

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

ARTUR LUIZ GUEDES ROCHA

**ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM BEBIDAS
ALCOÓLICAS DESTILADAS POR CROMATOGRÁFIA A GÁS COM
AMOSTRAGEM POR “HEADSPACE” – ESTUDO DE VIABILIDADE**

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

ARTUR LUIZ GUEDES ROCHA

**ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM BEBIDAS
ALCOÓLICAS DESTILADAS POR CROMATOGRAFIA A GÁS COM
AMOSTRAGEM POR “HEADSPACE” – ESTUDO DE VIABILIDADE**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso - QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato
Orientadora

Porto Alegre, 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu pai, CizinoRisso Rocha, pelo incentivo inigualável na busca pelo conhecimento e pela formação acadêmica; a minha mãe, Ana Lúcia Guedes Rocha, pela preocupação e pelo carinho acima de qualquer coisa; a meu irmão, André Luiz Guedes Rocha, cuja experiência valiosa abriu e ainda abre tantas portas no meu caminho.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato, pela dedicação e pela confiança em mim.

Agradeço a minha parceira, Thais Kazakevicius Bolzan, que aceitou construir comigo um novo caminho, alicerçado em amor, carinho e compreensão.

Aos meus colegas de LABV, Paulo Gustavo Celso e Samuel Giovanaz, por tornar a labuta diária mais tranquila e divertida.

Aos amigos e colegas do LANAGRO, pelos cafés n'O Décimo Andar e pelas tantas cervejas (após o expediente).

Aos meus amigos do Setor de Química Analítica – Alex, Lucas, Mauro e Marcia – por mostrarem o valor de uma equipe num ambiente um tanto quanto “insalubre”.

Aos colegas e amigos que a Química me trouxe – Luiza, Rodrigo, Joni, Neimar, Adriana, Franciela, Matheus e Carolina – pela amizade e pela parceria nessa jornada aparentemente interminável.

Ao meu mestre, Sérgio Murilo de Souza, e à família PaKua Porto Alegre.

À boa e velha Broderlândia – Robim, Breno, Philip, Fernanda, Renan e Marcelo – que estiveram ao meu lado desde o primeiro desejo de cursar Química até a data de entrega deste Trabalho.

A todos os professores do Instituto de Química, cujas contribuições individuais exemplificaram e moldaram, por semelhança ou por total aversão, exatamente o tipo de profissional que eu gostaria de me tornar.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul, pelos materiais e equipamentos empregados neste trabalho.

RESUMO

A determinação de congêneres e contaminantes orgânicos em cachaças é estabelecida pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de Junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O monitoramento destes compostos é competência da rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROs) e é parte fundamental do processo de fiscalização e de garantia da qualidade de um produto autenticamente brasileiro, seja para o consumo interno ou para a exportação. Compostos como acetaldeído e acetato de etila, cuja presença em pequenas quantidades favorece as características sensoriais do destilado, são tóxicos se consumidos em quantidades elevadas. Neste trabalho, estudou-se a viabilidade de analisar compostos orgânicos voláteis por cromatografia a gás utilizando amostragem por *headspace* em substituição à injeção direta, que é o método atualmente utilizado. A amostragem por *headspace* elimina a etapa de preparo da amostra, para a remoção de açúcares e corante caramelo que são adicionados à cachaça, e que podem interferir na análise cromatográfica. A fim de ajustar a metodologia utilizando amostragem por *headspace*, foram avaliados os parâmetros: temperatura, tempo de incubação, volume de injeção e adição de aditivos. Foi realizado um estudo semiquantitativo comparando amostras analisadas pelo método de injeção direta e pelo método por *headspace*. Os resultados obtidos em ambas as metodologias apresentaram boa relação indicando que o sistema proposto poderá ser utilizado na rotina, após validação completa.

Palavra-chave: congêneres e contaminantes orgânicos, cachaça, cromatografia a gás, amostragem por *headspace*.

ABSTRACT

The presence of organic congeners and contaminants in “cachaça” (Brazilian sugarcane spirit drink) are controlled by the Normative Instruction n° 13, July 29th, 2005, from the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply in Brazil. The monitoring of these compounds is the responsibility of the National Agricultural Laboratories (LANAGROs) and is a fundamental part of the process of inspection and quality assurance of an authentically Brazilian product, either for internal consumption or for export. Compounds such as acetaldehyde and ethyl acetate, whose presence in small quantities favors the sensorial characteristics of the distillate, can be toxic if consumed in high amounts. In this work, was evaluated the viability of analyzing volatile organic compounds by gas chromatography using headspace sampling in substitution for direct injection, which is the currently used method. The sampling headspace has the advantage of eliminating sample preparation step for removing sugar and caramel colorant which is added to the “cachaça”, and may interfere in the chromatographic analysis. In order to adjust the sampling methodology using headspace, the parameters evaluated were: temperature, incubation time, injection volume and addition of additives. A semiquantitative study was carried out comparing samples analyzed by the direct injection and by headspace method. The results from both methods showed good value indicating that the proposed system can be used in routine, after complete validation.

Keywords: organic congeners and contaminants, sugarcane spirit drink, gas chromatography, headspace sampling.

LISTA DE ABREVIACÕES

BIPEA – *Bureau Interprofessionnelles Etudes Analytiques*

GC-MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

GC-FID – Cromatografia a gás com detector por ionização em chama

HS – *Headspace sampling*

IN – Instrução Normativa

LABV – Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MDGC – Cromatografia a gás multidimensional

PIQ – Padrão de identidade e qualidade

PTFE – Politetrafluoretileno

SHA – Solução hidroalcoólica

ST – Solução de trabalho

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do equilíbrio líquido-gás em um frasco para análise por headspace.	17
Figura 2 – Cromatógrafo a gás multidimensional com autoamostrador.	19
Figura 3 - Cromatograma-base com identificação dos sinais.	20
Figura 4 – Sobreposição de cromatogramas do estudo inicial de temperatura de incubação.....	21
Figura 5 – Sobreposição de cromatogramas do estudo final de temperatura de incubação	21
Figura 6 – Sobreposição de cromatogramas do estudo final de temperatura de incubação (região de analitos mais voláteis)	21
Figura 7 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de tempo de incubação	23
Figura 8 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de tempo de incubação (região de analitos mais voláteis).....	23
Figura 9 – Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de injeção (região de analitos mais voláteis).	24
Figura 10 – Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de injeção (região de analitos menos voláteis).	25
Figura 11 – Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de amostra (região de analitos mais voláteis).....	25
Figura 12 – Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de amostra (região de analitos menos voláteis)	26
Figura 13 – Sobreposição de cromatogramas do segundo estudo de volumes, variando o volume de amostra (região de analitos mais voláteis).....	27
Figura 14 – Cromatograma completo comparativo entre as duas condições ótimas.....	27
Figura 15 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de avaliação do aditivo cloreto de sódio.....	28
Figura 16 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de avaliação do aditivo cloreto de potássio	29
Figura 17 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de avaliação do aditivo sacarose	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão de identidade e qualidade de congêneres e contaminantes em cachaça.....	14
Tabela 2 – Curva analítica para análise por headspace, em miligramas por litro.	31
Tabela 3 – Curva analítica para análise por injeção direta, em miligramas por litro.	31
Tabela 4 – Comparação de resultados de concentração para os métodos de inserção da amostra: injeção direta e injeção de headspace.....	33
Tabela 5 – Comparação de resultados de 2-butanol e 1-butanol para a amostra 7.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. CACHAÇA	10
2.1.1. Produção	10
2.1.2. Composição da Cachaça.....	11
2.1.3. Legislação Brasileira sobre a Cachaça.....	13
2.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	15
2.2.1. Cromatografia a gás com detecção por ionização em chama	15
2.2.2. Método de referência (METLABV/008)	15
2.2.3. Amostragem por <i>headspace</i>	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. EXPERIMENTAL	18
4.1. MATERIAIS E REAGENTES	18
4.2. EQUIPAMENTOS.....	18
4.3. AVALIAÇÃO PARAMÉTRICA	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS	20
5.1.1. Temperatura de incubação	20
5.1.2. Tempo de incubação	22
5.1.3. Volumes de <i>headspace</i> e de amostra no <i>vial</i>	24
5.2. ESTUDO DE ADITIVOS.....	28
5.2.1. Cloreto de sódio	28
5.2.2. Cloreto de potássio	29
5.2.3. Sacarose.....	29
5.2.4. Avaliação.....	30
5.3. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA.....	30
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida genuinamente brasileira, e o estudo da cachaça é uma área notavelmente fértil em termos de ciência e tecnologia brasileiras: composição em aromas e sabores (compostos de *flavor*), presença de contaminantes, pesquisas de melhoramento no cultivo de cana-de-açúcar, inovações em processos industriais e muitas outras áreas a respeito da cachaça (desde o plantio da cana até o consumo do produto final, dentro ou fora do Brasil).

Sendo uma das bebidas mais consumidas pelos brasileiros, a definição de cachaça frente à legislação brasileira está publicada no Decreto 6.871 de 04 de junho de 2009 – conhecido como decreto geral de bebidas – e repetida na Instrução Normativa nº 13 de 29 de Junho de 2005 do Ministério da Agricultura, que aprova o regulamento técnico para a fixação de Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) da aguardente de cana e da cachaça. Nessa instrução, estão determinados limites superiores ou inferiores em relação a diversos compostos orgânicos, podendo ser compostos completamente indesejados (contaminantes) ou compostos que, até certo ponto, contribuem para a qualidade do produto (congêneres). Este trabalho visa avaliar a viabilidade de uma metodologia alternativa para análise desses compostos orgânicos voláteis através da técnica de cromatografia a gás com detector por ionização em chama e amostragem por *headspace*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CACHAÇA

2.1.1. Produção

A produção da Cachaça no Brasil data da época do Império, onde há indícios de que o primeiro engenho de açúcar construído no Brasil foi construído em 1516, no litoral norte do estado de Pernambuco, e que a primeira destilação de cachaça tenha sido realizada entre 1516 e 1532, sendo o primeiro destilado a ser produzido na América Latina (GUARDA, 2016). Conforme dados do Instituto Brasileiro da Cachaça, o Brasil tem mais de 2 mil produtores registrados e produz em torno de 800 milhões de litros por ano. Em 2016, foram exportados 8 milhões de litros, totalizando aproximadamente 14 milhões de dólares (IBRAC, 2016).

