

**João Rodrigo da Silva Santos**

Licenciado em Química

Determinação do *trans*-2-nonenal em Cerveja por  
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com  
Detecção Espectrofotométrica



Dissertação para Mestrado em Química  
na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



**João Rodrigo da Silva Santos**  
Licenciado em Química

**Determinação do *trans*-2-nonenal em Cerveja por  
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com  
Detecção Espectrofotométrica**



**Dissertação para Mestrado em Química na  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**

**Porto, Janeiro de 2002**

# *Agradecimentos*

Gostaria de agradecer, em especial, ao meu orientador, Doutor José António Maia Rodrigues, por todos os ensinamentos que me deu, por toda a paciência e por todo o apoio facultado, sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Aquiles Araújo Barros, a oportunidade que me deu de poder trabalhar no seu grupo de investigação. Foi para mim um enorme privilégio.

Ao doutor Luís Guilherme Guido, por todo o interesse demonstrado e valiosa ajuda que dedicou durante este trabalho.

Ao doutor Pedro Miguel Rodrigues, pela amizade e pelos muitos favores que me prestou.

Ao Doutor Paulo Joaquim Almeida, pela boa camaradagem e auxílio sempre prestado.

A todos os colegas de bancada, Carla, Ana, Ricardo, Mário, Paula, Clara, Marta, Sérgio e Tiago, com os quais passei muitos e bons momentos.

A todos os meus colegas de curso. Inexcedíveis.

À UNICER S.A. e seu quadro, pelo profissionalismo e hospitalidade sempre demonstrados.

À minha família

o meu muito obrigado

# Índice Geral

Agradecimentos . . . . .	i
Índice Geral . . . . .	iii
Índice de Figuras . . . . .	vii
Índice de Tabelas . . . . .	xiii
Resumo . . . . .	xvii
Abstract . . . . .	xix

## Parte I – Fundamentação do tema

<b>1. – Aspectos gerais sobre a cerveja.</b> . . . . .	<b>3</b>
1.1. – A cerveja através dos tempos . . . . .	3
1.2. – O processo de fabrico da cerveja . . . . .	4
1.2.1. – Matérias primas usadas no fabrico da cerveja . . . . .	4
1.2.2. – Etapas no processo de fabrico da cerveja . . . . .	5
1.3. – A estabilidade organoléptica da cerveja . . . . .	6
1.4. – Caracterização organoléptica da cerveja . . . . .	9
1.5. – A influência dos compostos carbonílicos . . . . .	11
<b>2. – Reactividade de compostos carbonílicos</b> . . . . .	<b>15</b>
2.1. – Introdução . . . . .	15
2.2. – Algumas reacções de adição nucleófilas . . . . .	17
2.2.1. – Adição da molécula de água . . . . .	17
2.2.2. – Adição de aminas . . . . .	19
2.2.3. – Condensação aldólica. . . . .	21
2.2.4. – Adição de hidrogenossulfito . . . . .	22
2.3. – Tautomerismo entre as formas carbonilo e enol . . . . .	23
2.4. – Oxidação / redução de compostos carbonílicos . . . . .	25
<b>3. – O <i>trans</i>-2-nonenal na cerveja</b> . . . . .	<b>27</b>
3.1. – Introdução . . . . .	27
3.2. – Equilíbrios que condicionam o teor de <i>trans</i> -2-nonenal no processo de fabrico da cerveja. . . . .	30

