

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALINE KLERING JUCHEM

**ANÁLISE DE COMPOSTOS CARBONILADOS EM BEBIDAS ALCOÓLICAS  
COM ALTERNATIVA DE SUBSTITUIÇÃO DO CATALISADOR UTILIZADO.**

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALINE KLERING JUCHEM

**ANÁLISE DE COMPOSTOS CARBONILADOS EM BEBIDAS ALCOÓLICAS  
COM ALTERNATIVA DE SUBSTITUIÇÃO DO CATALISADOR UTILIZADO.**

Trabalho de Conclusão de curso  
apresentado junto à atividade de ensino  
“Projeto Tecnológico” do Curso de  
Química Industrial, como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Químico  
Industrial

Prof. Dra. Tânia Mara Pizzolato  
Orientadora

Porto Alegre, 2013

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe, meu irmão e a meu amor.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende."  
(Leonardo da Vinci)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe Rosane por me contagiar com o amor aos estudos. Obrigada pelos conselhos e incentivos durante toda a graduação.

Ao meu irmão Lucas, obrigada por me acalmar quando pensei que tudo estava perdido e me divertir em meus momentos livres.

Agradeço ao meu amor, Márcio pelo carinho, pela compreensão, por me ensinar a ver o lado positivo das coisas e tornar meus dias mais felizes.

Agradeço a minha grande amiga e companheira Thaís, que desde o primeiro semestre me acompanhou nesta jornada. Obrigada por nunca me deixar desistir.

Agradeço aos demais amigos que estiveram sempre ao meu lado e entenderam os motivos da minha ausência durante a graduação.

Um muito obrigada especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Mara Pizzolato pela atenção, esforço e paciência dedicados a mim durante o preparo deste projeto.

Por fim, agradeço a Souza Cruz pela oportunidade de me desenvolver como pessoa e como profissional.

## RESUMO

Esta proposta surgiu devido a uma demanda interna da empresa de descontinuar o uso de ácidos e solventes clorados. Como a análise de carbonilados voláteis utilizava o ácido perclórico como catalisador foi solicitada a substituição do reagente por outro ácido disponível que representasse menor periculosidade. Foi avaliado qual ácido presente no laboratório poderia vir a substituir o ácido clorado. O ácido fosfórico foi o ácido escolhido, por ser utilizado no laboratório para outra análise e apresentar uma toxicidade menor e periculosidade reduzida. Uma vez definido o catalisador substituto, partiu-se para a etapa de avaliação dos resultados obtidos.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação do método utilizado na rotina e apresentação de propostas de melhorias, além da realização de uma validação parcial do novo método, garantindo a qualidade do novo método igual ou superior ao anterior. Para estas avaliações utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi determinada a melhor razão amostra e derivatizante, melhor temperatura de reação, tempo de reação, além da eliminação do processo de agitação, utilizado anteriormente.

Através dos resultados obtidos, o ácido fosfórico foi implementado como catalisador na rotina analítica, substituindo o ácido perclórico. Unificou-se as soluções utilizadas, reduziu-se o volume de solvente utilizado, além da redução da toxicidade de análise, com manutenção do preço da análise

Desta forma, foi atendida a solicitação de descontinuação de ácidos clorados na rotina analítica, com a manutenção dos resultados obtidos com o método anterior.

**Palavras-chave:** Bebidas Alcoólicas. DNPH. Carbonilados. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Estrutura molecular simplificada de aldeídos e cetonas, respectivamente.....	16
Figura 2 - Estruturas Híbridas do grupo carbonila.....	16
Figura 3 - Fórmula estrutural do formaldeído.....	17
Figura 4 - Fórmula estrutural do acetaldeído.....	18
Figura 5 - Fórmula estrutural da acetona.....	19
Figura 6 - Fórmula estrutural 2-butanona.....	20
Figura 7 - Esquema de um CLAE-UV .....	23
Figura 8 - Reação de formação das hidrazonas.....	24
Figura 9 - Fluxograma geral para análise de Compostos Carbonilados em Bebidas alcoólicas.....	28
Figura 10 - Demonstração gráfica da relação sinal x ruído no LD.....	31
Figura 11- Demonstração gráfica da relação sinal x ruído no LQ.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Programa de eluição utilizado. ....	30
Tabela 2 - Resultados obtidos com a solução 2,4-DNPH acidificada com ácido fosfórico.....	34
Tabela 3 - Resultados obtidos com a solução 2,4-DNPH e solução de ácido perclórico.....	35
Tabela 4- Planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> com ponto central. ....	35
Tabela 5 - Áreas dos analitos estudados obtidas pelo teste das variáveis, utilizando ácido fosfórico como catalisador. ....	36
Tabela 6 - Áreas dos analitos estudados obtidas pelo teste das variáveis, utilizando ácido perclórico como catalisador. ....	37
Tabela 7- Equação da reta e coeficiente de determinação para cada um dos analitos estudados. ....	38
Tabela 8 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cachaça 1. ....	39
Tabela 9 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cachaça 2. ....	39
Tabela 10 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cachaça Artesanal. ....	40
Tabela 11 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cerveja 1. ....	40
Tabela 12 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cerveja 2. ....	41
Tabela 13 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cerveja Artesanal. ....	41
Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação dos analitos. ....	42
Tabela 15 - Recuperações obtidas para cada analito. ....	43
Tabela 16 - Concentrações obtidas nas análises com e sem adição de padrão. ....	44
Tabela 17- Concentração dos padrões utilizados em cada nível de fortificação. ....	45
Tabela 18 - Custos de cada recurso que foi utilizado para o cálculo de custo da análise de compostos carbonilados. ....	46

Tabela 19 - Comparativo de custos entre a situação atual e a proposta tecnológica.....	47
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	12
<b>2 HISTÓRICO</b> .....	14
2.1 BEBIDAS ALCOÓLICAS .....	14
2.1.1 Cerveja .....	14
2.1.2 Cachaça.....	15
2.2 COMPOSTOS CARBONILADOS.....	15
2.2.1 Formaldeído.....	17
2.2.2 Acetaldeído .....	18
2.2.3 Acetona .....	19
2.2.4 2-Butanona.....	19
2.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISE .....	20
2.3.1 Cromatografia de eluição como técnica analítica .....	21
2.3.2 Análise Quantitativa .....	21
2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	22
2.3.4 Componentes básicos de um sistema de cromatografia de alta eficiência.....	22
<b>3 SITUAÇÃO ATUAL</b> .....	24
3.1 DETERMINAÇÃO DE CARBONILADOS VOLÁTEIS EM BEBIDAS ALCOÓLICAS .....	24
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	26
4.1 OBJETIVO GERAL .....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>5 PROPOSTA TECNOLÓGICA</b> .....	27
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	28
6.1 METODOLOGIA ANALÍTICA .....	28

6.2 SOLUÇÕES E REAGENTES .....	29
<b>6.2.1 Solução de DNPH e ácido perclórico</b> .....	29
<b>6.2.2 Solução de DNPH com ácido fosfórico</b> .....	29
<b>6.2.3 Preparação da fase móvel</b> .....	29
6.3 INSTRUMENTAÇÃO.....	30
6.4 VALIDAÇÃO PARCIAL.....	30
<b>6.4.1 Linearidade</b> .....	30
<b>6.4.2 Limite de detecção (LD)</b> .....	31
<b>6.4.3 Limite de quantificação (LQ)</b> .....	31
<b>6.4.4 Recuperação</b> .....	32
<b>6.4.5 Repetibilidade</b> .....	32
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	34
7.1 AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DO USO DE SHAKER NO PROCEDIMENTO .....	34
7.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>3</sup> COM PONTO CENTRAL .....	35
7.3 LINEARIDADE .....	37
7.4 REPETIBILIDADE.....	38
7.5 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	42
7.6 RECUPERAÇÃO.....	43
<b>8 ANÁLISE DE CUSTOS</b> .....	46
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>10 BIBLIOGRAFIA</b> .....	49

## 1 APRESENTAÇÃO

Os compostos carbonilados encontram-se bastante difundidos na natureza e podem entrar no organismo humano através da respiração, por absorção cutânea ou pela ingestão de alimentos e bebidas.

Como esses compostos apresentam propriedades patogênicas aos seres vivos, com sintomas que variam desde irritação dos olhos, pele e trato respiratório, até características fitotóxicas, teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas, grande atenção tem sido dedicada ao estudo e quantificação dos mesmos. Essas propriedades são mais acentuadas nos compostos carbonilados com menor massa molar que possuem insaturação e substituintes halogenados.

A ingestão de bebidas alcoólicas contendo aldeídos e cetonas provoca sintomas como dores de cabeça, náusea, vômito, inquietação, suor, confusão e queda na pressão. Além do efeito à saúde, os compostos carbonilados afetam as características sensoriais das bebidas. A presença de altos valores de concentração destes produtos pode ser um indicador de deterioração ou indicador de contaminação paralela durante a fermentação ou por embalagens, ou ainda por processo inadequado de engarrafamento.

Apesar de todos esses aspectos negativos, é importante salientar que, em estudos direcionados à caracterização de alimentos e bebidas, é possível observar que alguns aldeídos e cetonas aparecem entre os componentes responsáveis pela qualidade sensorial do produto.

Diversas técnicas e ensaios, atualmente, são utilizados para quantificar estes compostos em bebidas alcoólicas. Porém a cromatografia líquida é a técnica mais utilizada, devido a sua alta reprodutibilidade e sensibilidade.

Por outro lado, as empresas buscam sempre processos que sejam mais produtivos e que atenuem o uso de recursos, além de minimizar o impacto na saúde dos funcionários e no meio ambiente.

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo propor alternativas para melhorar o processo analítico de quantificação de compostos carbonilados através da avaliação da mudança de catalisador e do tempo de derivatização.

Através destas propostas, objetiva-se diminuir o tempo total do procedimento analítico, bem como complexidade das soluções envolvidas, minimizando o risco envolvido no procedimento a fim de atender a solicitação da empresa de descontinuar o uso de ácidos clorados nas análises de rotina.

## 2 HISTÓRICO

### 2.1 BEBIDAS ALCOÓLICAS

As bebidas alcoólicas têm sido estudadas principalmente devido ao impacto social causado pelo consumo excessivo, embora vários produtos secundários presentes possam contribuir também para agravar a saúde pública devido a sua toxicidade (PENTEADO, 2006).

