



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
COMPOSTOS CARBONÍLICOS EM AROMAS DE
FUMAÇA**

Filipe Avelar de Almeida

**Belo Horizonte - MG
2013**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
COMPOSTOS CARBONÍLICOS EM AROMAS DE
FUMAÇA**

Filipe Avelar de Almeida

Monografia apresentada ao Curso de Química Tecnológica do CEFET-MG como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II).

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Akemi Okuma

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carazza

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Adriana Akemi Okuma (Orientadora)

Prof^a Dra. Esther Maria Ferreira Lucas

Prof. MSc. Janice Cardoso Pereira Rocha

Monografia aprovada em 26 de março de 2013.

**Belo Horizonte-MG
2013**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Fernando Carazza (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me iluminado, me dado sabedoria para enfrentar as dificuldades e ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

Ao prof. Fernando Carazza e profa. Adriana Akemi, que foram mais do que mestres e orientadores. É impossível colocar em palavras toda a gratidão pelos anos de apoio, pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos e pela companhia insubstituível.

À empresa Biocarbo pelo fornecimento das amostras e materiais para realização deste trabalho.

À professora Luiza de Marilac da UFMG pelo conhecimento transmitido e apoio na realização das análises quantitativas.

Aos colegas do grupo Carboquim, Isaac, Leonardo, Letícia, Nathália, Aline e Mariana pelo apoio e companheirismo.

Aos meus colegas do curso de Química Tecnológica por tornarem as manhãs mais agradáveis e essa caminhada menos árdua.

Aos meus irmãos Igor e Flávia, pela amizade e apoio.

E finalmente, aos meus avós Delcídia e Geraldo e minha madrinha Maria Alice, pelo amor incondicional e por terem me educado da melhor forma possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-DNFHi	2,4-Dinitrofenil-hidrazina
2,4-DNFHo	2,4-Dinitrofenil-hidrazona
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CGAR-DIC	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com Detector de Ionização em Chama
CGAR-EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas
CIT	Cromatograma de Íons Totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-DAD	Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos
CL-ISE-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por "Spray" Eletrostático
EM	Espectrômetro de Massas
EM-IQPA	Espectrometria de Massas com Ionização Química sob pressão atmosférica
HMF	Hidroximetilfurfural
HPA's	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

	p.
Figura 1: Estruturas químicas dos HPA's mais comuns.....	2
Figura 2: Estrutura da madeira.....	4
Figura 3: Planta piloto de destilação da empresa BIOCARBO.....	5
Figura 4: Esquema da reação do grupo carbonila com o grupo amina na Reação de Maillard.....	7
Figura 5: Esquema geral para a obtenção da melanoidina à partir de compostos carbonílicos.....	8
Figura 6: Diagrama esquemático de um experimento espectrofotométrico de feixe simples.....	10
Figura 7: Esquema de um instrumento de CG-EM típico.....	15
Figura 8: Mecanismo para a reação de condensação entre compostos carbonílicos e 2,4-DNFHi.....	20
Figura 9: Reação de desprotonação da 2,4-Dinitrofenil-hidrazona em meio básico.....	21
Figura 10: Espectros na região do UV-Vis para a 2,4-DNFHo de Butan-2-ona em metanol isento de carbonilas.....	22
Figura 11: Espectro de absorção na região do UV-Vis da 2,4-DNFHo do padrão de Butan-2-ona em metanol isento de carbonilas.....	23
Figura 12: Curvas de degradação das 2,4-DNFHo's obtidas por Jordan & Veatch.....	24
Figura 13: Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra I.....	25
Figura 14: Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra II.....	25
Figura 15: Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra III.....	26
Figura 16: Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra IV.....	26
Figura 17: Curva de analítica do padrão de Butan-2-ona a 480 nm....	28
Figura 18: Cromatograma da amostra I.....	34
Figura 19: Cromatograma da amostra II.....	35
Figura 20: Cromatograma da amostra III.....	36

Figura 21: Cromatograma da amostra IV.....	37
Figura 22: Estruturas dos compostos carbonílicos identificados.....	39
Figura 23: Estruturas Químicas do cicloteno e maltol.....	41

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	p.
Tabela 1: Frações e rendimentos médios obtidos após destilação fracionada do alcatrão vegetal.....	6
Tabela 2: Resultados da análise dos padrões de Butan-2-ona.....	27
Tabela 3: Resultados da análise da solução de Pentan-2-ona.....	30
Tabela 4: Resultado da leitura das amostras.....	30
Tabela 5: Resultados da análise da amostra "Florest Flavors".....	32
Tabela 6: Resultados da análise das misturas (1) e (2).....	33
Tabela 7: Principais substâncias identificadas na amostra I.....	34
Tabela 8: Principais substâncias identificadas na amostra II.....	35
Tabela 9: Principais substâncias identificadas na amostra III.....	36
Tabela 10: Principais substâncias identificadas na amostra IV.....	38
Quadro 1: Teor de compostos carbonílicos nas frações de alcatrão de <i>Eucalyptus</i> sp.....	31
Quadro 2: Misturas entre o padrão de Butan-2-ona e as frações de alcatrão de <i>Eucalyptus</i> sp.....	32

RESUMO

QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS EM AROMAS DE FUMAÇA

ALMEIDA, F. A.; OKUMA, A. A.; CARAZZA, F.

A conversão da madeira em carvão libera fumaças que, ao serem condensadas, fornecem o alcatrão vegetal. O alcatrão vegetal "in natura" só apresenta aplicação como insumo energético, entretanto, da mesma forma que o petróleo, pode ser fracionado e usado como insumo químico. As frações do alcatrão vegetal são utilizadas como aromas de fumaça no setor alimentício para a defumação de carnes, peixes e queijos, exercendo várias funções nos alimentos: conservação, flavorização e coloração. Várias propriedades dos aromas de fumaça - cor, sabor, textura, ações antibacterianas e antioxidantes - estão diretamente relacionadas com a presença de três importantes classes de compostos orgânicos: os carbonílicos, os fenólicos e os ácidos. Os compostos carbonílicos atuam como contribuintes primários e/ou precursores de cor nos alimentos, principalmente em decorrência da Reação de Maillard. Assim, o presente trabalho tem como objetivo determinar a presença compostos carbonílicos em frações do alcatrão de *Eucalyptus* sp. para a avaliação destas como aromas de fumaça. Foi utilizado como método analítico a espectrofotometria de absorção molecular na região do visível para a quantificação e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para a caracterização desses compostos. O alcatrão de *Eucalyptus* sp. foi submetido à destilação fracionada na planta da Biocarbo Indústria e Comércio, sendo separadas quatro frações - uma aquosa (amostra 1), três oleosas (amostras 2, 3 e 4) e uma residual (piche vegetal). Com relação à quantificação, as amostras das frações do alcatrão de *Eucalyptus* sp. foram preparadas conforme procedimento descrito por Lappin e Clark e, em seguida, submetidas à análise espectrofotométrica nas mesmas condições dos padrões de Butan-2-ona. Para padronização do método, foi feita comparação com um padrão de 2-Pentanona. Também foi feita a análise de um aroma de fumaça já utilizado na indústria de alimentos para comparação. Por fim, realizou-se a adição de concentrações conhecidas do padrão de Butan-2-ona nas amostras e determinou-se o teor de carbonilas. As amostras 2 (óleo leve) e 3 (óleo médio) apresentaram maior teor de compostos carbonílicos, representando assim potenciais agentes de cor nos alimentos, quando utilizadas como aromas de fumaça. As análises de CG-EM permitiram a identificação dos principais compostos carbonílicos nas amostras de aromas de fumaça.

Palavras-chave: aromas de fumaça, compostos carbonílicos, reação de Maillard.

SUMÁRIO

	p.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Alcatrão Vegetal	3
2.2 Reação de Maillard	6
2.3 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Visível	9
2.3.1 Determinação quantitativa de compostos carbonílicos	11
2.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas ..	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Considerações sobre o trabalho.....	16
3.2 Obtenção das amostras	16
3.3 Purificação de solventes e reagentes.....	16
3.4 Preparo de soluções	17
3.5 Quantificação dos compostos carbonílicos.....	18
3.6 Caracterização dos compostos carbonílicos	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Análises Quantitativas	20
4.1.1 Determinação do comprimento de onda de leitura	22
4.1.2 Análise da decomposição em função do tempo para as amostras das frações de alcatrão de <i>Eucalyptus</i> sp.	24
4.1.3 Obtenção da curva de analítica	27
4.1.4 Padronização do método	29
4.1.5 Quantificação dos compostos carbonílicos das amostras	30
4.1.6 Adição de padrão nas amostras.....	32
4.2 Caracterização dos compostos carbonílicos das amostras	33
5. CONCLUSÕES.....	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	423
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
8. ANEXOS.....	467
8.1 Construção da curva analítica.....	467

1. INTRODUÇÃO

O processo de defumação empregado na indústria de alimentos atualmente possui um papel que vai além da conservação e conseqüente aumento do tempo de prateleira de produtos, tais como carnes, peixes e queijos. A exposição de tais produtos à ação da fumaça faz com que sejam adquiridas particularidades sensoriais no aroma e sabor interessantes para o consumidor.

Um dos procedimentos de defumação utilizados é o tradicional, isto é, a exposição direta do produto às fumaças procedentes da queima de madeiras, serragem ou carvão em uma instalação própria. A defumação tradicional pode ser feita a frio, durante algumas horas ou vários dias, ou a quente com injeção de vapor d'água para evitar a dessecação do produto (PEREDA *et al.*, 2005).

A pirólise da madeira libera uma ampla quantidade de compostos químicos, que têm origem nos três principais componentes da madeira: celulose, hemicelulose e a lignina. A combustão da lignina acima de 350 °C, produz substâncias mutagênicas e carcinogênicas, entre os quais o α -benzopireno e o 1,2,5,6-fenantraceno (EVANGELISTA, 2003). Essas substâncias são classificadas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) e os mais comuns podem ser visualizados na Figura 1 (p. 2).

Para eliminar a presença dos HPA's no produto alimentício, é cada vez mais frequente o uso de aromas e condensados de fumaça, a fumaça líquida ou aroma de fumaça ("*smoke flavor*"), obtida mediante ao processo de condensação da fumaça proveniente do processo de carbonização da madeira. A fumaça gerada durante a carbonização da madeira é deslocada até um ciclone, onde o choque das partículas com as paredes do equipamento provoca aglutinação destas, originando um líquido denominado licor pirolenhoso.

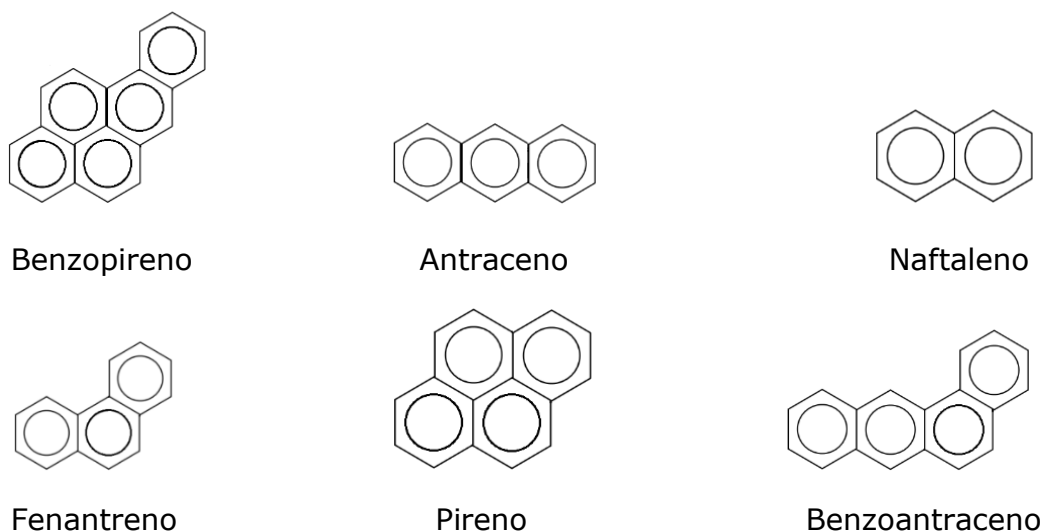


Figura 1 - Estruturas químicas dos HPA's mais comuns.

Este, por decantação, fornece o ácido pirolenhoso (fração aquosa) e o alcatrão vegetal (fração orgânica). O alcatrão vegetal, é então submetido ao fracionamento por destilação, extração com água e diluição. Após o preparo dos aromas de fumaça, estes são submetidos ao controle de qualidade para padronização e segurança alimentar. Antes de serem adicionados aos alimentos, os aromas de fumaça ainda são diluídos nas indústrias e, por fim, diluídos novamente no produto final. Como os HPA's apresentam elevada massa molar e são substâncias pouco solúveis em água, após as etapas de diluição mencionadas, eles são praticamente eliminados da constituição dos aromas de fumaça (OKUMA *et al.*, 2007). O uso dos aromas de fumaça além da eliminação dos HPAs tem como vantagem em relação ao processo convencional de defumação o baixo custo, flexibilidade para aplicação e rapidez, distribuição uniforme do "flavor" ao longo do produto, maior padronização dos produtos e controle do teor de substâncias tóxicas garantindo a segurança alimentar.

Em Minas Gerais, a Biocarbo (indústria de base tecnológica e parceira neste projeto) vem destilando o alcatrão vegetal bruto, proveniente da Vallourec & Mannesmann, e comercializando aromas de fumaça para as indústrias de alimentos. Visando conhecer melhor o perfil químico de seus produtos e o potencial dessas frações como flavorizantes, foi selecionada uma das classes de compostos químicos para investigação, no caso os compostos carbonílicos.

Os compostos carbonílicos presentes nos aromas de fumaça atuam como contribuintes primários e/ou precursores de cor nos alimentos por meio de reações químicas, dentre as quais se destaca a Reação de Maillard. É importante ressaltar que a cor é o primeiro e mais óbvio fator sensorial em produtos alimentícios, tendo papel chave na aparência do produto final. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo a determinação do teor de compostos carbonílicos em frações de alcatrão vegetal utilizando a técnica analítica de Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Visível. Dessa forma, pode ser realizada uma avaliação do potencial destas frações como agentes de cor em alimentos. A técnica utilizada é mais acessível para uso no controle de qualidade na indústria. Além disso, é importante caracterizar essas frações utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) para identificar possíveis compostos carbonílicos presentes com potencial de reação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alcatrão Vegetal

A madeira tem despertado grande interesse nos pesquisadores devido à sua complexidade estrutural e as suas diversas aplicações. Ela é constituída por várias substâncias inorgânicas e orgânicas, dentre as quais se destacam a celulose, a hemicelulose, a lignina e os extrativos (Figura 2, p. 4).

A mais antiga forma de aproveitamento da madeira como insumo é sua transformação em carvão (combustível sem fumaça), entretanto, por ser um processo de conversão, a carbonização fornece rendimentos muito baixos. Quando a madeira é carbonizada, apenas 30% de sua massa são convertidas em carvão e os 70% restantes são lançados na atmosfera sob a forma de fumaças. A carbonização da madeira é fundamentalmente um processo de aquecimento a altas temperaturas em ambiente deficiente de oxigênio, sendo extremamente complexo, envolvendo trocas físicas e químicas (OKUMA, 2004).