3.3. – Vias potenciais de formação e equilíbrios que condicionam o teor de <i>trans</i> -2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja . . . . .	31
3.3.1. – Oxidação de ácidos gordos . . . . .	32
3.3.1.1. – Auto-oxidação de ácidos gordos . . . . .	33
3.3.1.2. – Foto-oxidação de ácidos gordos . . . . .	35
3.3.1.3. – Mecanismo iónico de degradação de ácidos gordos . . . . .	36
3.3.2. – Outras vias potenciais de formação de <i>trans</i> -2-nonenal . . . . .	37
3.3.3. – Alguns equilíbrios prováveis que envolvem o <i>trans</i> -2-nonenal . . . . .	38
3.3.3.1. – Equilíbrios de isomerização entre o <i>trans</i> -2-nonenal e o <i>cis</i> -3-nonenal . . . . .	38
3.3.3.2. – Equilíbrios de formação de bases de <i>Schiff</i> . . . . .	38
3.3.3.3. – Equilíbrios de hidratação . . . . .	39
3.3.3.4. – Auto-oxidação secundária de aldeídos . . . . .	40
3.3.4. – Interação do <i>trans</i> -2-nonenal com o sulfito em cerveja . . . . .	40
3.4. – Efeito da temperatura de armazenamento na concentração de <i>trans</i> -2-nonenal na cerveja. . . . .	43
3.5. – Efeito do pH na concentração de <i>trans</i> -2-nonenal na cerveja . . . . .	45
3.6. – Efeito do oxigénio na concentração de <i>trans</i> -2-nonenal em cerveja . . . . .	46
3.7. – Metodologias analíticas para determinação de <i>trans</i> -2-nonenal na cerveja . . . . .	48
3.8. – Conclusão . . . . .	51
<b>4. – Aspectos gerais sobre a técnica cromatográfica e sobre a técnica de extracção em fase sólida . . . . .</b>	<b>53</b>
4.1. – Introdução . . . . .	53
4.2. – Breve história da cromatografia . . . . .	54
4.3. – Classificação das técnicas cromatográficas . . . . .	56
4.4. – Descrição genérica da cromatografia de eluição como técnica analítica . . . . .	58
4.5. – Cromatografia líquida de alta eficiência . . . . .	59
4.5.1. – Componentes básicos de um sistema de cromatografia de alta eficiência . . . . .	60
4.5.2. – Cromatografia líquida de alta eficiência de partição . . . . .	60
4.5.3. – Colunas para cromatografia de partição de fase ligada . . . . .	61
4.6. – Aspectos gerais sobre a técnica de extracção em fase sólida . . . . .	63
4.6.1. – Introdução . . . . .	63
4.6.2. – Enchimentos em colunas de extracção em fase sólida . . . . .	63

4.6.3. – Os 4 passos básicos na utilização de uma coluna de extracção em fase sólida . . . . .	64
--	----

## ***Parte II – Desenvolvimento do método***

<b>1. – Introdução . . . . .</b>	<b>69</b>
<b>2. – Instrumentação e reagentes utilizados . . . . .</b>	<b>71</b>
2.1. – Instrumentação . . . . .	71
2.2. – Reagentes . . . . .	72
2.3. – Preparação de soluções . . . . .	73
<b>3. – Estudos preliminares com <i>trans</i>-2-nonenal . . . . .</b>	<b>75</b>
3.1. – Caracterização do comportamento do <i>trans</i> -2-nonenal por CLAE com detecção espectrofotométrica . . . . .	75
3.2. – Estudos de estabilidade de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal . . . . .	78
<b>4. – Desenvolvimento da metodologia experimental para a determinação de <i>trans</i>-2-nonenal em soluções modelo . . . . .</b>	<b>81</b>
4.1. – Estudo e optimização de um sistema de destilação por arrastamento de vapor para extracção do <i>trans</i> -2-nonenal . . . . .	81
4.1.1.– Estudo da força iónica na extracção de <i>trans</i> -2-nonenal . . . . .	82
4.1.2.– Estudo do efeito do volume de amostra a destilar na extracção do <i>trans</i> -2-nonenal . . . . .	84
4.1.3.– Estudo da evolução da extracção de <i>trans</i> -2-nonenal ao longo da recolha de destilado em soluções modelo . . . . .	86
4.2. – Estudo da eficiência de colunas C18 na extracção e concentração de <i>trans</i> -2-nonenal em soluções aquosas . . . . .	89
4.2.1.– Estudo da eficiência da extracção de <i>trans</i> -2-nonenal em colunas C18 . . . . .	89
4.2.2.– Estudo da eficiência das colunas C18 na extracção de <i>trans</i> -2-nonenal em soluções etanólicas . . . . .	91
4.2.3. – Estudo da influência da diluição de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal de meio água e etanol na extracção de <i>trans</i> -2-nonenal em colunas C18 . . . . .	94

