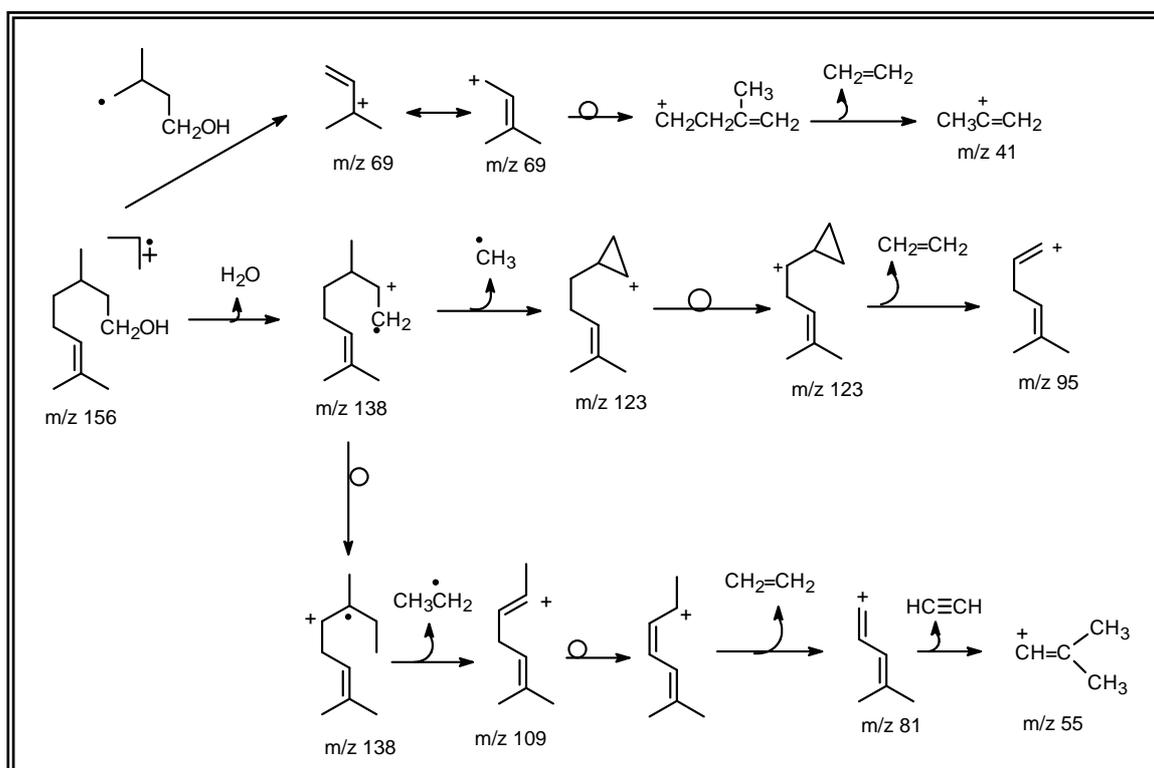
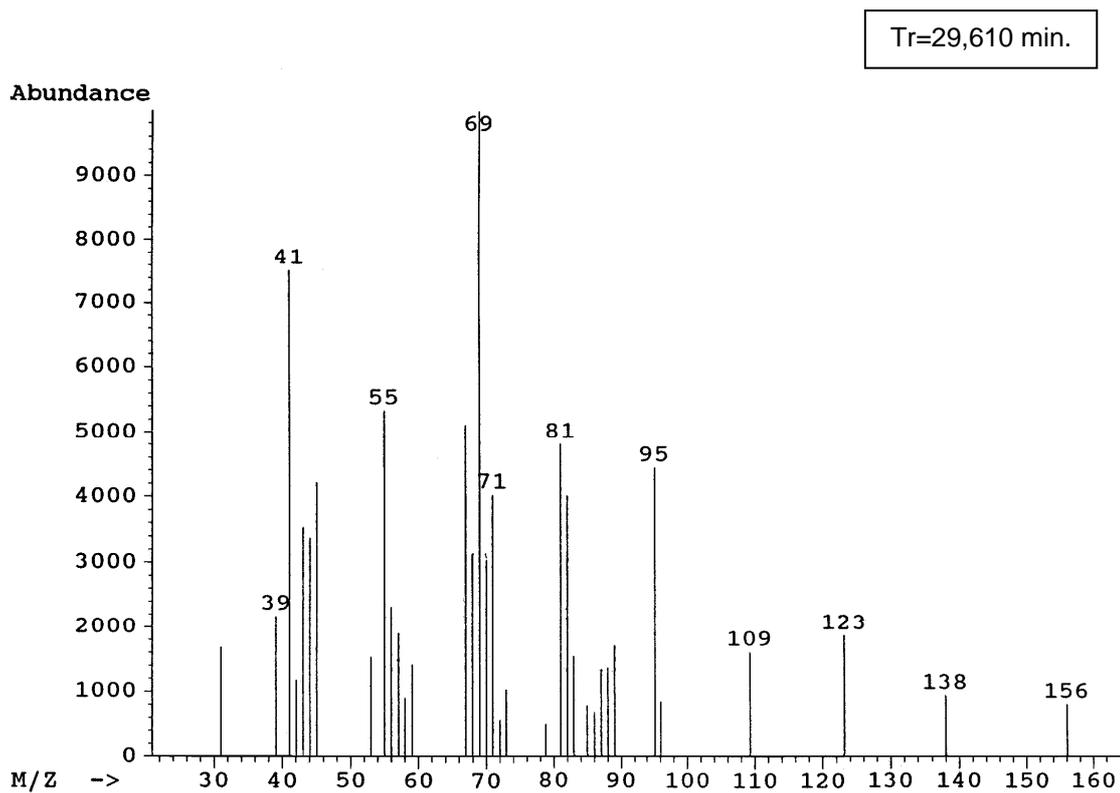
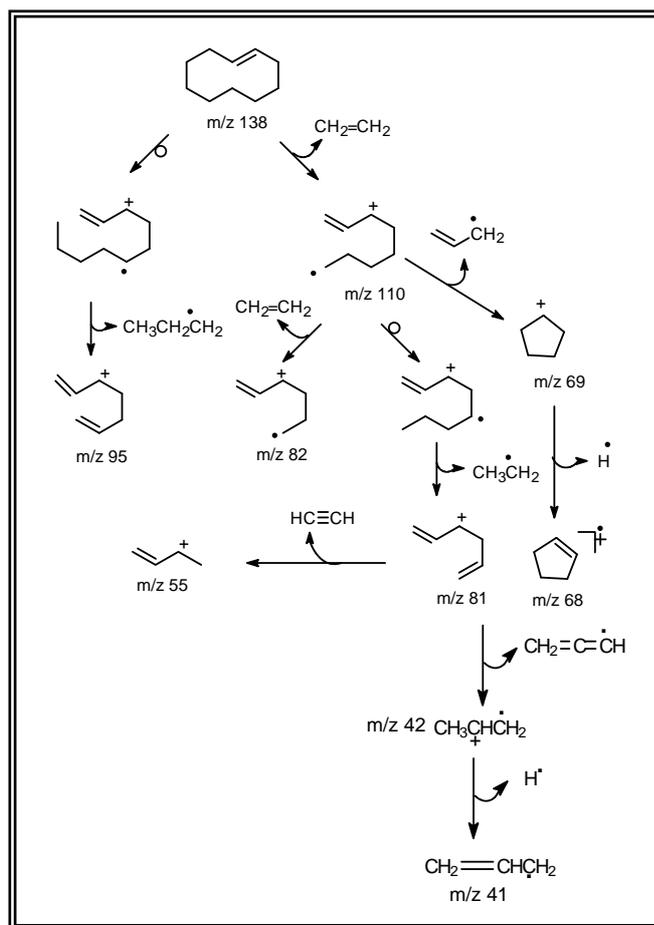
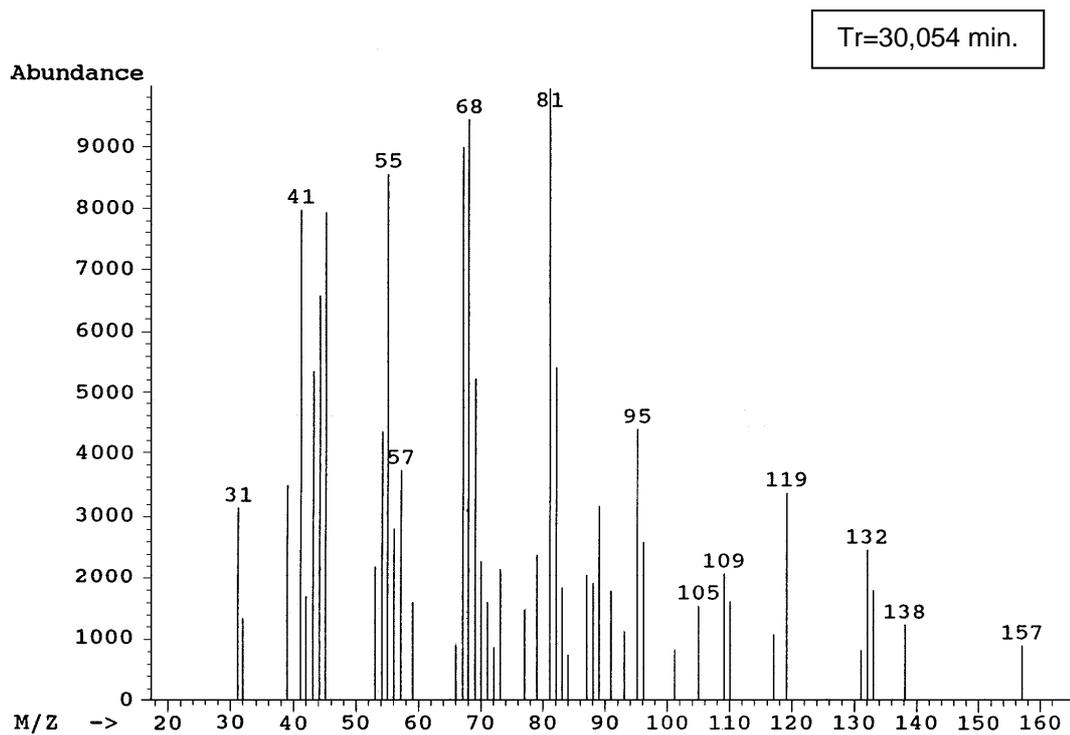