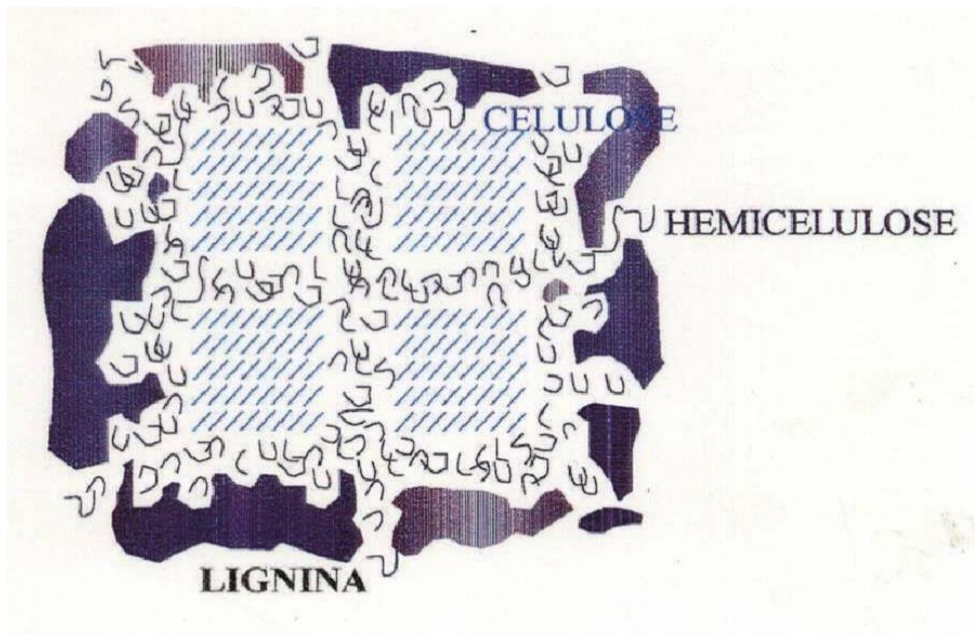


Figura 2 – Estrutura da madeira.

Fonte: CARAZZA *et al.* (2000).

No período inicial de aquecimento, a madeira é simplesmente secada. Com o aumento da temperatura, as estruturas da celulose, hemicelulose e lignina começam a se decompor dando origem a subprodutos que podem ser divididos em dois grupos: gases não condensáveis, como monóxido de carbono, dióxido de carbono, metano, hidrogênio e gases condensáveis, como vapor de água e uma mistura de centenas de compostos orgânicos (CARAZZA *et al.*, 2000). Os gases condensáveis gerados no processo são deslocados com o auxílio de um exaustor até um ciclone localizado no topo do forno. O choque das partículas com as paredes do equipamento provoca aglutinação destas, originando um líquido denominado licor pirolenhoso. Este, por decantação, fornece o ácido pirolenhoso (fração aquosa) e o alcatrão vegetal (fração orgânica). O ácido pirolenhoso é constituído principalmente de água (80%), mas contém alguns produtos de interesse como metanol (1,2%), acetona (0,9%) e ácido acético (4,4%). No alcatrão encontram-se dezenas de substâncias das mais diversas classes químicas, como fenóis, ácidos e ciclopentenonas (STUCKENBRUCK, 1990).

O alcatrão "*in natura*" praticamente não tem outra aplicação a não ser o uso como insumo energético. Assim, no início dos anos 80, as grandes siderúrgicas desenvolveram tecnologias de recuperação de alcatrão em

fornos de alvenaria, visando a sua utilização como combustível em suas usinas. Entretanto, a elevada presença de compostos oxigenados limita o seu poder calorífico, reduzindo a sua competitividade frente ao óleo combustível (ACESITA, 1991). De forma mais ousada, o alcatrão vegetal vem sendo considerado como um insumo químico, uma vez que, da mesma forma que o petróleo, pode ser fracionado e utilizado pelas indústrias química e farmacêutica (CARAZZA *et al.*, 2000).

Atualmente, a Biocarbo (indústria de base tecnológica e parceira neste trabalho) vem destilando o alcatrão vegetal bruto, proveniente da Vallourec & Mannesmann, e comercializando alguns produtos tais como: Biopiról® (agrofortificante organo-mineral), aromas de fumaça (flavorizantes), creosoto e piche vegetal (OKUMA *et al.*, 2007).

No processo de destilação realizado pela Biocarbo (Figura 3) o alcatrão é separado em frações com composições típicas. Inicialmente, à temperaturas mais baixas, é separada uma fração aquosa. Em seguida, com a elevação da temperatura, são obtidas três frações oleosas e, por fim, um resíduo denominado piche vegetal. A Tabela 1 (p. 6) apresenta as temperaturas de obtenção das frações e o rendimento de cada uma.



Figura 3 - Planta piloto de destilação da empresa BIOCARBO.

Fonte: OKUMA (2004).

Tabela 1 - Frações e rendimentos médios obtidos após destilação do alcatrão vegetal.

DESCRIÇÃO	% DO ALCATRÃO BRUTO
Fração A: até 105 °C - fração aquosa	10,4
Fração B: 105-180 °C - óleo leve	10,6
Fração C: 180-240 °C - óleo médio	20,9
Fração D: acima de 240 °C - óleo pesado	4,6
Piche - Resíduo	44,0
Perdas	9,5
Total	100,0

Fonte: CARAZZA *et al.* (2000) modificado.

As frações separadas no processo de destilação do alcatrão são comercializadas pela Biocarbo como insumos na área de alimentos, especialmente no preparo de aromas de fumaça. Tais frações são conhecidas como fumaças líquidas ou "*liquid smoke*".

As várias formas e propriedades das fumaças líquidas – cor, sabor, contribuição para a textura, ações antibacterianas e antioxidantes são diretamente derivadas de três importantes classes de compostos orgânicos: os carbonílicos, os fenólicos e os ácidos carboxílicos. Estes compostos têm origem nos três principais componentes da madeira: celulose, cuja decomposição gera compostos carbonílicos, alcatrão e voláteis; hemicelulose, que quebra formando ácidos carboxílicos, compostos carbonílicos e furanos, e a lignina, cuja quebra produz compostos fenólicos.

A fim de estabelecer a padronização das frações de alcatrão já comercializadas e também promover o desenvolvimento de novos produtos é de fundamental importância a análise química e a implantação de uma metodologia eficaz para o controle de qualidade de tais frações.

2.2 Reação de Maillard

A reação de Maillard, descrita pela primeira vez em 1912 por Louis-Camille Maillard (MAILLARD, 1912), é um processo caracterizado pela reação do grupo carbonila dos açúcares redutores (aldoses) com um grupo amina primário das proteínas, peptídeos ou aminoácidos, levando à formação de

pigmentos que podem ser desejáveis ou não. Essa reação pode ocorrer em meio básico ou meio ácido, sendo mais rápida no meio alcalino que favorece o ataque nucleofílico do nitrogênio (Figura 4).

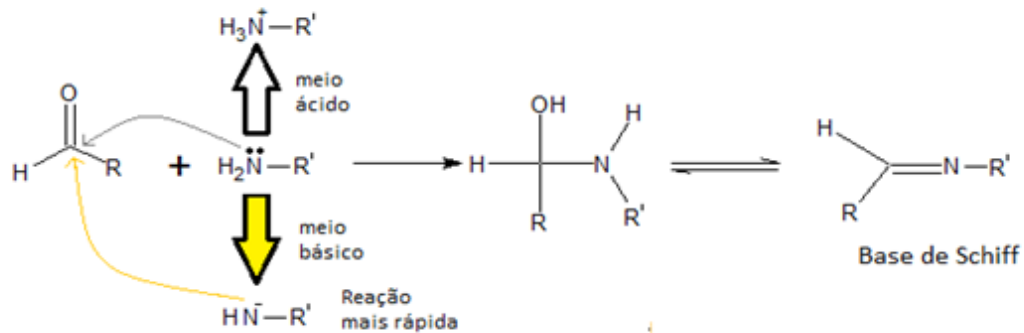


Figura 4 – Esquema da reação do grupo carbonila com o grupo amina na Reação de Maillard.

Os compostos carbonílicos reagem de modo reversível com a amina para formação da base de Schiff (uma imina $\text{RHC}=\text{NHR}'$), a qual pode originar um anel (assim como uma aldose se torna cíclica) para formar uma glicosilamina (ou *N*-glicosídeo). Então, a base de Schiff é submetida a uma reação chamada de rearranjo de Amadori para originar um composto de Amadori. Os compostos de Amadori são os primeiros intermediários da sequência de reações de escurecimento (FENNEMA *et al.*, 2010). Em seguida, ocorrem rearranjos, eliminações e a degradação de Strecker, onde são formados o hidroximetilfurfural (HMF) ou o furfural. Estes podem sofrer polimerização, produzindo as melanoidinas (Figura 5, p. 8), que são os pigmentos escuros (castanho a preto). Dependendo dos tipos de proteínas e açúcares que compõem o alimento, o processo produz resultados diferentes quanto ao aspecto, cor e sabor.

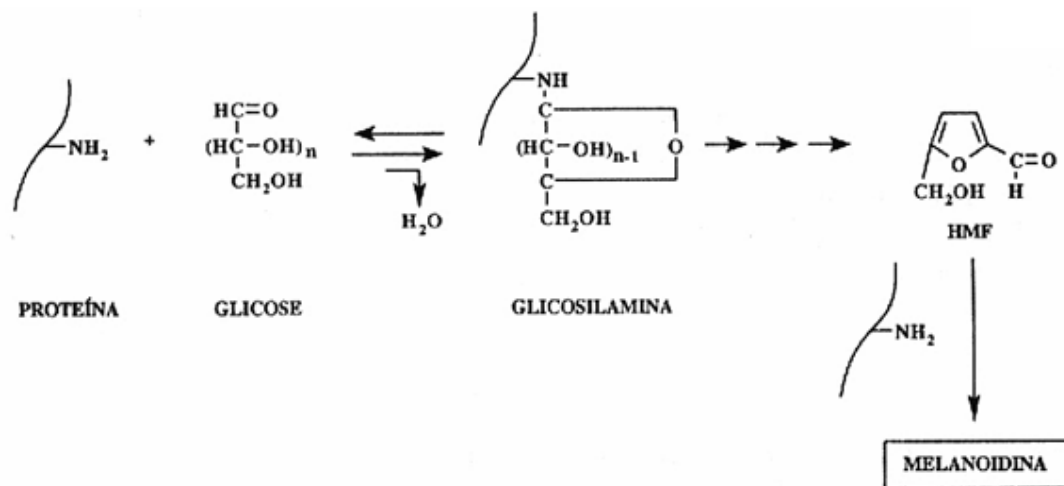


Figura 5 – Esquema geral para a obtenção da melanoidina à partir de compostos carbonílicos.

Fonte: ARAÚJO, 2008.

Na reação de Maillard há também a formação de compostos voláteis responsáveis pelo odor característico do produto. Esta reação, desencadeada a temperaturas elevadas, também é conhecida como "escurecimento não-enzimático", diferente daquele processo geralmente observado em plantas e promovido por enzimas, como as peroxidases, que atuam nos compostos fenólicos, formando os pigmentos escuros. O processo de escurecimento pode ser desejável, como no caso do pão, onde a cor, sabor e aroma produzidos são fundamentais para a aceitação do alimento, mas pode ser prejudicial quando estas propriedades sensoriais são alteradas ou ocorrem perdas de proteínas importantes na nutrição (ARAÚJO, 2008).

O controle desta reação durante o tratamento térmico dos alimentos pode conduzir à maior exploração comercial de seus efeitos, como a geração "in situ" de sabores e cores desejáveis, melhorando assim a qualidade do alimento processado. Este controle pode ser atingido com a utilização das frações separadas por destilação do alcatrão de *Eucalyptus* sp. ricas em compostos carbonílicos. Para este fim, é de fundamental importância o conhecimento do teor dos compostos carbonílicos com potencial corante nas frações do alcatrão de *Eucalyptus* sp., sendo que a quantificação pode ser feita utilizando-se a Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Visível.

2.3 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Visível

A espectrofotometria é qualquer processo que utiliza a luz para medir concentrações de espécies químicas. A luz pode ser descrita em termos de partículas e de ondas, sendo que, com relação à energia, é mais conveniente considerar a luz como partículas, denominadas fótons. Cada fóton transporta a energia, E , que é dada pela fórmula: $E = h\nu$, onde " h " é a constante de Planck e " ν " é a frequência do fóton. Quando uma molécula absorve um fóton, a energia da molécula aumenta, isto é, os elétrons são promovidos para orbitais de maior energia. A molécula passa do estado fundamental, de menor energia, para um estado excitado, de maior energia. A luz visível e a radiação ultravioleta são radiações eletromagnéticas que provocam esse tipo de excitação eletrônica. Se a molécula no estado excitado emite um fóton, a energia da molécula diminui, os elétrons movimentam-se para orbitais de menor energia ou retornam para o estado fundamental (HARRIS, 2005).

Essa energia absorvida pelas moléculas pode ser quantificada por meio de equipamentos, denominados espectrofotômetros. A luz visível e a radiação ultravioleta são energias radiantes e quando são absorvidas por uma amostra, a energia radiante do feixe de luz emitido pela fonte diminui. A luz emitida pela fonte passa por um monocromador (um prisma, uma rede de dispersão, ou mesmo um filtro) para selecionar um dado comprimento de onda. A luz com um único comprimento de onda é denominada de luz monocromática (SKOOG *et al.*, 2006).

A luz monocromática, com energia radiante P_0 , atinge uma amostra de comprimento " b ". A energia radiante do feixe (energia por unidade de tempo por unidade de área no feixe de luz) que sai do outro lado da amostra é denominada " P " e é medida por um detector de luz. A energia radiante, " P ", é a energia por segundo por unidade do feixe de luz. Se alguma quantidade de luz for absorvida pela amostra, teremos que $P \leq P_0$. O esquema de um espectrofotômetro pode ser visto na Figura 6 (p. 10) (HARRIS, 2005).

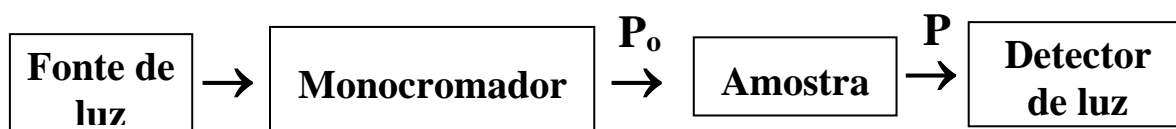


Figura 6 – Diagrama esquemático de um experimento espectrofotométrico de feixe simples.

A Transmitância, T , é definida como a fração da luz original que passa pela amostra (Equação 1).

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (\text{Equação 1})$$

A Absorvância, A , se relaciona com a Transmitância, T , por meio de uma função logarítmica (Equação 2).

$$A = 2 - \log T \quad (\text{Equação 2})$$

A Absorvância é chamada algumas vezes de densidade óptica. É muito importante porque ela é diretamente proporcional à concentração, “ c ”, de espécies absorventes de luz na amostra. Essa relação é conhecida como Lei de Beer-Lambert ou Lei de Beer (Equação 3).

$$A = \epsilon bc \quad (\text{Equação 3})$$

A absorvância é adimensional. A concentração da amostra, “ c ”, é geralmente dada em unidades de mol por litro. O caminho óptico, “ b ”, geralmente é expresso em centímetros. A grandeza “ ϵ ” é chamada de absorvidade molar e possui unidades de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para tornar o produto adimensional. A absorvidade molar é característica de uma substância e indica a quantidade de luz absorvida num determinado comprimento de onda. Quanto maior a absorvidade molar, maior a absorvância (SKOOG *et al.*, 2006).