<b>5. – Desenvolvimento de uma metodologia experimental para a separação e quantificação de <i>trans</i>-2-nonenal na cerveja</b>	<b>97</b>
5.1. – Identificação do sinal do <i>trans</i> -2-nonenal na cerveja	97
5.2. – Optimização das fases cromatográficas para a resolução do sinal do <i>trans</i> -2-nonenal em cerveja	99
5.3. – Estudo da influência de alguns factores na determinação de <i>trans</i> -2-nonenal	102
5.3.1.– Estudo da influência do pH na formação do <i>trans</i> -2-nonenal durante a etapa de destilação por arrastamento de vapor da cerveja	102
5.3.2.– Influência da adição de hidrazina ao destilado de cerveja	104
5.3.3.– Estudo da influência do teor em SO <sub>2</sub> na determinação de <i>trans</i> -2-nonenal	107
5.3.4.– Estudo da etapa de destilação por arrastamento de vapor em amostras de cerveja na indução da formação de <i>trans</i> -2-nonenal	108
5.3.4.1. – Estudo da formação de <i>trans</i> -2-nonenal em cerveja submetida a aquecimento por refluxo	109
5.3.4.2. – Estudo da formação de <i>trans</i> -2-nonenal durante a destilação por arrastamento de vapor.	110
<b>6. – Aplicações da metodologia desenvolvida</b>	<b>115</b>
6.1. – Descrição detalhada da metodologia optimizada para a determinação do teor em <i>trans</i> -2-nonenal existente na cerveja	115
6.2. – Aplicação do método das adições de padrão para a determinação do teor em <i>trans</i> -2-nonenal existente na cerveja	117
6.3. – Aplicação da metodologia desenvolvida na monitorização do teor de <i>trans</i> -2-nonenal em cervejas submetidas a envelhecimento forçado	119
6.4. – Aplicação da metodologia desenvolvida à identificação de outros aldeídos insaturados	112
6.4.1. – Estudo espectrofotométrico de aldeídos insaturados	123
6.4.2. – Identificação dos aldeídos em cerveja	124
<b>7. – Considerações finais e propostas de trabalho futuro</b>	<b>129</b>
Bibliografia	131
Anexo A1	
Anexo A2	

# Índice de Figuras

## Parte I – Fundamentação do tema

### 1. – Aspectos gerais sobre a cerveja

- Figura 1.1. – Diagrama esquemático representativo dos principais passos do processo de fabrico da cerveja . . . . . 5
- Figura 1.2. – A roda dos aromas e sabores - *The Flavour wheel* . . . . . 10
- Figura 1.3. – Representação esquemática das alterações sensoriais da cerveja ao longo do seu envelhecimento – Diagrama de Dalglish . . . . . 11

### 2. – Reactividade de compostos carbonílicos

- Figura 2.1. – Estrutura simplificada de compostos carbonílicos: a) aldeídos e b) cetonas . . . . . 16
- Figura 2.2. – Estruturas híbridas do grupo carbonilo . . . . . 16
- Figura 2.3. – Reacção genérica de adição nucleófila ao grupo carbonilo. “B:” representa um composto nucleófilo . . . . . 17
- Figura 2.4. – Mecanismos propostos para a adição de água ao grupo carbonilo. a) reacção catalisada em meio ácido; b) reacção catalisada em meio alcalino . . . . . 17
- Figura 2.5. – Mecanismo proposto para a formação de acetais em meio ácido. a) protonação do grupo carbonilo; b) adição de uma molécula de álcool à estrutura anterior com formação de um hemiacetal; c) protonação do grupo hidroxilo do hemiacetal; d) adição de uma molécula de álcool à estrutura anterior com formação de um acetal . . . . . 19
- Figura 2.6. – Mecanismo proposto para a adição de aminas ao grupo carbonilo. a) ataque nucleófilo do composto azotado com formação de um  $\alpha$ -aminoálcool; b) eliminação de uma molécula de água com formação de uma imina . . . . . 20
- Figura 2.7. – Mecanismo proposto para a reacção aldólica em meio alcalino. a) formação do carbanião; b) adição nucleófila do enolato ao grupo carbonilo; c) formação do aldol . . . . . 22
- Figura 2.8. – Reacção de adição do anião hidrogenossulfito ao grupo carbonilo com formação de  $\alpha$ -hidroxissulfonato . . . . . 22
- Figura 2.9. – Indicação de hidrogénios  $\alpha$  num composto carbonílico . . . . . 23
- Figura 2.10. – Equilíbrio de tautomeria carbonilo – enol. a) remoção do hidrogénio  $\alpha$ ; b) protonação das formas enolato e carbanião . . . . . 24

### 3. – O *trans*-2-nonenal na cerveja

- Figura 3.1. – Diagrama esquemático ilustrativo do aparecimento/formação de aldeídos durante o fabrico e envelhecimento da cerveja DS: Degradação de *Strecker*; CA: Condensação Aldólica . . . . . 27
- Figura 3.2. – Possíveis vias de formação de *trans*-2-nonenal que ocorrem durante a produção e envelhecimento da cerveja . . . . . 30