As bebidas alcoólicas são geralmente classificadas em dois grandes grupos: fermentadas e destiladas. As primeiras obtidas por processos de fermentação, e as últimas, como diz o próprio nome, aquelas em que o mosto fermentado sofre algum processo de destilação.

Nossa legislação faz uma classificação mista: fermentadas, por misturas e fermento-destiladas, sendo estas últimas ainda subdivididas em destiladas e destilo-retificadas.

Os exemplos mencionados em cada caso são os seguintes:

- Fermentadas: cerveja, vinho, vinhos de frutas e outros fermentados;
- Por mistura: licor, amargo e aperitivo, aguardente composta e bebidas mistas;
- Destiladas: aguardente de cana ou caninha, aguardente de melão ou cachaça, rum, uísque, conhaque, graspa, aguardente de frutas, tequila e tiquira; destilo-retificadas: vodca, genebra, gim, steinhager, aquavit e corn. (SOUZA, H.R., 2004).

#### 2.1.1 Cerveja

A cerveja é a bebida fermentada mais consumida no Brasil e segundo Mattanna (2010), pode ser considerada uma solução água-etanol com centenas de diferentes moléculas dissolvidas, originadas do processamento das matérias primas.

A cerveja é a bebida obtida através da fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, geralmente malte de cevada, sendo facultativa a adição de outra matéria-prima fonte de carboidratos, como milho, arroz ou trigo e possui

em geral teor alcoólico entre 3% e 8%, segundo Siqueira, Bolini e Macedo (2008, p. 491).

Segundo especialistas neste mercado, a variação de consumo deste produto no país tem sido influenciados pela estabilidade econômica do mesmo. O aumento da renda está diretamente relacionado com o aumento do consumo de cerveja (HANSEN, 2011).

### **2.1.2 Cachaça**

A cachaça é a bebida destilada mais consumida no Brasil. Sua origem se deu durante a produção do açúcar nos canaviais, caracterizando o nosso país como o seu descobridor. Seu consumo abrange hoje todas as classes sociais por ter vencido as barreiras do preconceito diante da bebida que surgiu nas senzalas (ARAÚJO, 2010).

As bebidas destiladas, por conterem mais etanol na sua composição, sofrem um processo fermentativo mais intenso e conseqüentemente geram mais produtos secundários que dificultam sua separação no processo de destilação. Inúmeros compostos orgânicos podem ser produzidos e são ingeridos diretamente pelo consumidor (PENTEADO, 2006).

## **2.2 COMPOSTOS CARBONILADOS**

Com o objetivo de se conhecer os principais equilíbrios em que os aldeídos e cetonas estudados estarão envolvidos será necessário neste ponto uma breve abordagem sobre a reatividade dos compostos carbonilados.

Os compostos carbonílicos são caracterizados por possuírem na sua estrutura um grupo carbonila. Estes compostos dividem-se em aldeídos e em cetonas cuja diferença reside no fato de que nos aldeídos existe pelo menos um átomo de hidrogênio ligado ao átomo do carbono do grupo carbonila, ao passo que, nas cetonas não existe nenhum átomo de hidrogênio ligado a esse átomo de carbono.

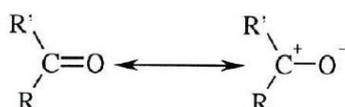
Figura 1– Estrutura molecular simplificada de aldeídos e cetonas, respectivamente.



Fonte: SANTOS, 2002.

A reatividade dos compostos carbonílicos envolve o seu grupo funcional, cuja estrutura geral pode ser representada através de duas estruturas híbridas:

Figura 2 - Estruturas Híbridas do grupo carbonila.



Fonte: SANTOS, 2002.

Existe inerente a este grupo um dipolo elétrico que se estabelece entre o átomo de oxigênio e o átomo de carbono. Este dipolo resulta da maior eletronegatividade do átomo de oxigênio relativamente ao átomo de carbono, o que implica a existência de uma maior densidade de carga negativa em torno do átomo de oxigênio.

Um maior ou menor deslocamento de carga entre estes dois átomos depende das características dos grupos R e R' que se encontram ligados ao átomo de carbono. Grupos que possam doar densidade eletrônica ao carbono atenuam o momento de dipolo que existe entre o carbono e o oxigênio; Pelo contrário, grupos R e R' receptores de densidade eletrônica, tais como, grupos possuidores de átomos muito eletronegativos, acentuam o dipolo que existe no grupo carbonila. A intensidade do dipolo também é dependente das condições de meio, em particular do pH. Em meio ácido, facilita-se a protonação do átomo de oxigênio do grupo carbonila, o que por sua vez, provoca uma maior deslocalização da densidade eletrônica responsável pela ligação do grupo carbonila (SANTOS, 2002).

Os compostos carbonílicos podem ser emitidos para a atmosfera por uma grande variedade de fontes naturais e antropogênicas(SODRÉ,2006),

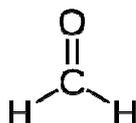
além de serem obtidas através da fotólise e fotooxidação de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos (ANDRADE, M. V. A. S. et al., 2002, p. 1117).

### 2.2.1 Formaldeído

O formaldeído é o principal poluente da classe das carbonilas. É um composto volátil a temperatura ambiente, inflamável, incolor, reativo e de forte odor (SODRÉ, 2006). O formaldeído está presente no ambiente externo devido à fotoxidação de metano e outros compostos orgânicos como o produto do metabolismo de plantas, que ocorrem naturalmente.

Segundo Sodré (2006), a meia vida do formaldeído na atmosfera varia de 3,8 a 8,6 horas e a concentração varia entre 2 a 39 ppb.

Figura 3 - Fórmula estrutural do formaldeído.



Fonte: CETESB.

É o aldeído mais simples, mas provavelmente o mais estudado devido à sua freqüente incidência na atmosfera e hidrosfera, provocando irritação nos olhos e no trato respiratório, náuseas, dor de cabeça, cansaço e sede (AZEVEDO, 2007).

O odor do formaldeído pode ser percebido em concentrações de aproximadamente  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ ; acima disso torna-se irritante ao trato respiratório e em concentrações maiores que  $30,00 \text{ mg L}^{-1}$  pode provocar pneumonia, bronquite ou resultar em morte quando esta concentração exceder  $100,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Por isso é importante conhecer as concentrações desse aldeído no ar, na água e nos alimentos para minimizar os danos à saúde (AZEVEDO, L.C. et al. 2007, p. 1968).

As fontes antropogênicas de formaldeído que contribuem para o aumento dos níveis são a exaustão automotiva, processos de combustão e atividades industriais como a produção de resinas.

Anualmente são produzidos em torno de 21 milhões de toneladas de formaldeído, conforme a *International Agency for Research on Cancer*

(IARC,2004). Muitos desses compostos são utilizados na fabricação de móveis e utensílios e podem liberar formaldeído em pequenas quantidades durante anos em ambientes confinados.

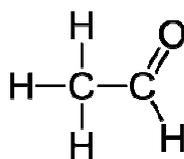
Segundo ANDRADE e BRAVO (1989, p.186) o formaldeído mostrou evidências suficientes de ser uma substância carcinogênica, e hoje ocupa posição no “Grupo 1” na escala de carcinogenicidade do IARC.

Um número de estudos tem encontrado associação entre exposição ao formaldeído e câncer em outros locais, incluindo a cavidade oral e hipofaringe, pâncreas, laringe, fígado e cérebro, além de evidências da relação deste analito com leucemia. Estudos com animais nos quais o formaldeído foi administrado em ratos por inalação apresentaram evidências de carcinogenicidade (Instituto Nacional do Câncer).

### 2.2.2 Acetaldeído

O acetaldeído é um composto orgânico volátil e é um dos carbonilados mais encontradas na atmosfera depois do formaldeído. Segundo o manual de produtos químicos perigosos da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), o acetaldeído é um líquido sem coloração, de odor frutífero, distinto e forte, produz vapores irritantes e infamáveis e também considerado como substância perigosa classe 3.

Figura 4 - Fórmula estrutural do acetaldeído.



Fonte: CETESB.

É irritante para os olhos, nariz e garganta. Se inalado causará náusea, vômito, dor de cabeça, dificuldade respiratória ou perda de consciência. Pode causar queimadura nos olhos e na pele.

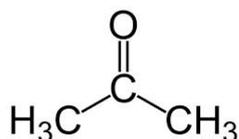
O acetaldeído ocorre naturalmente como produto intermediário do metabolismo de plantas superiores e do ser humano (quebra do etanol). Pode ser formado em vinhos e outras bebidas alcoólicas após exposição ao ar (SOUZA, L.M et al., 2009, p. 2308). Segundo a CETESB, o acetaldeído é um produto da combustão incompleta da madeira (lareiras e fogões), queima de

cigarro, torrefação de café, exaustão veicular. As fontes naturais incluem incêndios florestais, vulcões e resíduos de animais e de insetos. Apresenta aromas acres e pungentes em altas concentrações (MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. ; MARIA, C.A.B., 2000, p. 197).

### 2.2.3 Acetona

A acetona é um composto carbonilado da família das cetonas, sendo um líquido aquoso, incolor, possui odor agradável e produz vapores irritantes. É irritante para os olhos, nariz e garganta, se inalado pode causar dificuldade respiratória ou perda de consciência (SODRÉ, 2006).

Figura 5 - Fórmula estrutural da acetona.



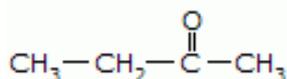
Fonte: CETESB.

A exposição humana a acetona pode ocorrer por via dérmica, inalatória e oral. Em contato com a pele, ocorre a extração de gorduras, causando dermatites e pequenas lesões. A inalação pode causar irritação nos olhos, nariz e garganta. Já a ingestão pode produzir perda de consciência. A presença de pequenas quantidades do composto no organismo não é prejudicial, o fígado é capaz de biotransformar a acetona em outras substâncias menos tóxicas. Estudos apontam danos nos rins, fígado e nervos de animais expostos por um longo período (CETESB).