Desde abril de 2013, a cachaça é reconhecida pelo governo dos Estados Unidos como um produto exclusivamente brasileiro, como parte de um acordo bilateral entre os governos brasileiro e americano, impulsionando a exportação e a importação de destilados entre os dois países. Até então, a cachaça era comercializada no mercado americano como “rum brasileiro” (BRASIL, 2013).

O processo de produção da cachaça inicia-se pela extração do caldo de cana em moendas, que passa por uma etapa de purificação e é enviado às dornas para a fermentação. Findada a etapa de fermentação, o mosto fermentado (também chamado de “vinho”) é destilado em alambiques ou em colunas de destilação – dependendo se o processo é artesanal ou industrial – após o qual ela pode ser destinada ao consumo ou à maturação em barris, para evolução das características sensoriais (BOSQUEIRO, 2010).

Atualmente, com a modernização dos processos de produção e de controle de qualidade, a qualidade da matéria-prima é de maior relevância (havendo, em alguns casos, requisitos legais). Além disso, considera-se que a etapa de fermentação na fabricação de bebidas destiladas deve ser tão bem estudada e controlada como na elaboração de um vinho (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

2.1.2. Composição da cachaça

Bebidas destiladas, de forma geral, são classificadas entre congenéricas e não-congenéricas. As bebidas congenéricas, como cachaça, rum e uísque, têm padrões definidos quanto às matérias-primas utilizadas e quanto às condições de fermentação, destilação e envelhecimento. As bebidas não-congenéricas, como vodca e gin, são provenientes da retificação de um destilado que pode ser obtido de diferentes matérias-primas (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Em geral, destilados congenéricos são bebidas de produção complexa e sabor característico, portanto maior concentração de compostos orgânicos de importância sensorial. Bebidas não congenéricas tendem a apresentar menos características sensoriais, sendo produzidas a partir de álcool etílico potável de origem agrícola diluído ou de destilados alcoólicos de origem agrícola retificados.

A cachaça é uma solução hidroalcoólica com teor de etanol variável (38 a 48% em volume, segundo a legislação brasileira), produzida a partir da fermentação do caldo de cana e da subsequente destilação do mosto fermentado (MACHADO,

2010). É uma matriz complexa proveniente de diversas transformações químicas e bioquímicas, o que a torna uma bebida congênica. A cachaça contém dezenas de compostos minoritários (ou secundários) que influenciam diretamente nos atributos sensoriais do produto final (MACHADO, 2010). Grande parte dos compostos secundários são formados na etapa de fermentação, embora também haja formação ou concentração destes compostos durante as etapas de destilação e de maturação (YOKOYA, 1995). Por ser tão complexa, ainda não foi possível identificar todos os compostos presentes, nem mesmo associá-los a fenômenos específicos (MACHADO, 2010).

Além do etanol, a cachaça é composta por diversos outros álcoois. O metanol, um dos álcoois contaminantes, é um dos responsáveis pela agressividade olfativa do produto final e leva muito mais tempo para ser metabolizado que o etanol, podendo levar vários dias até a completa eliminação do organismo. Entre os sintomas da intoxicação por metanol, estão: vômitos, dor abdominal intensa, cefaleia, visão embaçada e até cegueira (MACHADO, 2010). O metanol é formado pela hidrólise ácida ou enzimática de grupos metoxila presentes na pectina e em seus derivados (CARDOSO, 2013). Além do metanol, existem na cachaça: 1-butanol e 2-butanol (álcoois contaminantes), 1-propanol, 2-metil-propanol, 2-metil-butanol e 3-metil-butanol (álcoois congênicos); todos produzidos na etapa de fermentação, seja por contaminação de outras bactérias ou por degradação de aminoácidos. (CARDOSO, 2013).

O principal aldeído presente na cachaça é o acetaldeído, formado nas primeiras horas de fermentação, pela descarboxilação do ácido pirúvico (YOKOYA, 1995). O acetaldeído tem se mostrado um potente embriotóxico e teratogênico em ratos, podendo ser considerado também um agente mutagênico e carcinogênico (ANDRADE et al, 2007). A acroleína, outro aldeído, é formada na etapa de fermentação, no processo de desidratação do glicerol; em vinhos, a formação de acroleína é associada a bactérias termofermentativas. A acroleína é extremamente tóxica, tem apresentado caráter mutagênico e provoca irritação no trato respiratório de animais e de humanos (ANDRADE et al, 2007).

De forma geral, também podem ser encontrados na cachaça ácidos carboxílicos como ácido acético e ácido láctico, subprodutos normais da fermentação. Em pequenas quantidades, também podem ser encontrados os ácidos

succínico, cítrico, pirúvico e oxaloacético, que contribuem sensorialmente para a cachaça, direta ou indiretamente (MACHADO, 2010).

Os ésteres são produzidos durante a fermentação e também pela esterificação de ácidos orgânicos com etanol, sendo que o acetato de etila representa aproximadamente 80% dos ésteres presentes na cachaça. Em pequena quantidade, ele confere um agradável aroma de frutas, porém torna o produto enjoativo e é indesejável em quantidades elevadas (PARAZZI et al, 2008). Além do acetato de etila, foram encontrados mais de quinze outros ésteres, dos quais os quatro principais foram decanoato de etila, octanoato de etila, acetato de 3-metilbutila e dodecanoato de etila (NÓBREGA, 2003).

O carbamato de etila, o éster etílico do ácido carbâmico, é um composto apontado por diversos estudos como carcinogênico em diversas espécies animais (LABANCA et al, 2008), cujo mecanismo de formação ainda não foi perfeitamente compreendido. Dependendo das condições, o carbamato pode ser formado antes, durante ou após a destilação, através da reação do etanol com alguns compostos nitrogenados (BOSQUEIRO, 2010).

Em menor quantidade, a cachaça também pode apresentar compostos de enxofre. Compostos voláteis sulfurados são considerados relevantes ao aroma de qualquer alimento ou bebida, pois a maioria deles possui valor de limiar de odor muito baixo (NÓBREGA, 2003). Na cachaça, podem ser encontrados sulfeto de hidrogênio e dimetilsulfeto, produzidos principalmente pela degradação de aminoácidos sulfurados (MACHADO, 2010).

2.1.3. Legislação brasileira sobre a cachaça

A Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça (BRASIL, 2005), na qual cachaça é definida como a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% (trinta e oito por cento em volume) a 48% (quarenta e oito por cento em volume) a 20°C (vinte graus Celsius), obtida da destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L (seis gramas por litro), expressos em sacarose. No caso de produtos com teor de açúcares entre 6 e 30 g/L, expressos em sacarose,

inclui-se a denominação “adoçada”. Assim sendo, não existe cachaça que não seja produzida no Brasil.

No item 3 da Instrução Normativa, “Composição Química e Requisitos de Qualidade”, é definido o monitoramento dos compostos congêneros: acetaldeído, acetato de etila, ácido acético, soma de furfural e hidroximetilfurfural e soma de álcoois isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-butanol e 3-metil-butanol) e n-propílico (1-propanol), além do próprio coeficiente de congêneres, que é a soma dos anteriores. No item 5 da mesma Instrução Normativa, “Contaminantes”, sub-item 5.1, “Contaminantes Orgânicos”, são monitorados: álcool metílico (metanol), acroleína (2-propenal), álcool sec-butílico (2-butanol), álcool n-butílico (2-butanol) e carbamato de etila. Os valores de concentração estão relacionados na tabela abaixo.

Tabela 1– Padrão de identidade e qualidade de congêneres e contaminantes em cachaça ($\mu\text{g L}^{-1}$ para carbamato de etila em mg / 100 mL de álcool anidro para os demais)

Parâmetro	Mínimo	Máximo
Aldeídos totais (expressos em acetaldeído)		30
Ésteres totais (expressos em acetato de etila)		200
Acidez volátil (expressa em ácido acético)		150
Soma de furfural de hidroximetilfurfural		5
Soma de álcoois isobutílico, isoamílicos e n-propílico		360
Coeficiente de congêneres (soma dos anteriores)	200	650
Álcool metílico		20
Carbamato de etila		150
Acroleína		5
Álcool sec-butílico		10
Álcool n-butílico		3

Fonte: Instrução Normativa MAPA nº 13, de 29 de junho de 2005.

Conforme o decreto 6.871 de 04 de junho de 2009, é de competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. A rede de Laboratórios Nacionais

Agropecuários (LANAGRO), oficiais e credenciados, é responsável pela realização de análises físico-químicas a fim de verificar se bebidas e vinagres nacionais ou importados atendem os padrões de identidade e qualidade estabelecidos em instruções gerais e em legislação específica.

2.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As técnicas de cromatografia instrumental são aquelas em que os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de suas interações com uma fase estacionária, tendo a fase móvel como transporte apenas (cromatografia a gás) ou como parte do processo de separação (cromatografia a líquido) (SKOOGet al, 2006).

2.2.1. Cromatografia a gás com detecção por ionização em chama

A cromatografia a gás é uma técnica de separação de compostos voláteis, semi-voláteis ou passíveis de volatilização que sejam termicamente estáveis na temperatura de trabalho, na qual os constituintes da amostra são particionados entre uma fase estacionária e uma fase móvel gasosa, que percola através da primeira (McNAIR; BONELLI, 1969). A detecção de ionização em chama consiste na medição da corrente gerada em uma chama de nitrogênio, hidrogênio e oxigênio pela qual passa um campo elétrico, devido à queima e posterior ionização – pela ação do campo elétrico – dos compostos orgânicos provenientes da amostra (CIOLA, 1985). O FID (do inglês, *Flame Ionization Detector*) é um detector de funcionamento simples, altamente recomendado para análise de compostos orgânicos (CIOLA, 1985).