FIGURA 46 – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 1-decanol



**FIGURA 47** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o  $\beta$ -citronelol



**FIGURA 48** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ciclodeceno



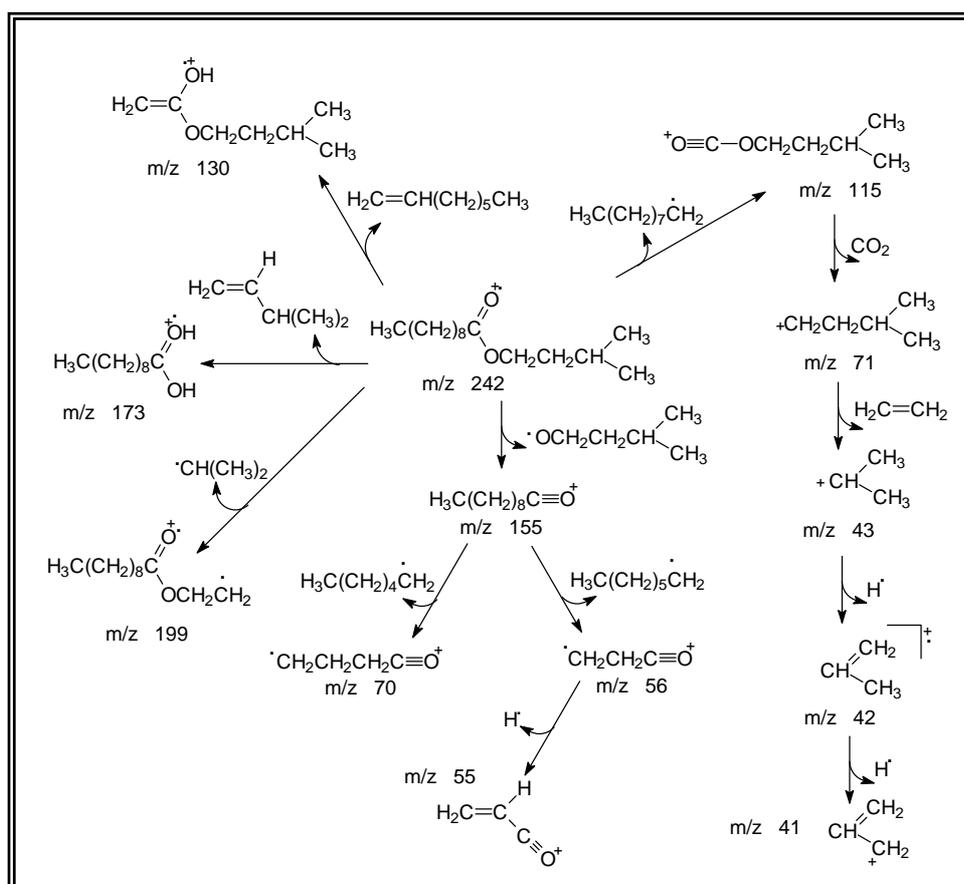
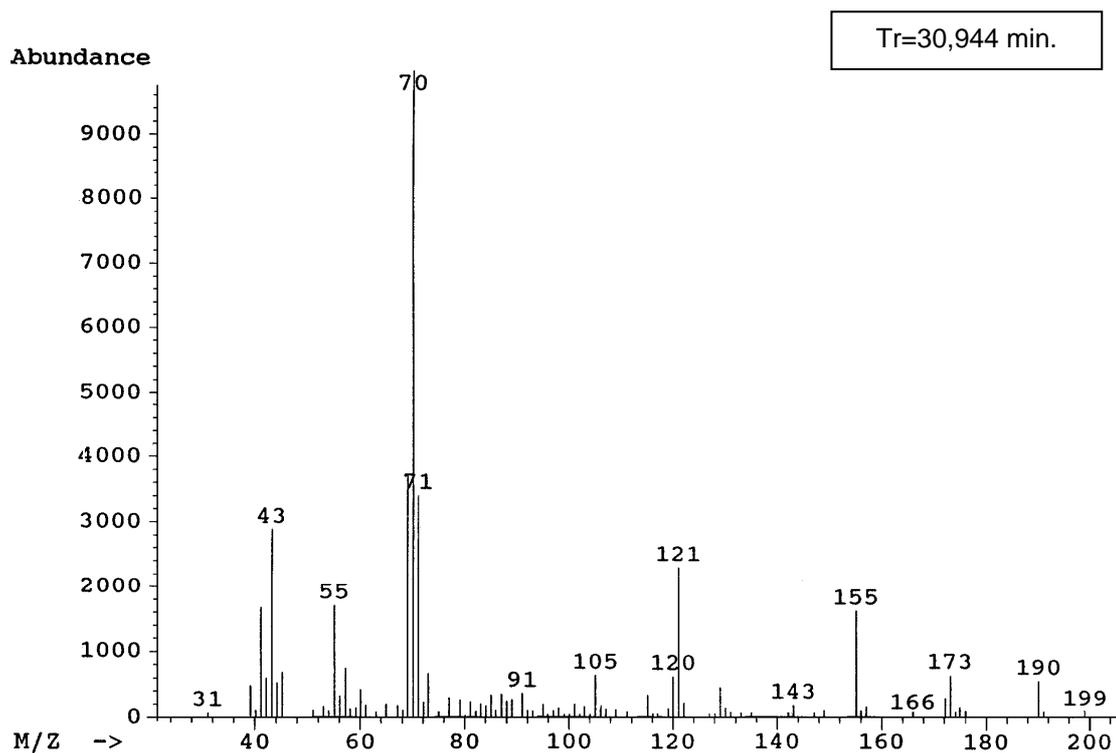
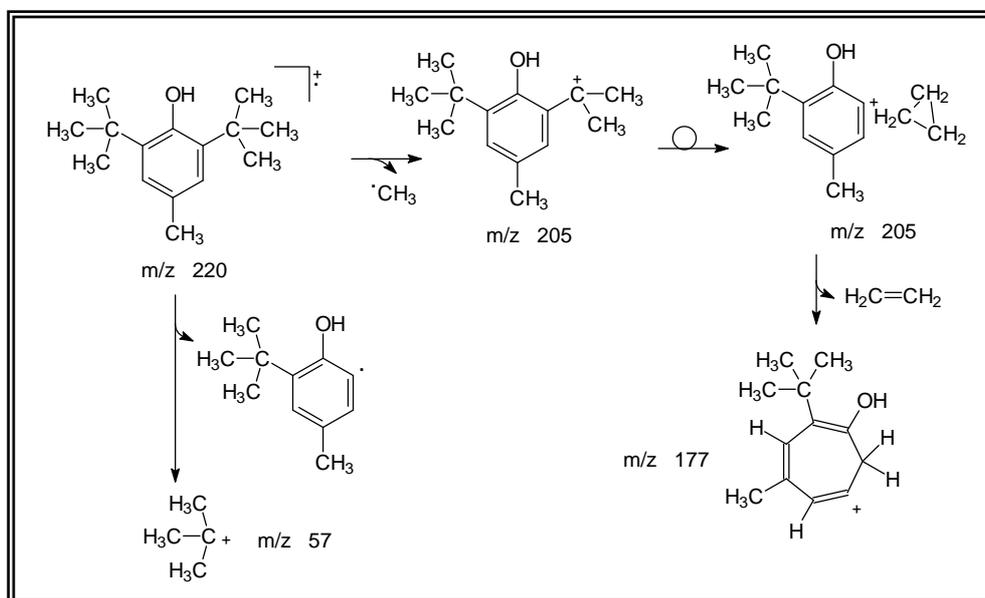
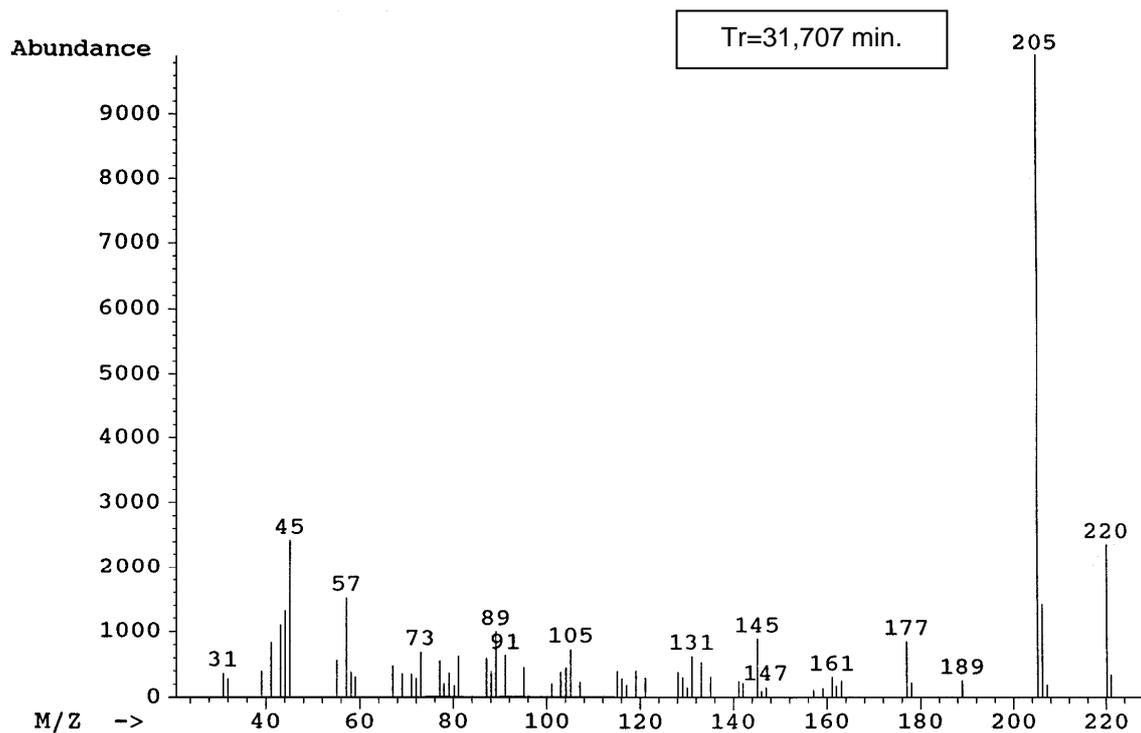
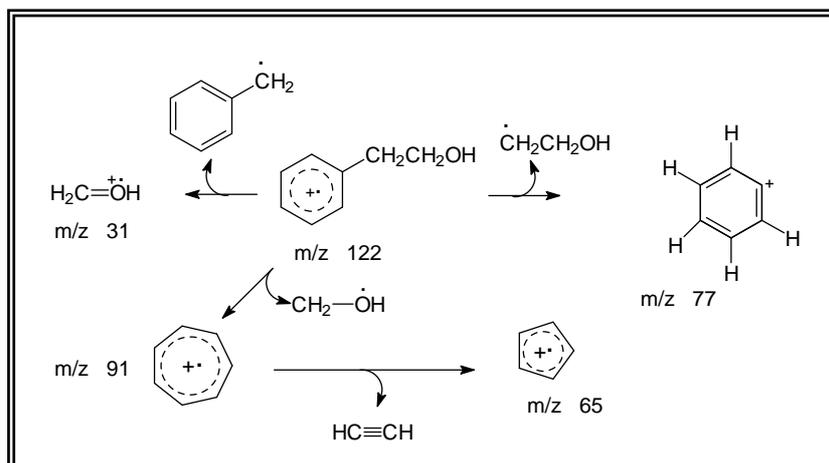
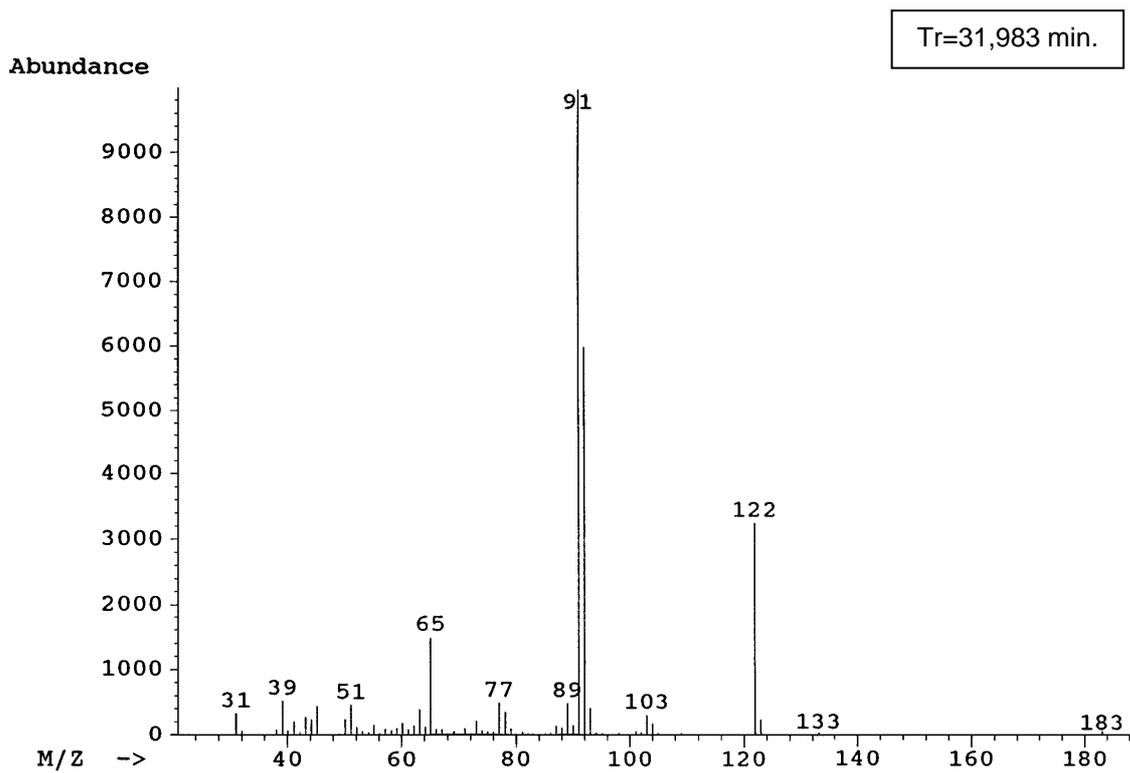