Figura 3.3. –	Variação da concentração de <i>trans</i> -2-nonenal em diferentes cervejas envelhecidas a temperatura ambiente	32
Figura 3.4. –	Velocidade de oxidação de ácidos gordos em função das condições de meio ; 1 – Concentração de espécies pró-oxidantes baixa; 2 – Concentração de espécies pró-oxidantes elevada.	33
Figura 3.5. –	Mecanismo radicalar proposto para a formação de <i>trans</i> -2-nonenal a partir da auto-oxidação do ácido linoleico; (I) – formação de monohidroperóxidos; (II) – cisão do monohidroperóxido. A cisão do monohidroperóxido(9) pela via (A) apresentada em (II), conduz à formação de <i>trans</i> -2-nonenal	34
Figura 3.6. –	a) Excitação de uma molécula de oxigénio. b) Configuração electrónica das orbitais 2p <sub>x</sub> e 2p <sub>y</sub> numa molécula de O <sub>2</sub> nos estados singleto ( <sup>1</sup> Σ <sub>g</sub> <sup>-</sup> e <sup>1</sup> Δ <sub>g</sub> ) e no estado tripleto ( <sup>3</sup> Σ <sub>g</sub> <sup>-</sup> )	35
Figura 3.7. –	(I) - Mecanismo proposto de adição de O <sub>2</sub> no estado excitado singleto à ligação dupla do ácido linoleico com formação de um monohidroperóxido; (II) - Monohidroperóxidos formados por foto-oxidação a partir do ácido linoleico	36
Figura 3.8. –	Mecanismo iónico de degradação do monohidroperóxido (9) derivado do ácido linoleico. R <sub>1</sub> : COOH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - ; R <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	37
Figura 3.9. –	Influência do pH na formação da base de <i>Schiff trans</i> -2-nonenal-lisina (temperatura de aquecimento = 100°C durante 30 minutos)	39
Figura 3.10.–	Influência da temperatura na formação da base de <i>Schiff trans</i> -2-nonenal-lisina (pH 5,4; tempo de aquecimento = 30 minutos)	39
Figura 3.11.–	Mecanismo proposto para adição de água à ligação dupla de um aldeído α,β-insaturado com formação de um β-hidroxialdeído	39
Figura 3.12.–	Produtos da interacção entre o sulfito e o <i>trans</i> -2-nonenal; I – Adição do sulfito ao grupo carbonilo; II – Adição do sulfito à ligação dupla; IIIa – Dupla adição do sulfito, à ligação dupla e ao grupo carbonilo (configuração R); IIIb – Dupla adição do sulfito, à ligação dupla e ao grupo carbonilo (configuração S)	42
Figura 3.13.–	Influência da temperatura de armazenamento da cerveja na concentração de <i>trans</i> -2-nonenal: A – 0°C; B – 38°C	44
Figura 3.14.–	Influência da temperatura de armazenamento da cerveja na concentração de <i>trans</i> -2-nonenal: A–0°C; B–25°C; C– 40°C	44
Figura 3.15.–	Ácidos carboxílicos identificados por Graveland e Stenroos como responsáveis pela formação de <i>trans</i> -2-nonenal em cerveja aquecida a pH 2	45
Figura 3.16.–	Efeito do pH no sinal de quimioluminescência em amostras de cerveja; 1 – cerveja fresca a pH 4,3; 2 – cerveja fresca a pH 3,8; 3 – cerveja envelhecida durante 2 dias a 37°C a pH 4,3; 4 – cerveja envelhecida durante 2 dias a 37°C a pH 3,8	46
4. –	<b>Aspectos gerais sobre a técnica cromatografia e sobre a técnica de extracção em fase sólida</b>	
Figura 4.1. –	Mikhail Tswett (1872-1919)	54
Figura 4.2. –	Diagrama esquemático dos módulos que compõem sistema de cromatografia líquida de alta eficiência	60

Figura 4.3. – Preparação de fases ligadas por reacção entre sílica e organosilanos com a formação de fases ligadas monoméricas . . . . .	61
Figura 4.4. – Superfície de uma fase estacionária ligada para CLAE de fase reversa . . . . .	62
Figura 4.5. – Representação esquemática de uma coluna de extracção em fase sólida . . . . .	63
Figura 4.6. – Diferentes tipos de interacções que se podem estabelecer entre o enchimento de uma coluna de extracção em fase sólida e os componentes de uma amostra. a) Interacção não polar; b) Interacção polar; c) Interacção electrostática . . . . .	64
Figura 4.7. – Esquema ilustrativo do modo de utilização de uma coluna de extracção em fase sólida quando se pretende a extracção e recolha de uma espécie presente numa amostra. 1) Condicionamento da coluna; 2) Retenção; 3) Lavagem da coluna; 4) Eluição da espécie retida . . . . .	65