2.2.2. Método de referência (MET LABV/008)

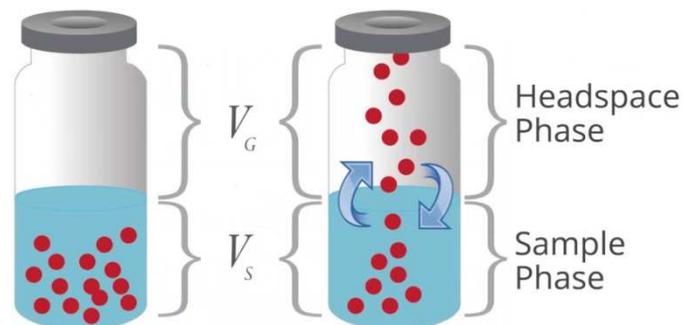
No âmbito do Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres (LABV) do LANAGRO-RS, já é utilizada uma metodologia para análise de congêneres e contaminantes orgânicos em destilados utilizando cromatografia a gás com detector por ionização em chama (GC-FID); apesar da variação existente entre colunas, equipamentos e condições cromatográficas, o uso do GC-FID já bastante usual no meio de controle de qualidade de cachaça (RODELLA; BORGES, 1989). Entretanto, o método utilizado no LABV envolve a injeção direta da amostra líquida, que pode comprometer o sistema cromatográfico devido à presença de açúcares em destilados adoçados e de corante caramelo em destilados envelhecidos.

Para evitar este problema, as amostras são redestiladas utilizando um destilador eletrônico enoquímico, cuja força-motriz da destilação é a aplicação de uma diferença de potencial, não de temperatura. Ainda que razoavelmente eficaz, esse sistema é lento em função da necessidade de destilar cada amostra individualmente – cada destilação pode levar de dez a vinte minutos – tornando-se praticamente inexecutável em campanhas pontuais de coleta (como denúncias de consumidores), em que o número de amostras recebidas pelo laboratório é muito maior que o usual. Além disso, o sistema foi desenvolvido para a destilação de vinhos. Destilados tem graduação alcoólica significativamente maior e menor quantidade de compostos dissolvidos, o que diminui a condutividade do sistema e, portanto, aumenta ainda mais o tempo de destilação de cada amostra. Por esses motivos, é importante avaliar a potencialidade de metodologias em que não se faça necessária a injeção direta da amostra líquida, reduzindo o tempo de preparo e aumentando a eficiência.

2.2.3. Amostragem por *headspace*

A amostragem por *headspace* consiste de uma extração líquido-gás que ocorre de forma semelhante à extração líquido-líquido. Em um frasco fechado, os compostos voláteis são parcialmente solubilizados na fase gasosa imediatamente acima, e parte deles volta novamente à amostra. Após certo tempo, estabelece-se um equilíbrio, na qual a concentração dos analitos voláteis na fase gasosa se mantém constante. A esse gás em contato e em equilíbrio com uma fase não-volátil proveniente da amostra, dá-se o nome de *headspace*. Ao remover uma alíquota do *headspace*, é possível analisar os compostos voláteis presentes na amostra com menor interferência da matriz (KOLB; ETTRE, 2006).

Figura 1– Ilustração do equilíbrio líquido-gás em um frasco para análise por headspace



Fonte: <https://i.ytimg.com/vi/ik2GLhKkKel/maxresdefault.jpg>; acesso em 12.01.2018

A técnica de HS-GC pode ser utilizada para análise de ácidos graxos em efluentes industriais (CRUWYS et al, 2002), etanol e drogas de abuso em sangue (WASFI et al, 2004), resíduos de solventes em medicamentos (URAKAMI et al, 2004), entre outros. Na análise de compostos voláteis em alimentos, a técnica de amostragem por headspace pode ser realizada utilizando uma fibra de microextração em fase sólida (SPME) e/ou acoplado um detector olfatométrico para compostos de aroma em alimentos e bebidas, avaliando qualidade (BALASUBRAMANIAN; PANIGRAHI, 2010), autenticidade (RAVID et al, 2010), compostos de aroma e sabor (YANG; PEPPARD, 1994) (RUTH, 2001), entre outros.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencialidade de utilização de amostragem por headspace acoplada a cromatografia a gás com detector de ionização na chama para análise de compostos orgânicos voláteis em bebidas alcoólicas destiladas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer os parâmetros de análise por HS-GC-FID para análise dos compostos orgânicos voláteis: acetaldeído, acroleína, acetato de etila,

metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-propanol, 1-butanol, 2-metil-butanol e 3-metil-butanol em cachaça;

- Avaliar as melhores condições de cada parâmetro a fim de obter sinais compatíveis com a faixa de concentração a ser trabalhada;
- Avaliar o uso de aditivos como alternativa de preparo de amostra para aumentar o sinal analítico;
- Comparar a metodologia desenvolvida com a metodologia de referência em um estudo semiquantitativo.
- Propor uma metodologia que atenda às necessidades do LABV para análise de compostos orgânicos voláteis em bebidas alcoólicas destiladas.

4. EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

A solução de trabalho (ST) foi preparada a partir da mistura de duas amostras de cachaça, comercialmente disponíveis e de comportamento conhecido. Acroleína (Absolute Standards, 97%) e metanol (Aldrich, $\geq 99,8\%$) foram utilizados para aumentar o sinal da amostra real. Etanol (Fluka, $\geq 99,8\%$) e água purificada de resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ (Gehaka Master System MS2000) foram utilizados para o preparo da solução hidroalcoólica, utilizada como branco e para o preparo das curvas analíticas. Cloreto de sódio (Vetec, $\geq 99,5\%$), cloreto de potássio (Cromoline, $\geq 99\%$) e sacarose (Sigma, $\geq 99,5\%$) foram utilizados de forma direta no estudo de aditivos.

As amostras de comparação no estudo semiquantitativo são amostras de diversos tipos de destilados (cachaça, rum, Bourbon, calvados etc.) remanescentes de programas de ensaio de proficiência nacionais e internacionais, como Rede Metrológica, BIPEA e LGC. Todos os testes foram realizados utilizando frascos de 20 mL para análise por *headspace* (vidro transparente, fundo plano, borda chanfrada, selos de metal tipo *crimp* e septo de PTFE).

4.2. EQUIPAMENTOS

Neste estudo, foi utilizado um cromatógrafo a gás multidimensional (MDGC): na primeira dimensão, um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama Shimadzu GC-2010Plus/FID, com coluna polar de sílica fundida com cobertura de

polietilenoglicol (Varian CP-Wax 57CB 50m x 0,25mm x 0,2mm), utilizado para as análises de forma geral; na segunda dimensão, um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu GC-2010Plus/MS_QP2010 Ultra, com coluna de sílica fundida de alta polaridade com cobertura de polietilenoglicol Cross Bond Carbowax (RestekStabilwax 60m x 0,25mm x 0,25mm), para confirmação dos sinais obtidos (não utilizado neste trabalho). Acoplado ao sistema, um autoamostrador combiPAL AOC5000 com seringa para análise por *headspace* de 2,5 ml.



Figura 3 – Cromatógrafo a gás multidimensional com autoamostrador.

Fonte: o autor..

As condições cromatográficas foram utilizadas de forma a obter a melhor resolução analítica possível em tempo de análise diariamente viável. A análise começa a 40°C e se mantém a essa temperatura por 4,4min. Então, o sistema é aquecido a uma taxa de 4°C/min a 110°C e, ao atingir essa temperatura, é aquecido a uma taxa de 50°C/min até 190°C, temperatura na qual permanece por 6,5min. O tempo total de cada análise é de 30 minutos.

4.3. AVALIAÇÃO PARAMÉTRICA

Na amostragem por *headspace*, os parâmetros avaliados foram: temperatura de incubação, tempo de incubação, volume de amostra no *vial* e volume de amostra injetada. O efeito *salting out* foi avaliado pela adição de cloreto de sódio, cloreto de potássio e sacarose. As variáveis mantidas constantes durante todo o estudo

foram: amostragem (*headspace*), método de injeção (*Split*, 20:1), velocidade de agitação da incubadora (250 rpm) e volume do vial (20 mL).

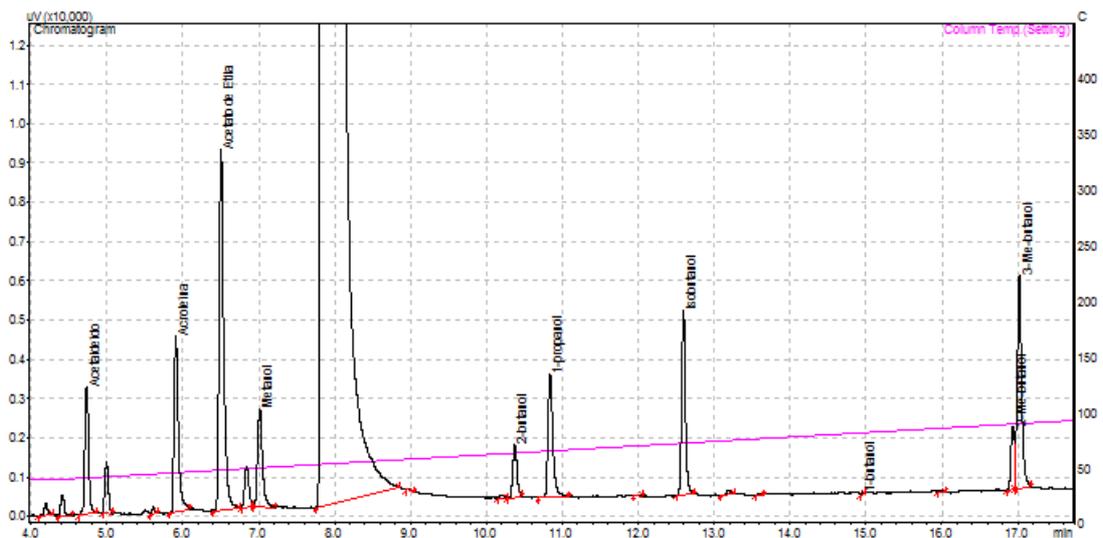
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

5.1.1. Temperatura de incubação

Na figura 3, é apresentado o cromatograma da primeira análise realizada, com temperatura de incubação de 35°C, tempo de incubação de 10 min, volume de amostra de 10 mL e volume de injeção de 1 mL.