### 2.2.4 2-Butanona

A 2-butanona é uma cetona, também conhecida como Metil Etil Cetona (MEC). É um líquido muito inflamável com odor característico. Sua inalação pode causar tosse, vertigens, tonturas, dores de cabeça, náuseas vomito, enjôo, câimbras abdominais e perda da consciência (CETESB).

Figura 6 - Fórmula estrutural 2-butanona.



Fonte: CETESB.

É encontrado na natureza devido a produção por algumas árvores e presente em pequenas quantidades em frutos e vegetais. Aproximadamente metade de sua produção é utilizada como solvente, tintas e outros revestimentos. Também é utilizada como desnaturante do álcool etílico, para evitar seu uso em culturas alimentícias.

Dissolve muitas substâncias e é usada como solvente em processos envolvendo gomas naturais, resinas, revestimentos de acetato de celulose e nitrocelulose e em filmes de vinil. No meio ambiente, se encontra como produto derivado da combustão dos motores de veículos.

### 2.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISE

Em 1964, o químico Calvin Gidding resumiu as condições necessárias para conferir a cromatografia líquida o mesmo poder resolutivo que se obtinha por cromatografia gasosa. Era necessário o desenvolvimento de bombas de fluxo, capazes de gerar uma alta pressão no sistema, além de desenvolver detectores em fluxo. Primeiramente eram utilizadas somente as fases estacionárias utilizando sólidos adsorventes, já que líquidos suspensos sobre um sólido eram impraticáveis em cromatógrafos que utilizavam bombas de fluxo. A partir deste momento passou-se a utilizar fases ligadas, onde a fase estacionária é ligada quimicamente ao sólido de suporte (SANTOS, 2002).

A concepção de fases ligadas permitiu o uso de bombas de fluxo e faz com que a cromatografia líquida de alta eficiência seja, atualmente, a técnica de separação mais versátil que existe (COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S., 2006, p. 283).

### **2.3.1 Cromatografia de eluição como técnica analítica**

Na cromatografia de eluição, os componentes de uma amostra são deslocados ao longo da fase estacionária movidos pela fase móvel (SANTOS,2002). Normalmente, a fase estacionária está disposta numa coluna de vidro recheada, onde um pequeno volume de amostra é inserido no topo e em seguida um solvente, a fase móvel (ou eluente) que é continuamente adicionada ao topo dessa coluna, desloca os componentes da amostra pela fase estacionária, por ação da gravidade, em um processo que habitualmente se denomina de eluição(SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W., 2010. p. 2).

A separação dos componentes da amostra resulta das diferentes velocidades de deslocamento de cada componente ao longo da fase estacionária, devido às interações mais ou menos fortes que estabelecem com as diferentes fases.

Se for colocado no fim da coluna um detector que responda à concentração dos componentes e se representar-se o sinal do detector em função do tempo obtém-se uma série de sinais ou picos simétricos, respectivos a cada componente. A representação destes sinais ao longo do tempo denomina-se de cromatograma. O sinal cromatográfico pode ser usado para identificação qualitativa e para determinação quantitativa das espécies separadas.

### **2.3.2 Análise Quantitativa**

A análise quantitativa em cromatografia é feita por comparação entre a altura ou área do sinal do composto a estudar com respectivamente a altura ou área do sinal obtido a partir de padrões de concentração conhecida do mesmo composto.

A quantificação através da medição da altura dos picos cromatográficos exige um controle rígido sobre as condições experimentais usadas durante a análise, tais como, a temperatura da coluna, o fluxo da fase móvel ou a composição da fase móvel. Todas estas condições experimentais afetam o tempo de retenção do composto, e como tal, a sua variação pode alterar a

altura do sinal. A medição da altura do pico apresenta a vantagem de ser muito precisa para picos estreitos.

### **2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) envolve uma fase móvel líquida e uma fase estacionária constituída por partículas finamente divididas. Estas partículas possuem um diâmetro interno compreendido habitualmente entre 5 e 10 $\mu$ m. A fase estacionária é concebida empacotando estas partículas numa coluna. Deste modo, consegue-se um aumento da área de contacto entre a fase estacionária e a amostra, o que permite obter uma maior eficiência de separação.

Como esta coluna é muito compactada, a utilização de bombas de fluxo se torna inevitável, e com a passagem do solvente por essa coluna extremamente empacotada, são obtidas altíssimas pressões. Assim, consegue-se aliar fluxos razoáveis da fase móvel ao elevado poder de separação associado à fase estacionária.

A CLAE é atualmente o método analítico de separação muito usado. Dependendo do tipo da fase estacionária que se utiliza, esta técnica encontra aplicações para a generalidade das amostras, desde amostras polares a amostras apolares, com elevado peso molecular ou não.

### **2.3.4 Componentes básicos de um sistema de cromatografia de alta eficiência**

Um sistema de CLAE inclui os seguintes componentes básicos (HOLLER, R.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R., 2007, p. 831 - 845):

**Bomba de fluxo:** responsável por impulsionar a fase móvel, com uma velocidade constante, gerando uma elevada pressão no sistema cromatográfico.

**Injetor:** módulo responsável pela introdução da amostra que permite introduzir com precisão a alíquota de amostra na coluna.

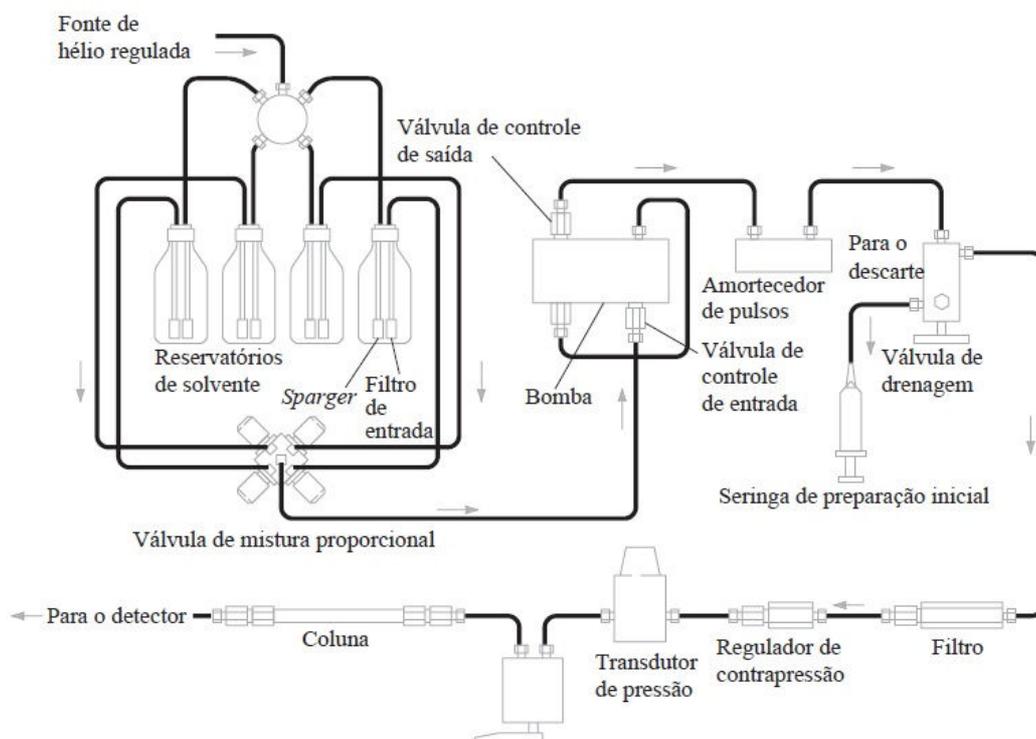
**Coluna cromatográfica:** onde ocorre a separação dos componentes da amostra. Pode existir uma coluna de guarda antes da coluna cromatográfica,

esta aumenta a vida útil da coluna, removendo os contaminantes e materiais particulados existentes na amostra. Também pode existir uma manga termostaticada, cuja função é melhorar a eficiência da coluna por ajuste de temperatura.

**Detector:** Os detectores da cromatografia líquida são geralmente instrumentos analíticos adaptados por células em fluxo para medir baixas concentrações de solutos.

**Integrador/computador:** este módulo registra e integra a resposta proveniente do detector.

Figura 7 - Esquema de um CLAE-UV



Fonte: HOLLER; SKOOG; CROUCH; (2007)

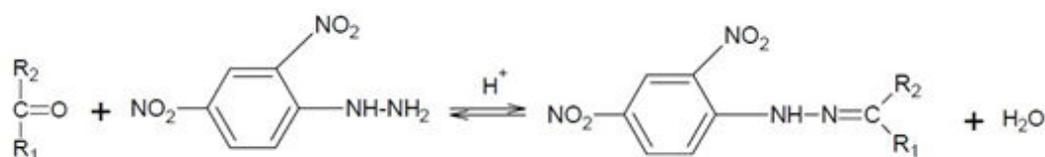
### 3 SITUAÇÃO ATUAL

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DE CARBONILADOS VOLÁTEIS EM BEBIDAS ALCOÓLICAS

A determinação de compostos voláteis em bebidas alcoólicas ocorre através da reação de derivatização dos aldeídos e cetonas presentes nas bebidas alcoólicas com uma solução ácida de 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH).

O processo de derivatização é feito pela adição de uma alíquota da bebida a ser testada a uma solução contendo DNPH acidificada com ácido perclórico. A reação de formação das hidrazonas está representada na figura 7. Esta reação ocorre em meio ácido com liberação de água.

Figura 8 - Reação de formação das hidrazonas.



Fonte: Sampaio, 2006.

O DNPH é uma das melhores alternativas para determinação de aldeídos e cetonas tanto em amostras líquidas como gasosas. O principal motivo para sua ampla utilização como agente derivatizante é que a sua reação com os compostos carbonilados é altamente específica, favorecendo um tratamento de amostra mais rápido e minimizando os efeitos de matriz. Além disso, a reação é seletiva e ocorre facilmente a temperatura ambiente.

Segundo Sampaio (2006), a formação das hidrazonas deve ocorrer em meio ácido, pois a catálise ácida ativa o carbono carbonílico por meio da protonação do oxigênio, tornando-o muito mais eletrofílico e passível de ser atacado por um nucleófilo fraco como a 2,4 DNPH.