## Parte II - Desenvolvimento do Método

### 3. – Estudos preliminares com *trans*-2-nonenal

Figura 3.1. – Espectro de absorção de uma solução aquosa de <i>trans</i> -2-nonenal, $25 \times 10^{-6}$ M . . . . .	76
Figura 3.2. – Cromatograma de uma solução modelo de <i>trans</i> -2-nonenal, $5 \times 10^{-8}$ M. As condições cromatográficas utilizadas para a análise desta solução encontram-se descritas no Quadro I. . . . .	77
Figura 3.3. – Curva de calibração para o <i>trans</i> -2-nonenal obtida por CLAE com detecção espectrofotométrica . . . . .	78
Figura 3.4. – Valores de área de pico de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal em meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v) . . . . .	79
Figura 3.5. – Valores de área de pico de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal em meio aquoso . . . . .	80

### 4. – Desenvolvimento da metodologia experimental para a determinação de *trans*-2-nonenal em soluções modelo

Figura 4.1. – Representação esquemática da montagem experimental efectuada para uma destilação por arrastamento de vapor . . . . .	82
Figura 4.2. – Representação gráfica das recuperações de <i>trans</i> -2-nonenal obtidas no estudo da variação do volume de amostra a destilar na extracção de <i>trans</i> -2-nonenal . . . . .	85
Figura 4.3. – Perfil de extracção de <i>trans</i> -2-nonenal durante uma destilação por arrastamento de vapor em soluções modelo a) aquosas b) água/etanol, 6% (v/v) . . . . .	89
Figura 4.4. – Representação esquemática da montagem experimental utilizada para a eluição de soluções por colunas C18 . . . . .	90
Figura 4.5. – Representação gráfica do efeito do teor em etanol na percentagem de recuperação de <i>trans</i> -2-nonenal para diferentes concentrações deste composto . . . . .	94
Figura 4.6. – Representação gráfica da percentagem de recuperação de <i>trans</i> -2-nonenal em função da percentagem de etanol da solução. Volume total de etanol que atravessa a coluna = 15 mL; Volume de solução variável . . . . .	96

<b>5. – Desenvolvimento de uma metodologia experimental para a separação e quantificação de <i>trans</i>-2-nonenal na cerveja</b>	
Figura 5.1. – Picos cromatográficos obtidos a partir de extractos de cerveja envelhecida para identificação do sinal de <i>trans</i> -2-nonenal. Em a) análise de um extracto de cerveja envelhecida; em b) análise de um extracto de cerveja envelhecida contaminada <i>a priori</i> com <i>trans</i> -2-nonenal. Condições cromatográficas descritas no Quadro I (Composição do eluente, água/acetonitrilo, 55:45 (v/v))	99
Figura 5.2. – Picos cromatográficos obtidos na análise de um extracto de cerveja com as seguintes composições de fase móvel: a) água/acetonitrilo, 50:50 (v/v); b) água/acetonitrilo, 55:45 (v/v); c) água/acetonitrilo, 60:40 (v/v); d) Tampão acetato, pH 4, 25mM/acetonitrilo, 55:45 (v/v); e) Tampão fosfato, pH 8, 25mM/acetonitrilo, 55:45 (v/v). Fase estacionária: <u>Pré-coluna e coluna C8</u>	100
Figura 5.3. – Picos cromatográficos obtidos por análise de um extracto de cerveja com as seguintes composições de fase móvel: a) água/acetonitrilo, 30:70 (v/v); b) água/acetonitrilo, 40:60 (v/v); c) água/acetonitrilo, 45:55 (v/v); d) água/acetonitrilo, 50:50 (v/v). Condições cromatográficas descritas no Quadro 1. Fase estacionária: <u>Pré-coluna e coluna C18</u>	100
Figura 5.4. – a) Picos cromatográficos obtidos por análise de um extracto de cerveja (cromatograma apresentado no anexo A2, dia 0); b) cálculo do parâmetro $R_s$ . Os valores de $R_s$ obtidos (ambos superiores a 1,5), confirmam que as condições cromatográficas utilizadas permitem a resolução do sinal do aldeído em estudo	101
Figura 5.5. – Estudo da influência de adição de soluções de ácido forte e de base forte no pH da cerveja. Volume de cerveja ensaiada, 250 mL	103
Figura 5.6. – Variação dos valores de área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal após a destilação de cervejas com diferentes valores de pH inicial.	104
Figura 5.7. – Equação global da formação de hidrazonas	105
Figura 5.8. – Efeito da adição de hidrazina ao destilado de cerveja. a) pico do <i>trans</i> -2-nonenal no extracto de uma cerveja destilada a pH 2 sem adição de hidrazina ao destilado; b) pico do <i>trans</i> -2-nonenal no extracto de uma cerveja destilada a pH 2 com adição de hidrazina ao destilado	106
Figura 5.9. – Esquema da montagem experimental utilizada para refluxar a cerveja	109
Figura 5.10.– Efeito do tempo de refluxo nos picos adjacentes ao do <i>trans</i> -2-nonenal no extracto da cerveja	110
Figura 5.11.– Representação gráfica da variação do teor de <i>trans</i> -2-nonenal com o volume de destilado recolhido para vários conjuntos de cerveja. A zona a sombreado identifica o intervalo ideal do volume de destilado a recolher para a extracção de <i>trans</i> -2-nonenal existente na cerveja, sem que ocorra formação apreciável deste aldeído pela matriz	113
<b>6. – Aplicações da metodologia desenvolvida</b>	
Figura 6.1. – Aplicação do método das adições de padrão na determinação de <i>trans</i> -2-nonenal em cerveja	119