A parte de uma molécula responsável pela absorção de luz é chamada de grupo cromóforo. Qualquer substância que absorve a luz visível aparece colorida quando a luz branca é transmitida por ela ou refletida a partir dela.

Para muitos tipos de análises químicas, a resposta para o procedimento analítico deve ser avaliada por comparação com quantidades conhecidas dos constituintes de interesse (padrões), de forma que a resposta para uma quantidade desconhecida possa ser interpretada.

Para esse propósito, normalmente constrói-se uma curva analítica, isto é, um gráfico que representa a resposta de um método analítico como uma função de quantidades conhecidas do constituinte analisado. A equação do gráfico é dada pela Lei de Beer e deve ser utilizada a região onde a curva analítica apresenta linearidade. A lei de Beer se aplica à maioria das substâncias quando a radiação é monocromática e as soluções estudadas estão suficientemente diluídas. As soluções contendo concentrações conhecidas do constituinte de interesse são designadas como soluções-padrão. Soluções contendo todos os reagentes e solventes usados na análise, mas sem a adição do constituinte de interesse, são chamadas de branco analítico. O branco analítico mede a resposta do procedimento analítico para impurezas ou espécies interferentes nos reagentes (HARRIS, 2005). Esse tipo de análise tem a vantagem de apresentar menor custo em comparação com outros métodos e ótima reprodutibilidade dos resultados.

2.3.1 Determinação quantitativa de compostos carbonílicos

Há quase um século, a 2,4-dinitrofenil-hidrazina (2,4-DNFHi) vem sendo utilizada como reagente para determinações quantitativas de compostos carbonílicos. Mathewson (1920) descreveu a determinação de baixas quantidades de carbonilas baseado na precipitação das 2,4-dinitrofenil-hidrazonas (2,4-DNFHo's) de acetona. Entretanto, seu procedimento era aplicável apenas para amostras solúveis em água.

Allen (1930) realizou um estudo do uso da 2,4-DNFHi para a identificação de compostos carbonílicos mediante determinação do ponto de fusão das respectivas 2,4-DNFHo's. Segundo Allen e colaboradores (1937) existem limitações quanto ao uso desse reagente para esse tipo de determinação e recomenda o uso do ácido clorídrico como o catalisador para a reação de precipitação, pois gera 2,4-DNFHo's menos impuras do que com o uso de ácido sulfúrico.

Iddles *et al.* (1939) descreveram um método gravimétrico para determinação de compostos carbonílicos solúveis em etanol utilizando a 2,4-DNFHi como reagente. Roberts *et al.* (1946) estudaram os espectros de absorção das 2,4-DNFHo's de forma a identificar o composto carbonílico correspondente.

Lappin *et al.* (1951) descreveram um método para determinação quantitativa de compostos carbonílicos utilizando a técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do visível. As análises foram feitas a 480 nm, pois este valor foi identificado como o $\lambda_{\text{máx}}$ do espectro, não dependente da estrutura do composto carbonílico correspondente. Além disso, observaram que a cor vermelho-vinho formada após a adição de hidróxido de potássio era relativamente estável. Entretanto, Medelowitz *et al.* (1953) observaram que o $\lambda_{\text{máx}}$ varia dependendo do composto carbonílico de partida e, para a maioria dos compostos estudados, se encontra próximo de 430 nm. Observaram também que a temperatura de aquecimento não pode ultrapassar 60 °C, pois o metanol pode evaporar e que pequenas diferenças de volume de ácido clorídrico adicionado causam variação na intensidade da cor formada, além de promover a precipitação de KCl após a adição de hidróxido de potássio.

Jones *et al.* (1956) fizeram um estudo sobre a determinação espectrofotométrica de diferentes 2,4-DNFHo's isoladas. Os espectros de ultravioleta-visível e de infravermelho permitiram a determinação, com maior precisão, do composto carbonílico de origem. Além disso, realizaram varreduras no espectro em intervalos de tempo definidos para medir a diminuição da intensidade de cor formada após a adição de KOH.

Jordan *et al.* (1964) publicaram uma revisão da literatura e propuseram o uso de uma mistura de hexano e metanol para extrair as 2,4-DNFHo's e então determiná-las por espectrofotometria. Esse método é útil para compostos que não são solúveis em etanol ou metanol. Estudaram também, com mais detalhes, a degradação de uma série de compostos carbonílicos em função do tempo e definiram que o tempo ideal para a realização da análise seria de 8 a 15 minutos. Yukawa *et al.* (1993) propuseram um método de determinação de aldeídos em meio aquoso, modificando a

metodologia de Lapin e Clark. Dasgupta *et al.* (1994) publicaram um estudo da degradação das 2,4-DNFHo's. Utilizando a técnica de injeção em fluxo ("*Flow-Injection*") e de RMN eles identificaram a estrutura dos compostos formados após a degradação das hidrazonas. Vieira *et al.* (2012) descreve o método de utilização da 2,4-DNFHi para determinação espectrofotométrica de compostos carbonílicos presentes em derivados do petróleo.

Recentemente, muitos autores descreveram métodos de determinação de compostos carbonílicos com o uso da 2,4-DNFHi utilizando de técnicas com alto custo de análise como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no trabalho de Oliva-Teles *et al.* (2002), Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por "*Spray*" Eletrostático (LC-ESI-MS) como, por exemplo, na determinação de carbonilas de proteínas de carnes descrito por Armenteros *et al.* (2009), Espectrometria de Massas com Ionização química sob pressão atmosférica (APCI-MS) no trabalho de van Leeuwen *et al.* (2004), Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos (LC-DAD) descrito por Baños *et al.* (2009), entre outras. Entretanto, essas tecnologias nem sempre estão acessíveis, o que faz da técnica de espectrofotometria bastante útil para a indústria e laboratórios de pesquisa quando se trata da determinação quantitativa de compostos carbonílicos.

2.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Uma técnica muito eficiente para separar compostos químicos presentes em uma amostra desconhecida e identificá-los é a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Constitui uma técnica analítica rápida e fácil para a determinação do número de componentes em uma mistura, mesmo que esses estejam em pequenas quantidades. Assim, pode verificar a presença de impurezas em uma amostra e, por meio da análise dos espectros de massas, pode-se identificar cada um de seus componentes.

A CG-EM consiste em volatilizar os constituintes de uma amostra, que deverá ser solubilizada em um solvente ou mistura de solventes orgânicos,

para que esses constituintes possam ser arrastados por um gás através de uma coluna recoberta internamente por uma fase estacionária e localizada dentro de um forno, responsável pelo aquecimento do sistema, até chegar ao detector que, no caso, é um espectrômetro de massas. Portanto, essa técnica pode ser utilizada apenas para analisar constituintes que possam ser volatilizados nas condições de trabalho do injetor, ou, de forma geral, para substâncias que apresentem temperaturas de ebulição de até 300 °C e que sejam termicamente estáveis.

Após ser volatilizada e injetada, a amostra entra em contato com o gás de arraste, que é chamado de fase móvel. O gás de arraste deve ser inerte e puro para não interagir com a amostra, no caso desse método é usado o gás hélio. O gás hélio arrasta a amostra, com um fluxo pré-determinado, pela fase estacionária, que está dentro da coluna cromatográfica, e esta interage com os compostos químicos presentes. A fase estacionária é geralmente um líquido não volátil, mas também pode ser constituída por um sólido e pode apresentar diferentes polaridades. Dependendo do tipo de polaridade dos compostos presentes nas amostras, eles tendem a interagir mais ou menos com a fase estacionária. Com isso, os compostos que interagem mais com a fase estacionária, ou seja, que apresentam polaridade próxima, tendem a ficar mais tempo retidos e os compostos que não apresentam polaridade próxima à da fase estacionária tendem a ser carregados mais facilmente pelo gás de arraste até o final da coluna. Durante a análise, pode ser configurada uma ou mais rampas de temperatura para a operação do forno. Aumentando a temperatura aumenta-se a pressão de vapor dos constituintes, fazendo com que a velocidade de migração dos constituintes pela coluna seja maior. O ideal é programar a variação da temperatura para que se consiga uma separação total dos constituintes da amostra. Depois de serem arrastados pela coluna, os constituintes são transferidos para o detector.

O Espectrômetro de Massas (EM) é um dos detectores mais importantes para a cromatografia gasosa. Um espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) de íons que são produzidos pela amostra. A maioria dos íons produzidos apresenta uma carga unitária ($z=1$) devido à perda ou ganho de um elétron e , com isso, facilita a relação com a massa do íon.

O sistema do EM funciona a baixas pressões, possuindo um complexo sistema de vácuo. Quando a amostra é transferida do CG para o EM por meio do sistema de entrada, ocorre a mudança entre a pressão atmosférica do primeiro sistema para o segundo. Então, a amostra é ionizada por uma fonte de ionização, que é suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas, mas não tão fortes o suficiente para decompor tais moléculas em seus átomos constituintes. A fonte de ionização produz fragmentos que também podem ser ionizados. Os íons das moléculas da amostra são chamados de íons moleculares. As moléculas e fragmentos não ionizados são extraídos da fonte de íons por meio de bombas de vácuo, enquanto que as moléculas e fragmentos ionizados passam pelo analisador. O analisador serve para seleccionar os íons de acordo com seus valores de m/z . Os íons separados são então detectados e um gráfico é construído pelo sistema de dados com os valores da intensidade do sinal gerado pelo íon em função da relação m/z (SKOOG *et al.*, 2006). A Figura 7 apresenta um diagrama esquemático de um CG-EM.

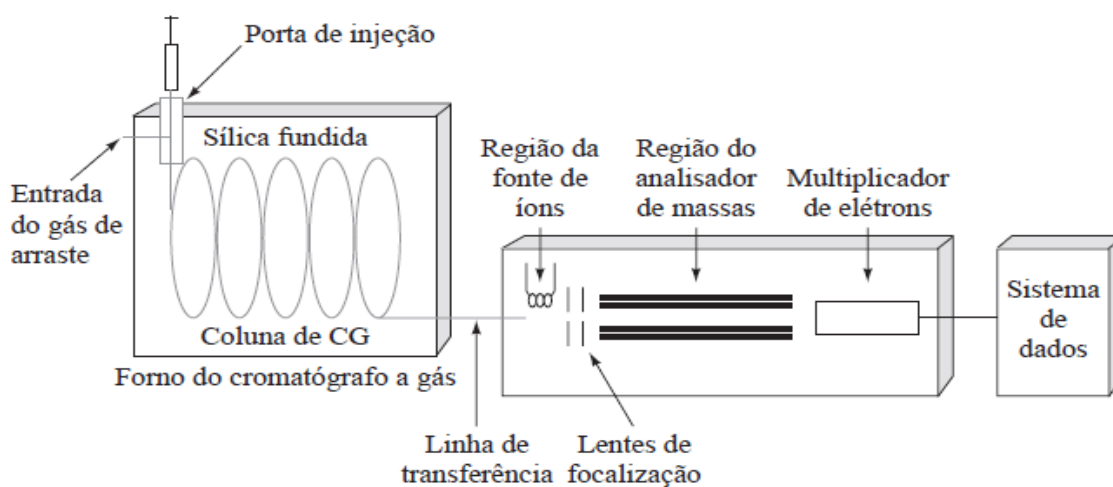


Figura 7 – Esquema de um instrumento de CG-EM típico.

Fonte: SKOOG *et al.*, 2006

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações sobre o trabalho

O trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Química/CEFET-MG e nos laboratórios de Pesquisa do Departamento de Química/ICEx/UFMG. As análises qualitativas (varreduras) e quantitativas foram feitas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 CONC UV-Vis. Todas as amostras foram analisadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. As análises de CG-EM foram realizadas no laboratório de Cromatografia do CEFET-MG. Para análise da pureza dos reagentes sólidos, foi determinada a temperatura de fusão no aparelho Fisher-Johns, utilizando-se lamínulas de vidro e o valor obtido foi comparado dados da literatura. Para análise da pureza dos reagentes líquidos foi utilizado um refratômetro tipo ABBE PZO RL 2, e o valor do índice de refração obtido foi comparado dados da literatura.

3.2 Obtenção das amostras

O alcatrão de *Eucalyptus* sp. foi coletado nas plantas de carbonização da Vallourec & Mannesmann e beneficiado na planta de destilação industrial da Biocarbo Indústria e Comércio Ltda., localizada em Itabirito/MG. As frações A, B, C e D, obtidas na destilação e coletadas de um mesmo lote (Tabela 1, p. 6) foram denominadas amostra I, II, III e IV, respectivamente, sendo a amostra I aquosa e as demais oleosas.

3.3 Purificação de solventes e reagentes

Metanol: Purificação por destilação simples, seguida de tratamento (refluxo) com 2,4-DNFHi em meio ácido e separação do metanol isento de carbonilas por destilação fracionada. Inicialmente realizou-se a destilação simples do metanol P.A. Em seguida, o metanol recém-destilado (500 mL) foi tratado (3 h de refluxo) com 2,4-DNFHi (1,0 g) e ácido clorídrico concentrado (gotas). A mistura resultante foi submetida à destilação com coluna de Hempel preenchida com anéis de Raschig, obtendo-se assim o **metanol isento de carbonilas**.

2,4-Dinitrofenil-hidrazina: Purificação por recristalização (duas vezes) em metanol isento de carbonilas. Uma mistura de aproximadamente 5 g do reagente P.A. e 250 mL de solvente foi refluxada durante uma hora e meia e o resíduo sólido foi separado por filtração sob pressão reduzida à quente. A água-mãe foi esfriada até a temperatura ambiente e mantida em repouso durante 24 h para a recristalização do material de interesse. Os cristais obtidos foram separados por filtração sob pressão reduzida. Realizou-se novamente este procedimento de recristalização para obtenção da 2,4-DNFHi purificada.

Butan-2-ona: Purificação por destilação simples.

3.4 Preparo de soluções

Solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina: Preparou-se uma solução saturada de 2,4-DNFHi (duas vezes recristalizada) em metanol isento de carbonilas. Para este fim, adicionou-se a 2,4-DNFHi até a saturação da solução (comprovada pela presença de corpo de fundo). O sólido pouco solúvel foi separado por filtração sob pressão reduzida e a solução, de coloração alaranjada, foi acondicionada sob refrigeração. A cada duas semanas preparou-se uma nova solução.

OBS: *Essa etapa é de extrema importância para o sucesso da análise e a não saturação da solução pode ocasionar problemas, portanto, por precaução, deve-se adicionar um excesso de 2,4-DNFHi.*

Solução de Hidróxido de Potássio: Dissolveu-se 10 g de hidróxido de potássio em 20 mL de água destilada. A mistura foi então diluída para 100 mL em um balão volumétrico usando metanol isento de carbonilas. Homogeneizou-se a solução.

Solução estoque de Butan-2-ona: Preparou-se uma solução estoque de 12,5 µL de Butan-2-ona em 100 mL de metanol isento de carbonilas. Os padrões utilizados na construção da curva analítica foram obtidos a partir de diluições da solução estoque.

Amostra I: Inicialmente preparou-se 100 mL de uma solução aquosa contendo 1,0 mL da amostra da fração aquosa do alcatrão de *Eucalyptus* sp. Em seguida, 1,0 mL desta solução recém-preparada foi diluída com metanol isento de carbonilas para 10 mL de solução. Desta forma, a solução

final apresentou um fator de diluição de 1000 em relação à amostra original.