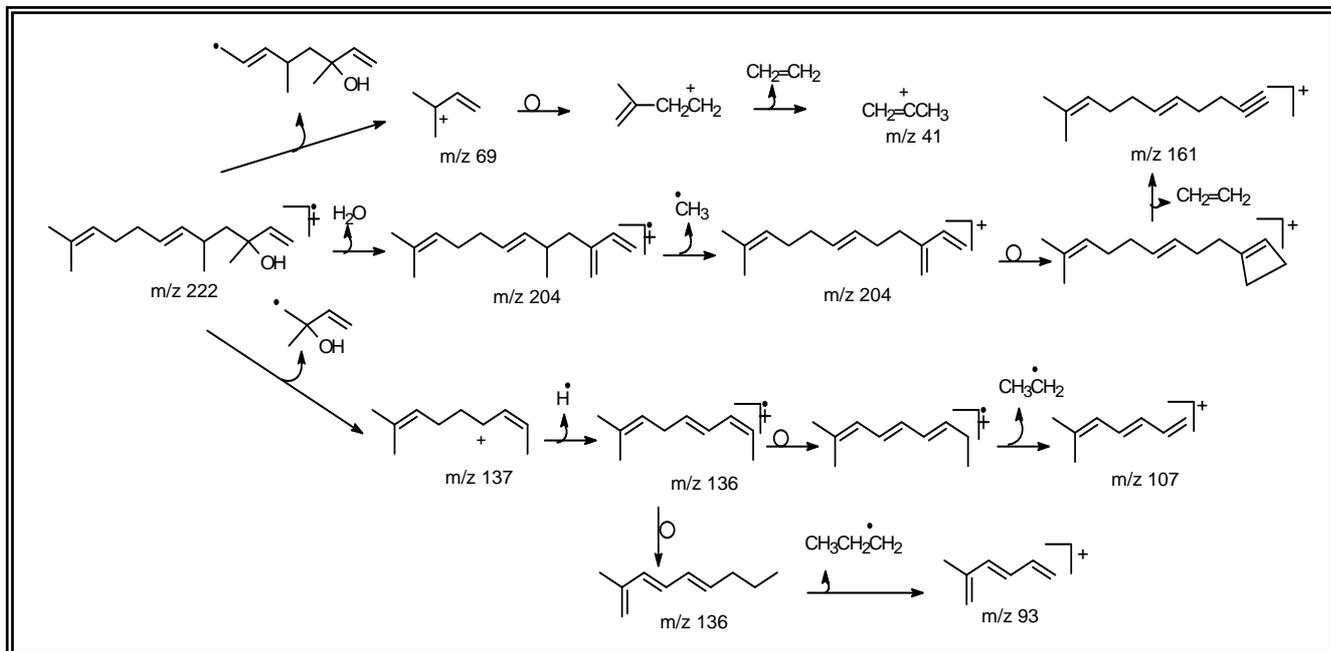
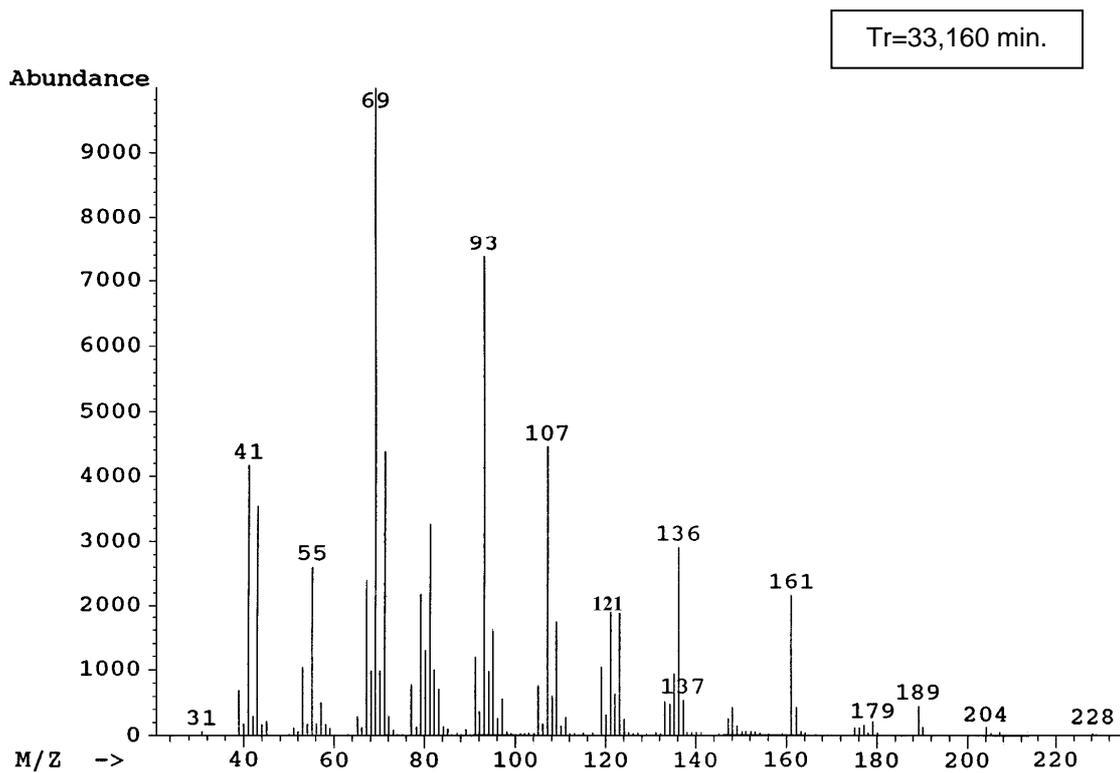
FIGURA 50 – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o decanoato de 3-metil-butila