A partir de uma pesquisa bibliográfica foi possível constatar que muitas pesquisas utilizam métodos colorimétricos ou métodos iodométricos para determinação de aldeídos em bebidas alcoólicas. Mas, segundo Nascimento et al. (1998, p. 351), as metodologias supracitadas não são capazes de fornecer

resultados confiáveis em amostras coloridas e não permitem a especificação dos analitos, apenas quantificam o teor total de aldeídos em função de acetaldeído.

Já os métodos cromatográficos permitem identificar e quantificar cada um dos aldeídos presentes. A metodologia proposta utilizando a técnica de cromatografia líquida com detecção por UV é simples, rápida e apresenta maior sensibilidade que os métodos oficiais sendo aplicável também a amostras que apresentam coloração.

O procedimento analítico atualmente utilizado na rotina do laboratório, parte de uma alíquota de 2mL da amostra a qual se adiciona 8 mL de solução 0,25% de DNPH em acetonitrila e 2 mL de solução 5% de ácido perclórico. O sistema é agitado em agitador por 5 minutos. Após, o extrato é filtrado por uma membrana de 0,45 $\mu$ m para um frasco de 2mL e analisado por HPLC. Esta metodologia é recomendada pelo laboratório da empresa onde o estudo foi realizado.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho da metodologia de análise de compostos carbonilados em bebidas alcoólicas, substituindo o ácido catalisador convencionalmente utilizado e avaliar o desempenho do método proposto por meio de uma validação parcial.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Substituir, o ácido perclórico, pelo ácido fosfórico como catalisador da reação;
- Avaliar a necessidade da etapa de agitação em shaker;
- Determinar o tempo necessário para realizar a reação de derivatização;
- Determinar a razão ideal de solução e amostra a ser utilizada nas análises;
- Determinar a melhor temperatura da análise;
- Comparar os custos entre o sistema atualmente utilizado e o proposto.

## 5 PROPOSTA TECNOLÓGICA

Através da revisão constante das metodologias de rotina de laboratórios, bem como da constante atualização bibliográfica, é possível sempre melhorar os métodos existentes a partir de sistemas novos disponibilizados pelo mercado ou pela substituição de etapas tidas como estabelecidas.

A partir desta perspectiva, as empresas têm trabalhado em suas rotinas de laboratório, o aprimoramento das metodologias utilizadas, a partir da substituição de solventes nocivos por outros menos agressivos ao meio-ambiente. Uma das metodologias que tem sido objetivo deste tipo de avaliação é a análise de compostos carbonilados voláteis.

Dentro do mesmo escopo, vislumbrou-se a possibilidade de realizar estudo sistemático com relação ao método em questão, a fim de verificar os atuais parâmetros empregados (p. ex.: pH, tempo de reação, temperatura, etc), bem como a alteração do catalisador.

A partir destas discussões, esta proposta tecnológica, propõe avaliar a viabilidade da substituição do catalisador ácido perclórico por ácido fosfórico, para a determinação de compostos carbonilados em bebidas alcoólicas.

A partir da possibilidade de troca do catalisador, o procedimento completo com a alteração proposta, será avaliado com relação ao seu desempenho analítico, bem como será realizado levantamento dos resíduos gerados e dos custos do novo sistema. Estes dados serão comparados com o atualmente empregado a fim de certificar sua viabilidade analítica, ambiental e econômica.

## 6 METODOLOGIA

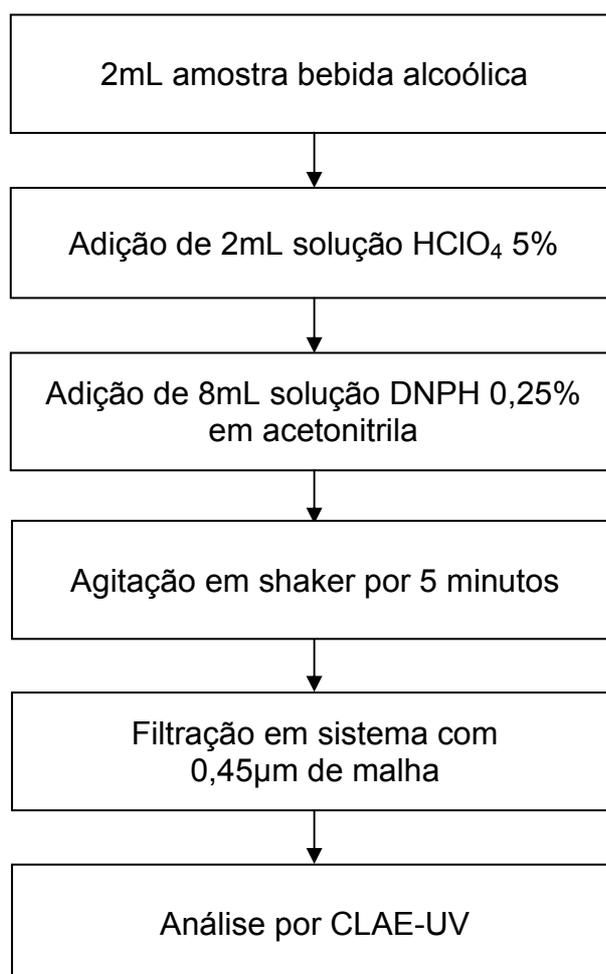
### 6.1 AMOSTRAS

Seis amostras de bebidas alcoólicas foram utilizadas, sendo três de cachaça e três de cerveja. Teve-se o cuidado de selecionar amostras cuja venda ocupasse destaque entre a sua classe e uma amostra de cachaça e cerveja artesanais.

### 6.1 METODOLOGIA ANALÍTICA

O esquema da Figura 9 representa o fluxograma do procedimento analítico prévio até o momento que a amostra será analisada por CLAE-UV.

Figura 9 - Fluxograma geral para análise de Compostos Carbonilados em Bebidas alcoólicas.



Fonte: Autoria própria.

Considerando as etapas do procedimento em avaliação, inicialmente verificou-se a necessidade da etapa de agitação. Após foram realizados experimentos estabelecidos a partir de planejamento experimental fatorial com ponto central a fim de estabelecer as melhores condições. Os parâmetros que foram considerados são: tempo da reação de derivatização, temperatura, razão entre o volume de amostra e derivatizante e análise de custos.

## 6.2 SOLUÇÕES E REAGENTES

### 6.2.1 Solução de DNPH e ácido perclórico

A solução de DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazina) foi preparada pela pesagem de 2,5 g do derivatizante e solubilização com adição acetonitrila grau HPLC até completar o volume a 1L, em balão volumétrico.

A solução de ácido perclórico foi preparada separadamente, com adição de 50 mL do ácido a um balão volumétrico de 1L que já continha uma alíquota de água Milli-Q e completando o volume após adição do ácido.

### 6.2.2 Solução de DNPH com ácido fosfórico

O preparo da solução foi realizado com a pesagem de 2,5 g de derivatizante 2,4Dinitrofenilhidrazina e solubilização do sólido com adição de 500 mL de acetonitrila grau HPLC, a esta solução é adicionada uma alíquota de 12 mL de ácido fosfórico 85%. Esta solução é avolumada com água Milli-Q até completar o volume de 1L, em balão volumétrico.

### 6.2.3 Preparação da fase móvel

São utilizadas duas fases móveis no método de análise por CLAE-UV. As análises foram realizadas no modo gradiente, constituído por diferentes proporções das fases móveis A e B.

**Fase Móvel A:** 200 mL Tetrahydrofurano (THF), 800 mL Acetonitrila(ACN) e 1000 mL de água Milli-Q.

**Fase Móvel B:** 800 mL de ACN e 1200 mL água Milli-Q.

### 6.3 INSTRUMENTAÇÃO

Para as análises instrumentais, foi utilizado um cromatógrafo líquido (CLAE), modelo 1200 da Agilent Technologies, equipado com uma coluna ZORBAX Eclipse ZBD-C18 (4,6 mm x 50 mm x 1,8 µm) para análise instrumental. Foi utilizado detector de UV no comprimento de onda 365 nm. Um gradiente da Fase Móvel A e B foi programado para a análise o qual esta descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Programa de eluição utilizado.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>Fase A (%)</b>	<b>Fase B (%)</b>
0	100	0
2	100	0
6	50	50
12	0	100
15	100	0

Fonte: Aatoria própria.

### 6.4 VALIDAÇÃO PARCIAL

Para avaliação das mudanças realizadas no método de análise foram realizados alguns testes de validação para garantir que o método modificado virá atender as premissas de qualidade analítica. Serão determinadas a linearidade da curva analítica, limites de detecção e quantificação, recuperação e a reprodutibilidade do método.

#### 6.4.1 Linearidade

Segundo FIGUEIREDO, 2012, a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa, e formulada como expressão matemática (equação da regressão linear) que vai

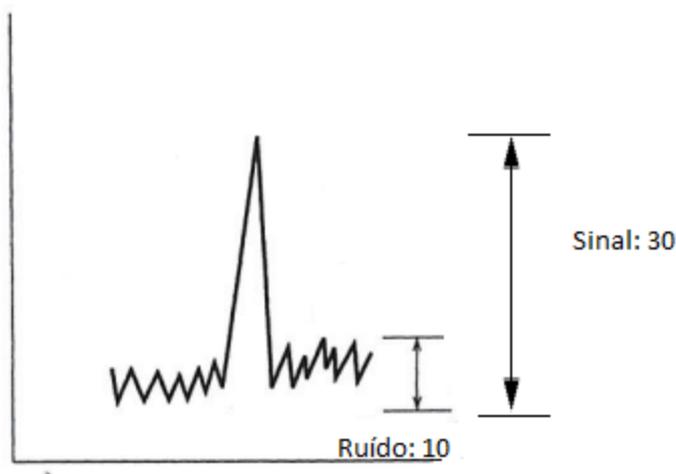
ser utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) será utilizado para traduzir a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais.

#### 6.4.2 Limite de detecção (LD)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de concentração do analito ou de uma propriedade, é importante saber qual o menor valor de concentração que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2007). Para isso será determinada a razão sinal/ruído de uma amostra já diluída, e deve ser determinada a concentração onde o sinal é igual a 3 vezes o ruído medido pelo equipamento.

Figura 10 - Demonstração gráfica da relação sinal x ruído no LD.