Amostras III e IV: Inicialmente preparou-se 100 mL de uma solução contendo 1,0 mL da amostra da fração oleosa do alcatrão de *Eucalyptus* sp. em metanol isento de carbonilas. Em seguida, 1,0 mL desta solução recém-preparada foi diluída com metanol isento de carbonilas para 25 mL de solução. Desta forma, a solução final apresentou um fator de diluição de 2500 em relação à amostra original.

Amostra II: Inicialmente preparou-se 100 mL de uma solução contendo 1,0 mL da amostra da fração oleosa do alcatrão de *Eucalyptus* sp. em metanol isento de carbonilas. Em seguida, 1,0 mL desta solução recém-preparada foi diluída com metanol isento de carbonilas para 50 mL de solução. Desta forma, a solução final apresentou um fator de diluição de 5000 em relação à amostra original.

3.5 Quantificação dos compostos carbonílicos

Em cinco recipientes, devidamente rotulados, adicionou-se 1 mL da solução de 2,4-DNFHi. Em um dos recipientes adicionou-se 1 mL de metanol isento de carbonilas (branco analítico) e nos restantes os volumes de: 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 mL da solução estoque do padrão de Butan-2-ona. Foram preparadas triplicatas de cada padrão e do branco analítico.

Para a leitura das amostras, foram separados quatro recipientes para cada amostra. Em um dos recipientes adicionou-se 1 mL de metanol isento de carbonilas (branco analítico) e nos demais (triplicata) o volume de 1 mL da solução contendo a amostra de interesse diluída.

Adicionou-se uma gota de HCl concentrado à todos os recipientes para acidificar o meio (observou-se uma mudança de cor de laranja para amarelo claro). Agitaram-se bem os conteúdos dos recipientes e estes foram aquecidos em banho-maria por 30 minutos a 50° C. Após o aquecimento, resfriou-se rapidamente os recipientes em água à temperatura ambiente. Os conteúdos foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, devidamente rotulados. Adicionou-se 5 mL da solução de KOH a 10% em cada balão, observando-se o escurecimento da mistura resultante. Completou-se o volume de cada balão usando metanol isento de carbonilas.

Utilizando-se o espectrofotômetro, leu-se em transmitância no comprimento de onda de 480 nm sobre o branco analítico colocado no equipamento. Realizou-se a leitura dos padrões de Butan-2-ona concentrados em mg/100 mL para obter uma curva analítica padrão. Para análise das amostras, foi novamente realizada a leitura de um branco analítico a 480 nm e, em seguida, realizada a leitura das amostras.

Para melhor reprodutibilidade analítica, a leitura da transmitância foi feita de 8 a 15 minutos após a adição da solução de KOH.

3.6 Caracterização dos compostos carbonílicos

A caracterização dos compostos carbonílicos foi realizada pelo estudo dos espectros de massas obtidos em conjunto com o cromatograma. As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás Agilent GC 7890 com detector de Massas Agilent MSD 5975, equipado com amostrador e injetor automático, coluna capilar HP-5MS - 5% Fenil Metil Siloxano (30 m de comprimento, diâmetro interno de 250 µm e 0,25 µm de espessura do filme da fase estacionária). O gás hélio foi usado como gás de arraste, com fluxo igual a 1,4 mL/min. A temperatura do injetor foi ajustada para 225°C e o detector foi utilizado um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo. Para análise dos cromatogramas e espectros foi utilizada a estação de tratamento de dados com biblioteca *NIST 2008*.

Para análise da amostra I (aquosa) foi usada uma rampa de temperatura diferente das demais. Condições de análise: 40°C (5 min)/(5°C/min)/165°C/(20°C/min)/185°C (1 min). O tempo total de corrida foi de 32 minutos. Foi usado o modo split 50:1. Para o preparo da amostra, foram transferidos 60 µL da amostra I (não diluída) para um *vial* de 1,5 mL e o volume foi completado para 1,0 mL com metanol.

Para as amostras oleosas, as condições cromatográficas empregadas foram: 80°C (5 min)/(3°C/min)/165°C(3 min)/(10°C/min)/200°C (1 min). O tempo total de corrida foi de 40,83 minutos. Foi usado o modo split 100:1. Para o preparo das amostras II, III e IV, foram transferidos 30 µL da amostra de interesse (não diluída) para um *vial* e o volume foi completado para 1,0 mL com diclorometano.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Quantitativas

Os compostos carbonílicos reagem com a 2,4-DNFHi em meio ácido formando 2,4-DNFHo's, usualmente produtos de coloração amarelo-avermelhada que apresentam absorção na região do visível.

A reação de condensação entre os compostos carbonílicos e a 2,4-DNFHi foi realizada na presença de catálise ácida (ácido clorídrico) e metanol como solvente.

O mecanismo geral para a reação de condensação de compostos carbonílicos com 2,4-DNFHi na presença de ácido clorídrico é apresentado na Figura 8.

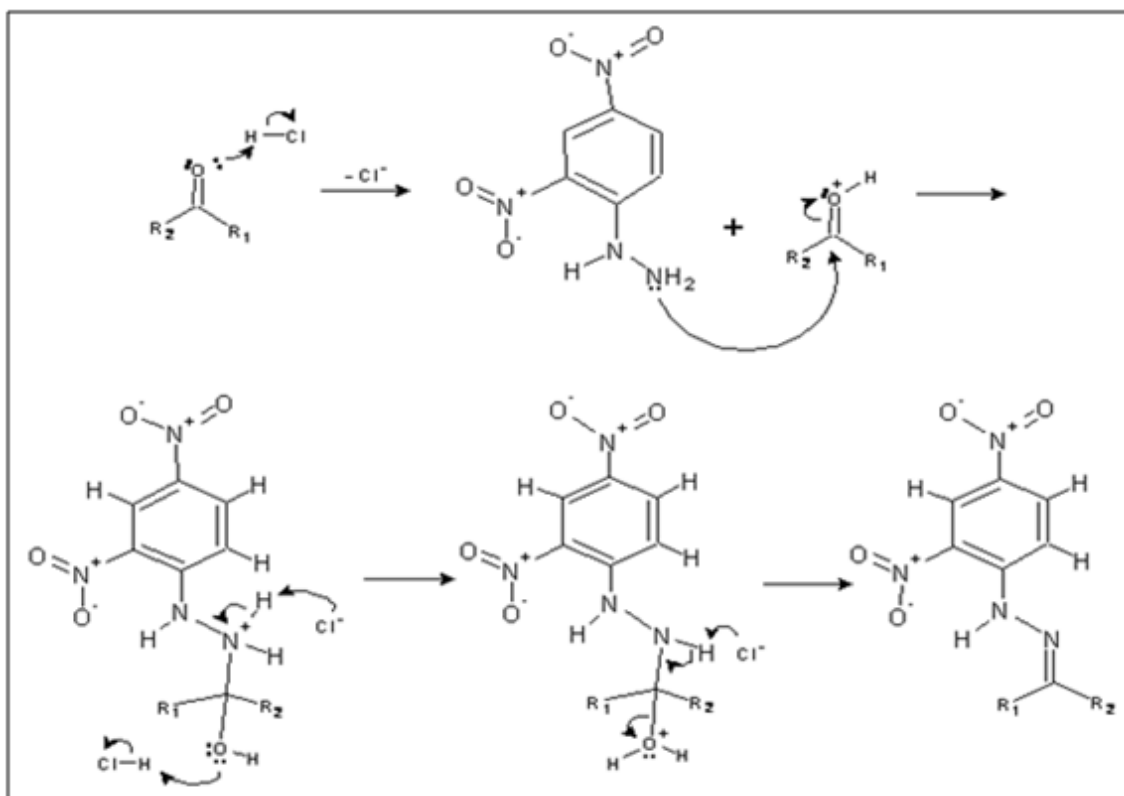


Figura 8 – Mecanismo para a reação de condensação entre compostos carbonílicos e 2,4-DNFHi.

As cadeias carbônicas representadas por R_1 e R_2 nas 2,4-DNFHo's são provenientes dos compostos carbonílicos encontrados nas frações de alcatrão de *Eucalyptus* sp. Em meio básico, ocorre desprotonação do nitrogênio, aumentando a extensão da conjugação na estrutura do produto

e a mudança de cor da solução, conforme ilustrado na Figura 9. A deslocalização eletrônica pode envolver tanto o grupo nitro na posição *para*, quanto aquele em *orto*. Nos experimentos descritos neste trabalho utilizou-se como base uma solução aquosa de hidróxido de potássio.

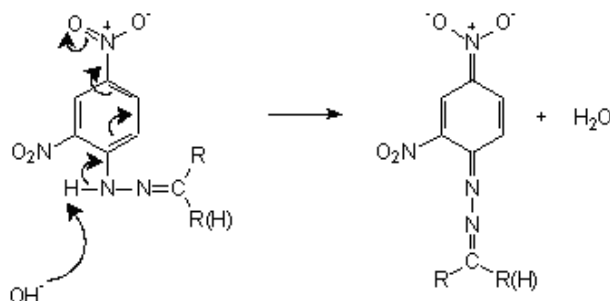


Figura 9 – Reação de desprotonação da 2,4-Dinitrofenil-hidrazona em meio básico.

Para demonstrar a importância da adição de álcali ao meio de reação, realizou-se uma comparação entre os espectros de absorção na região do UV-Vis da solução metanólica de 2,4-DNFHo solubilizada e da 2,4-DNFHo nas condições da análise quantitativa. Para isso, foi sintetizada a 2,4-DNFHo da Butan-2-ona, mediante precipitação com uma solução aquosa ácida de 2,4-DNFHi. O sólido sintetizado foi solubilizado em metanol e, então, obteve-se seu espectro eletrônico de absorção. O espectro da 2,4-DNFHo nas condições da análise quantitativa foi obtido por meio de um dos padrões utilizados na análise. A comparação entre os espectros de varredura podem ser visualizada na Figura 10, p. 22.

Em trabalho anterior do grupo de pesquisa em carboquímica vegetal foram analisados os espectros de absorção na região do UV-Vis das 2,4-DNFHos de compostos carbonílicos presentes nas frações de alcatrão de *Eucalyptus* sp. Os espectros apresentaram o mesmo perfil, demonstrando que essas 2,4-DNFHos possuem os máximos de absorção muito próximos.

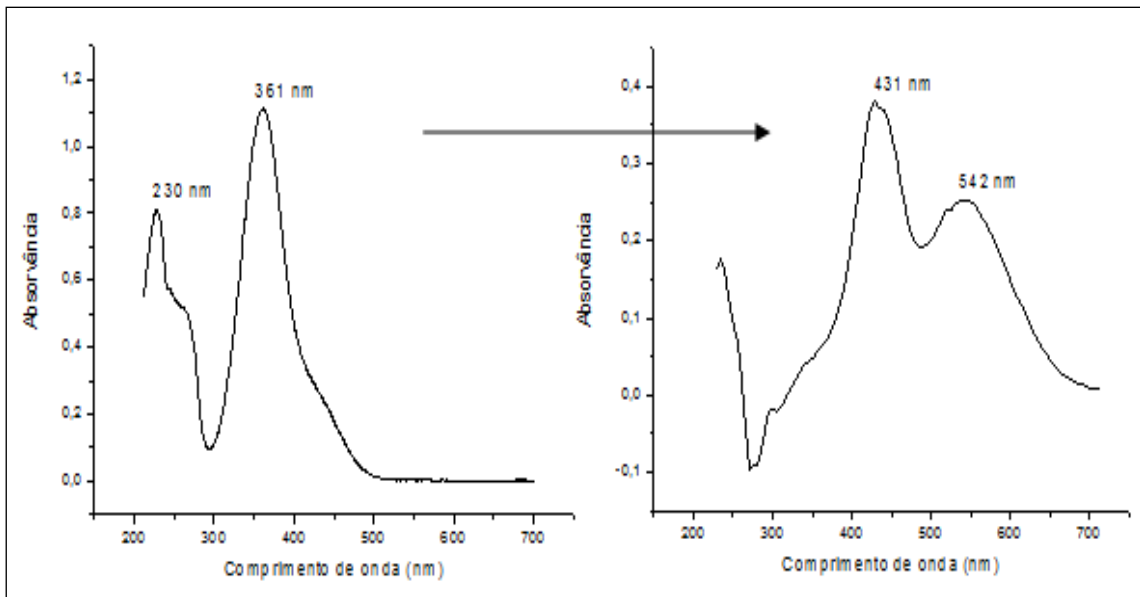


Figura 10 – Espectros na região do UV-Vis para a 2,4-DNFHo de Butan-2-ona em metanol isento de carbonilas.

Com a adição da solução alcalina, observou-se que o aumento da conjugação deslocou os máximos de absorção do ultravioleta (230 e 361 nm) para a região do visível (431 e 542 nm). Esse fato possibilita a utilização de um equipamento mais simples e de menor custo, como o colorímetro, que realiza análises apenas na região do visível, ao invés de um espectrofotômetro de UV-Vis, de custo mais elevado.

4.1.1 Determinação do comprimento de onda de leitura

Para a escolha correta do valor de comprimento de onda de leitura para as amostras de interesse foi feito um espectro de varredura na região do UV-Vis para o padrão de Butan-2-ona. Com podemos observar no espectro mostrado na Figura 11 (p. 23), a amostra apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ a 431 nm e um mínimo a aproximadamente 480 nm.

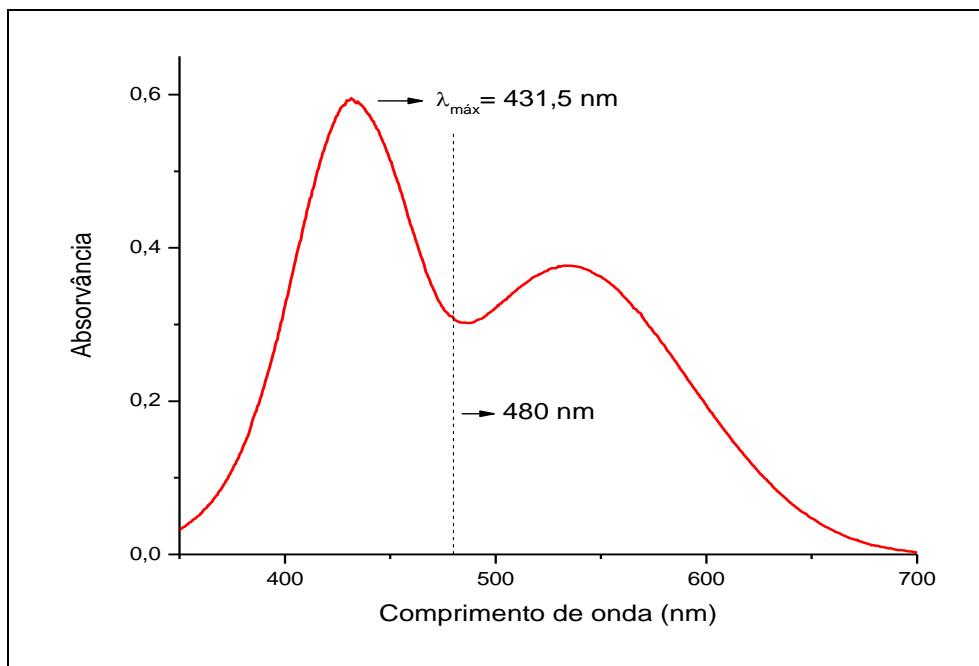


Figura 11 – Espectro de absorção na região do UV-Vis da 2,4-DNFHo do padrão de Butan-2-ona em metanol isento de carbonilas.