**FIGURA 51** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2,6-bis-(1,1-dimetil)etil-4-metil-fenol

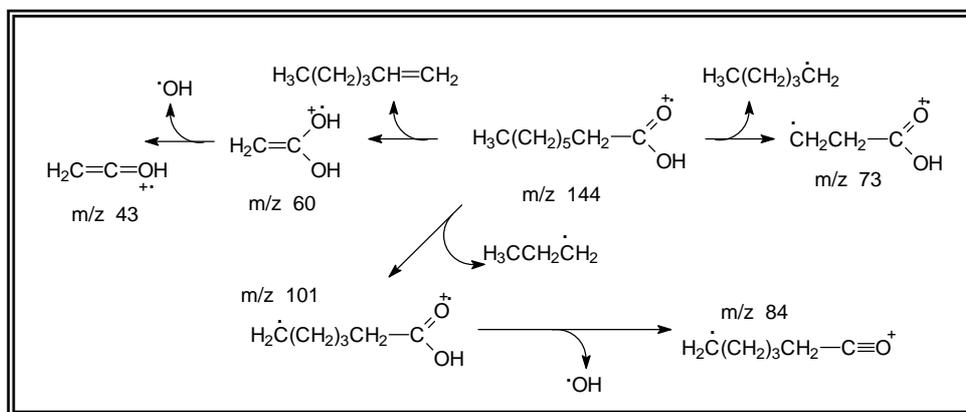
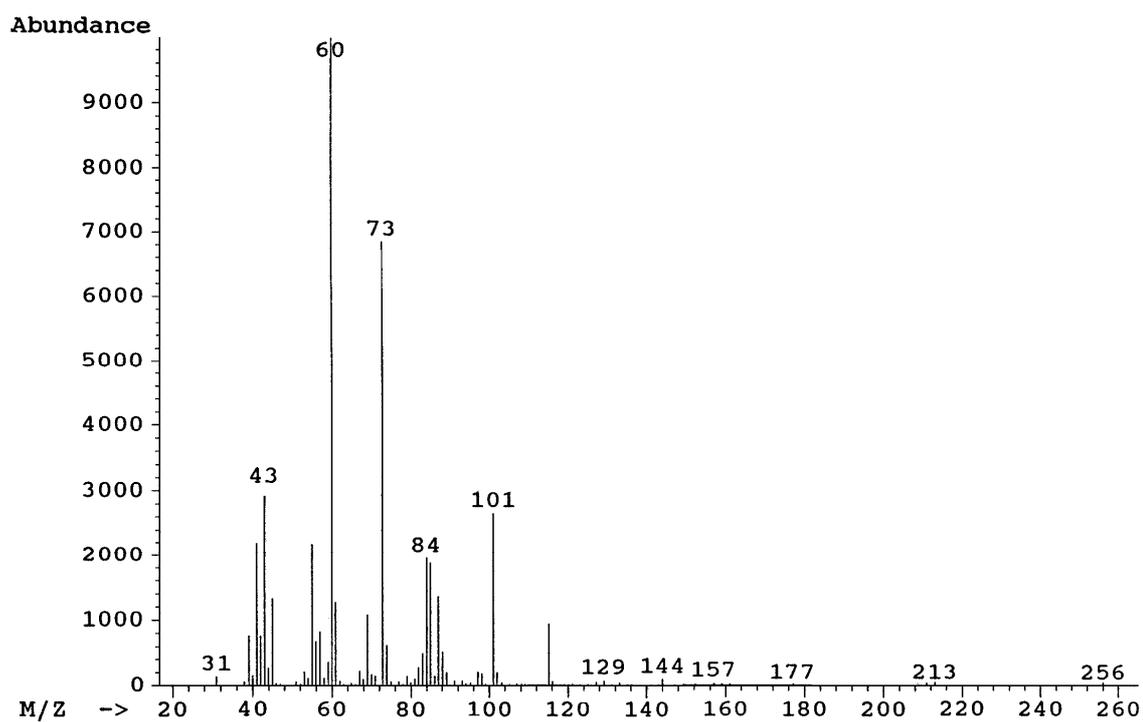


**FIGURA 52** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o fenil-etanol

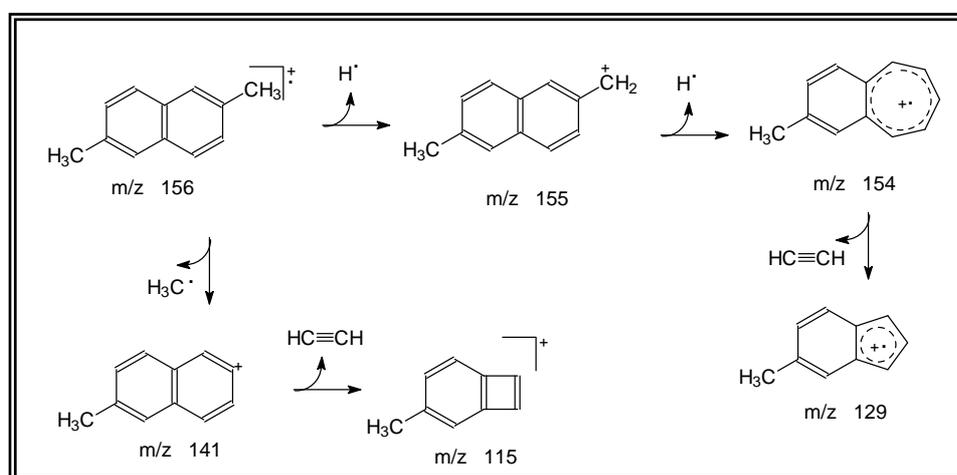
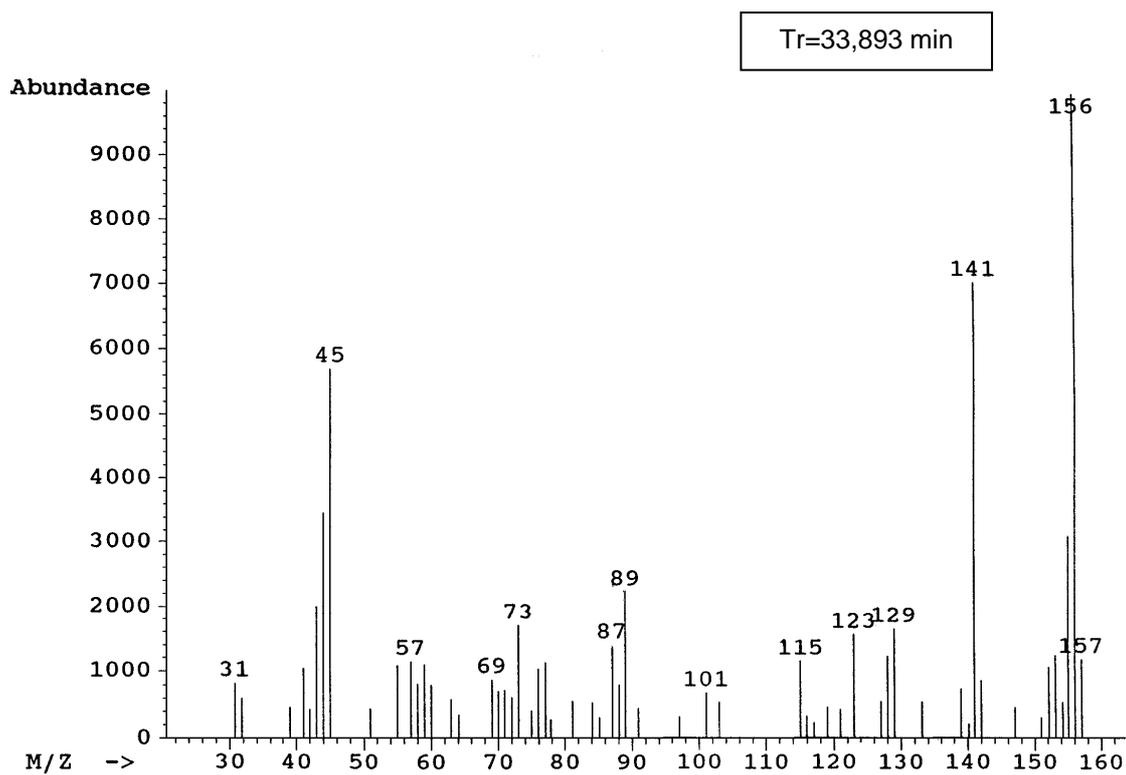


**FIGURA 53** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o nerolidol

Tr=33,384 min.