- Figura 6.2. – Representação gráfica dos valores médios de área de pico de *trans*-2-nonenal obtidos para um conjunto de cervejas submetidas a envelhecimento forçado . . . . . 121
- Figura 6.3. – a) Sobreposição dos espectros de absorção dos aldeídos *trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal, *trans*-2-octenal e *trans*-2-decenal. O comprimento de onda ao qual ocorre a absorção máxima de radiação é comum a todos os *trans*-2-alcenais (*trans*-2-nonenal inclusive): 226 nm. b) Espectro de absorção do aldeído *trans*, *trans*-2,4-nonadienal. O comprimento de onda ao qual ocorre a absorção máxima de radiação é comum ao aldeído *trans*, *trans*-2,4-decadienal: 280 nm . . . . . 124
- Figura 6.4. – Picos cromatográficos de extractos de cerveja com e sem adição *à priori* de aldeídos. Da esquerda para a direita: (1) análise ao extracto de cerveja com fase móvel água/acetonitrilo, 45:55 (v/v); (2) análise ao extracto de cerveja contaminada com fase móvel água/acetonitrilo, 45:55 (v/v); (3) análise ao extracto de cerveja com fase móvel água/acetonitrilo, 50:50 (v/v); (4) análise ao extracto de cerveja contaminada, com fase móvel água/acetonitrilo, 50:50 (v/v) . . . . . 127

# Índice de Tabelas

## Parte I – Fundamentação do Tema

### 1. – Aspectos gerais sobre a cerveja

Tabela 1.1. – Limites de percepção e descrição sensorial de alguns compostos carbonilo em cerveja	12
---	----

### 2. – Reactividade de compostos carbonílicos

Tabela 2.1. – Valores de constantes de hidratação para alguns compostos carbonílicos (Valores obtidos a 25°C)	18
Tabela 2.2. – Exemplos de compostos azotados que podem formar bases de <i>Schiff</i> estáveis a partir de compostos carbonílicos	21
Tabela 2.3. – Valores de constantes de equilíbrio para a reacção de adição do anião hidrogenossulfito a aldeídos e cetonas (valores obtidos a 0°C)	23
Tabela 2.4. – Valores de constante de equilíbrio carbonilo-enol para alguns compostos carbonílicos	24

### 3. – O *trans*-2-nonenal na cerveja

Tabela 3.1. – Aldeídos detectados por cromatografia gasosa em soluções aquosas de 2-alcenais a pH 4,0 e a 20°C	40
Tabela 3.2. – Caracterização da reactividade do <i>trans</i> -2-butenal, butanal e acetaldeído com sulfito em soluções modelo por RMN	42
Tabela 3.3. – Teores médios de <i>trans</i> -2-nonenal encontrado em cervejas frescas e em cervejas envelhecidas, com teor normal e teor elevado em oxigénio	47