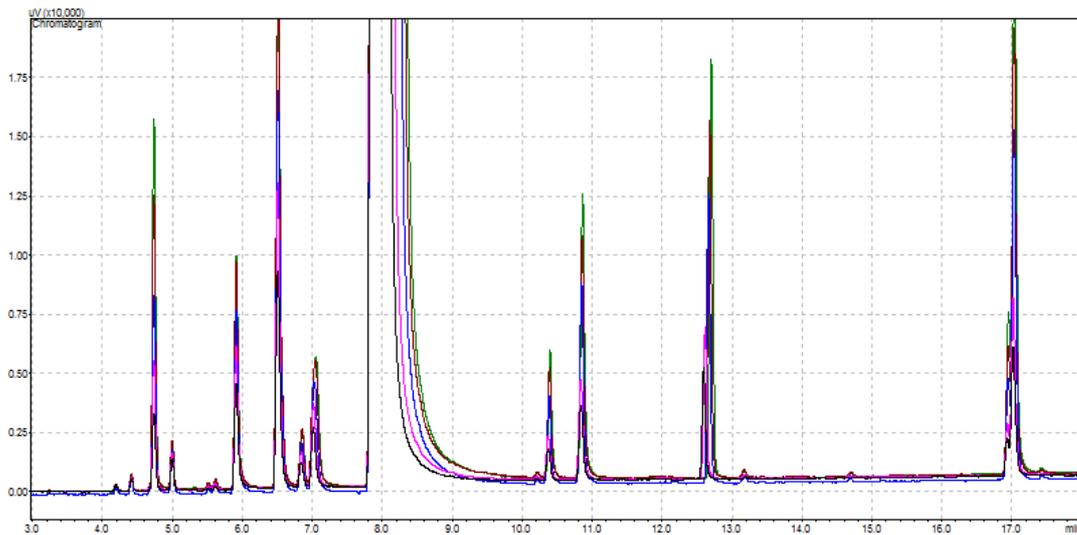
Figura 4 – Cromatograma da solução padrão com identificação dos picos: acetaldeído (4,7 min), acroleína (5,9 min), acetato de etila (6,5 min), metanol (7,0 min), 2-butanol (10,4 min), 1-propanol (10,8 min), isobutanol (12,6 min), 1-butanol (15,0 min, não detectado), 2-metil-butanol (16,9 min) e 3-metil-butanol (17,0 min).



Fonte: o autor

Na figura 4, estão sobrepostos os cromatogramas da solução de trabalho analisada em diversas condições de temperatura de incubação. No primeiro momento, foram avaliadas as temperaturas de 35°C, 45°C, 55°C, 65°C e 75°C. Observa-se que, de 35°C a 75°C, os sinais analíticos não apresentaram perda de intensidade nem de resolução. Assim sendo, foram testadas temperaturas de incubação maiores – 85°C e 95°C – no intuito de observar o limite de proporcionalidade entre as variáveis temperatura de incubação e intensidade do sinal.

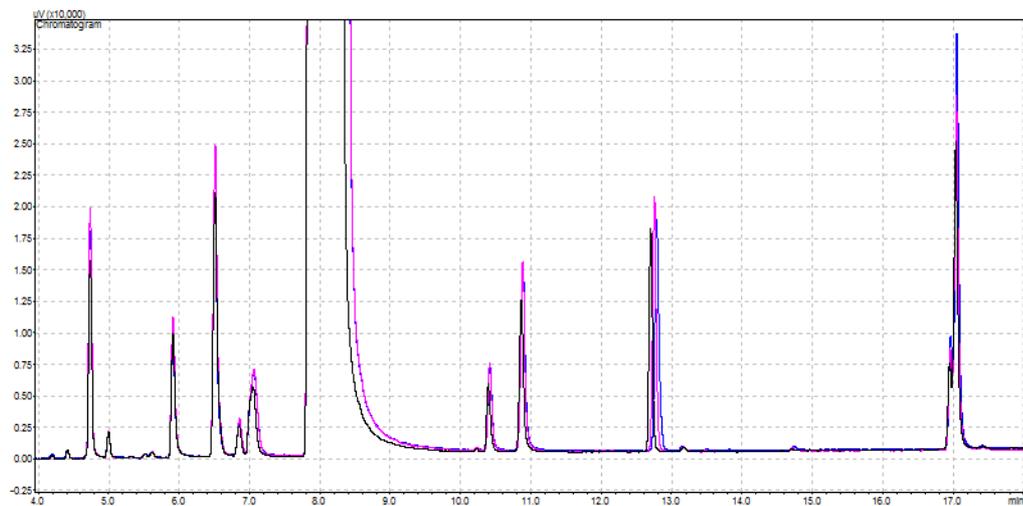
Figura 6 – Sobreposição de cromatogramas do estudo inicial de temperatura de incubação. Cromatogramas relativos às análises a 35°C (preto), 45°C (rosa), 55°C (azul), 65°C (vermelho) e 75°C (verde).



Fonte: o autor

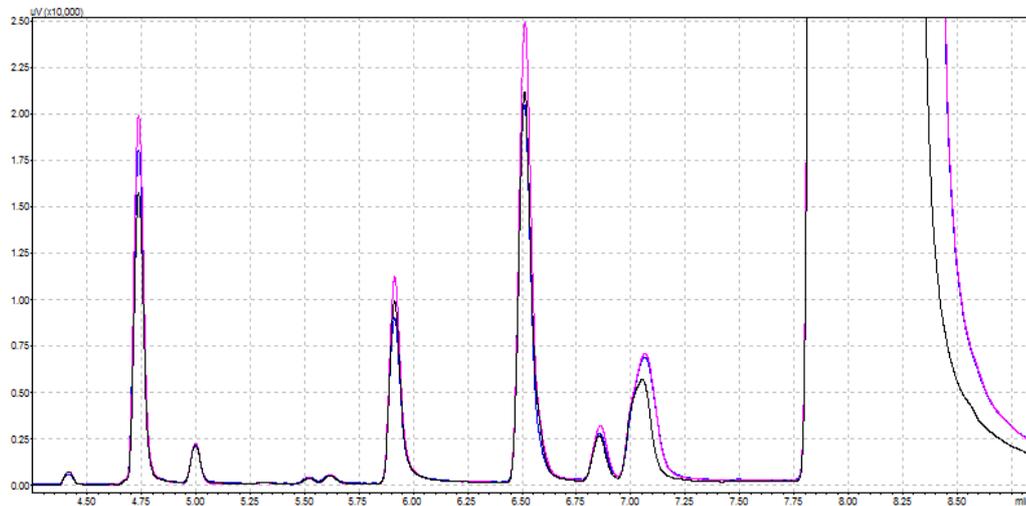
Nas figuras 5 e 6 estão apresentados os resultados apenas das três análises com temperaturas de incubação mais altas, a primeira com todos os sinais analíticos e a segunda, apenas com a região de analitos mais voláteis.

Figura 9 – Sobreposição de cromatogramas do estudo final de temperatura de incubação. Cromatogramas relativos às análises a 75°C (preto), 85°C (rosa) e 95°C (azul).



Fonte: o autor.

Figura 11 – Sobreposição de cromatogramas do estudo final de temperatura de incubação (região de analitos mais voláteis). Cromatogramas relativos às análises a 75°C (preto), 85°C (rosa) e 95°C (azul).



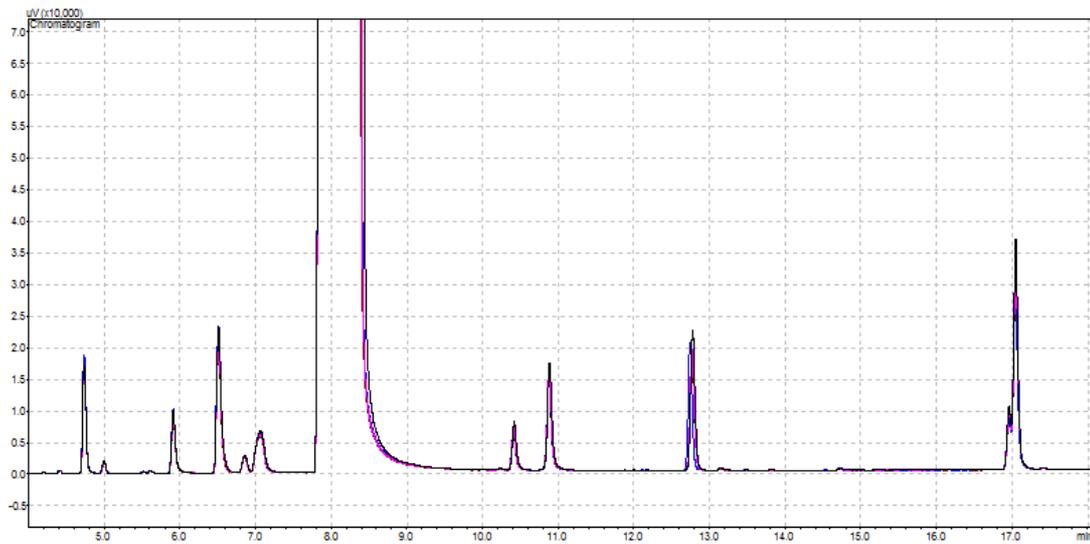
Fonte: o autor

Na figura 6, observa-se que, para os analitos mais estáveis, a intensidade do sinal continua diretamente proporcional à temperatura de incubação. Entretanto, fica visível na figura 5 que existe uma diminuição de intensidade nos analitos mais voláteis (acetaldéido e acetato de etila), provavelmente devido à degradação ou perda destes compostos extremamente voláteis resultante da temperatura excessivamente alta. Assim sendo, estabeleceu-se a temperatura de 85°C como temperatura de incubação ótima, em que a intensidade analítica é máxima sem perda de resolução.