**FIGURA 54** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ácido octanóico



**FIGURA 55** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 2,6-dimetil-naftaleno

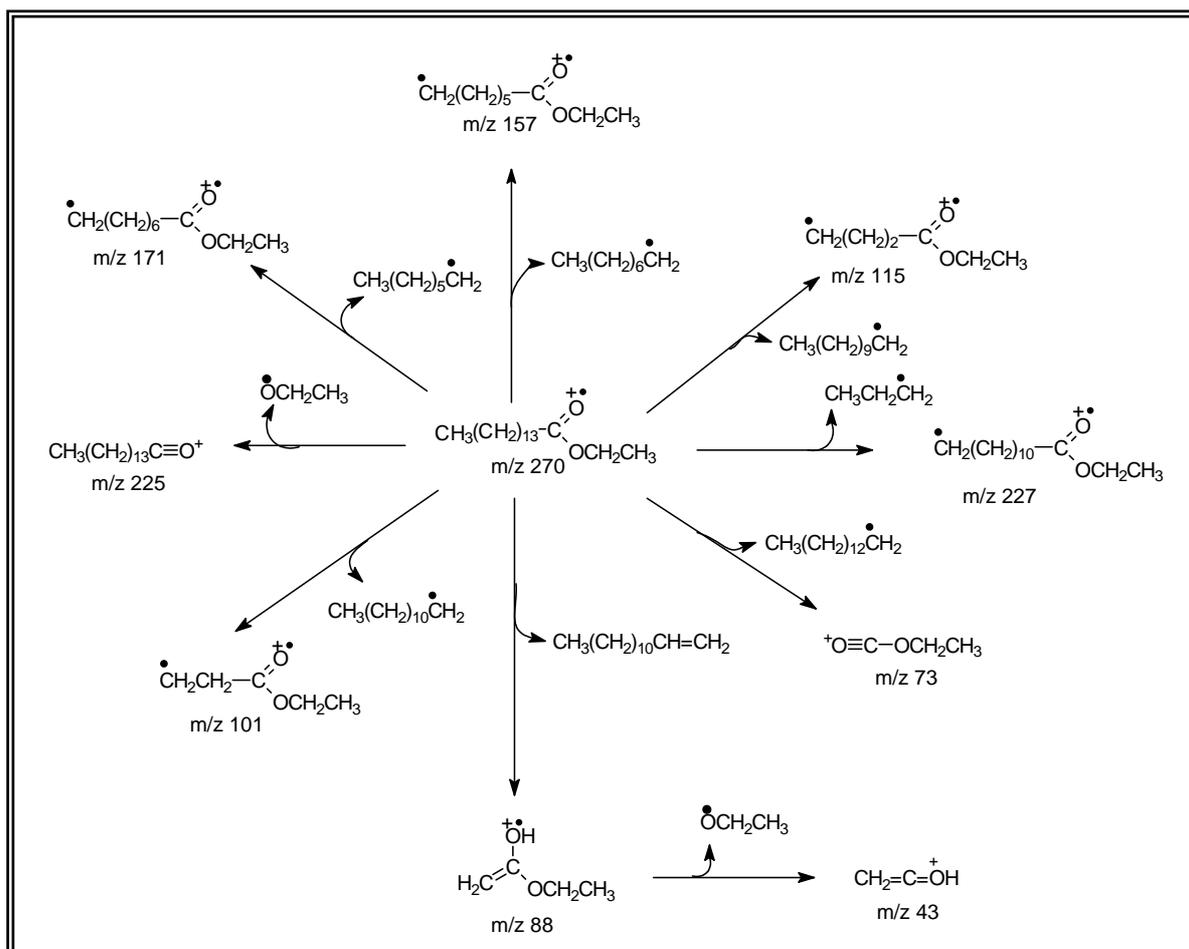
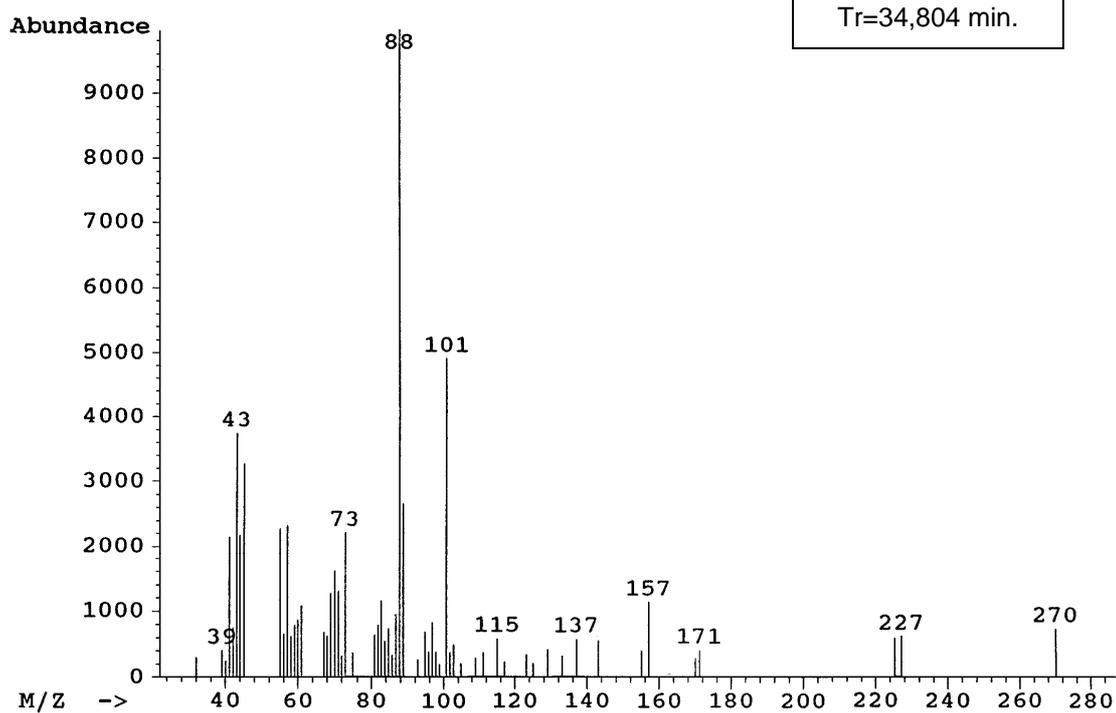


FIGURA 56 – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o pentadecanoato de etila