### 4. – Aspectos gerais sobre a técnica cromatografia e sobre a técnica de extracção em fase sólida

Tabela 4.1. – Classificação das técnicas cromatográficas	57
--	----

## Parte II - Desenvolvimento do Método

### 2. – Instrumentação e reagentes utilizados

Tabela 2.1. – Características das colunas de CLAE utilizadas	72
Tabela 2.2. – Aldeídos utilizados na realização do trabalho experimental	73
Tabela 2.3. – Reagentes gerais utilizados na realização do trabalho experimental	73
Tabela 2.4. – Modo de preparação das soluções de partida dos aldeídos	74
Tabela 2.5. – Modo de preparação das soluções de partida dos reagentes gerais	74

### 3. – Estudos preliminares com *trans*-2-nonenal

Tabela 3.1. – Valores de área de pico e tempo de retenção obtidos por análise de soluções modelo de <i>trans</i> -2-nonenal por CLAE com detecção espectrofotométrica	77
---	----

Tabela 3.2. – Estudo de estabilidade de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal em meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v)	79
Tabela 3.3. – Estudo de estabilidade de soluções aquosas de <i>trans</i> -2-nonenal.	79

**4. – Desenvolvimento da metodologia experimental para a determinação de *trans*-2-nonenal em soluções modelo**

Tabela 4.1. – Estudo do efeito da força iônica na extração de <i>trans</i> -2-nonenal de soluções aquosas com diferentes concentrações em NaCl	83
Tabela 4.2. – Estudo do efeito do volume de solução a destilar na extração de <i>trans</i> -2-nonenal	84
Tabela 4.3. – Estudo da evolução da extração do <i>trans</i> -2-nonenal ao longo da destilação de soluções aquosas	86
Tabela 4.4. – Estudo da evolução da extração do <i>trans</i> -2-nonenal ao longo da destilação de soluções água:etanol, 6% v/v	87
Tabela 4.5. – Estudo da eficiência da extração de <i>trans</i> -2-nonenal de soluções aquosas em colunas C18	90
Tabela 4.6. – Estudo da eficiência da extração do <i>trans</i> -2-nonenal de soluções etanólicas (1, 5, 10, 20 e 40 % de EtOH v/v) em colunas C18	92
Tabela 4.7. – Estudo da eficiência da extração do <i>trans</i> -2-nonenal de soluções etanólicas (20, 25, 30, 35 e 40 % de EtOH v/v) em colunas C18	93
Tabela 4.8. – Estudo da influência da diluição de soluções etanólicas de <i>trans</i> -2-nonenal na extração em colunas C18	95

**5. – Desenvolvimento de uma metodologia experimental para a separação e quantificação de *trans*-2-nonenal na cerveja**

Tabela 5.1. – Área do pico de <i>trans</i> -2-nonenal obtida após destilação de cervejas com valores de pH ajustados	103
Tabela 5.2. – Efeito da adição de hidrazina na área de pico do <i>trans</i> -2-nonenal	106
Tabela 5.3. – Variação do sinal de <i>trans</i> -2-nonenal com a concentração de sulfito na cerveja	108
Tabela 5.4. – Valores de área de pico obtidos em amostras de cerveja submetidas a refluxo por diferentes intervalos de tempo	109
Tabela 5.5. – Resultados experimentais obtidos para o estudo da formação de <i>trans</i> -2-nonenal durante a destilação por arrastamento de vapor de uma cerveja	112

**6. – Aplicações da metodologia desenvolvida**

Tabela 6.1. – Resultados experimentais obtidos pelo método das adições de padrão	118
Tabela 6.2. – Recuperações de <i>trans</i> -2-nonenal obtidas após adições de padrão	118
Tabela 6.3. – Valores de áreas de pico de <i>trans</i> -2-nonenal obtidos em amostras de cerveja submetidas a envelhecimento acelerado	120
Tabela 6.4. – Limites de percepção e descrição sensorial de alguns compostos carbonílicos em cerveja	123

Tabela 6.5. – Tempos de retenção de diferentes aldeídos por eluição com diferentes composições de fase móvel . . . . . 125

# Resumo

Este trabalho teve por objectivo o desenvolvimento de uma metodologia experimental para a determinação do aldeído *trans*-2-nonenal em cerveja.