5.1.2. Tempo de incubação

Mantendo a temperatura de incubação em 85°C, foram feitas quatro análises variando o tempo de incubação entre 10 min, 12 min, 15 min e 20 min. A figura 7 apresenta os quatro cromatogramas sobrepostos. Pode-se observar que o incremento de área dos sinais analíticos com tempos de incubação maiores é pequeno, porém existente.

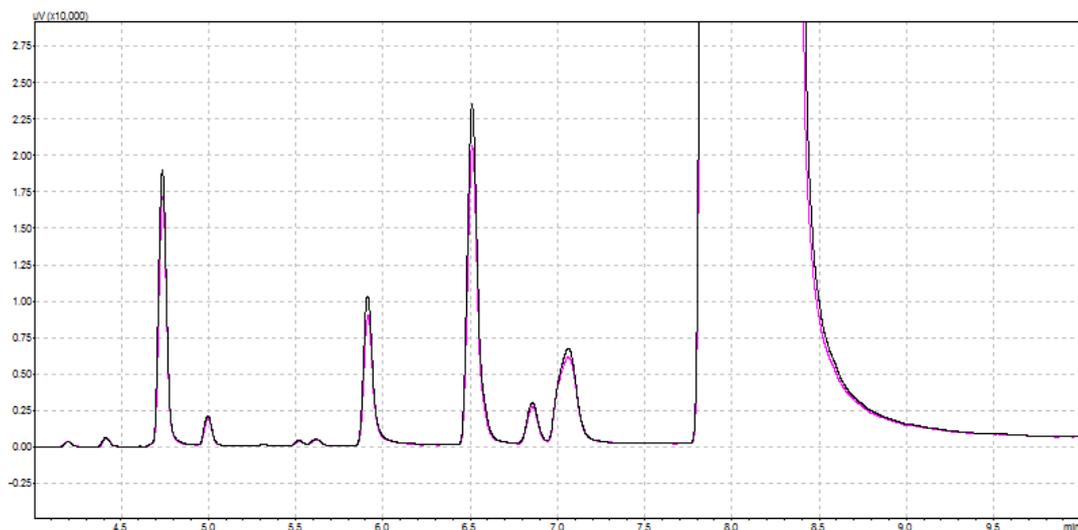
Figura 12 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de tempo de incubação: 10 min (preto), 12 min (rosa), 15 min (azul) e 20 min (vermelho).



Fonte: o autor.

Apenas a região de analitos mais voláteis das análises com 15 e 20 min de tempo de incubação (figura 8), ocorreu uma proporcionalidade inversa da área pelo tempo, isto é, a área dos sinais diminui com o aumento do tempo de incubação.

Figura 14 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de tempo de incubação (região de analitos mais voláteis), relativos às análises de 15 min (preto) e de 20 min (rosa) de tempo de incubação.



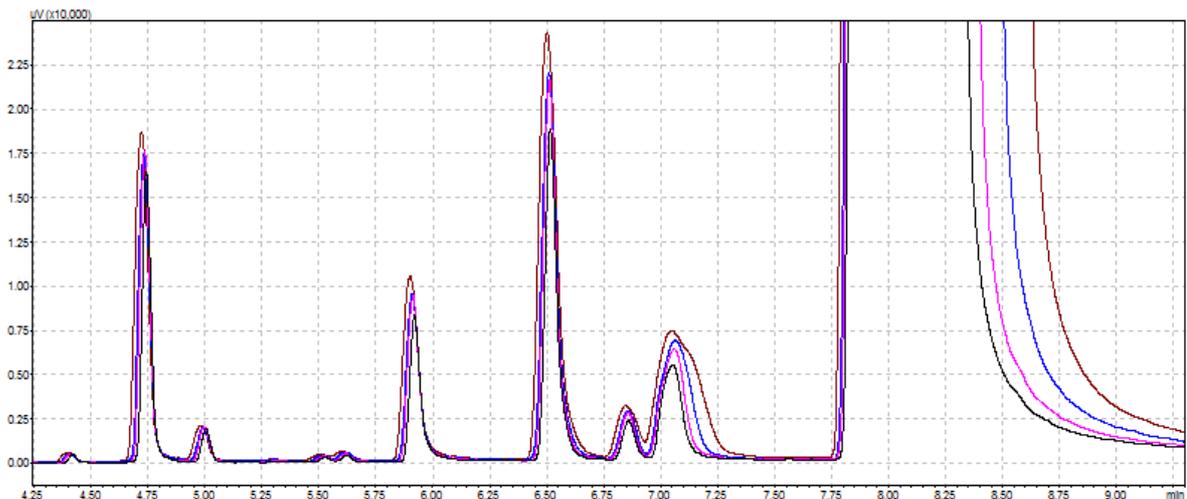
Fonte: o autor.

Provavelmente, como a volatilidade dos analitos é alta, o sistema começa a apresentar problemas de recuperação em condições mais extremas. Assim sendo, definiu-se o tempo de incubação de 15min como condição ótima.

5.1.3. Volumes de *headspace* e de amostra no *vial*

Foram realizados dois grupos de experimentos: um com alto volume de amostra (*vial*) e volumes intermediários de injeção (*headspace*) e outro com alto volume de injeção e volumes intermediários de amostra. No primeiro grupo, foi mantido o volume de amostra de 10 mL (50% da capacidade do *vial*) e foram testados os volumes *headspace* de 0,8 mL, 1,0 mL, 1,2 mL e 1,5 mL; os cromatogramas referentes a esse estudo estão sobrepostos nas figuras 9 e 10.

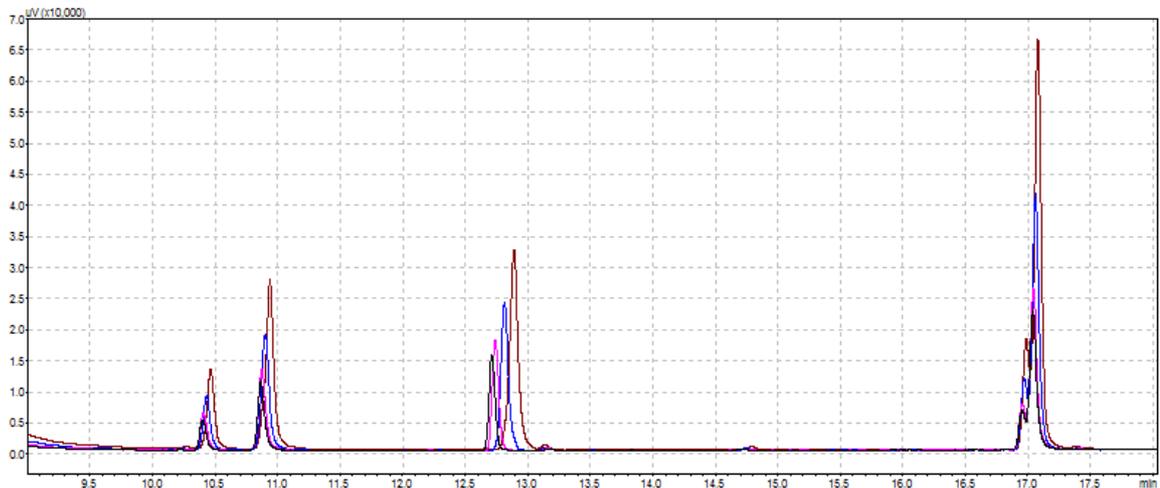
Figura 16 – Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de injeção (região de analitos mais voláteis). Volume de injeção de 0,8 mL (preto), 1,0 mL (rosa), 1,2 mL (azul) e 1,5 mL (vermelho).



Fonte: o autor.

Observa-se um ganho pouco expressivo em intensidade do sinal no que tange aos analitos mais voláteis – entretanto, este ganho é substancialmente maior na região de analitos menos voláteis. Devido a esse incremento de intensidade, adotou-se, para este grupo, o volume de *headspace* de 1,5 mL como volume ótimo.

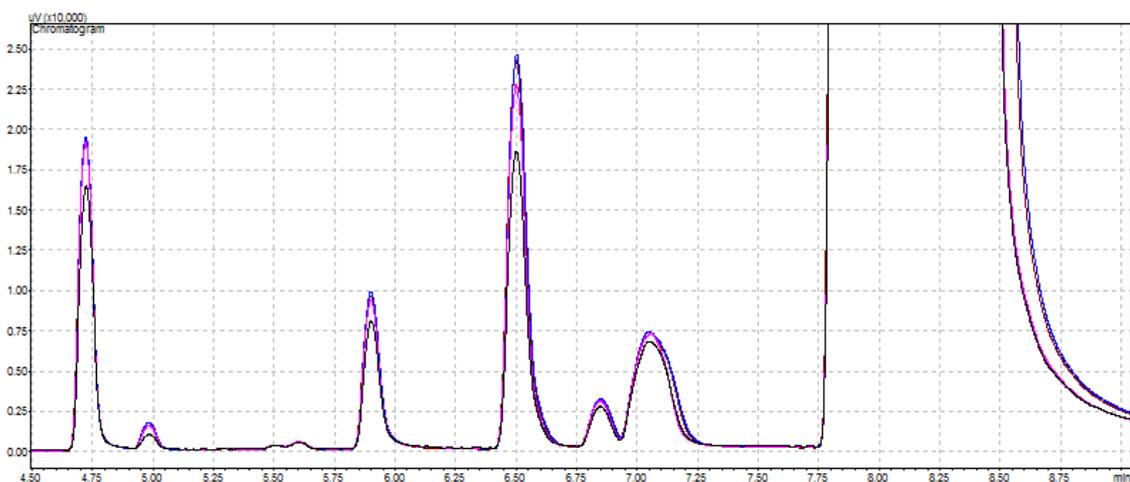
Figura 10 – Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de injeção (região de analitos menos voláteis). Cromatogramas relativos às análises com injeção de 0,8 mL (preto), 1,0 mL (rosa), 1,2 mL (azul) e 1,5 mL (vermelho).