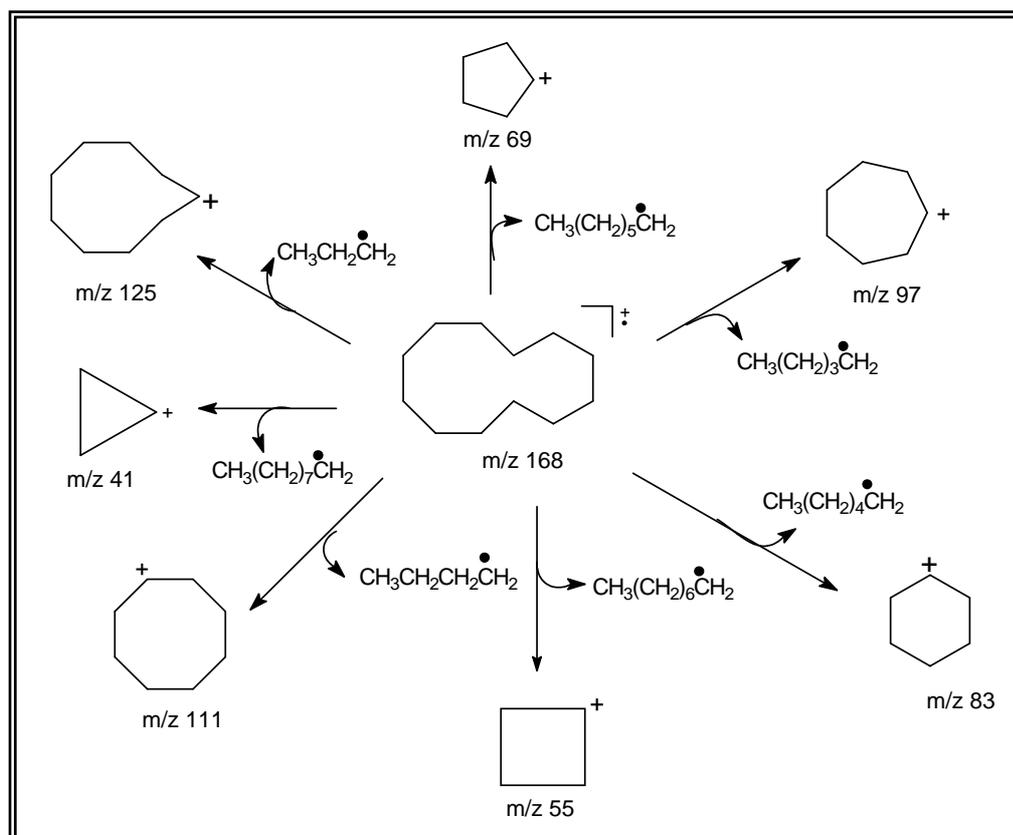
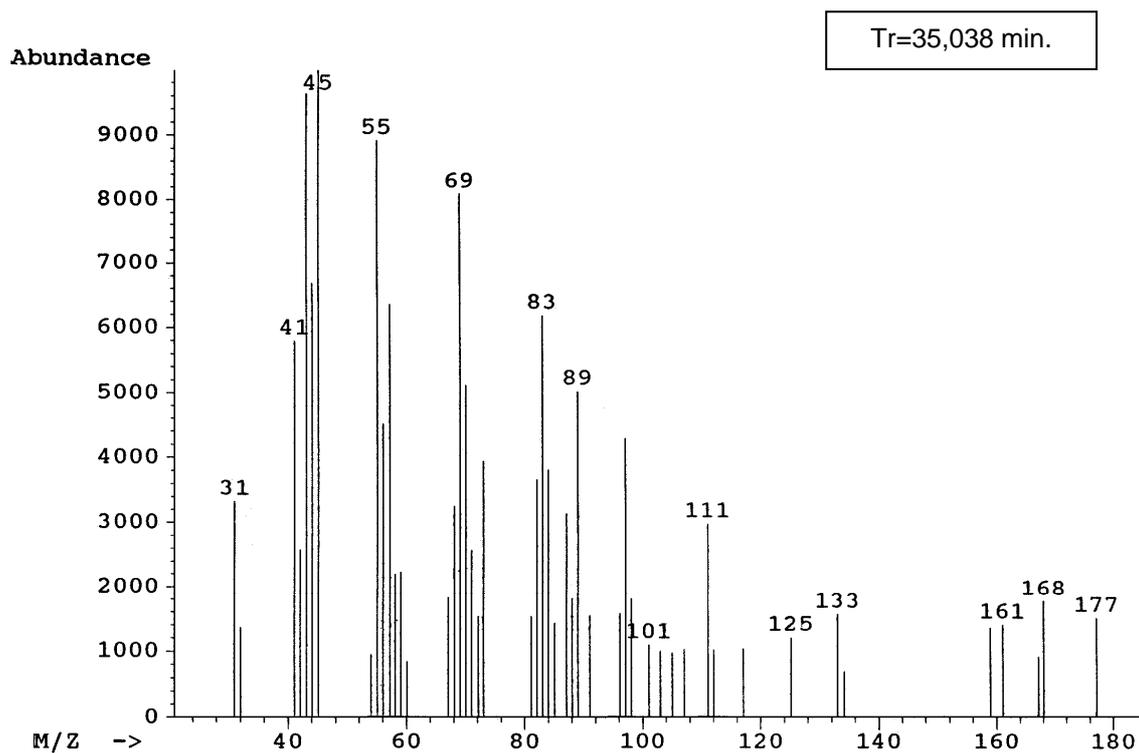
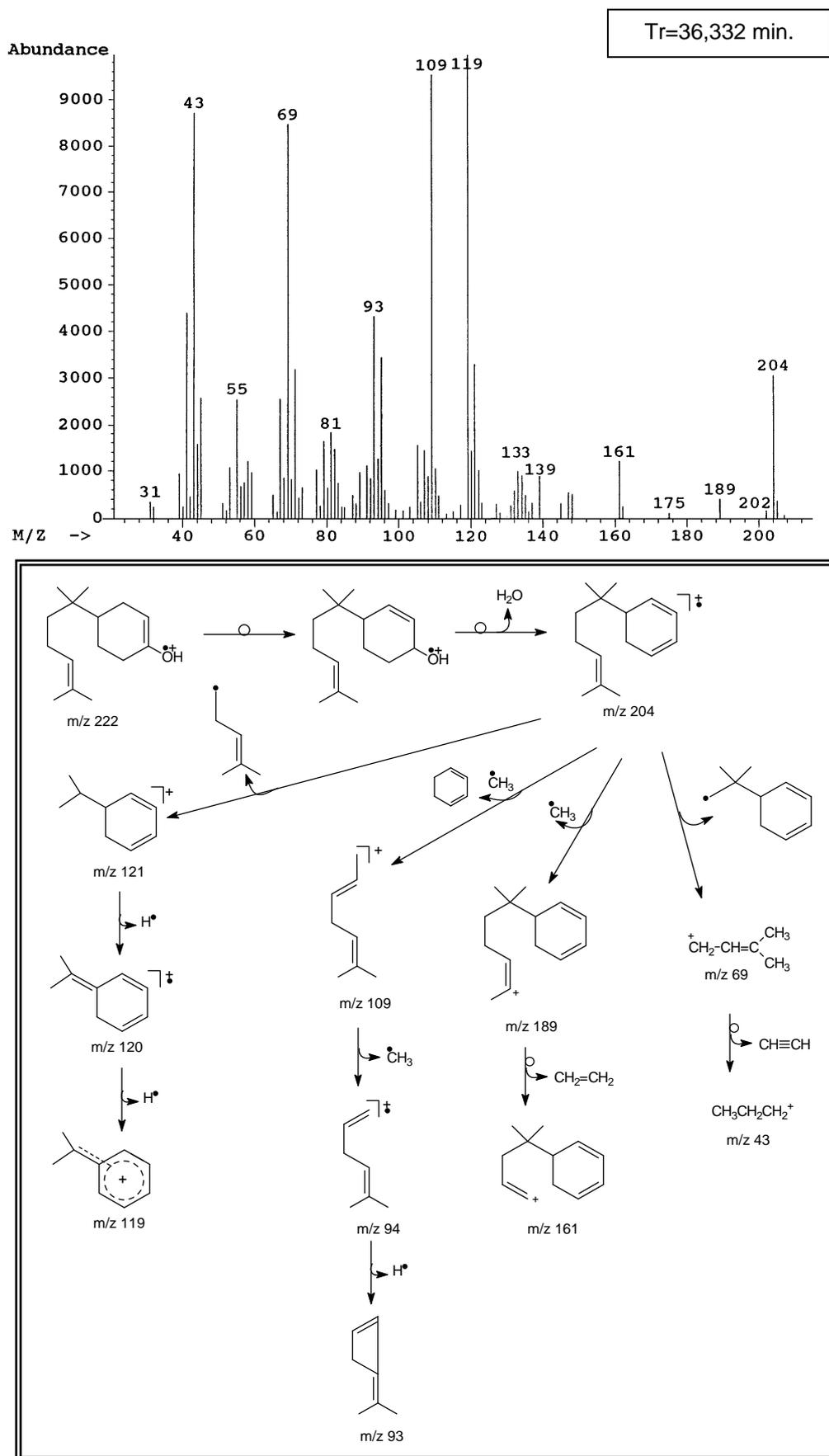
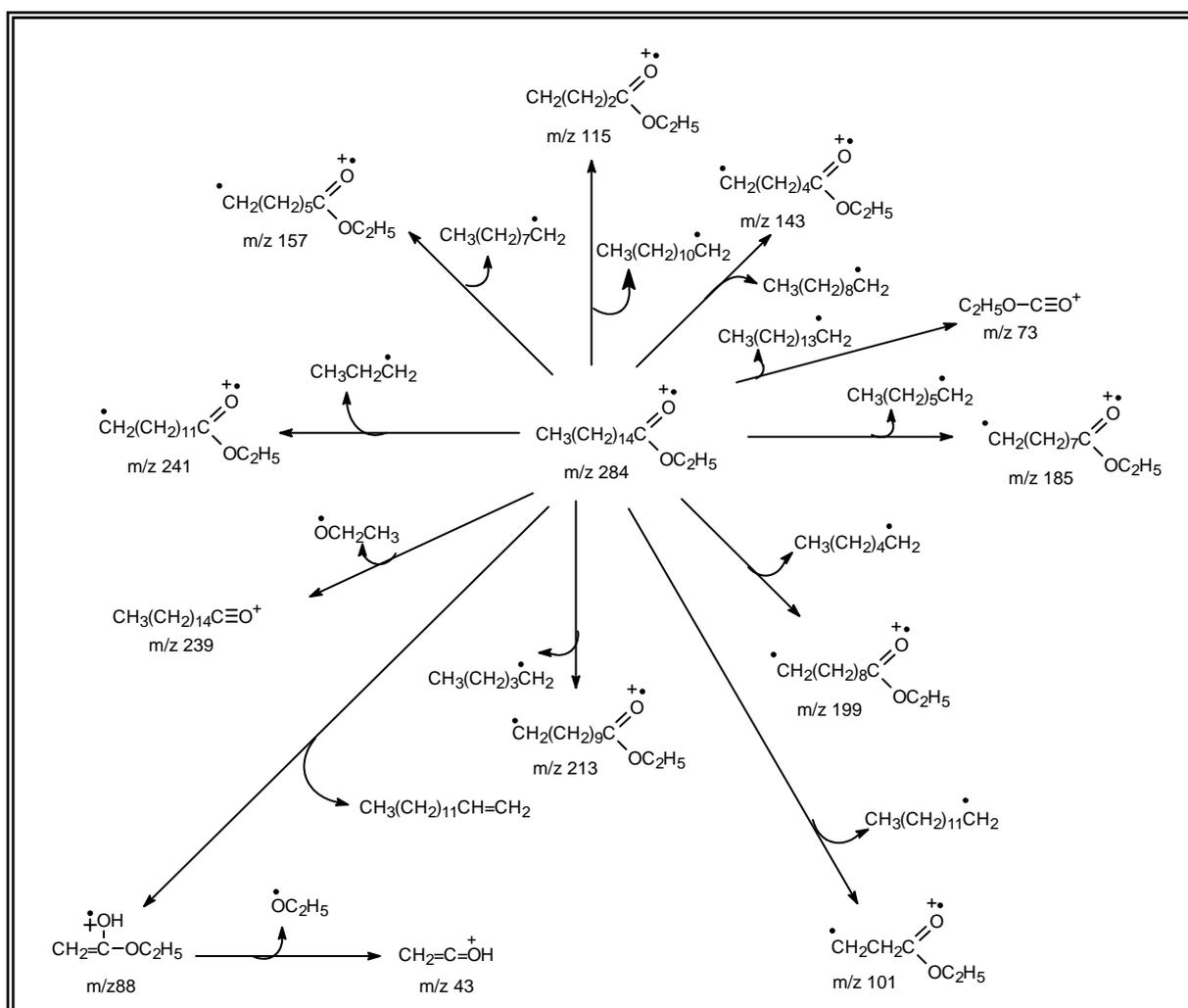
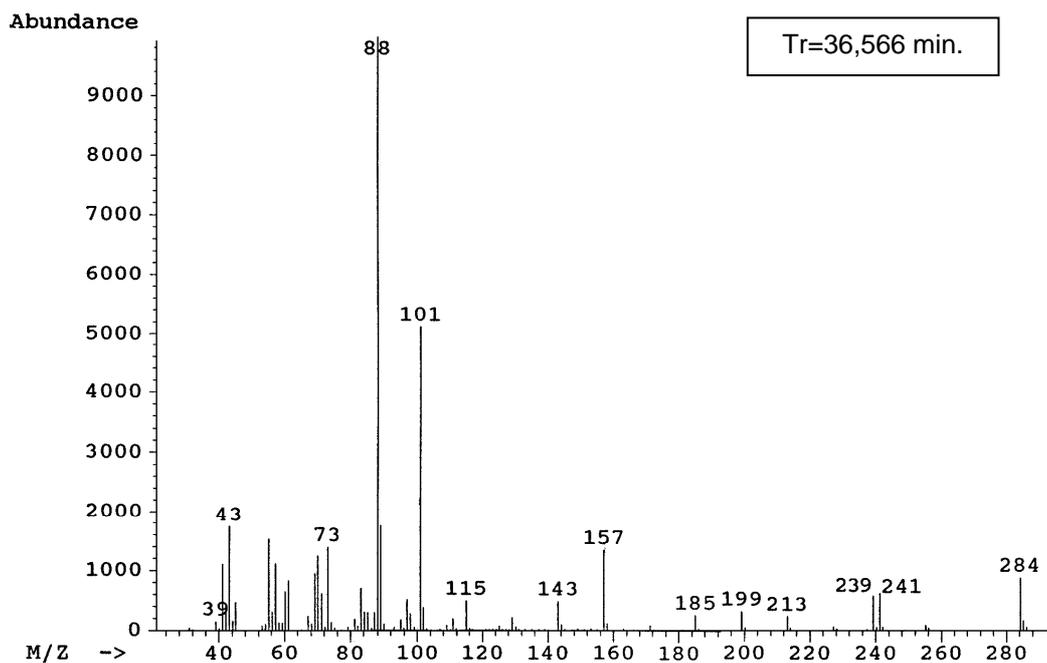