A escolha do λ de leitura foi feita baseando-se nos artigos de Lappin *et al.* (1951) e de Jordan *et al.* (1964). No primeiro artigo citado, os autores relatam que o comprimento de onda de 480 nm é o ideal para a leitura das 2,4-DNFHo's, mas não justificam este valor. Já no segundo artigo mencionado, os autores justificam a escolha: nesse comprimento de onda (480 nm) a sensibilidade permite exatidão e a reprodutibilidade na determinação de uma grande quantidade de compostos carbonílicos. Caso o λ escolhido para as determinações fosse 430 nm (λ_{\max}), o ganho de sensibilidade iria extrapolar a faixa ótima de trabalho e possibilitaria a leitura de apenas poucos compostos carbonílicos sem que fossem feitas mudanças nos procedimentos.

Os espectros de varredura na região do UV-Vis apresentados na Figura 12 (p. 24) mostram a degradação linear das 2,4-DNFHo's com o passar do tempo. As curvas 1, 2, 3 e 4 representam espectros obtidos 10, 15, 60 e 120 minutos, respectivamente, após a adição da solução alcoólica de hidróxido de potássio nas amostras contendo 2,4-DNFHo's de (a) heptaldeído, (b) ciclohexanona, (c) 2-heptanona, (d) acetofenona, (e) Butan-2-ona e (f) mistura complexa de alcoóis.

O comprimento de onda de leitura (480 nm) está marcado em todas as curvas. De modo geral, este é o comprimento de onda que apresentou menor taxa de variação com o tempo, possibilitando melhor reprodutibilidade das medidas. Sendo assim, o comprimento de onda escolhido para as análises relatadas neste trabalho foi 480 nm.

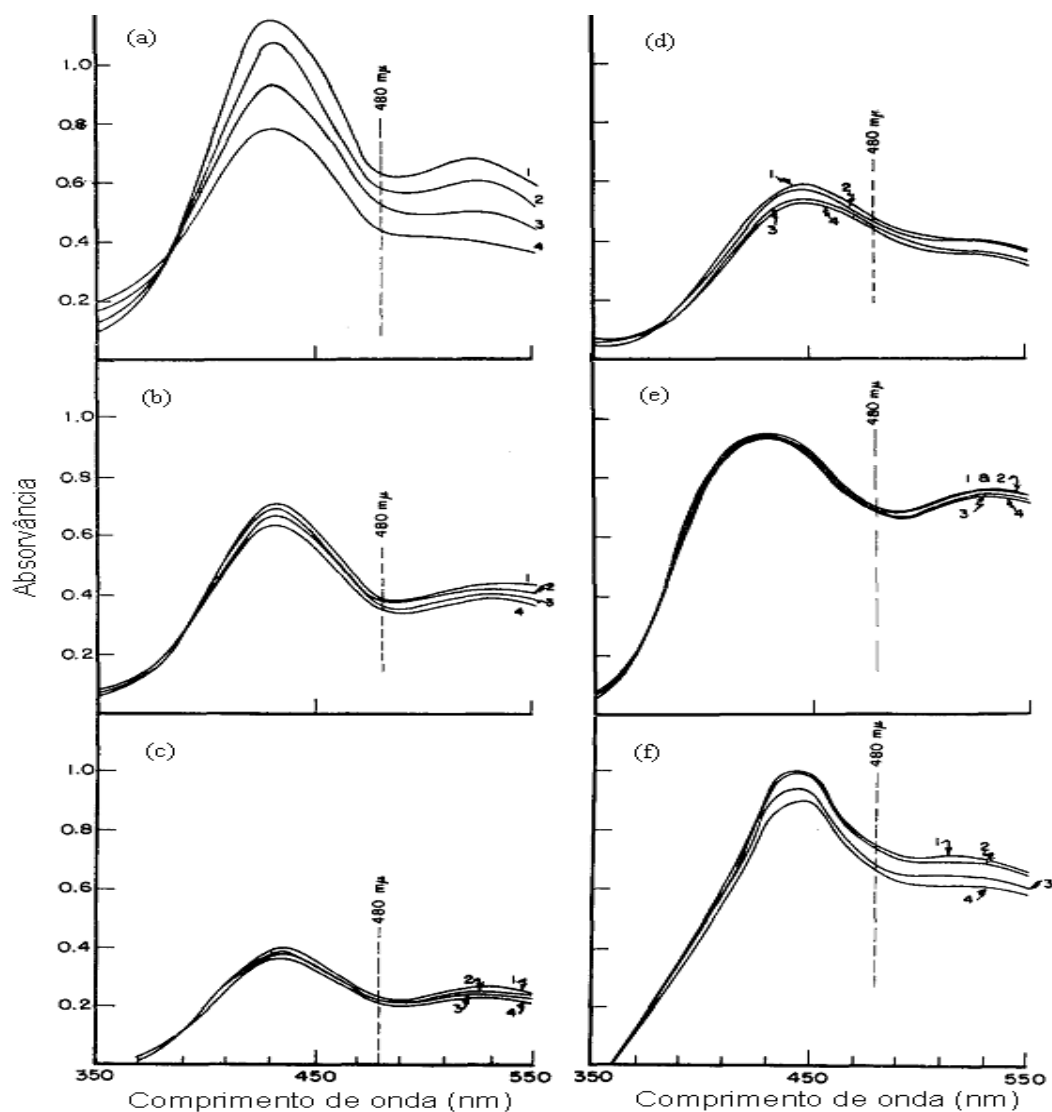


Figura 12 – Curvas de degradação das 2,4-DNFHo's obtidas por Jordan & Veatch.

JORDAN *et al.* (1964) modificado.

4.1.2 Análise da decomposição com o passar do tempo para as amostras das frações de alcatrão de *Eucalyptus* sp.

Foram feitas análises da degradação com o tempo das 2,4-DNFHo's das amostras I, II, III e IV durante os tempos de 10, 20, 30 e 60 minutos após

a adição da solução de hidróxido de potássio. Foi feita a leitura do branco analítico antes de cada varredura e tomados os devidos cuidados com a evaporação do solvente presente na cubeta, com uso de uma tampa e vedando o sistema com papel filme. Os espectros obtidos estão apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16 (p. 25 e 26) e condizem com o que foi observado na literatura.

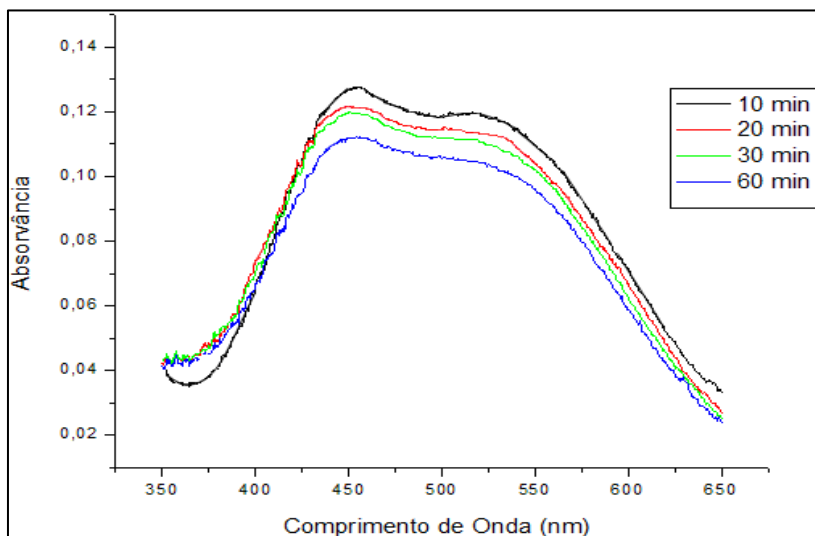


Figura 13 – Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra I.

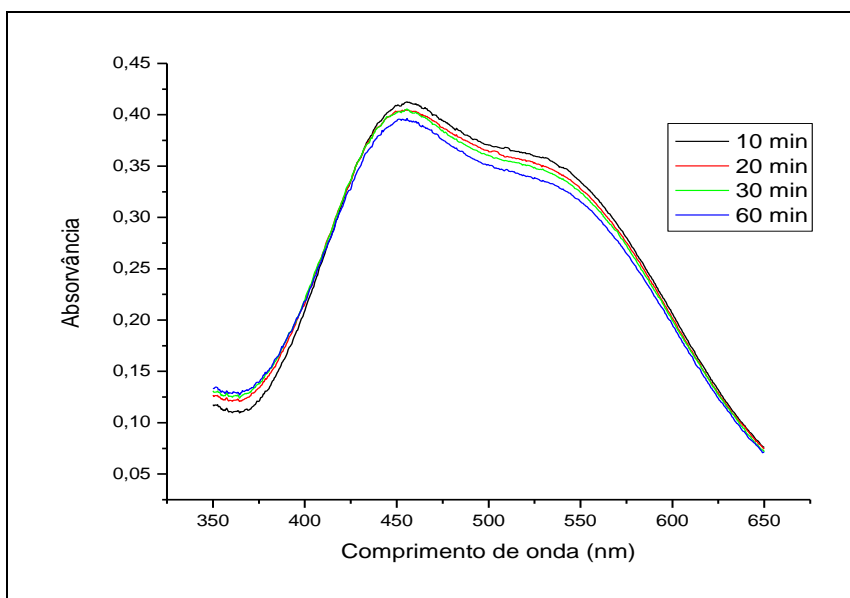


Figura 14 – Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra II.

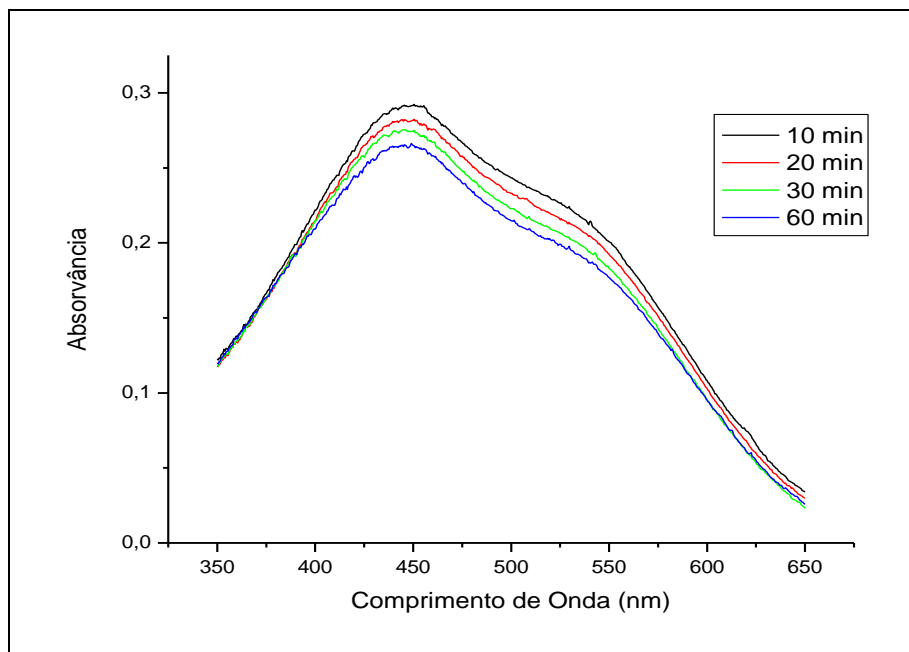


Figura 15 – Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra III.

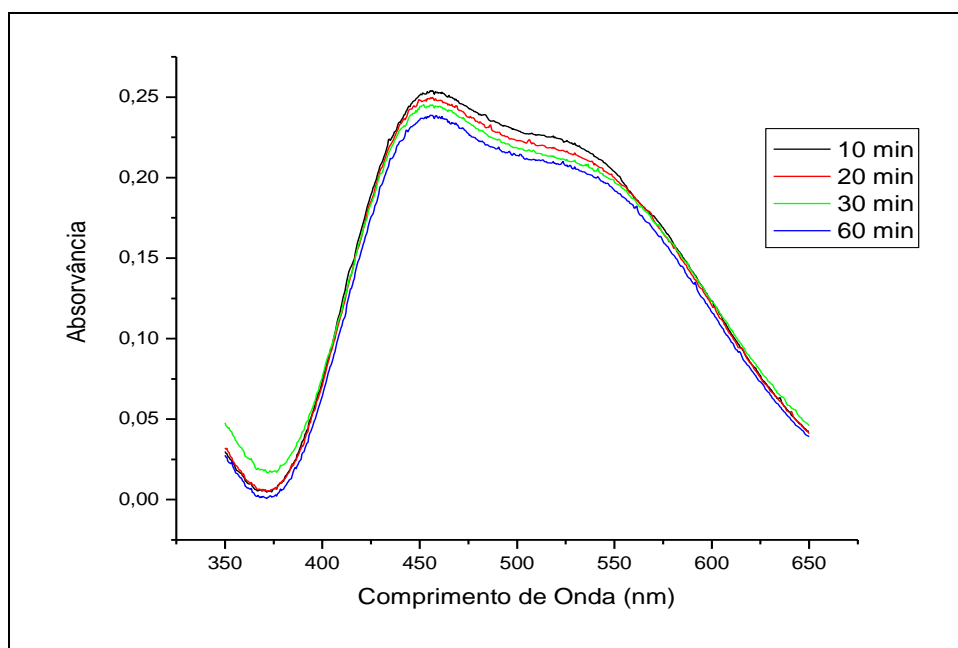


Figura 16 – Espectro UV-Vis de varredura em função do tempo para a Amostra IV.

Após 60 minutos houve um decréscimo de absorvância de 12% para a amostra 1, 10% para a amostra 2, 4% para a amostra 3 e 6% para a amostra 4. Os espectros obtidos estão muito similares àqueles

apresentados na Figura 12 obtidos por Jordan e Veatch. Assim, o tempo de leitura das amostras não pode ser maior do que 20 minutos após a adição da base para não afetar a reprodutibilidade do método. Para o presente trabalho, o tempo realizado foi de 15 minutos após preparo das amostras e padrões.

4.1.3 Obtenção da curva analítica

Os valores de leitura obtidos após análise dos padrões de Butan-2-ona são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da análise dos padrões de Butan-2-ona

Padrões Butan-2-ona	Volume da solução de Butan-2-ona (mL)	Concentração de 2-Butanona (mol L ⁻¹)	Transmitância Média	Absorvância Média	Desvio Padrão
Branco	0,00	0	100,0	0,000	0,000
P1	0,25	1,387 x10 ⁻⁵	74,1	0,130	0,006
P2	0,50	2,770 x10 ⁻⁵	55,4	0,256	0,004
P3	0,75	4,160 x10 ⁻⁵	41,9	0,378	0,009
P4	1,00	5,540 x10 ⁻⁵	31,8	0,498	0,010

Após o cálculo da absorvância média dos padrões de Butan-2-ona, foi construída uma curva analítica da absorvância em função da concentração de Butan-2-ona em mol por litro. A construção da curva analítica é apresentada no Anexo 8.1 (p. 47). O erro relativo no eixo y (referente à absorvância) foi determinado mediante cálculo do desvio padrão dos valores de absorvância média de cada ponto da curva de analítica. A curva analítica obtida pode ser visualizada na Figura 17 (p. 28).