Fonte: o autor

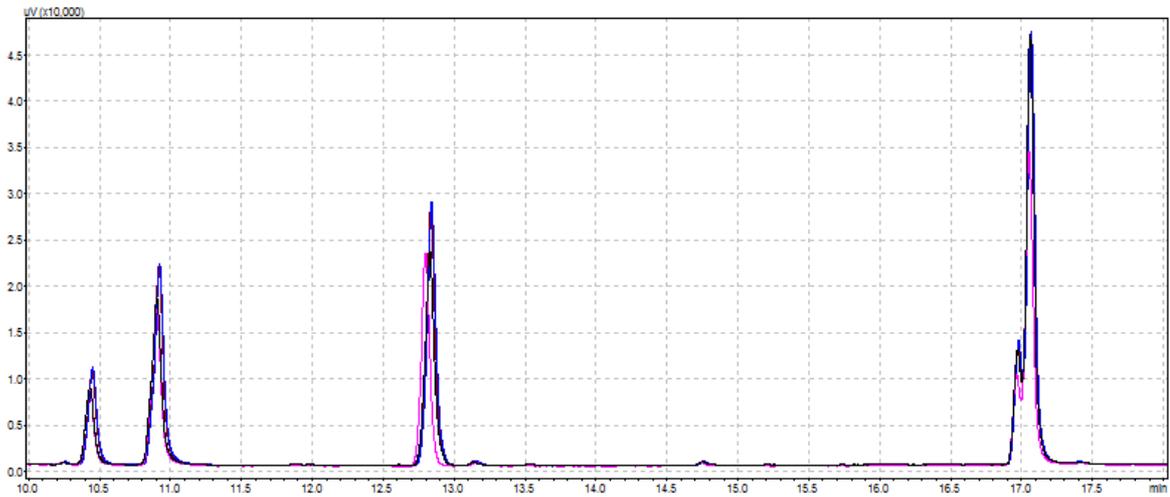
Fixando o volume de 1,5 mL, estudou-se o melhor volume de amostra no vial. Nesse estudo, foram testados 25%, 40%, 50% e 60% da capacidade do *vial*, ou seja: 5, 8, 10 e 12 mL. Abaixo, os cromatogramas sobrepostos.

Figura 11 – Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de amostra (região de analitos mais voláteis): 5 mL (preto), 8 mL (rosa), 10 mL (azul) e 12 mL (vermelho).



Fonte: o autor

Figura 12–Sobreposição de cromatogramas do primeiro estudo de volumes, variando o volume de amostra (região de analitos menos voláteis): 5mL (preto), 8 mL (rosa), 10 mL (azul) e 12 mL (vermelho).

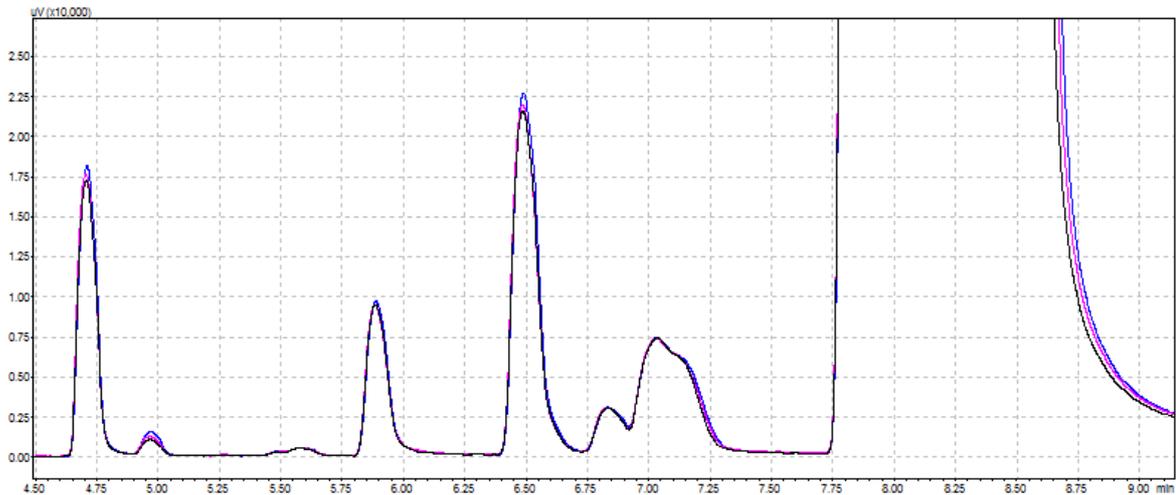


Fonte: o autor

Observa-se que existe um ganho de intensidade proporcional ao aumento de volume entre 8 e 10 mL, porém este se torna desprezível entre 10 e 12 mL. Dessa forma, estabeleceu-se como volume ótimo o volume de 10 mL.

No segundo grupo de experimentos, foi fixado o volume de injeção de 2 mL de *headspace* e foram avaliados os volumes de amostra de 2, 3 e 5 mL. Observa-se, através dos cromatogramas sobrepostos na figura 13, que a intensidade analítica não é significativamente alterada entre os volumes.

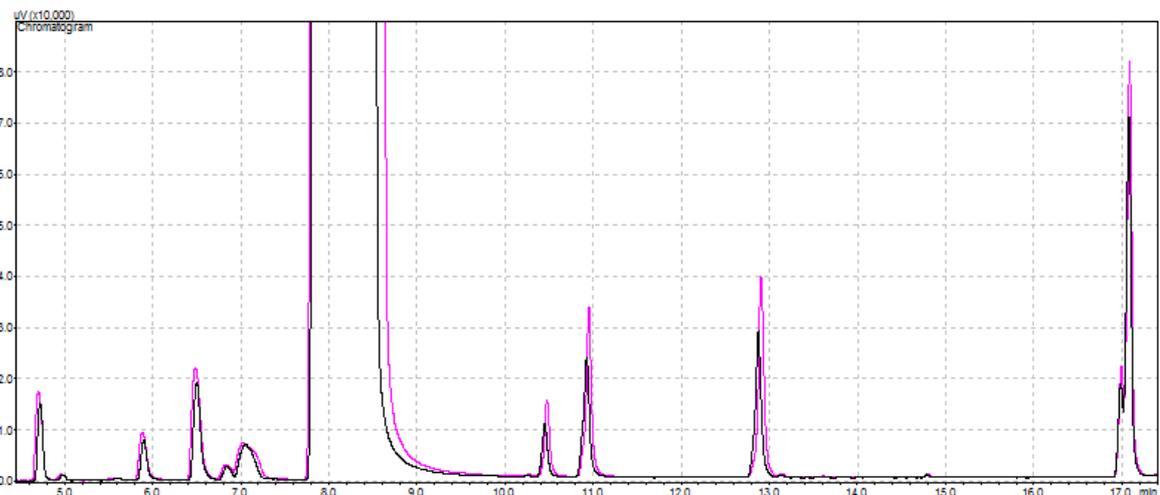
Figura 13—Sobreposição de cromatogramas do segundo estudo de volumes, variando o volume de amostra (região de analitos mais voláteis): 2mL (preto), 3 mL (rosa) e 5 mL (azul).



Fonte: o autor

Adotou-se como ótimo o volume intermediário de 3 mL. Neste caso, o volume de injeção de *headspace* não foi variado, devido ao alargamento dos picos proporcional ao aumento do volume de injeção – além de já estar trabalhando próximo do volume máximo da seringa (2,5 mL). Por fim, foram comparados os cromatogramas das melhores configurações do primeiro estudo, 10 mL de amostra e 1,5 mL de *headspace*, e do segundo estudo, 3mL de amostra e 2 mL de *headspace*.

Figura 194 – Cromatograma comparativo entre as duas condições ótimas: com 10 mL de amostra e 1,5 mL de *headspace* (preto) e com 3 mL de amostra e 2 mL de *headspace* (rosa).



Fonte: o autor

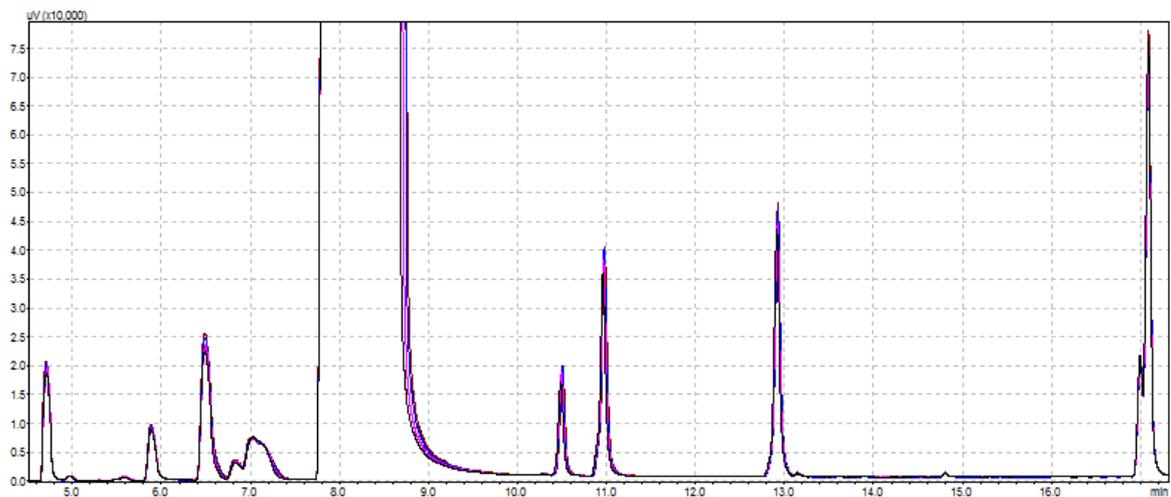
Pode-se concluir que a primeira configuração resulta em sinais mais finos, enquanto a segunda configuração resulta em sinais mais intensos. Como as condições cromatográficas resultaram em boa separação entre os sinais analíticos de interesse, sinais mais largos são uma consequência aceitável quando também se há sinais mais intensos e oriundos de um volume muito menor de amostra. Assim sendo, optou-se pela segunda metodologia: 85°C de temperatura de incubação, 15 min de tempo de incubação, 3 mL de amostra colocada no *vial*, 2 mL de *headspace* injetado no equipamento.