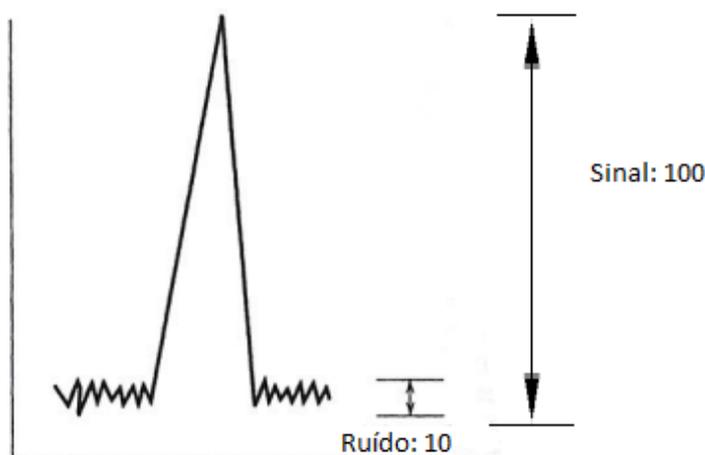
Fonte: SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH; 1997, p. 646. Modificado pela autora.

#### 6.4.3 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental, segundo RIBANI et al. (2004, p. 778).

Para isso será determinada a razão sinal/ruído de uma amostra já diluída, e deve ser determinada a concentração onde o sinal é igual a 10 vezes o ruído medido pelo equipamento.

**Figura 11-** Demonstração gráfica da relação sinal x ruído no LQ.



Fonte: SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH; 1997, p. 646. Modificado pela autora.

#### 6.4.4 Recuperação

O teste de recuperação pode ser estimado pela análise de amostras que foram fortificadas com alíquotas conhecidas do analito estudado. O estudo de recuperação consiste na adição de diferentes alíquotas analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (LAQUATEC,2011).

A quantidade percentual recuperada pelo processo pode ser calculada através da Equação 1:

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{Concentração obtida} - \text{Concentração sem adição padrão}}{\text{Concentração adicionada}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

#### 6.4.5 Repetibilidade

O termo repetibilidade, ou precisão intra-córidas, define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, por um mesmo analista e com

a mesma instrumentação e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), segundo RIBEIRO et al. (2008, p. 167).

Foi realizado por meio de análises da mesma amostra, durante dois dias, realizando-se três replicatas por dia, cada uma delas injetada em duplicata. O mesmo operador realizou o procedimento e as amostras foram injetadas no mesmo cromatógrafo.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 7.1 AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DO USO DE SHAKER NO PROCEDIMENTO

No método analítico anteriormente utilizado, a reação de derivatização era realizada com agitação do conjunto derivatizante/amostra por shaker a aproximadamente 200 rpm por 5 minutos para garantir a reação de derivatização.

A primeira etapa do trabalho foi a avaliação de real necessidade da agitação do conjunto por shaker. Para isto, uma alíquota de 2mL de amostra foi adicionado a 8 mL de solução de 2,4-DNPH 0,25% e 2 mL de solução de ácido perclórico 5% e foi testada com tempo ZERO, 5 minutos e 10 minutos. Também foi testada a condição com adição de 2mL de amostra a 10 mL de solução de 2,4-DNPH acidificada com ácido fosfórico com os mesmos tempos de agitação.

Foram tabeladas as áreas correspondentes a cada um dos testes realizados e os resultados estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultados obtidos com a solução 2,4-DNPH acidificada com ácido fosfórico

Ensaio	Tempo agitação (min.)	Área			
		Formaldeído	Acetaldeído	Acetona	MEC
Amostra Cachaça 1	ZERO	4,39	409,94	6,76	15,14
Amostra Cachaça 1	5	4,32	409,53	6,75	15,23
Amostra Cachaça 1	10	4,39	406,45	6,85	14,89
	Média	4,36	408,64	6,79	15,09
	Desvio	0,04	1,90	0,05	0,17
	Coefficiente de Variação (%)	0,91	0,46	0,81	1,19

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 - Resultados obtidos com a solução 2,4-DNPH e solução de ácido perclórico.

Ensaio	Tempo agitação (min.)	Área			
		Formaldeído	Acetaldeído	Acetona	MEC
Amostra Cachaça 1	ZERO	4,79	467,36	6,54	15,78
Amostra Cachaça 1	5	4,87	462,22	6,22	15,61
Amostra Cachaça 1	10	4,36	409,17	5,80	13,83
	Média	4,67	446,25	6,19	15,08
	Desvio	0,27	32,21	0,37	1,08
	Coefficiente de Variação (%)	5,87	7,22	5,94	7,15

Fonte: Autoria própria.

Foi observado através deste teste que a reação por agitação do shaker não é necessária já que não foi observada uma grande variação nos resultados obtidos com tempo de agitação e sem agitação, que justificasse a reação com agitação. A partir desta informação pode-se determinar as variáveis que seria utilizadas para realizar o planejamento fatorial com ponto central.

## 7.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^3$ COM PONTO CENTRAL

A definição dos experimentos para avaliar os parâmetros de quantidade de amostra, temperatura da reação de derivatização, tempo da reação e catalisador, foi estabelecida a partir de um Planejamento Fatorial completo  $2^3$  com ponto central. O conjunto de experimentos, para cada catalisador, que foram realizados está resumido na Tabela 4. Foi utilizada a amostra da Cachaça 1 para realização dos ensaios.

Tabela 4- Planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central.

Ensaio	Tempo reação (min)	Volume de amostra (mL)	Temperatura reação (°C)
1	5	2	25
2	20	2	25
3	5	4	25
4	20	4	25
5	5	2	45
6	20	2	45

Ensaio	Tempo reação (min)	Volume de amostra (mL)	Temperatura reação (°C)
7	5	4	45
8	20	4	45
9	12,5	3	35
10	12,5	3	35
11	12,5	3	35

Fonte: Autoria própria.

A partir da realização destes experimentos, os resultados obtidos, em termos de área de pico, são apresentados nas Tabelas 5 e 6:

Tabela 5 - Áreas dos analitos estudados obtidas pelo teste das variáveis, utilizando ácido fosfórico como catalisador.

Ensaio	Área			
	Formaldeído	Acetaldeído	Acetona	MEC
1	4,150	391,505	5,475	14,263
2	4,245	402,398	5,612	14,514
3	5,331	696,859	8,993	24,282
4	5,440	686,253	8,786	23,711
5	4,227	402,193	5,596	14,388
6	4,193	404,562	5,683	14,523
7	5,302	692,417	8,834	23,708
8	5,504	696,491	8,937	23,927
9	4,875	552,060	7,486	19,490
10	5,236	574,083	7,648	20,086
11	4,950	555,100	7,406	19,473

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 - Áreas dos analitos estudados obtidas pelo teste das variáveis, utilizando ácido perclórico como catalisador.

Ensaio	Área			
	Formaldeído	Acetaldeído	Acetona	MEC
1	4,070	398,565	5,465	13,862
2	3,905	402,649	5,548	13,436
3	5,196	682,949	8,396	22,205
4	5,420	695,593	8,555	22,810
5	4,207	405,864	5,495	13,585
6	4,453	410,418	5,618	13,692
7	5,383	693,745	8,568	22,198
8	5,612	710,515	8,664	21,948
9	4,917	581,481	7,586	19,224
10	4,868	563,865	7,267	18,432
11	4,823	558,135	7,262	18,229

Fonte: Autoria própria.

O resultado destacado apresentou a melhor relação área x tempo x temperatura de reação, entre as propostas analisadas. A escolha da melhor condição de análise permitiu a continuidade das análises. O próximo passo é a validação parcial do método.

### 7.3 LINEARIDADE

A linearidade foi testada graficando as áreas obtidas pela análise de soluções padrão contendo concentrações conhecidas de cada um dos analitos. Através da plotagem realizada foi possível determinar a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ). As equações das retas e os coeficientes de determinação podem ser encontrados na Tabela 7. Os gráficos podem ser encontrados nos anexos.

Tabela 7- Equação da reta e coeficiente de determinação para cada um dos analitos estudados.

Analito	Equação da reta	Coefficiente de determinação ( $r^2$ )
Formaldeído	$y = 41,42x + 1,222$	0,999
Acetaldeído	$y = 32,42x - 4,038$	0,999
Acetona	$y = 24,57x + 0,219$	1,000
Metil Etil Cetona	$y = 18,37x - 0,268$	0,999

Fonte: Autoria própria.

A curva de calibração apresenta o valor de interseção, a equação de regressão linear e o coeficiente de determinação.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é representada pela equação 2:

$$y = ax + b \text{ (Eq. 2)}$$

Onde:

y: resposta medida (área do pico, absorvância lida, etc.)

x: concentração

a: coeficiente angular (sensibilidade, conhecido como *slope*)

b: interseção com o eixo y, quando  $x=0$ .

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito.

O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) é uma medida de ajuste de modelos estatísticos, em relação aos valores observados. O  $r^2$  varia entre 0 e 1, e indica em porcentagem o quanto o modelo consegue explicar os valores observados (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH; 1997, p. 644).

Avaliando os resultados obtidos para linearidade dos analitos estudados, o menor coeficiente de determinação obtido foi  $r^2 = 0,999$ . O que significa que 99,9% da variável dependente é explicada pelo modelo utilizado.

#### 7.4 REPETIBILIDADE

Para avaliara repetibilidade do método, foram realizadas três replicatas por dia, e cada amostra foi injetada duas vezes, para testar a variação que o método apresentaria.

Tabela 8 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cachaça 1.

<b>Amostra</b>	<b>Formaldeído</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Acetona</b>	<b>MEC</b>
Cachaça 1	0,45	83,44	1,18	5,16
Cachaça 1	0,41	73,77	1,02	4,55
Cachaça 1	0,42	75,01	1,05	4,66
Cachaça 1	0,42	74,18	1,02	4,60
Cachaça 1	0,42	74,73	1,04	4,65
Cachaça 1	0,41	74,35	1,01	4,52
Cachaça 1	0,38	74,71	1,06	4,50
Cachaça 1	0,37	73,87	1,05	4,62
Cachaça 1	0,38	75,37	1,06	4,72
Cachaça 1	0,37	75,27	1,07	4,73
Cachaça 1	0,36	75,30	1,05	4,71
Cachaça 1	0,37	75,23	1,04	4,76
Média	<b>0,40</b>	<b>75,43</b>	<b>1,05</b>	<b>4,68</b>
Desvio Padrão	<b>0,03</b>	<b>2,58</b>	<b>0,04</b>	<b>0,17</b>
CV %	<b>7,27</b>	<b>3,42</b>	<b>4,01</b>	<b>3,70</b>

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cachaça 2.