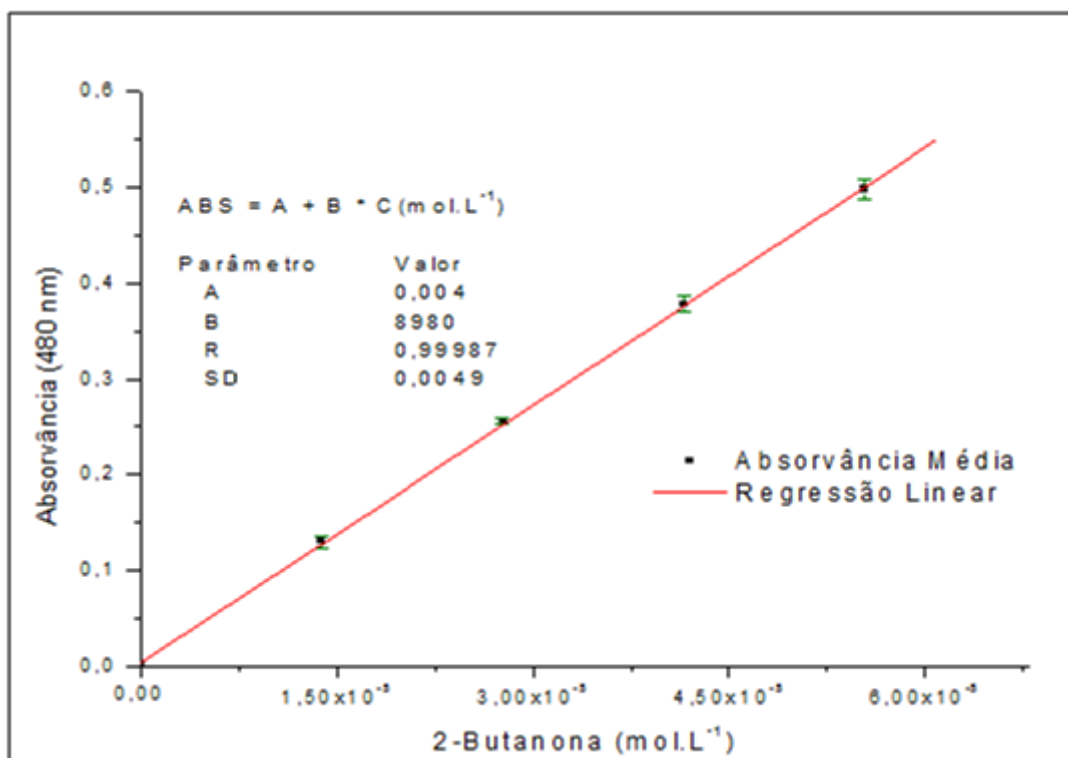


Figura 17 – Curva de analítica do padrão de Butan-2-ona a 480 nm.

A curva obtida possui equação igual a: $Abs = 8980x + 0,004$. O coeficiente de correlação (R) foi de 0,9999.

O limite de detecção (LD) pode ser calculado por meio da Equação 4.

$$LD = \frac{3 \times SD}{coef. angular} \quad (Equação 4)$$

(RIBANI *et al.*, 2004)

em que SD é o desvio padrão da Curva analítica, que apresentou o valor de 0,0049. Logo, o LD é igual a $1,637 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

O limite de quantificação (LQ) é calculado por meio da Equação 5.

$$LQ = \frac{10 \times SD}{coef. angular} \quad (Equação 5)$$

(RIBANI *et al.*, 2004)

O LQ obtido foi de $5,456 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Logo, todos os pontos da curva analítica estão dentro do limite de quantificação.

4.1.4 Padronização do método

Para a padronização do método, foi feita uma solução de concentração conhecida de um composto carbonílico similar ao padrão adotado (Butan-2-ona), utilizando o procedimento descrito no item 3.5 (p. 18), com as modificações descritas a seguir.

Preparou-se uma solução estoque de 2-pentanona de concentração 12,5 µL de 2-Pentanona/100mL de metanol isento de carbonilas. Transferiu-se 0,5 mL dessa solução estoque para um recipiente contendo 1,0 mL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina. Realizou-se a medida quatro vezes.

Logo, a concentração do balão de reação foi calculada da seguinte maneira:

Dados: - Solução Estoque de 2-Pentanona = 12,5 µL/100mL de metanol

- Densidade da 2-Pentanona = 0,81 g mL⁻¹

- Massa Molar da 2-Pentanona = 86,13 g mol⁻¹

Então: Solução Estoque de 2-Pentanona = 10,125 mg/100mL

Foi pipetado um volume de 0,5 mL da solução estoque de 2-pentanona. Esse volume foi diluído para 25 mL. Portanto, a concentração da solução resultante no balão de reação foi calculado pela Equação 6.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (\text{Equação 6})$$

$$0,50\text{mL} \times 10,125\text{mg} / 100\text{mL} = 25\text{mL} \times C \Rightarrow C = 0,2025\text{mg} / 100\text{mL}$$

Convertendo para mol L⁻¹, temos:

$$M = \frac{n \text{ o de mols}}{\text{Volume}_{(\text{litros})}} = \frac{\text{massa}(\text{gramas})}{\text{MassaMolar}(\text{g} / \text{mol}) \times \text{Volume}} = \frac{2,025 \times 10^{-4}}{86,13 \times 0,10} \Rightarrow M = 2,351 \times 10^{-5} \text{ mol} / \text{L}$$

Portanto, o resultado esperado para a solução de 2-pentanona foi de 2,351 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. A Tabela 3 (p. 30) apresenta os resultados obtidos com a leitura da solução de 2-Pentanona. A interpolação foi realizada na curva analítica construída com a leitura dos padrões de Butan-2-ona.

Tabela 3 - Resultados da análise da solução de 2-Pentanona

Amostra	Transmitância	Absorvância	Interpolação na equação da curva analítica	Erro relativo = $\frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}}$
2-Pentanona(1)	61,6	0,210	$2,298 \times 10^{-5}$	0,98 = 2%
2-Pentanona(2)	61,0	0,215	$2,346 \times 10^{-5}$	0,99 = 1%
2-Pentanona(3)	61,7	0,210	$2,290 \times 10^{-5}$	0,97 = 3%
2-Pentanona(4)	61,7	0,210	$2,290 \times 10^{-5}$	0,97 = 3%
Média 2-Pentanona	61,5	0,211	$2,306 \times 10^{-5}$	0,98 = 2%

Como pode ser visualizado na Tabela 3, a média dos resultados apresentou um erro de 2%, considerado satisfatório (menor do que 5%).

OBS: A 2-pentanona utilizada foi caracterizada mediante determinação do índice de refração. O valor obtido experimentalmente, $\eta_d^{22} = 1,3890$, foi comparado àquele descrito na literatura, $\eta_d^{20} = 1,3897$ (O'NEIL, 2006).

4.1.5 Quantificação dos compostos carbonílicos das amostras

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de absorvância obtidos na análise das amostras.

Tabela 4 – Resultado da leitura das amostras

Amostra	Abs (1)	Abs (2)	Abs (3)	Média Abs	Desvio Padrão
I	0,213	0,211	0,214	0,213	$1,42 \times 10^{-3}$
II	0,277	0,263	0,270	0,270	$7,28 \times 10^{-3}$
III	0,417	0,416	0,407	0,413	$5,53 \times 10^{-3}$
IV	0,255	0,261	0,261	0,259	$3,63 \times 10^{-3}$

A partir da curva analítica construída e dos valores de absorvância média registrados para as amostras, fez-se a interpolação dos dados para obter a

concentração das amostras em função da concentração de Butan-2-ona em mol por litro. A concentração foi então multiplicada pelo fator de diluição da amostra (diluição no preparo da amostra) e esse resultado foi multiplicado por 25 (diluição para leitura). Os resultados obtidos em mol por litro foram convertidos para gramas de carbonilas por 100 mL de Fumaça Líquida. Para converter o resultado para gramas de carbonila por 100 mL, multiplicou-se o resultado da concentração em mol L⁻¹ por 2,8. Os resultados estão resumidos no Quadro 1.

Quadro 1 - Teor de compostos carbonílicos nas frações de alcatrão de *Eucalyptus* sp.

Amostra	I	II	III	IV
Teor de Carbonilas (g/100mL)	0,813	10,372	7,974	4,963
Intervalo de Confiança (95%, n=3)	0,813 ± 0,009	10,372 ± 0,478	7,974 ± 0,182	4,963 ± 0,189
Teor de Carbonila em Butan-2-ona (g/100mL)	2,093	26,703	20,529	12,762

Portanto, a amostra II foi a que apresentou maior teor de compostos carbonílicos.

Além das análises realizadas com as amostras de aromas de fumaça provenientes do alcatrão de *Eucalyptus* sp., analisou-se também uma amostra de um aroma de fumaça já comercializado na indústria de alimentos, que foi denominada de amostra V, para comparação. A amostra V foi diluída 5000 vezes em metanol isento de carbonilas. Foi realizada uma triplicata dessa amostra e os resultados estão contidos na Tabela 5 (p. 32).

Tabela 5 – Resultados da análise da amostra V

Amostra	Transmitância	Absorvância	Concentração em gramas de Butan-2-ona/ 100 mL	Resultado em gramas de carbonila/ 100 mL
Amostra V (1)	65,5	0,184	18,78	7,30
Amostra V (2)	65,0	0,187	19,12	7,43
Amostra V (3)	66,7	0,176	17,99	6,99
Média	65,7	0,182	(18,63 ± 0,98)	(7,24 ± 0,38)

A amostra de aroma de fumaça analisada apresentou teor de compostos carbonílicos menor do que as amostras II e III aromas de fumaça provenientes de alcatrão de *Eucalyptus* sp. Com isso, pode-se concluir que, com relação ao teor de compostos carbonílicos, os aromas provenientes do alcatrão de *Eucalyptus* sp. tem grande potencial para uso na indústria como agentes de cor nos alimentos.

4.1.6 Adição de padrão nas amostras

Para comprovar mais uma vez a eficiência do método foram feitas as misturas descritas no Quadro 2.

Quadro 2 – Misturas entre o padrão de Butan-2-ona e as frações de alcatrão de *Eucalyptus* sp.

(1) -1,0 mL de Butan-2-ona = 0,80 gramas de Butan-2-ona	}	1,01 g / 100mL
-10,0 mL de Amostra I = 0,21 gramas de Butan-2-ona		
(2) -1,0 mL de Butan-2-ona = 0,80 gramas de Butan-2-ona	}	1,00 g / 100mL
-1,0 mL de Amostra III = 0,2 gramas de Butan-2-ona		

As misturas foram feitas em um balão de 100 mL e o volume foi completado utilizando água destilada na primeira e metanol isento de carbonilas na segunda.

De acordo com os resultados obtidos nas leituras das amostras apresentadas no Quadro 1, era esperado que essas misturas apresentassem

como resultado aproximadamente 1,0 g / 100 mL expresso em Butan-2-ona. Os resultados obtidos por espectroscopia na região do visível estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da análise das misturas (1) e (2)

Amostra	Transmitância	Absorvância	Concentração de Butan-2-ona em g 100 mL⁻¹	Erro relativo
Mistura 1 (1)	55,0	0,260	1,06	5,53 %
Mistura 1 (2)	57,3	0,242	0,98	1,86 %
Mistura 1 (3)	57,4	0,241	0,98	2,18 %
Média Mistura (1)	56,6	0,247	1,00	0,46 %
Mistura 2 (1)	56,2	0,250	1,02	2,05 %
Mistura 2 (2)	57,3	0,242	0,99	1,35 %
Mistura 2 (3)	59,7	0,224	0,91	8,56 %
Média Mistura (2)	57,7	0,239	0,97	2,67 %

Como observado na Tabela 6, as médias para as misturas apresentaram um erro relativo aceitável (menor do que 5%), o que comprova a eficiência do método.

4.2 Caracterização dos compostos carbonílicos das amostras

A caracterização dos compostos carbonílicos foi feita pela análise de CG-EM. As amostras foram analisadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.6 (p. 19) e os espectros fornecidos foram estudados com o auxílio da biblioteca *NIST 2008*. O objetivo das análises era a identificação dos principais compostos carbonílicos presentes nas amostras que podem atuar como agentes de cor nos alimentos.

A análise da amostra I por CG-EM forneceu o cromatograma da Figura 18. A Tabela 7 apresenta os principais picos identificados na Figura 18, com os respectivos tempos de retenção e atribuição química.

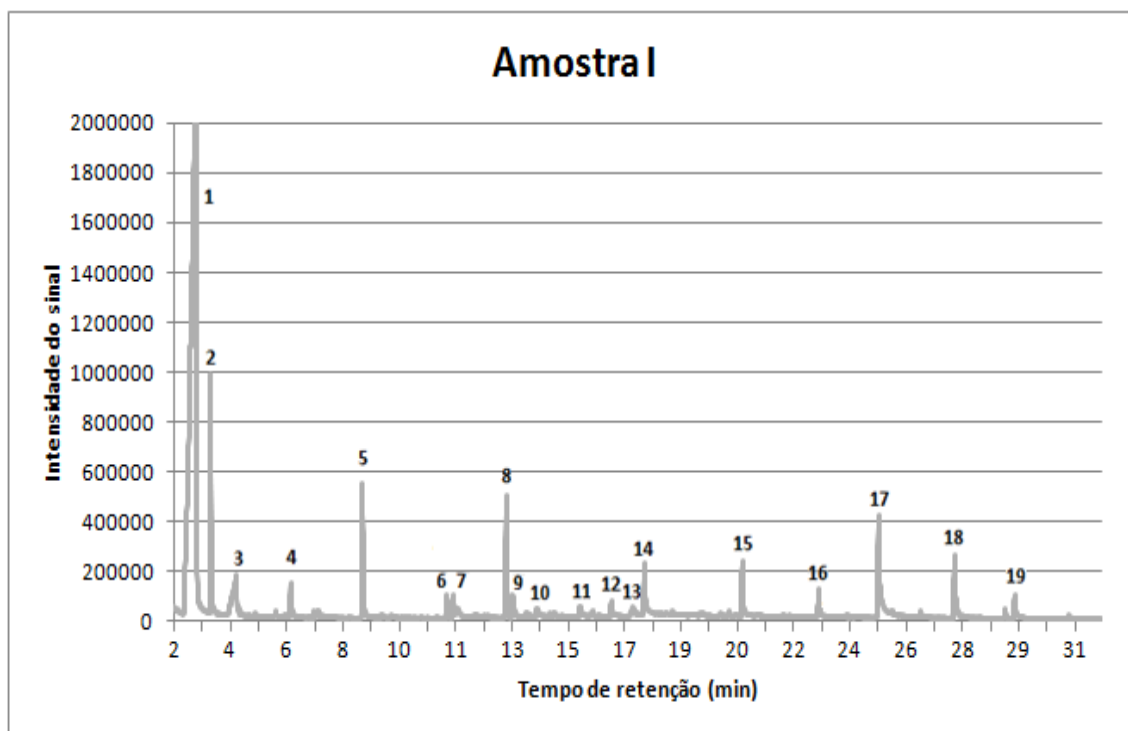


Figura 18 – Cromatograma (CIT) da amostra I.