FIGURA 57 – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ciclododecano



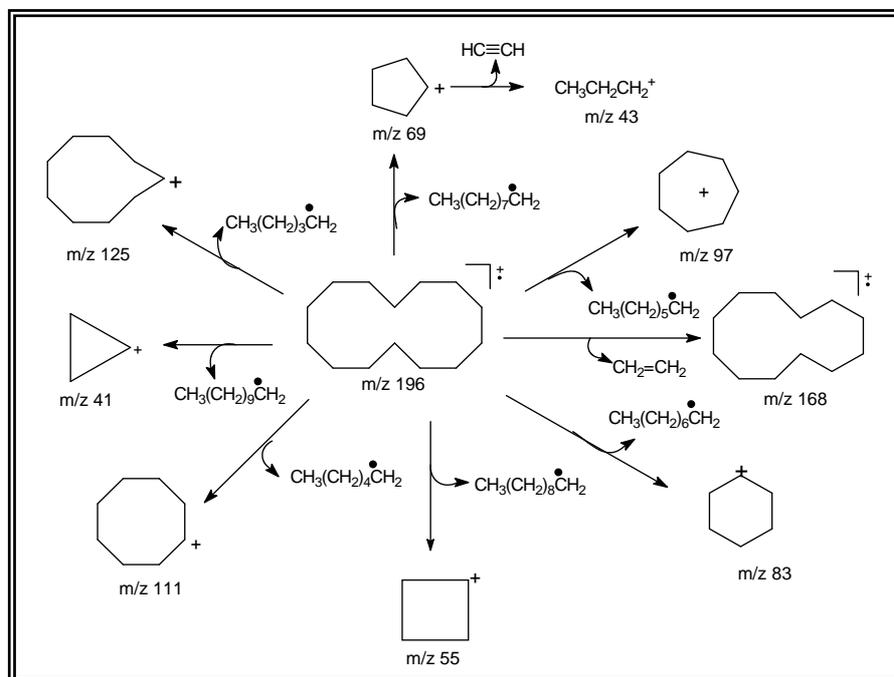
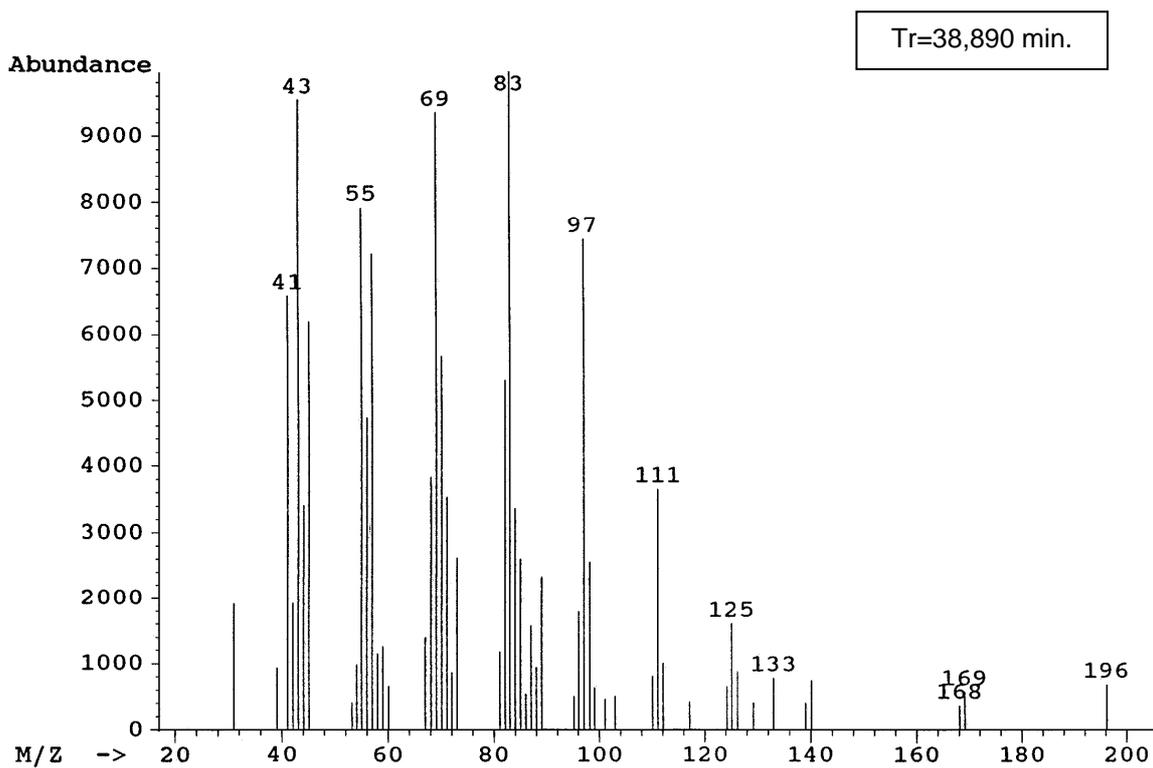
**FIGURA 58**– Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o α-bisabolol



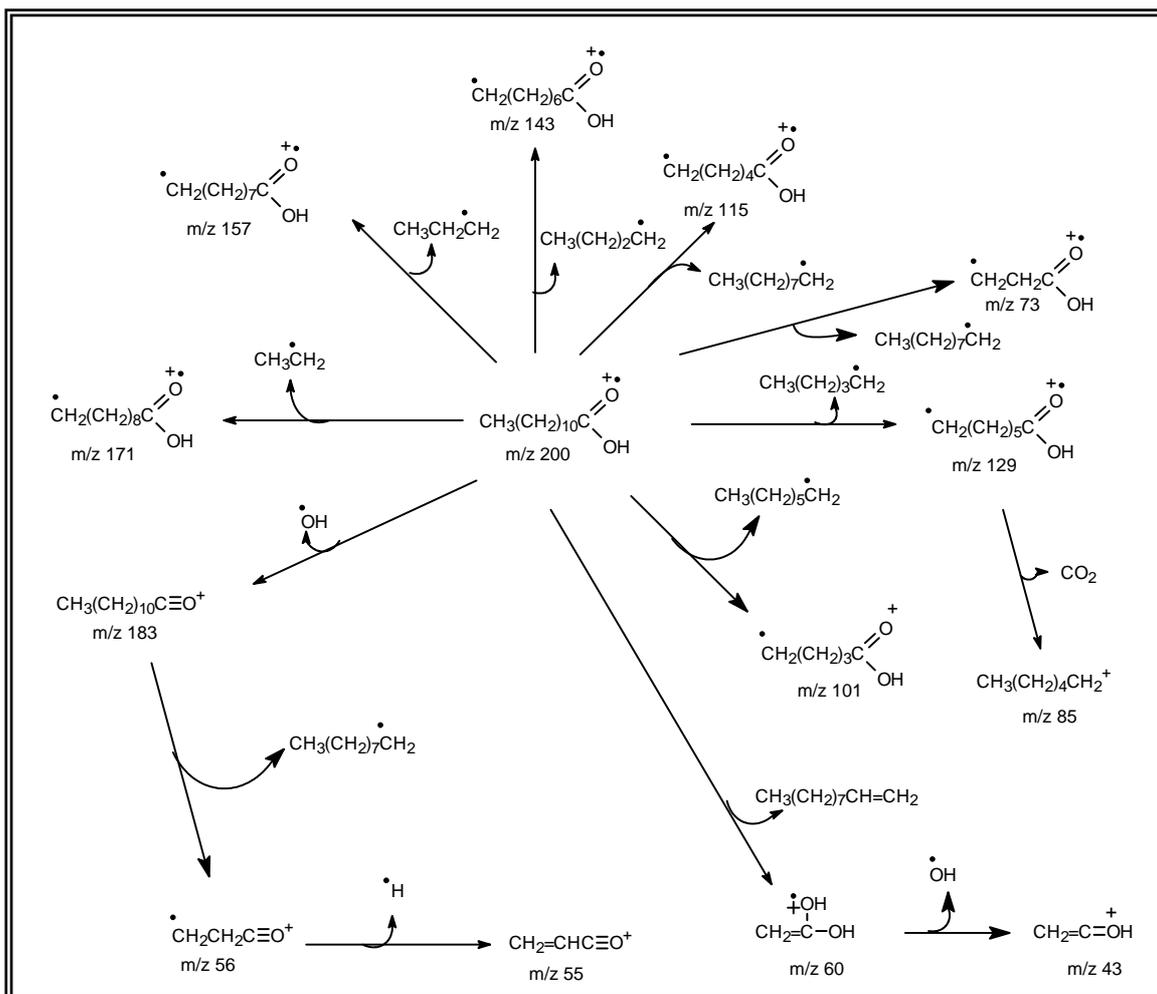
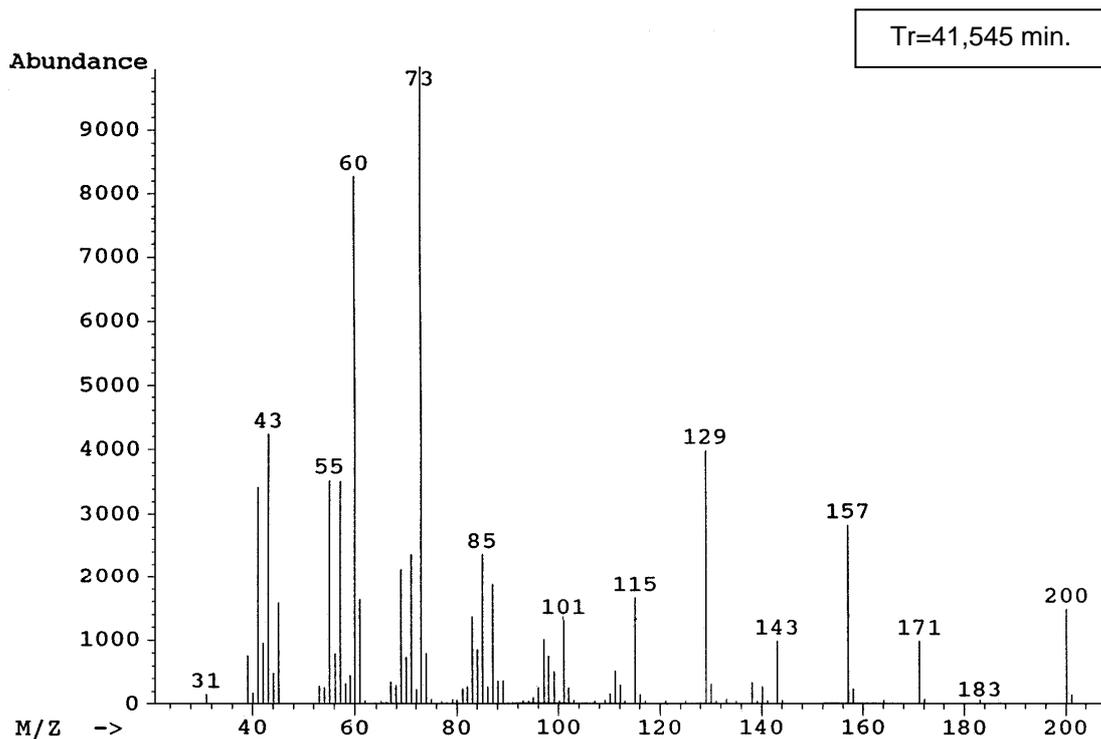
**FIGURA 59** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o hexanoato de etila