5.2. ESTUDO DE ADITIVOS

5.2.1. Cloreto de sódio

Com o método otimizado no item anterior, foram adicionadas à solução de trabalho, quantidades de cloreto de sódio de 150mg, 300mg e 450mg (5%, 10% e 15% m/V) e comparadas com uma análise da solução de trabalho sem aditivo, para observar as modificações. Os resultados estão sobrepostos na figura abaixo.

Figura 15 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de avaliação do aditivo cloreto de sódio. Sem aditivo (preto), com 150 mg de NaCl (rosa), com 300 mg de NaCl (azul) e com 450 mg de NaCl (vermelho)

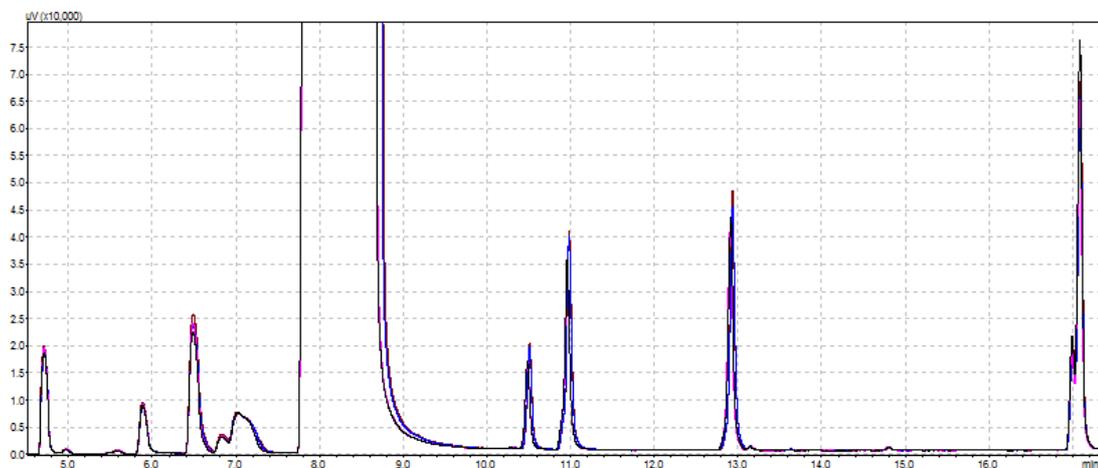


Fonte: o autor

5.2.2. Cloreto de potássio

Foram avaliadas adições de cloreto de potássio de 150 mg, 300 mg e 450 mg (5%, 10% e 15% m/V) e, como no item anterior, comparadas com um branco (Figura 16).

Figura 206 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de avaliação do aditivo cloreto de potássio: sem aditivo (preto), com 150 mg de KCl (rosa), com 300 mg de KCl (azul) e com 450 mg de KCl (vermelho).

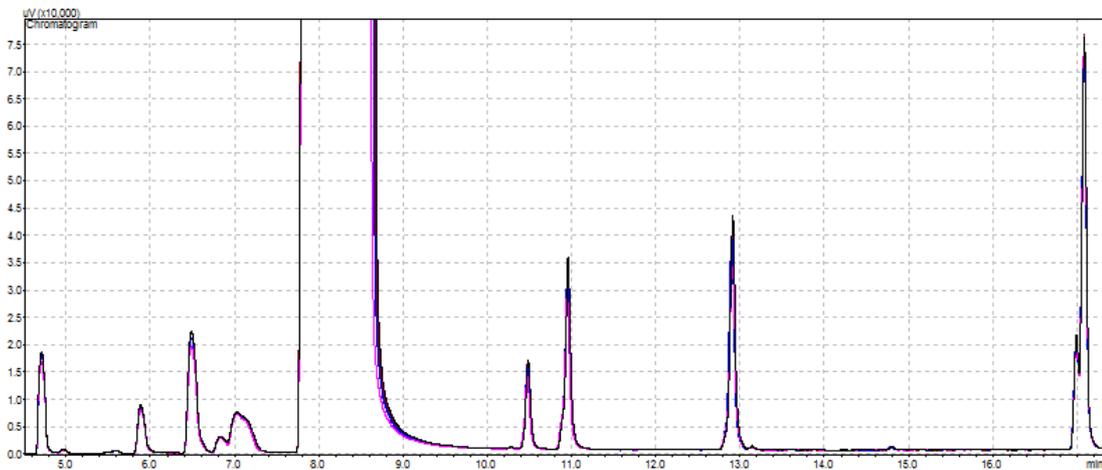


Fonte: o autor

5.2.3. Sacarose

Foram avaliadas adições de sacarose de 150 mg, 300 mg e 450 mg (5%, 10% e 15% m/V) e, como nos itens anteriores, comparadas a uma análise da solução de trabalho sem aditivo. Os resultados estão sobrepostos na figura 17.

Figura 217 – Sobreposição de cromatogramas do estudo de avaliação do aditivo sacarose: sem aditivo (preto), com 150 mg de sacarose (rosa), com 300 mg de sacarose (azul) e com 450 mg de sacarose (vermelho).



Fonte: o autor

5.2.4. Avaliação

Em todos os três casos, observa-se um ganho de intensidade nos sinais cromatográficos. Contudo, não é um ganho suficiente para justificar a adição desta etapa no preparo de amostra, principalmente dado o fato de que método todo está sendo estudado justamente com o intuito de simplificar a rotina analítica e agilizar a emissão de resultados.

O ponto mais interessante é que a adição de sacarose apresenta efeito semelhante em termos de aumento de área que os sais avaliados, com o diferencial de ser um composto naturalmente presente em algumas amostras. Este efeito de matriz poderia requerer, durante uma validação formal, a exploração de alternativas analíticas como diluição de amostra ou utilização de padrão interno. Essa questão será mais explorada no próximo item.

5.3. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA

Após a otimização dos parâmetros instrumentais, foram preparadas duas curvas analíticas de seis pontos a partir das mesmas soluções de padrões, uma para o método em desenvolvimento (tabela 1) e outra, para o método de referência (tabela 2). Todas as curvas analíticas, em ambas as metodologias, apresentaram coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,99 para todos os analitos.

Tabela 2– Dados das soluções padrões utilizadas na curva analítica para análise por *headspace* (mg L⁻¹).

Analito	A	B	C	D	E	F
Acetaldeído	293,2	244,3	146,6	58,6	29,3	19,5
Acetato de etila	61,5	51,2	30,7	12,3	6,1	4,1
Metanol	186,5	155,4	93,2	37,3	18,6	12,4
2-butanol	90,1	75,1	45,1	18,0	9,0	6,0
1-propanol	297,5	247,9	148,8	59,5	29,8	19,8
2-metil-propanol	295,9	246,6	148,0	59,2	29,6	19,7
1-butanol	91,1	75,9	45,5	18,2	9,1	6,1
2-metil-butanol	422,1	351,7	211,0	84,4	42,2	28,1
3-metil-butanol	775,1	645,9	387,5	155,0	77,5	51,7

Fonte: o autor

Tabela 3– Dados das soluções dos padrões utilizados na curva analítica para análise por injeção direta (mg L⁻¹).

Analito	A	B	C	D	E	F
Acetaldeído	293,2	234,6	146,6	58,6	29,3	11,7
Acetato de etila	61,5	49,2	30,7	12,3	6,1	2,5
Metanol	186,5	149,2	93,2	37,3	18,6	7,5
2-butanol	90,1	72,1	45,1	18,0	9,0	3,6
1-propanol	297,5	238,0	148,8	59,5	29,8	11,9
2-metil-propanol	295,9	236,7	148,0	59,2	29,6	11,8
1-butanol	91,1	72,8	45,5	18,2	9,1	3,6
2-metil-butanol	422,1	351,7	211,0	84,4	42,2	28,1
3-metil-butanol	775,1	645,9	387,5	155,0	77,5	51,7

Fonte: o autor.

Dez amostras de destilados diversos foram analisadas por *headspace*, utilizando os valores da Tabela 1 para a quantificação. Após isso, o sistema foi

alterado para o modo de injeção direta e as dez amostras foram analisadas novamente, dessa vez pelo método de referência, utilizando os valores da Tabela 2 para fazer a quantificação. Os resultados estão nas Tabelas 4 e foram expressos sem casas decimais por ser um estudo meramente semiquantitativo.

Para o acetaldeído, o método de injeção por *headspace* demonstra ser satisfatoriamente exato, não apresentando diferença maior que 5 mg/L.

Tabela 4– Comparação de resultados de concentração para os métodos de inserção da amostra: injeção direta e injeção de headspace.