Tabela 7 – Principais substâncias identificadas na amostra I

Pico	tr (min)	Atribuição
1	3,104	Ácido etanoico (Ácido acético)
2	3,559	1-hidróxi-propan-2-ona*
3	4,380	Ácido propanoico
4	6,857	Ciclopentanona*
5	8,395	Furan-2-carbaldeído (Furfural)*
6	11,300	1-(2-furanil)-etanona (2-Acetilfurano)*
7	11,379	3(H)-di-hidrofuran-2-ona (γ -Butirolactona)*
8	12,991	β -metóxi-(S)-2-furanetanol
9	13,191	5-metil-furan-2-carbaldeído (5-Metil-furfural)*
10	13,969	Fenol
11	15,346	2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona (Cicloteno)*
12	16,352	2-metilfenol (<i>o</i> -Cresol)
13	17,031	3-metilfenol (<i>m</i> -Cresol)
14	17,399	2-metoxifenol (Guaiacol)
15	20,528	4-metil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Metilguaiacol)
16	22,961	4-etil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Etilguaiacol)
17	24,879	2,6-dimetoxifenol (Siringol)
18	27,301	4-metil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Metilsiringol)
19	29,226	4-etil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Etilsiringol)

* Compostos carbonílicos

A análise da amostra II forneceu o cromatograma da Figura 19. A Tabela 8 apresenta os principais picos identificados na Figura 19, com os respectivos tempos de retenção e atribuição química.

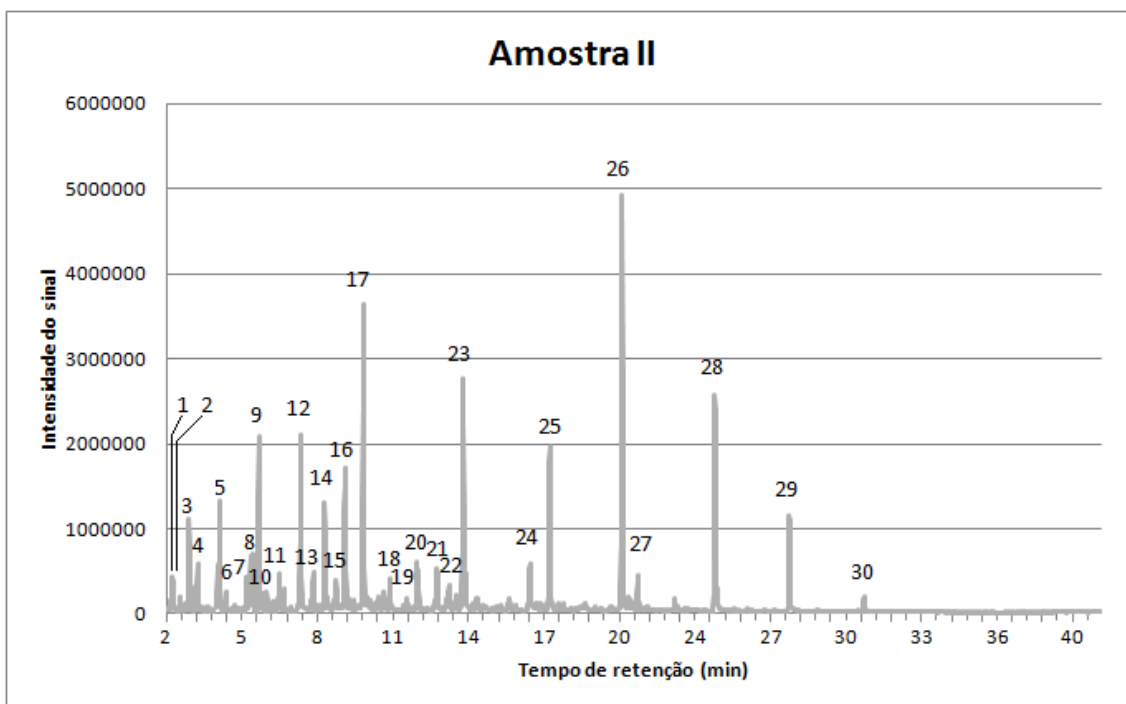


Figura 19 – Cromatograma (CIT) da amostra II.

Tabela 8 – Principais substâncias identificadas na amostra II

Pico	tr (min)	Atribuição
1	2,565	Ácido butanoico
2	2,598	1-hidróxi-butan-2-ona*
3	3,197	Furan-2-carbaldeído (Furfural)*
4	3,519	1-(acetiloxi)-2-propanona*
5	4,317	1-(2-furanil)-etanona (2-Acetilfurano)*
6	4,361	3(H)-di-hidro-2-furanona (γ -Butirolactona)*
7	5,348	3,3-dimetil-butan-2-ona*
8	5,426	1-(acetiloxi)-butan-2-ona*
9	5,429	5-metil-furan-2-carbaldeído (5-Metil-furfural)*
10	5,559	3-metil-2-ciclopenten-1-ona*
11	5,792	Fenol
12	6,546	2,5-di-hidro-3,5-dimetil-2-furanona*
13	7,344	2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona (Cicloteno)*
14	7,810	3,4-dimetil-2-ciclopenten-1-ona*
15	8,209	2-metilfenol (<i>o</i> -Cresol)
16	8,963	3-metilfenol (<i>m</i> -Cresol)
17	9,639	2-metoxifenol (Guaiacol)
18	10,723	3-etil-2-hidróxi-2-ciclopenten-1-ona*

19	11,873	2,3-dimetilfenol (Xilenol)
20	11,924	2,4-dimetilfenol
21	12,717	2,6-dimetilfenol
22	13,829	6-metil-2-metoxifenol (<i>o</i> -Metilguaiacol)
23	13,931	4-metil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Metilguaiacol)
24	16,629	3-metóxi-1,2-di-hidroxibenzeno (3-Metoxicatecol)
25	17,498	4-etil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Etilguaiacol)
26	20,553	2,6-dimetoxifenol (Siringol)
27	21,218	2-metóxi-4-propil-fenol (<i>p</i> -Propilguaiacol)
28	24,477	4-metil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Metilsiringol)
29	27,622	4-etil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Etilsiringol)
30	30,805	4-propil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Propilsiringol)

* Compostos carbonílicos

A análise da amostra III forneceu o cromatograma da Figura 20. A Tabela 9 apresenta os principais picos identificados na Figura 20, com os respectivos tempos de retenção e atribuição química.

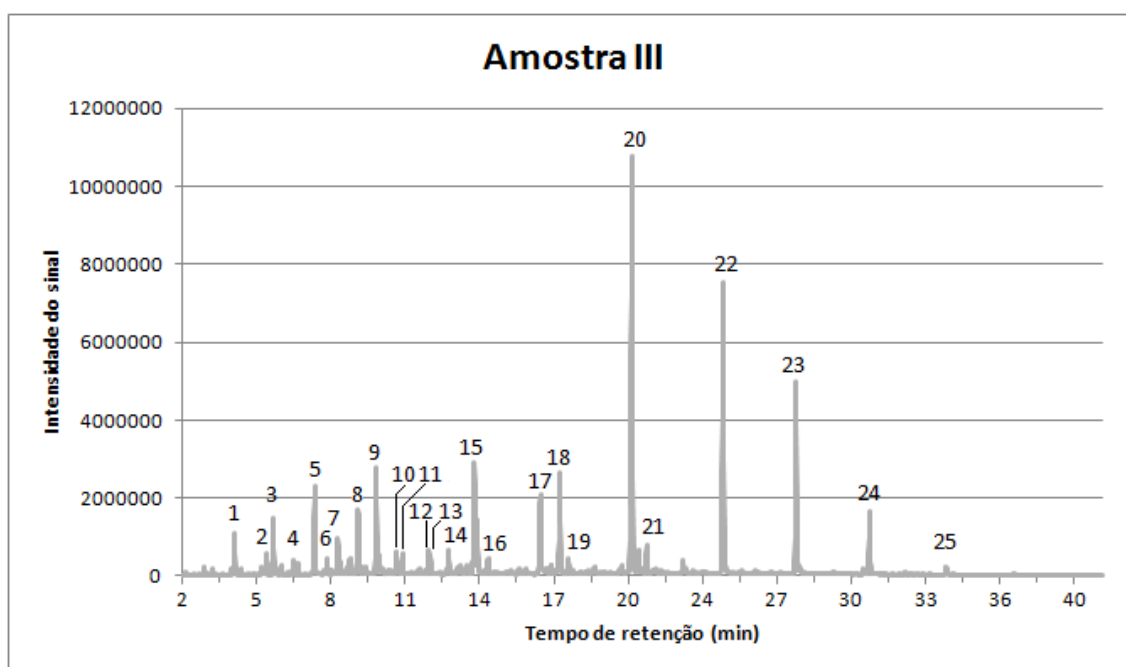


Figura 20 – Cromatograma (CIT) da amostra III.

Tabela 9 – Principais substâncias identificadas na amostra III

Pico	tr (min)	Atribuição
1	4,361	3(H)-di-hidro-2-furanona (γ -Butirolactona)*
2	5,559	3-metil-2-ciclopenten-1-ona*
3	5,792	Fenol
4	6,546	2,5-di-hidro-3,5-dimetil-2-furanona*
5	7,344	2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona (Cicloteno)*

6	7,810	3,4-dimetil-2-ciclopenten-1-ona*
7	8,209	2-metil-Phenol (<i>o</i> -Cresol)
8	8,963	3-metil-fenol (<i>m</i> -Cresol)
9	9,639	2-metoxifenol (Guaiacol)
10	10,475	2-hidróxi-3-metil-4(H)-piran-4-ona (Maltol)*
11	10,723	3-etil-2-hidróxi-2-ciclopenten-1-ona*
12	11,873	2,3-dimetilfenol (Xilenol)
13	11,924	2,4-dimetilfenol
14	12,717	2,6-dimetilfenol
15	13,829	4-metil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Metilguaiacol)
16	13,944	1,2-di-hidróxi-benzeno (Catecol)
17	16,667	3-metóxi-1,2-di-hidroxibenzeno (<i>m</i> -Metoxicatecol)
18	17,498	4-etil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Etilguaiacol)
19	17,856	4-metil-1,2-di-hidroxibenzeno (<i>p</i> -Metilcatecol)
20	20,566	2,6-dimetoxifenol (Siringol)
21	21,218	4-propil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Propilguaiacol)
22	24,516	4-metil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Metilsiringol)
23	27,635	4-etil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Etilsiringol)
24	30,805	4-propil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Propilsiringol)
25	34,103	4-(2-propenil)-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Alilsiringol)

* Compostos carbonílicos

A análise da amostra IV forneceu o cromatograma da Figura 21. A Tabela 10 (p. 38) apresenta os principais picos identificados na Figura 21, com os respectivos tempos de retenção e atribuição química.

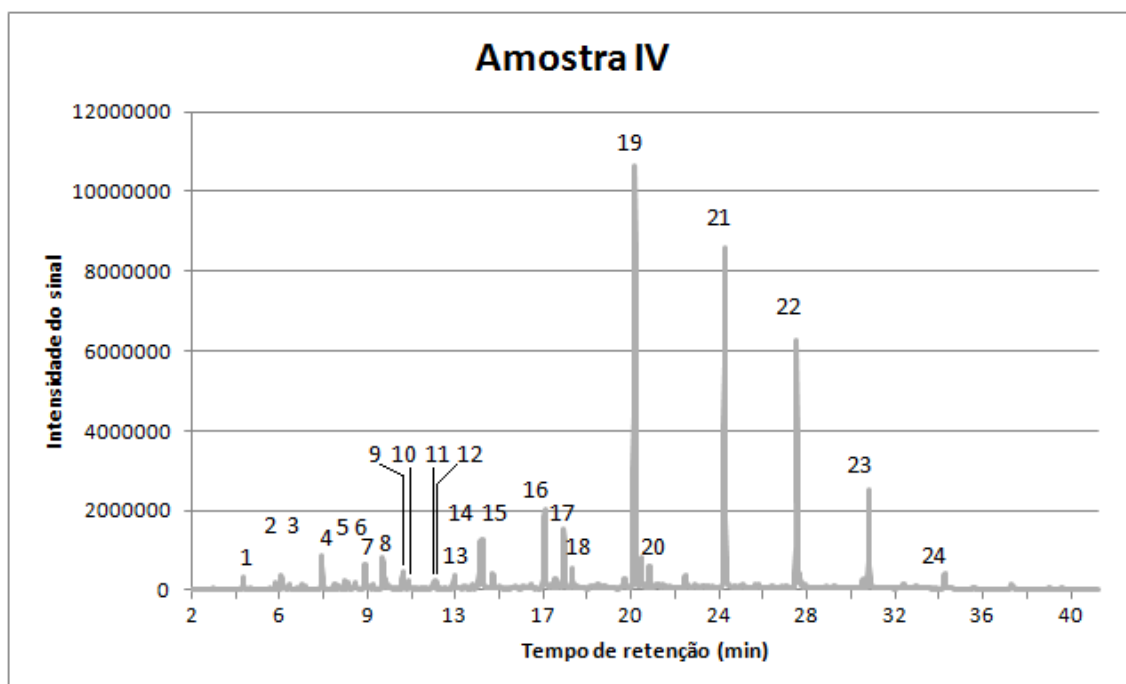


Figura 21 – Cromatograma (CIT) da amostra IV.

Tabela 10 – Principais substâncias identificadas na amostra IV

Pico	tr (min)	Atribuição
1	4,361	3(H)-di-hidro-2-furanona (γ -butirolactona)*
2	5,559	3-metil-2-ciclopenten-1-ona*
3	5,792	Fenol
4	7,322	2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona (Cicloteno)*
5	7,810	3,4-dimetil-2-ciclopenten-1-ona*
6	8,209	2-metil-fenol (<i>o</i> -cresol)
7	8,952	3-metil-fenol (<i>m</i> -cresol)
8	9,639	2-metoxifenol (Guaiacol)
9	10,467	2-hidróxi-3-metil-4(H)-piran-4-ona (Maltol)*
10	10,723	3-etil-2-hidróxi-2-ciclopenten-1-ona*
11	11,873	2,3-dimetilfenol (Xilenol)
12	11,924	2,4-dimetilfenol
13	12,729	2,6-dimetilfenol
14	13,816	6-metil-2-metoxifenol (<i>o</i> -Metilguaiacol)
15	13,931	4-metil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Metilguaiacol)
16	16,667	3-metóxi-1,2-di-hidroxibenzeno (<i>m</i> -Metoxicatecol)
17	17,498	4-etil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Etilguaiacol)
18	17,855	4-metil-1,2- di-hidroxibenzeno (<i>p</i> -Metilcatecol)
19	20,553	2,6-dimetoxifenol (Siringol)
20	21,230	4-propil-2-metoxifenol (<i>p</i> -Propilguaiacol)
21	24,515	4-metil-2,6- dimetoxifenol (<i>p</i> -Metilsiringol)
22	27,647	4-etil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Etilsiringol)
23	30,805	4-propil-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Propilsiringol)
24	34,103	4-(2-propenil)-2,6-dimetoxifenol (<i>p</i> -Alilsiringol)

* Compostos carbonílicos

Os compostos das Tabelas 7 a 10 que estão destacados com “*” são compostos carbonílicos. A Figura 22 (p. 39) apresenta as fórmulas estruturais dos compostos carbonílicos identificados.