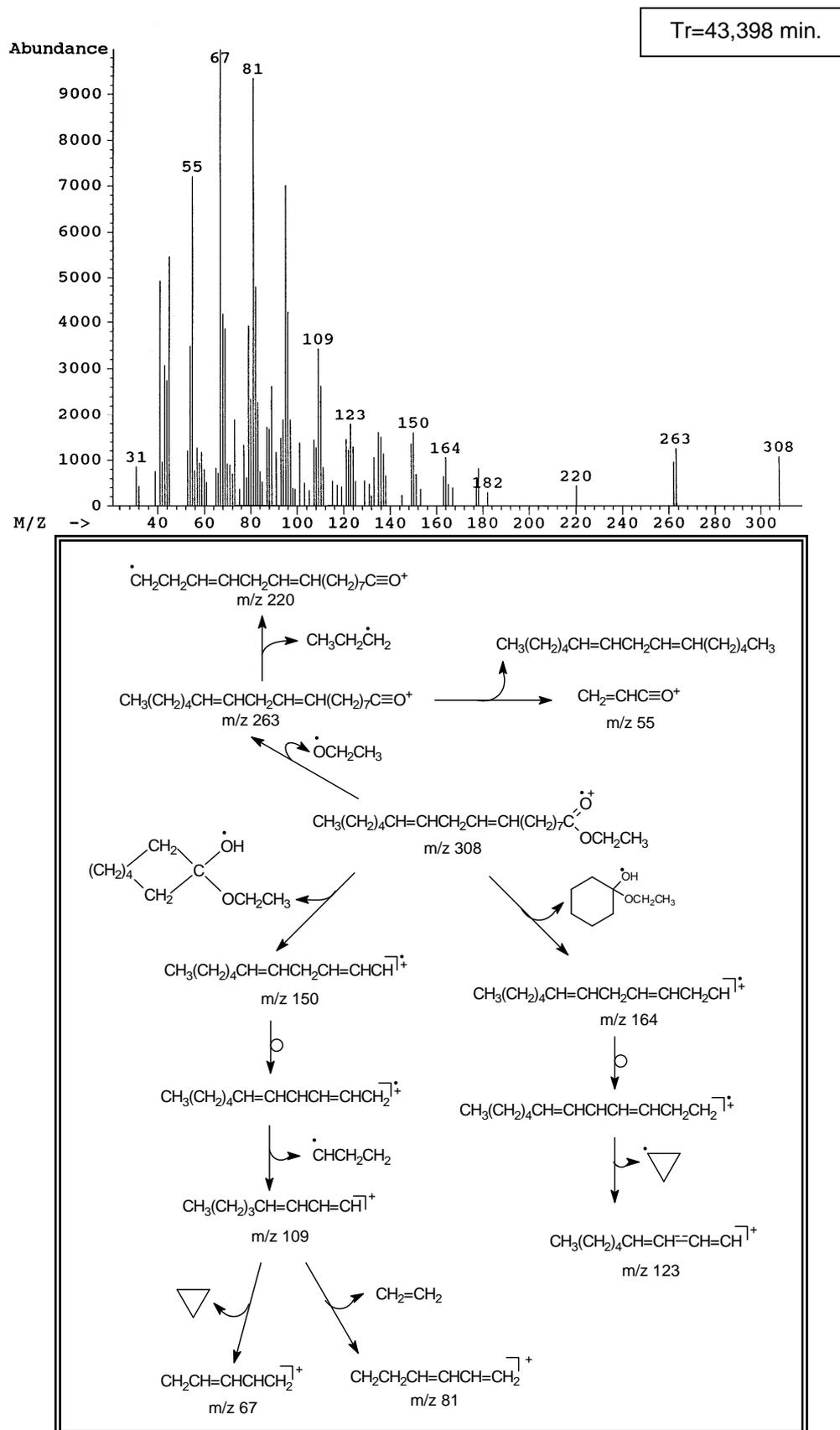




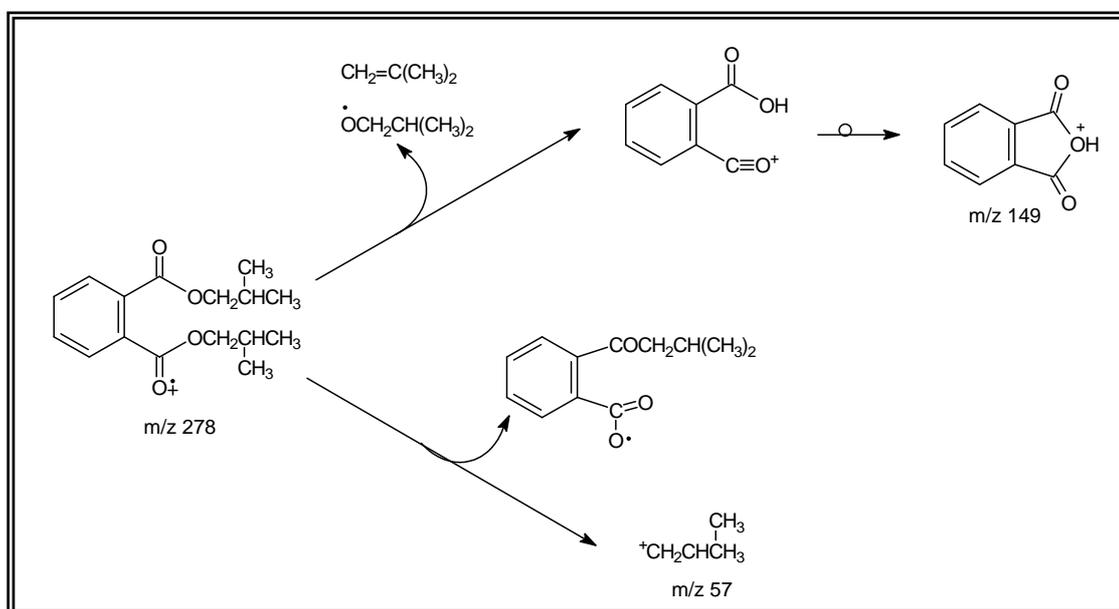
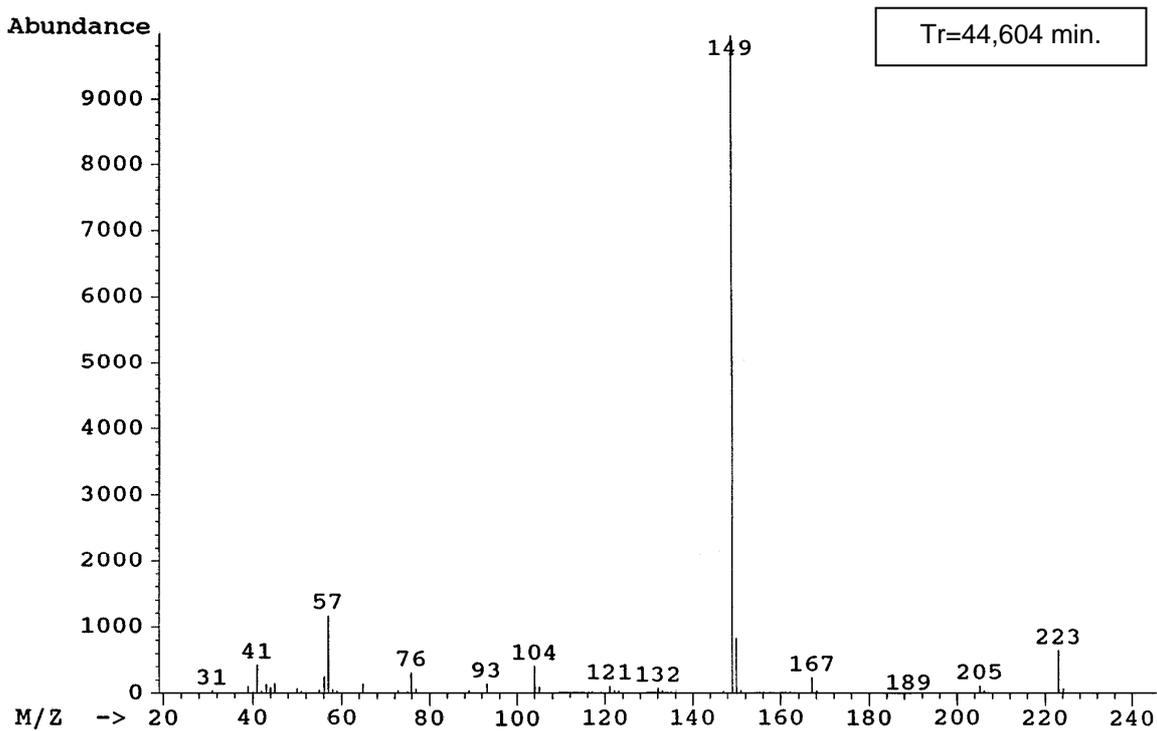
**FIGURA 62** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ciclodecano



**FIGURA 63** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o ácido dodecanóico



**FIGURA 64** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o linoleato de etila



**FIGURA 65** – Espectro de massa e caminhos de fragmentação para o 1,2-benzodicarboxilato de bis-2-metilpropila