<b>Amostra</b>	<b>Formaldeído</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Acetona</b>	<b>MEC</b>
Cachaça 2	0,30	48,56	1,27	<LQ
Cachaça 2	0,31	48,41	1,26	<LQ
Cachaça 2	0,31	48,77	1,23	<LQ
Cachaça 2	0,31	48,74	1,27	<LQ
Cachaça 2	0,31	48,79	1,26	<LQ
Cachaça 2	0,30	48,85	1,27	<LQ
Cachaça 2	<LQ	48,61	1,22	<LQ
Cachaça 2	<LQ	48,63	1,21	<LQ
Cachaça 2	0,28	49,52	1,27	<LQ
Cachaça 2	0,27	49,21	1,26	<LQ
Cachaça 2	<LQ	49,12	1,25	<LQ
Cachaça 2	<LQ	49,05	1,25	<LQ
Média	<b>0,28</b>	<b>48,86</b>	<b>1,25</b>	<LQ
Desvio Padrão	<b>0,03</b>	<b>0,32</b>	<b>0,02</b>	<b>NA</b>
CV %	<b>9,00</b>	<b>0,65</b>	<b>1,62</b>	<b>NA</b>

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cachaça Artesanal.

<b>Amostra</b>	<b>Formaldeído</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Acetona</b>	<b>MEC</b>
Cachaça Artesanal	<LQ	36,19	8,18	2,90
Cachaça Artesanal	<LQ	35,76	8,16	2,83
Cachaça Artesanal	<LQ	35,56	8,07	2,93
Cachaça Artesanal	<LQ	35,56	7,98	2,93
Cachaça Artesanal	<LQ	35,53	8,10	2,93
Cachaça Artesanal	<LQ	35,31	8,00	2,84
Cachaça Artesanal	<LQ	35,91	8,23	2,88
Cachaça Artesanal	<LQ	35,86	8,26	2,89
Cachaça Artesanal	<LQ	35,69	8,15	2,98
Cachaça Artesanal	<LQ	35,66	8,10	2,95
Cachaça Artesanal	<LQ	35,87	8,20	2,95
Cachaça Artesanal	<LQ	35,71	8,14	2,79
Média	<LQ	<b>35,72</b>	<b>8,13</b>	<b>2,90</b>
Desvio Padrão	<b>NA</b>	<b>0,23</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>
CV %	<b>NA</b>	<b>0,63</b>	<b>1,06</b>	<b>1,98</b>

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cerveja 1.

<b>Amostra</b>	<b>Formaldeído</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Acetona</b>	<b>MEC</b>
Cerveja 1	0,86	11,08	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,84	10,93	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,69	9,76	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,67	9,96	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,70	10,53	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,70	10,19	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,70	9,09	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,70	9,31	<LD	<LQ
Cerveja 1	0,70	9,14	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,70	9,19	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,70	9,04	<LQ	<LQ
Cerveja 1	0,69	9,12	<LD	<LQ
Média	<b>0,72</b>	<b>9,78</b>	<LQ	<LQ
Desvio Padrão	<b>0,06</b>	<b>0,75</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>
CV %	<b>8,37</b>	<b>7,69</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cerveja 2.

<b>Amostra</b>	<b>Formaldeído</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Acetona</b>	<b>MEC</b>
Cerveja 2	0,59	11,38	<LQ	1,00
<b>Cerveja 2</b>	<b>0,57</b>	<b>11,35</b>	<b>&lt;LQ</b>	<b>0,99</b>
Cerveja 2	0,53	11,07	<LQ	0,97
Cerveja 2	0,53	11,07	<LQ	0,97
Cerveja 2	0,50	11,06	0,16	0,95
Cerveja 2	0,50	10,99	<LQ	1,00
Cerveja 2	0,49	10,86	<LQ	0,89
Cerveja 2	0,48	10,91	<LQ	0,98
Cerveja 2	0,44	11,51	<LQ	1,01
Cerveja 2	0,42	11,67	<LQ	1,06
Cerveja 2	0,43	11,58	<LQ	0,97
Cerveja 2	0,45	11,30	<LQ	0,98
Média	<b>0,49</b>	<b>11,23</b>	<b>&lt;LQ</b>	<b>0,98</b>
Desvio Padrão	<b>0,05</b>	<b>0,27</b>	<b>NA</b>	<b>0,04</b>
CV %	<b>10,88</b>	<b>2,42</b>	<b>NA</b>	<b>4,07</b>

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13 - Avaliação da repetibilidade do método na amostra de Cerveja Artesanal.

<b>Amostra</b>	<b>Formaldeído</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Acetona</b>	<b>MEC</b>
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,82	8,58	<LQ	<LQ
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,81	8,62	<LQ	0,81
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,67	9,48	0,18	0,90
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,64	9,31	0,17	0,94
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,79	8,62	0,16	0,84
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,82	8,52	0,16	0,81
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,79	9,43	<LQ	<LQ
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,76	9,28	<LQ	0,82
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,72	9,37	<LQ	1,00
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,75	9,64	<LQ	<LQ
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,74	9,62	<LQ	0,81
<b>Cerveja Artesanal</b>	0,73	9,52	0,18	0,88
<b>Média</b>	<b>0,75</b>	<b>9,17</b>	<b>0,15</b>	<b>0,84</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,06</b>	<b>0,44</b>	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>
<b>CV %</b>	<b>7,57</b>	<b>4,84</b>	<b>13,07</b>	<b>8,58</b>

Fonte: Autoria própria.

Através das análises de reprodutibilidade, pode-se observar a baixa variação dos resultados das amostras, os analitos cuja concentração está próxima aos limites, tanto de detecção, como de quantificação apresentaram

uma variação maior, o que já era esperado. Segundo registros do laboratório, verificou-se que o método utilizado anteriormente possuía um coeficiente de variação em torno de 20%, considerando os resultados obtidos na validação da proposta do projeto tecnológico, esta variação diminuiu, apresentando variação máxima de 11% para o método proposto.

## 7.5 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para avaliação dos limites de detecção e limite de quantificação uma amostra cuja concentração pode ser considerada baixa, é submetida a diferentes diluições para que os picos dos analitos se aproximem da linha de base. Uma vez encontrada a diluição adequada para cada um dos analitos é realizada a medida em centímetros da altura do pico do analito e a medida do ruído próximo ao pico do carbonilado. Quando estas medidas estão determinadas é realizado o cálculo de razão entre estas medidas, para que se possa determinar qual a concentração associada ao ruído. O limite de detecção (também conhecido com LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo equipamento, mas não necessariamente quantificada (SWARTZ; KRULL; 2012. p. 70).

Esse limite é determinado pela razão sinal/ruído x 3 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH; 1997, p. 646). Já o limite de quantificação (também conhecido como LQ) é a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e acuracidade aceitáveis. Esse limite é determinado pelo cálculo do sinal/ruído x 10.

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação dos analitos.

Analito	Limite de Detecção ( $\mu\text{g/mL}$ )	Limite de Quantificação ( $\mu\text{g/mL}$ )
Formaldeído	0,08	0,25
Acetaldeído	1,56	5,20
Acetona	0,05	0,15
MetilEtilCetona	0,24	0,80

Fonte: Aatoria própria.

## 7.6 RECUPERAÇÃO

O teste de recuperação foi realizado mediante adição de uma alíquota de concentração conhecida de cada um dos analitos em três diferentes níveis de concentração. Para a recuperação ser considerada adequada ela deve estar na faixa entre 80 e 120 %. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Recuperações obtidas para cada analito.

<b>Recuperação (%)</b>	<b>Formaldeído</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Acetona</b>	<b>MEC</b>
<b>1ª Fortificação</b>	113,42	95,94	116,01	85,63
<b>2ª Fortificação</b>	117,23	95,16	103,59	82,41
<b>3ª Fortificação</b>	112,61	94,24	83,38	81,01

Fonte: Autoria própria.

Tabela 16 - Concentrações obtidas nas análises com e sem adição de padrão.

		Amostra Cachaça 2							
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
<b>Concentração Formaldeído (µg/mL)</b>	<b>Sem adição de padrão</b>	0,30	0,31	0,31	0,31	0,31	0,30	0,25	0,25
	<b>1ª Fortificação</b>	1,48	1,49	1,48	1,48	1,31	1,30	1,30	1,48
	<b>2ª Fortificação</b>	8,90	9,61	9,85	9,83	9,48	9,41	9,45	8,70
	<b>3ª Fortificação</b>	23,34	23,13	23,46	23,31	28,34	28,17	28,15	28,15
<b>Concentração Acetaldeído (µg/mL)</b>	<b>Sem adição de padrão</b>	48,56	48,41	48,77	48,74	48,79	48,85	48,61	48,63
	<b>1ª Fortificação</b>	79,47	79,46	86,11	85,88	84,50	84,39	84,29	84,38
	<b>2ª Fortificação</b>	119,30	119,33	121,04	120,88	115,76	115,56	115,71	115,46
	<b>3ª Fortificação</b>	144,49	144,09	144,95	144,66	144,91	144,69	144,62	144,62
<b>Concentração Acetona (µg/mL)</b>	<b>Sem adição de padrão</b>	1,27	1,26	1,23	1,27	1,26	1,27	1,22	1,21
	<b>1ª Fortificação</b>	23,23	23,22	23,52	23,49	20,95	20,90	20,84	20,85
	<b>2ª Fortificação</b>	73,15	73,15	84,05	83,91	73,36	72,96	73,16	72,76
	<b>3ª Fortificação</b>	130,58	129,24	131,94	130,92	132,64	131,88	131,61	131,48
<b>Concentração MEC (µg/mL)</b>	<b>Sem adição de padrão</b>	0,52	0,55	0,46	0,50	0,45	0,46	0,54	0,63
	<b>1ª Fortificação</b>	2,62	2,63	2,74	2,71	2,56	2,57	2,53	2,54
	<b>2ª Fortificação</b>	8,09	8,06	8,17	8,10	7,24	7,17	7,13	8,18
	<b>3ª Fortificação</b>	17,19	17,38	17,36	17,23	17,20	17,44	17,39	17,38

Fonte: Autoria própria.