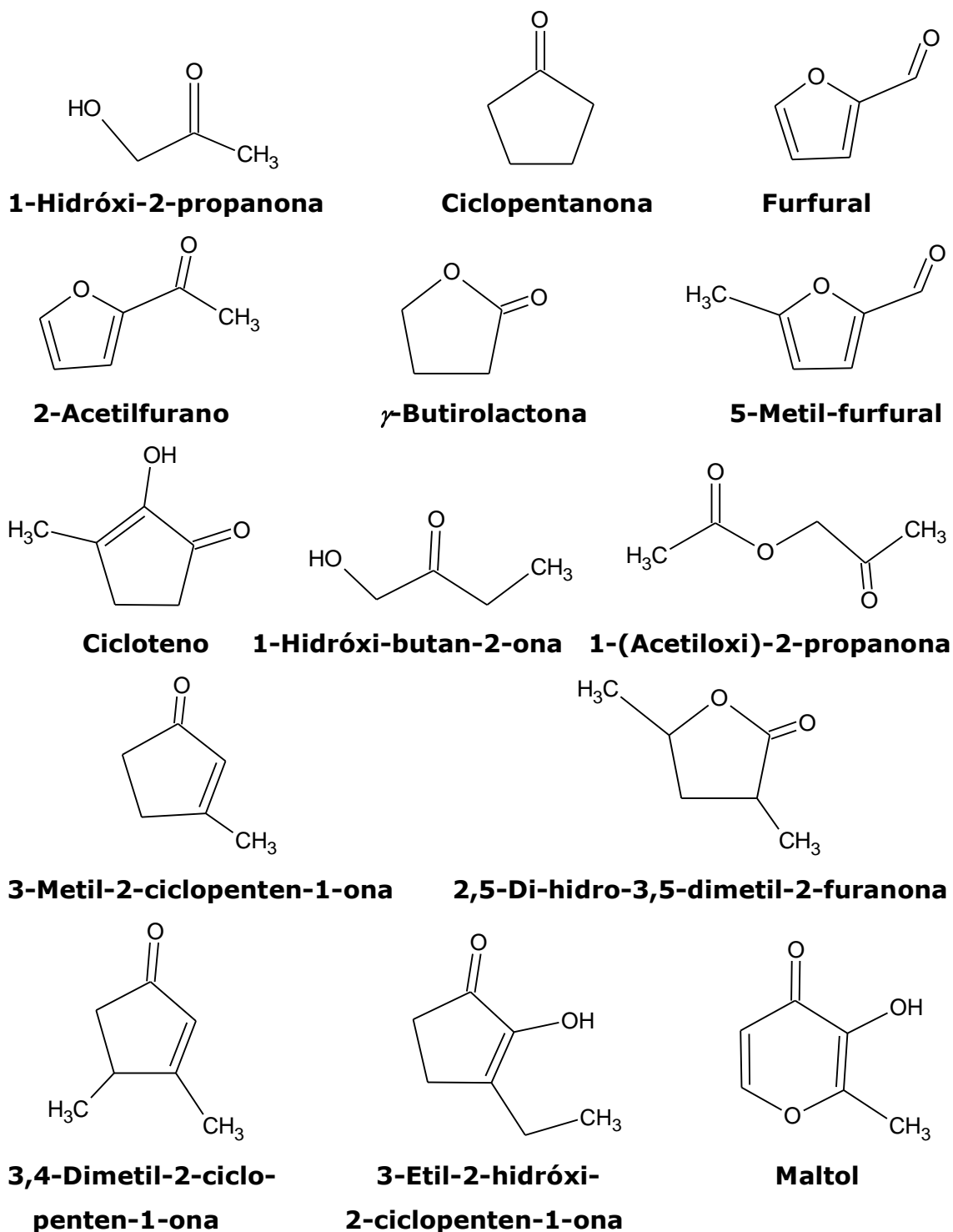


Figura 22 – Estruturas dos compostos carbonílicos identificados.

Foram identificados sete compostos carbonílicos na amostra I, 13 na amostra II, sete na amostras III e seis na amostra IV. Verificou-se, nas amostras analisadas, a presença de três classes de compostos: ácidos carboxílicos, carbonílicos e fenólicos, conforme informado pela literatura (CARAZZA *et al.*, 2000). Como a amostra I foi analisada por um

procedimento diferente das demais, não é possível realizar uma comparação efetiva com os outros espectros. Porém, os cromatogramas das amostras oleosas podem ser comparados entre si qualitativamente.

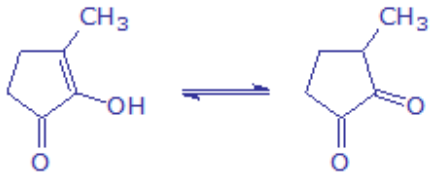
A amostra II apresentou maior intensidade do sinal dentre as outras amostras. Esse fato pode ser verificado observando os valores de abundância relativa no cromatograma apresentado na Figura 19 (p. 35). Além disso, a amostra II apresentou maior concentração de substâncias com baixos valores de t_r , sendo muitos deles identificados como compostos carbonílicos, de maior volatilidade e/ou menor polaridade.

Os cromatogramas das amostras III e IV apresentam mesma escala de abundância relativa. Realizando a comparação dos gráficos é possível observar que a amostra III apresenta maior intensidade do sinal para os compostos carbonílicos identificados do que a amostra IV. Com isso, pode-se verificar uma correlação positiva entre os cromatogramas apresentados e os resultados obtidos com a análise quantitativa.

STUCKENBRUCK (1990) caracterizou as frações de alcatrão de *Eucalyptus* sp. por meio de análises por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com Detector de Ionização em Chama (CGAR-DIC) e Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas (CGAR-EM). Os compostos identificados neste trabalho também estão presentes nas análises feitas por STUCKENBRUCK, podendo concluir que o presente trabalho apresentou resultados que estão de acordo com a literatura.

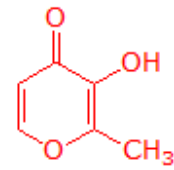
A partir da identificação dos constituintes do alcatrão de *Eucalyptus* sp., observou-se que alguns destes constituintes também estão presentes na natureza e podem ser utilizados na indústria de alimentos como aditivos flavorizantes (CARAZZA *et al.*, 2000). Dois importantes compostos carbonílicos identificados e já utilizados nesse ramo são o 2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona (Cicloteno) e o 2-hidróxi-3-metil-4(H)-piran-4-ona (Maltol) que apresentam o "flavor" caramelo/doce e são encontrados no café e no cacau (BELITZ *et al.*, 1999). O cicloteno encontra-se em equilíbrio ceto-enólico, como pode ser observado na Figura 23 (p. 41).

CICLOTENO



**2-Hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona ou
3-metil-1,2-ciclopentadiona**

MALTOL



3-Hidroxi-2-metil-piran-4-ona

Figura 23 – Estruturas químicas do Cicloteno e Maltol.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho realizou-se a determinação de compostos carbonílicos em amostras de aromas de fumaça por meio da aplicação da metodologia proposta por Lappin *et al.* (1951). A metodologia utilizada apresentou resultados satisfatórios para determinação de pequenas concentrações de compostos carbonílicos em soluções ($LD = 1,637 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $LQ = 5,456 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Para amostras com grandes concentrações de compostos carbonílicos é necessário um alto fator de diluição, entretanto, verificou-se que esse fator não compromete a análise, pois os resultados encontrados apresentaram boa exatidão (erro relativo satisfatório) e reprodutibilidade (desvio padrão pequeno).

As análises da degradação da cor formada após a adição de KOH foram feitas para as amostras das frações de alcatrão de *Eucalyptus* sp. e o resultado final obtido apresentou concordância com àqueles descritos na literatura. Após 60 minutos houve um decréscimo no valor da absorvância de 12% para a amostra 1, 10% para a amostra 2, 4% para a amostra 3 e 6% para a amostra 4.

O método foi padronizado mediante análise de uma solução de 2-pentanona de concentração conhecida, obtendo um erro relativo de 2% em média. De acordo com os dados apresentados no Quadro 1 (p. 31), as amostras II e III, correspondentes às frações oleosas leve e intermediária, respectivamente, apresentaram maior teor de compostos carbonílicos. Dessa forma, elas representam potenciais agentes de cor nos alimentos, quando utilizados como aromas de fumaça, devido à reação de Maillard.

Mediante caracterização das amostras por CG-EM, foram identificados os principais compostos carbonílicos presentes nas amostras. Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados das análises quantitativas e informações encontradas na literatura.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos pelo método de quantificação de compostos carbonílicos possibilitaram a sua aplicação no controle de qualidade das frações do alcatrão de *Eucalyptus* sp. na Biocarbo Indústria e Comércio Ltda.

A realização deste trabalho motivou o desenvolvimento de outras metodologias para o estudo e controle de qualidade de aromas de fumaça, como, por exemplo, o desenvolvimento de metodologias para a determinação do teor de compostos fenólicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, C. F. H.; The identification of carbonyl compounds by use of 2,4-dinitrophenylhydrazine. **Anal. Chem.** v. 52, p. 2955-2959, 1930.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. 4ª ed. Viçosa: Ed. UFV, 2008.
- ARMENTEROS, M. HEINONEN, M.; OLLILAINEN, V.; TOLDRÁ, F.; ESTÉVEZ, M. Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS). **Meat Science**. v. 83, p. 104-112, 2009.
- BAÑOS, C.E.; SILVA, M. In situ continuous derivatization/pre-concentration of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine in aqueous samples by solid-phase extraction. Application to liquid chromatography determination of aldehydes. **Talanta**. v. 77, p. 1597-1602, 2009.
- BELITZ, H.D., GROSH, W. **Food chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- CARAZZA, F.; OKUMA, A. A. Alcatrão de Eucalyptus: Fonte de Aromas e Sabores. Associação Brasileira de Metalurgia e Materias. v.1, p. 271 - 279, 2000.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DASGUPTA, P. K.; ZHANG, G.; SCHULZE, S.; MARX, J. N. Measurement of Carbonyl Compounds as the 2,4-Dinitrophenylhydrazonate Anion. Reaction Mechanism and an Automated Measurement System. **Anal. Chem.** v. 66, n. 13, p. 1965-1970, 1994.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- GOMES, P. A.; OLIVEIRA, J. B. Teoria da Carbonização da Madeira, In: PENEDO, W. R. Uso da madeira para fins energéticos, Belo Horizonte, CETEC, 1980, p. 27-41.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- IDDLES, H. A.; LOW, A. W.; ROSEN, B. D.; HART, R. T. Determination of Carbonyl Compounds by Means of 2,4-Dinitrophenylhydrazine. **Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.**, v. 11, n. 2, p. 102-103, 1939.
- JONES, L. A.; HOLMES, J. C.; SELIGMAN, R. B. Spectrophotometric Studies of Some 2,4-Dinitrophenylhydrazones. **Anal. Chem.** v. 28, p. 191-198, 1956.
- JORDAN, D. E.; VEATCH, F. C. Spectrophotometric determination of trace concentrations of carbonyl compounds. **Anal. Chem.** v. 36, n. 1, p. 120-124, 1964.
- LAPPIN, G. R.; CLARK, L. C. Colorimetric method for determination of traces of carbonyl compounds. **Anal. Chem.** v. 23, n. 3, p. 541-542, 1951.
- MAILLARD, L. C., Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. **C. R. Acad. Sci. Ser.** v. 154, n. 2, p. 66-68, 1912.

MATHEWSON, W. E. The combination of fractionation with spectrophotometry in proximate organic analysis. **J. Am. Chem. Soc.** v. 42, p. 1277, 1920.

OLIVA-TELES, M. T.; PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M. Determination of free formaldehyde in foundry resins as its 2,4-dinitrophenylhydrazone by liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta.** v. 467, p. 97-103, 2002.

O'NEIL, M. J. The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 14^a Ed. New Jersey: Merck, 2006.

OKUMA, A. A. Estudo da fração siringila do alcatrão de Eucalyptus sp. como insumo químico. 2004. 246 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OKUMA, A. A.; MAIA, A. B.; CARAZZA, F.; CARVALHO, M. E. M. D. de. Teor de compostos fenólicos em queijos defumados. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 21., 2002, Uberlândia: Sociedade Brasileira de Química, 2007.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova.** v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBERTS, J. D.; GREEN, C. Absorption Spectra of Some 2,4-Dinitrophenylhydrazones. **Anal. Chem.** v. 68, p. 214-216, 1946.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** São Paulo: Cengage Learning, 2006.

STUCKENBRUCK, P. Estudos de alcatrões vegetais por CGAR e seu acoplamento à Espectrometria de Massas: Análise do óleo de alcatrão de Eucalyptus citriodora. 1990, 270 p. (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

STUCKENBRUCK, P.; AQUINO NETO, F. R.; CARAZZA, F. Análise do óleo de alcatrão de Eucalyptus citriodora por CGAR-EM/C. In: ENCONTRO DE CARBOQUÍMICA, 2., 1985, Salvador. Conferências... Salvador: Associação Brasileira de Metais, 1989. 408p.

VAN LEEUWEN, S. M.; HENDRIKSEN, L.; KARST, U. Determination of aldehydes and ketones using derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine and liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** v. 1058, p. 107-112, 2004.

VIEIRA, F. S. V.; REBOUÇAS, M. V.; ANDRADE, J. B. Determinação de compostos carbonilados e carboxilados em derivados de petróleo. **Quim. Nova.** v. 35, n. 8, p. 1644-1656, 2012.

YUKAWA, N.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T. Determination of total carbonyl compounds in aqueous media. **J. Am. Chem. Soc.** v. 70, n. 9, p. 881-884, 1993.

8. ANEXOS

8.1 Construção da curva analítica

Os dados obtidos foram tratados em um programa de computador. O valor de transmitância foi convertido em absorvância utilizando a equação 2:

$$A = 2 - \log T \quad (\text{Equação 2})$$

A construção do gráfico foi feita colocando-se os valores de absorvância (eixo Y) em função dos valores das concentrações dos padrões (eixo X). Em seguida, fez-se uma análise linear dos dados, obtendo-se uma reta do tipo: $Y = BX + A$. Quando os dados são plotados é fornecido um coeficiente de correlação, indicado pela letra "R". Quanto mais próximo de 1,0 for o valor de R obtido pela análise linear, mais próximos da linearidade estarão os dados plotados.

A concentração dos balões de reação contendo os volumes da solução padrão foi calculada da seguinte maneira:

Dados: - Solução Estoque de Butan-2-ona = 12,5 μ L/100mL de metanol

-Densidade da Butan-2-ona = 0,80 g/mL

- Massa Molar da Butan-2-ona = 72,11 g/mol

Então: Solução Estoque de Butan-2-ona = 10,00 mg/100mL

Exemplo: foi pipetado um volume de 0,25 mL da Solução Estoque de Butan-2-ona. Esse volume foi diluído para 25 mL. Portanto, a concentração da solução resultante no balão de reação pode ser calculado pela equação 6:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (\text{Equação 6})$$

$$0,25\text{mL} \times 10\text{mg}/100\text{mL} = 25\text{mL} \times C \Rightarrow C = 0,10\text{mg}/100\text{mL}$$

Convertendo para mol L⁻¹ temos:

$$M = \frac{n \text{ o de mols}}{\text{Volume}_{(\text{litros})}} = \frac{\text{massa(gramas)}}{\text{MassaMolar (g / mol)} \times \text{Volume}} = \frac{1,0 \times 10^{-4}}{72,11 \times 0,10} \Rightarrow M = 1,387 \times 10^{-5} \text{ mol / L}$$

Os cálculos para os padrões de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mL foram feitos da mesma maneira. Dessa forma, as soluções padrões dos balões de reação serão:

Branco analítico = 0,0 = 0,0 mg de Butan-2-ona/100mL

P1 = 0,25 mL de solução estoque = $1,387 \times 10^{-5}$ mol/L = 0,10 mg de Butan-2-ona/100mL

P2 = 0,50 mL de solução estoque = $2,773 \times 10^{-5}$ mol/L = 0,20 mg de Butan-2-ona/100mL

P3 = 0,75 mL de solução estoque = $4,160 \times 10^{-5}$ mol/L = 0,30 mg de Butan-2-ona/100mL

P4 = 1,00 mL de solução estoque = $5,547 \times 10^{-5}$ mol/L = 0,40 mg de Butan-2-ona/100mL