Amostra	direta (mg/L)	Headspace (mg/L)	direta (mg/L)	Headspace (mg/L)	direta (mg/L)	Headspace (mg/L)	direta (mg/L)	Headspace (mg/L)
	acetaldeído		acetato de etila		metanol		1-propanol	
1	25	27	49	45	16	16	191	265
2	19	24	46	42	16	19	39	48
3	69	66	41	27	24	32	211	259
4	39	39	100	52	144	156	101	97
5	66	66	53	26	34	42	96	96
6	27	29	50	40	25	30	174	188
7	22	24	226	170	275	298	115	129
8	41	44	167	131	67	91	112	177
9	13	16	17	16	11	4	77	91
10	10	11	5	6	14	16	3	8

Fonte: o autor.

Tabela 4 - Continuação

Amostra	direta (mg/L)	<i>Headspace</i> (mg/L)	direta (mg/L)	<i>Headspace</i> (mg/L)	direta (mg/L)	<i>Headspace</i> (mg/L)
	Iso butanol		2-metil butanol		3-metil butanol	
1	191	203	139	143	571	575
2	112	126	102	108	282	299
3	166	193	111	124	519	558
4	604	467	273	191	1130	782
5	190	159	109	84	534	374
6	350	353	259	244	639	605
7	220	220	150	130	760	631
8	617	895	505	802	1060	1852
9	37	52	18	32	80	107
10	0	15	5	17	8	29

Observa-se que, para valores mais altos, o método de amostragem por *headspace* não apresenta boa recuperação. É necessário determinar a faixa dinâmica linear para este analito e avaliar a possibilidade de incluir uma diluição padrão na rotina analítica, para obter resultados mais exatos.

No que diz respeito ao metanol, observa-se que os valores obtidos pelos dois métodos são razoavelmente próximos, sendo que o método em desenvolvimento apresenta tendência a um valor mais alto, possivelmente em razão de efeito de matriz comentado anteriormente.

Tabela 5 – Comparação de resultados de 2-butanol e 1-butanol para a amostra 7.

amostra	2-butanol		1-butanol	
	direta (mg/L)	<i>Headspace</i> (mg/L)	direta (mg/L)	<i>Headspace</i> (mg/L)
7	101	106	40	39

Fonte: o autor.

A única amostra que apresentou 2-butanol em um valor passível de quantificação (acima de 5 ppm) foi a amostra de número 7. Ainda que um único caso não possa ser considerado representativo do todo, os valores são consideravelmente próximos.

Observa-se que os valores de 1-propanol obtidos pelos dois métodos são razoavelmente próximos, mas, assim como no caso do metanol, existe uma clara tendência a superdimensionar o resultado, provavelmente devido a efeito de matriz.

Com relação ao isobutanol, a diferença entre os dois métodos oscilou, sendo o resultado obtido pelo método em desenvolvimento maior em alguns casos e menor em outros, quando comparado ao valor obtido pelo método de referência. É importante lembrar que esse estudo não envolveu avaliação de repetibilidade e de reprodutibilidade, característicos de uma validação formal, portanto é razoável imaginar que parte dessa oscilação seja intrínseca do método.

A única amostra que apresentou 1-butanol em um valor passível de quantificação (acima de 5ppm) foi a amostra de número 7. Novamente, ainda que um único caso não possa ser considerado representativo do todos os valores são próximos.

Referente aos álcoois isoamílicos, 2-metil-butanol e 3-metil-butanol, observa-se uma variação complexa. Enquanto as três primeiras amostras apresentam pequena diferença entre os resultados obtidos pelas duas metodologias, a amostra 8 apresenta variações altíssimas. Assim como nos casos do metanol e do 1-propanol, pode-se supor que essa variação seja devido a um efeito de matriz.

A etapa de análise semiquantitativa deste estudo de viabilidade apresentou resultados plenamente satisfatórios. Ainda que haja variações entre os resultados obtidos pelo método em desenvolvimento e pelo método de referência, estas variações são esperadas devido às complexidades de matriz das bebidas destiladas e de equilíbrios líquido-gás da análise por *headspace*.

O importante a ressaltar é que podem se observar relações bastante próximas entre os dois métodos, evidenciando que a análise de bebidas destiladas por *headspace* não é algo impossível. Ao submeter a metodologia otimizada neste trabalho a um procedimento de validação metodológica tradicional, serão estudados parâmetros como repetibilidade, reprodutibilidade, linearidade, sensibilidade e avaliação do efeito de matriz. Os resultados desses estudos apontarão ao melhor caminho a se tomar para minimizar – seja por precisão ou por exatidão – a variação existente entre os dois métodos.

6. CONCLUSÃO

A determinação de compostos orgânicos voláteis em cachaça por cromatografia a gás com detecção por ionização em chama e amostragem por *headspace* mostrou-se exequível, ainda que a impressão geral fosse de que o método seria pouco sensível aos componentes secundários devido à presença de etanol a nível de solvente (38 a 48%V/V). A otimização das condições cromatográficas e dos parâmetros instrumentais permitiu um ganho significativo em resolução e em intensidade de sinais analíticos. Foram fixados os parâmetros: 85°C de temperatura de incubação, 15 minutos de tempo de incubação, 3 mililitros de amostra e 2 mililitros de *headspace*.

A utilização de aditivos não resultou em um ganho de área suficiente para justificar uma etapa adicional no preparo de amostra, mas indica que compostos dissolvidos podem influenciar na intensidade do sinal. Torna-se oportuno estudo de alternativas analíticas, como diluição de amostra ou adição de padrão interno.

A análise semiquantitativa de amostras reais mostrou que existem relações bastante próximas entre os resultados obtidos pelas duas metodologias (sendo plenamente suficiente para o caso do acetaldeído, por exemplo). Além disso, evidenciou ainda mais a conclusão do estudo de aditivos, mostrando a necessidade de avaliar a linearidade das análises em função da própria matriz.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível submeter a metodologia otimizada ao processo de validação padrão, determinando figuras de mérito, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para cada analito e, enfim, estimando a incerteza de medição. Uma vez realizado este processo, o método estará apto a ser aplicado diariamente nas análises de cachaça realizadas na rotina do Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres (LABV) do LANAGRO-RS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, L. C.; REIS, M. M.; SILVA, L. A.; ANDRADE, J. B..Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Quim.Nova*,v. 30, n. 8, p. 1968 – 1975, 2007.

BALASUBRAMANIAN, S.; PANIGRAHI, S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, n. 1, p. 1 – 26, 2011.

BOSQUEIRO, A. C. Composição química da aguardente de cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambique simples. 2010. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de Junho de 2009, disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm, acesso em 01 de novembro de 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº13, de 29 de Junho de 2005, Secretaria de Defesa Agropecuária, MAPA. BRASIL, Portal. “Cachaça é reconhecida como produto brasileiro pelos EUA”. Disponível em

<http://www.brasil.gov.br/governo/2013/03/cachaca-e-reconhecida-como-produto-brasileiro-pelos-eua>, acesso em 24 de janeiro de 2018.

CARDOSO, M. das G. Produção de Aguardente de Cana. 3ª ed. Lavras: UFLA, 2013. 340 p.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CIOLA, Remolo. Fundamentos da Cromatografia a Gás. 2ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1985.

CRUWYS, J. A. et al. Development of a static headspace gas chromatographic procedure for the routine analysis of volatile fatty acids in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v. 945, n. 1 – 2, p. 195 – 209, 2002.

GUARDA, A. “500 anos da Cachaça: Desafio da autêntica bebida brasileira é conquistar o mercado internacional”. Disponível em: <http://jconline.ne10.uol.com.br/canal/economia/pernambuco/noticia/2016/03/06/500-anos-da-cachaca-desafio-da-autentica-bebida-brasileira-e-conquistar-o-mercado-internacional--224493.php>; acesso em 07/11/2017.

KOLB, B; ETTRE, L. S. Static Headspace-Gas Chromatography – Theory and Practice. 2nd ed. John Wiley & Sons: Hoboken, 2006.

IBRAC. “IBRAC celebra crescimento das exportações de Cachaça em 2016”. Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php/noticias/cachaca-na-midia/509-ibrac-celebra-crescimento-das-exportacoes-de-cachaca-em-2016>; acesso em 07/11/2017.

LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M. B. A.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação de carbamato de etila em aguardente de cana por CG-EM. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1860 – 1864, 2008.

MACHADO, A. M. R. Carbamato de etila, acroleína e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: caracterização e quantificação em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e “bombonas” de PEAD. 2010. 270 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

McNAIR, H. M.; BONELLI, E. J. Basic Gas Chromatography. 5th ed. Palo Alto: Varian, 1969.

NÓBREGA, I. C. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 23, n. 2, p. 210 – 216, maio/ago. 2003.

PARAZZI, C. et al. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, n. 1, p. 193 – 199, jan./mar. 2008.

RAVID, U. et al. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS–SPME stereo selective GC–MS. Flavour and Fragrance Journal, v. 25, n. 1, p. 20 – 27, 2010.

RODELLA, A. A.; BORGES, M. T. M. R. Manual básico para o laboratório sucro-alcooleiro. Piracicaba, 1989. 225 p.

RUTH, Saskia. Methods for gas chromatography-olfactometry: A review. Biomolecular Engineering, v. 17, n. 4 – 5, p. 121 – 128, 2001.

URAKAMI, K. et al. Matrix media selection for the determination of residual solvents in pharmaceuticals by static headspace gas chromatography. Journal of Chromatography A, v. 1057, n. 1 – 2, p. 203 – 210, 2004.

SKOOG, A. D.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, R. S. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed. São Paulo: Thomson, 2006.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Beverages – Technology, Chemistry and Microbiology. Londres: Chapman & Hall, 1994.

WASFI, I. A. et al. Rapid and sensitive static headspace gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. *Journal of Chromatography B*, v. 799, n. 2, p. 331 – 336, 2004.

YANG, X; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 42, n. 9, p. 1925 – 1930, 1994.

YOKOYA, F. *Fabricação da Aguardente de Cana*. Campinas: F.T.P.T. André Tosello, 1995.