Tabela 17- Concentração dos padrões utilizados em cada nível de fortificação.

<b>Concentração dos padrões utilizados (ug/mL):</b>	<b>Quantidade Adicionada (ug/mL)</b>		
	<b>Nível1</b>	<b>Nível2</b>	<b>Nível3</b>
Formaldeído	<b>0,99</b>	<b>7,77</b>	<b>22,61</b>
Acetaldeído	<b>36,36</b>	<b>72,73</b>	<b>101,82</b>
Acetona	<b>17,99</b>	<b>71,98</b>	<b>155,96</b>
MEC	<b>2,45</b>	<b>8,80</b>	<b>20,75</b>

Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos pela recuperação foram excelentes. Atenderam o intervalo de recuperação mínimo e máximo esperado, com um baixo coeficiente de variação entre as replicatas. Foram utilizados padrões customizados, dos carbonilados já derivatizados em forma das hidrazonas de cada um dos analitos.

A validação apresentou resultados que puderam garantir a qualidade do método desenvolvido. Como não foi realizada validação do método utilizado anteriormente, não foi possível realizar comparativos, como diminuição dos limites de detecção e quantificação do método, melhor recuperação se comparado com o método anterior, etc. Só tem-se um critério do método antigo, o coeficiente de variação mínimo exigido para liberação dos resultados analíticos.

Tendo esta variável como comparação, podemos afirmar que o método sugerido tem qualidade superior, visto que os resultados obtidos pela validação tiveram uma variação menor em comparação com as variações obtidas pelas amostras analisadas pelo método com ácido perclórico.

## 8 ANÁLISE DE CUSTOS

Para efetuar a proposta tecnológica não foi necessário investimento inicial, já que o equipamento, operador e reagentes já eram utilizados para estes procedimentos ou para outra análise do laboratório.

Os seguintes custos estão envolvidos na análise otimizada, conforme Tabela 18.

Tabela 18 - Custos de cada recurso que foi utilizado para o cálculo de custo da análise de compostos carbonilados.

Custos dos recursos utilizados	
Operador	R\$ 14/hora
2,4- Dinitrofenilhidrazina	R\$5,00/g
Ácido Fosfórico	R\$ 130,00/L
Ácido Perclórico	R\$ 470,00/L
Acetonitrila	R\$ 48,00 /L
Água Milli-Q	R\$ 1,08/L
Tetrahidrofurano	R\$ 75,00/L
Seringas descartáveis	R\$0,50/unidade
Millex 0,45 µm	R\$ 3,00/unidade
Vial + cap	R\$ 1,1/unidade

Fonte: Autoria própria.

Para comparar os custos entre a situação atual e da proposta tecnológica, dividida entre a utilização de ácido perclórico como catalisador e a utilização de ácido fosfórico, utilizou-se a Tabela 19.

Nesta tabela estão apresentados apenas os tempos em que o operador estará envolvido com o processo. Por exemplo, na preparação dos reagentes e preparação da amostra. O tempo em que o equipamento está analisando não está sendo computado.

As etapas de preparação de soluções vão ter seus tempos reduzidos, uma vez que a solução proposta é composta de todos os reagentes e a atual é composta por duas preparações separadas.

Vale salientar que os custos com energia devido à utilização dos equipamentos não foram contemplados neste estudo devido ao valor muito baixo, não acarretando diferenças significativas nos resultados.

Tabela 19 - Comparativo de custos entre a situação atual e a proposta tecnológica.

<b>Comparativo de Custos entre a Situação Atual e a Proposta Tecnológica</b>		
<b>Custos envolvidos</b>	<b>Situação Atual</b>	<b>Proposta Tecnológica</b>
<b>Custo dos Reagentes e Consumíveis para análise de 100 replicatas (R\$)</b>		
DNPH	12,50	12,50
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,00	1,30
HClO <sub>4</sub>	2,35	0,00
ACN	134,40	110,40
Água Milli-Q	2,26	2,70
THF	15,00	15,00
Seringas descartáveis	50,00	50,00
Millex 0,45 um	300,00	300,00
Vial + cap	110,00	110,00
<b>Total Reagentes e consumíveis (R\$)</b>	<b>626,51</b>	<b>601,90</b>
<b>Tempo do Operador</b>		
<b>Atividade</b>	<b>Situação Atual</b>	<b>Proposta Tecnológica</b>
	<b>Tempo (min.)</b>	<b>Tempo (min.)</b>
Pesagem DNPH	5	5
Adição de ACN	5	3
Preparo solução HClO <sub>4</sub>	15	0
Adição alíquota de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0	2
Adição de água	0	5
Adição alíquota de sol DNPH	1	1
Adição alíquota de HClO <sub>4</sub>	1	0
Adição do volume de amostra	1	1
Agitação em shaker	5	0
Tempo reação	0	5
Filtração da amostra para vial	2	2
<b>Total tempo (min.)</b>	<b>35</b>	<b>24</b>
<b>Custo Operador (R\$)</b>	<b>8,20</b>	<b>5,60</b>
<b>Custo Total (R\$)</b>	<b>634,71</b>	<b>607,50</b>

Fonte: Autoria própria.

## 9 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que é possível realizar os ensaios de determinação de componentes carbonilados em bebidas alcoólicas com o catalisador proposto. A mudança no procedimento apresentou resultados muito semelhantes aos resultados obtidos no método anterior.

A eliminação do processo de agitação foi de grande importância devido a demanda de outras análises pelo equipamento utilizado para este fim (*shaker*), o estudo utilizando diferentes temperaturas de reação também facilitou a dinâmica da análise, não se fazendo necessário a utilização de banhos maria.

A mudança de catalisador, eliminando o uso do ácido perclórico atendeu a solicitação recebida pela empresa de descontinuação de todos os solventes e ácidos clorados utilizados nas análises. Além de atender a solicitação, o procedimento teve um ganho muito grande em segurança e saúde ocupacional, uma vez que o ácido perclórico é explosivo e muito mais agressivo que o ácido fosfórico, implementado após a otimização.

O custo da análise apresentou uma pequena redução, uma vez que parte do solvente utilizado para preparar a solução de derivatizante foi substituído por água, e o custo do ácido fosfórico é menor que o ácido perclórico.

Além disso, a diminuição do tempo de preparação da solução derivatizante, devido sua unificação, reduziu o tempo necessário para preparação das amostras e facilitou a dinâmica da preparação da amostra.

Este trabalho apresentou-se satisfatório na demonstração da possibilidade de utilizar um método para determinação de compostos carbonilados em bebidas alcoólicas, substituindo o catalisador utilizado, e otimizando as etapas envolvidas na análise, com benefícios de segurança e saúde dos colaboradores envolvidos no processo.

## 10 BIBLIOGRAFIA

1. ANDRADE, J.B.; BRAVO, R.V.F. Análise de aldeídos em bebidas alcoólicas: Um experimento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para cursos de graduação. **Química Nova**. Brasil. v. 12. No. 2. p. 196-198, 1989.
2. ANDRADE, M.V.A.S; PINHEIRO, H.L.C.; ANDRADE, J.B; PEREIRA, P.A.P. ; Compostos carbonílicos atmosféricos: fontes, reatividade, níveis de concentração e efeitos toxicológicos. **Química Nova**. Brasil. v. 25, no. 6b, 1117-1131,2002.
3. ARAUJO, S.M. **Análise quantitativa do teor de cobre em amostras de cachaça por espectrometria de absorção atômica**. 2010. 39 f. Dissertação (Bacharel em Farmácia e Bioquímica) – Universidade de Rio Verde, Rio Verde, 2010.
4. AZEVÊDO, L.C. **Estudo de compostos carbonílicos e os respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos em vinhos**. 2007. 177 f. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
5. AZEVÊDO, L.C.; REIS, M.M.; SILVA, L.A.; ANDRADE, J.B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**. Brasil. v. 30. No. 8, p. 1968-1975, 2007.
6. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006. 456 p.
7. CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - Informações Toxicológicas Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/laboratorios/109-informacoes-toxicologicas>>. Acesso em: 06 junho2013.
8. FIGUEIREDO, T.M.P. **Validação de métodos analíticos**. 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Univerddidade de Coimbra, Coimbra, 2012.
9. FORTI, M.C.; ALCAIDE, R.L.M. Validação de métodos analíticos do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – **LAQUATEC**. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais- INPE. São José dos Campos, 2011.
10. HANSEN, M.F. **Avaliação dos processos de oxidação em cervejas do tipo Pilsen**2011. 44 f. Dissertação (Bacharel em Química Industrial) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
11. HOLLER, R.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6.ed Porto Alegre: Bookman, 2007. 1055 p.

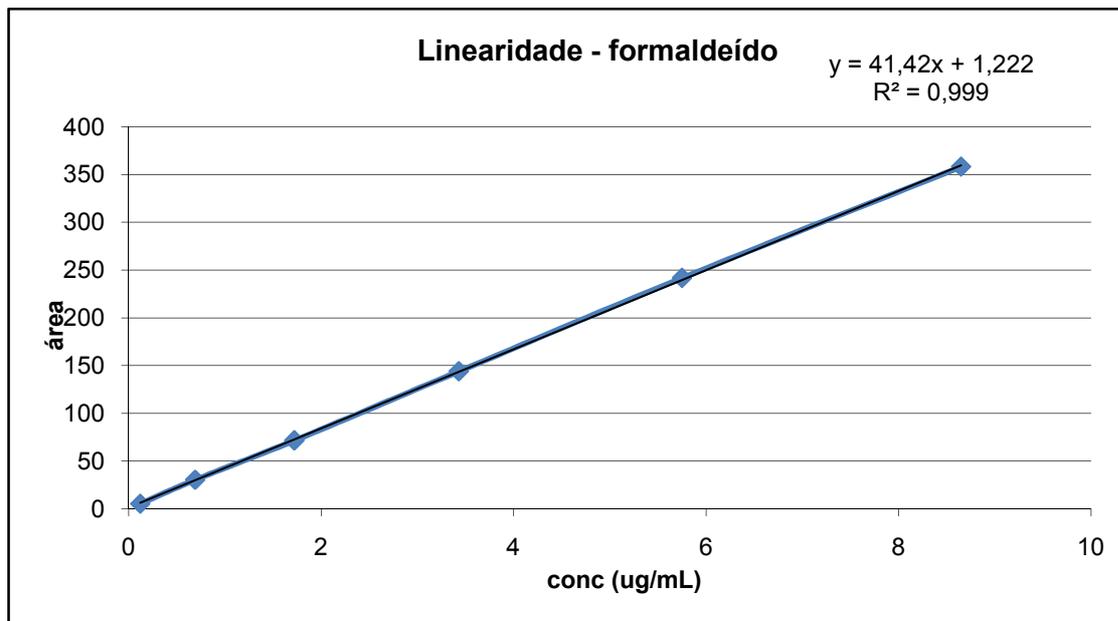
12. IARC (*International Agency for Research on Cancer*). **Formaldehyde, 2 – Butoxyethanol and 1 tert-Butoxy-2-propanol**. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 88, 2004.
13. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em 21 maio 2013.
14. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial): **DOQ-CGCRE-008, Revisão 2, Junho de 2007**. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.
15. MATTANNA, C.S. **Efeito do trans- 2 nonenal na qualidade sensorial da cerveja**. 2010. 39 f. Dissertação (Engenharia de Alimentos) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2010.
16. MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. ; MARIA, C.A.B. Componentes Voláteis do Café Torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**. Brasil, v.23, no. 2, p. 195-203, 2000.
17. NASCIMENTO, R.F.; CERRONI, J.L.; CARDOSO; D.R., LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. **Food Science and Technology**. Brasil v.18. no 3, p. 350-356, 1998.
18. PENTEADO, J.C.P. **Aplicação da análise multivariada para caracterização de bebida alcoólica destilada a partir de determinação de compostos voláteis por técnicas cromatográficas** 2006. 22 p. Projeto (Pós Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
19. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. Brasil. v. 27, no. 5, p. 771-780,2004.
20. RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**. Brasil. v. 31, no. 1, p. 164-171, 2008.
21. SAMPAIO, O.M. **Diferenciação entre rums cubanos e não cubanos** 2006. 153 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
22. SANTOS, J.R.S. **Determinação do trans-2-nonenal em Cerveja por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Espectrofotométrica** 2002. 158 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências da Faculdade do Porto, Porto, 2002.

23. SIQUEIRA, P.B.; BOLINI, H.M.A.; MACEDO, G.A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. Brasil. v. 19, no. 4, p. 491-498, 2008.
24. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.
25. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2.ed. Danvers: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.
26. SODRÉ, E.D. **Avaliação da Qualidade do Ar do Interior de Locais Públicos- Formaldeído, Acetaldeído e Acetona**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
27. SOUZA, H.R. **Caracterização Físico-Química de vinhos argentinos, chilenos e brasileiros**. 2004. 139 f. Dissertação (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2004.
28. SOUZA, L.M.; FERREIRA, K. S.; PASSONI, L.C.; BEVITORI, A.B.; MELO, K.V.; VIANA, A.R. Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na região norte fluminense – Rio de Janeiro. **Química Nova**. Brasil. v.32. no. 9, p. 2304-2309, 2009.
29. SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. **Handbook of Analytical Validation**. Boca Raton: CRC Press, 2012. 206 p.

## ANEXOS

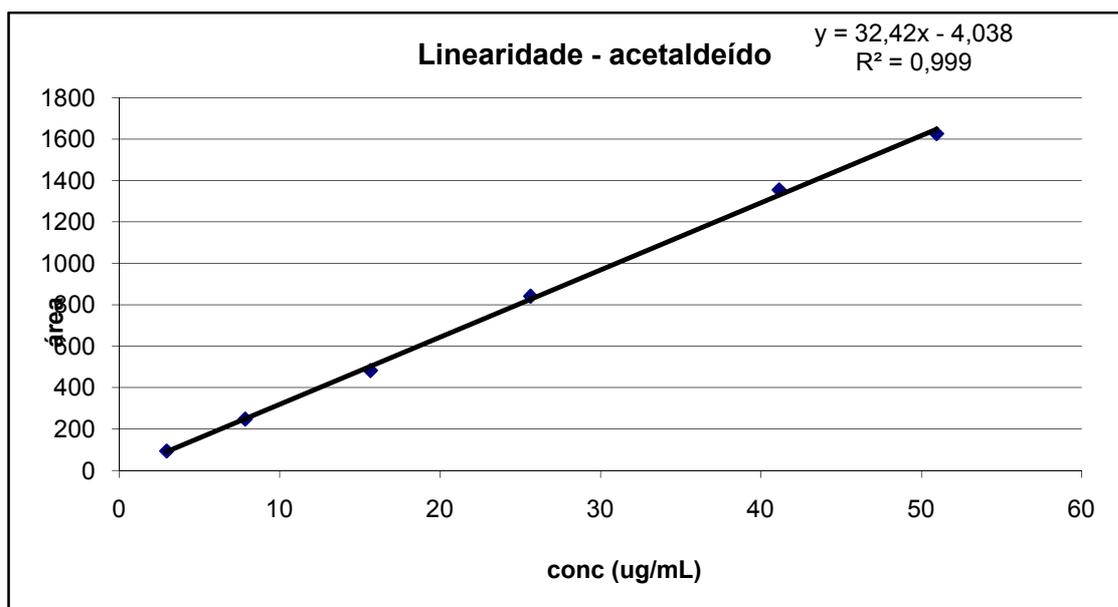
## ANEXO A

Gráfico 1 - Linearidade do Formaldeído.



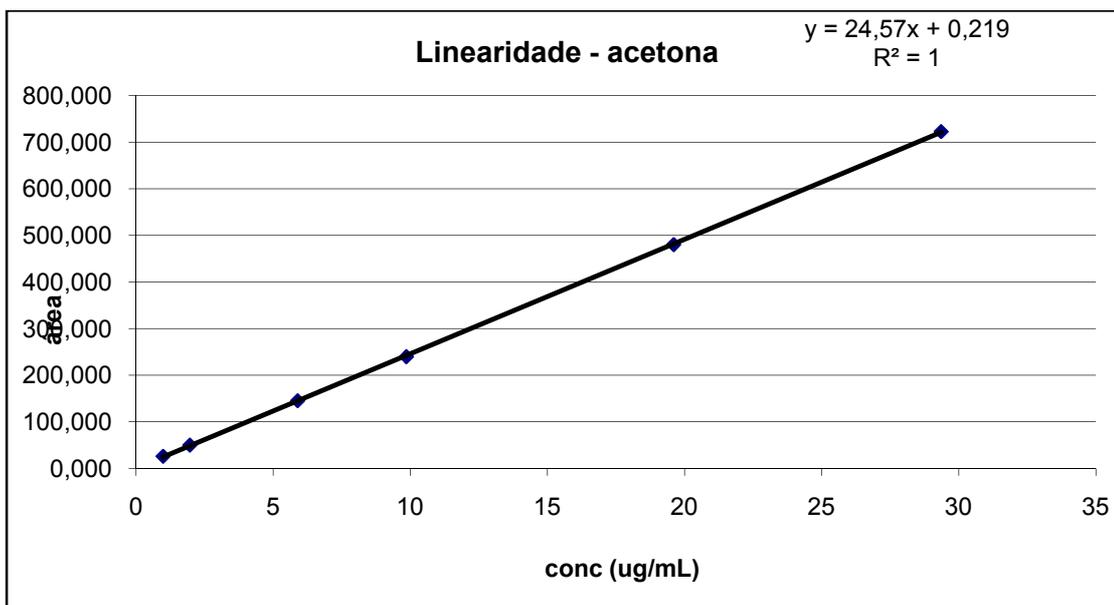
Fonte: Autoria própria.

Gráfico 2 - Linearidade Acetaldeído.



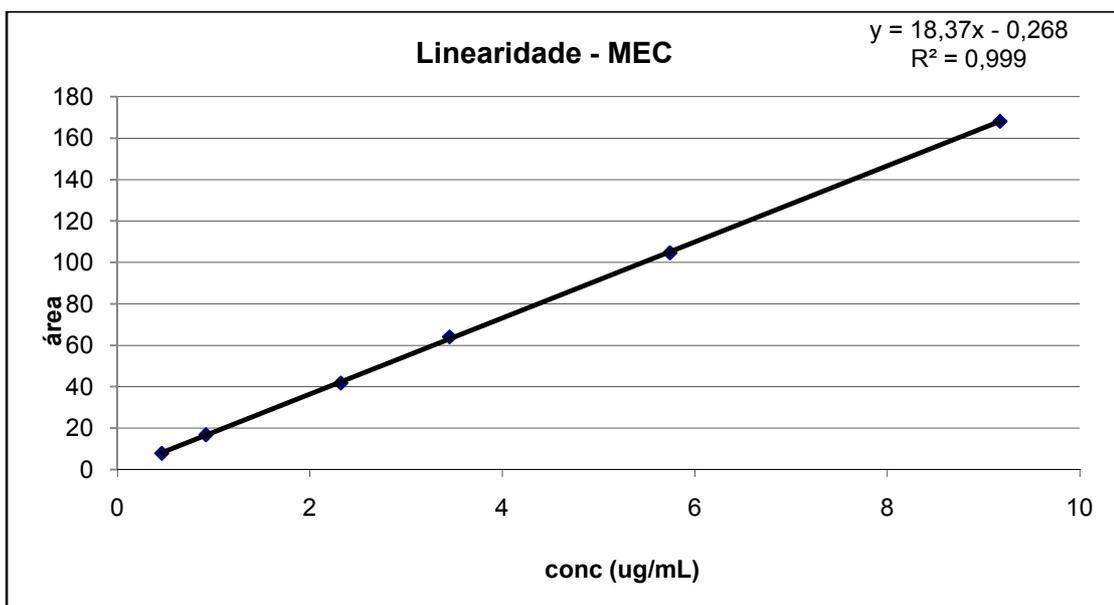
Fonte: Autoria própria.

Gráfico 3: Linearidade Acetona.



Fonte: Autoria própria.

Gráfico 4: Linearidade do Metil Etil Cetona.



Fonte: Autoria própria.