A presença de *trans*-2-nonenal na cerveja pode fazer surgir um sabor/aroma desagradável a papel/cartão que se torna notado em cerveja envelhecida e cujo limite de percepção é muito baixo, cerca de 0,1 µg/L. É, assim, de grande importância o desenvolvimento de metodologias de análise que permitam de uma forma expedita quantificar este composto na cerveja.

Este trabalho compreendeu duas fases. Numa primeira fase, desenvolveu-se uma metodologia experimental para a extracção e quantificação do *trans*-2-nonenal em soluções modelo. A metodologia desenvolvida baseou-se na destilação de soluções modelo por arrastamento de vapor, à qual se seguiu um passo de concentração e extracção do aldeído por passagem do destilado através de colunas de extracção de fase sólida. Por fim, era efectuada a análise do extracto por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica. Cada um destes passos foi alvo de um estudo individual com vista ao ajuste das condições experimentais para cada um.

Numa fase posterior, aplicou-se a metodologia desenvolvida à determinação de *trans*-2-nonenal em amostras de cerveja, tendo-se procedido ao estudo da aplicabilidade dessa metodologia à matriz cerveja. Neste contexto, estudou-se qual a influência da destilação por arrastamento de vapor na indução da formação do *trans*-2-nonenal (já que, durante este passo, a cerveja é submetida a uma temperatura elevada, e tal pode conduzir à formação de *trans*-2-nonenal a partir de precursores deste aldeído existentes na matriz), e ainda, qual o efeito da presença do sulfito na extracção deste aldeído.

Os estudos realizados permitiram seleccionar as condições experimentais mais adequadas para a determinação do *trans*-2-nonenal na cerveja.

A metodologia desenvolvida pretende ser uma alternativa válida aos métodos existentes para a determinação deste aldeído, apresentando como principais vantagens a rapidez e simplicidade do processo de análise.



# *Abstract*

The aim of this project was to develop a methodology to determine the aldehyde *trans*-2-nonenal in beer.

The presence of *trans*-2-nonenal in beer is responsible for an unpleasant flavour to paper/cardboard, which can be noticed in aged beer (this aldehyde has a perception limit very low, around 0,1 µg/L). Therefore, it is very important the development of methodologies of analysis that quickly allow the quantification of this compound in beer.

This work was developed in two parts. In the first part, a methodology was set up to extract and quantify the *trans*-2-nonenal in model solutions. This methodology was based on the steam distillation of model solutions of *trans*-2-nonenal, followed by concentration and extraction of this aldehyde on solid phase extraction columns. Finally, *trans*-2-nonenal was analysed in the extract by high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection.

In the second part, the developed methodology was applied to beer samples. In this context was studied, the influence of steam distillation on the induction of *trans*-2-nonenal as this compound can be formed from its precursors in beer, due to the use of high temperatures. The effect of the presence of sulphite was also investigated.

The methodology developed in this work proved to be a good alternative to the existent methods of determination of this *trans*-2-nonenal, presenting as major advantages the fastness and simplicity of analysis.

# *Parte I*

## *Fundamentação do Tema*

# *1. – Aspectos gerais sobre a cerveja*

- 1.1. – A cerveja através dos tempos
- 1.2. – O processo de fabrico da cerveja
- 1.3. – A estabilidade organoléptica da cerveja
- 1.4. – Caracterização organoléptica da cerveja
- 1.5. – A influência dos compostos carbonilo

## **1. – Aspectos gerais sobre a cerveja**

### **1.1. – A cerveja através dos tempos [1]**

A origem histórica da cerveja é desconhecida. Já os Sumérios e os Egípcios produziam cerveja, há mais de 5.000 anos antes de Cristo, e os Babilónios já fabricavam mais de dezasseis tipos de cerveja de cevada, trigo e mel, há mais de 4.000 anos. O mais antigo código de leis conhecido, o de Hamurabi na Babilónia (datado de 1.800 anos antes de Cristo), declarava que a pena de morte poderia ser imposta a quem diluía a cerveja que vendia. Igualmente, foi encontrada em papiros egípcios, de cerca de 1.300 anos antes de Cristo, uma regulamentação da venda de cerveja.

Na Europa, sabe-se que na Idade Média se fabricava cerveja em determinados conventos. Um dos conventos que iniciou a produção de cerveja foi o convento alemão de Weihestephan. Os monges deste convento foram os primeiros a obter uma autorização profissional para o fabrico e venda de cerveja em 1040. Esse convento transformou-se na cervejaria mais antiga do mundo e é onde, actualmente, se encontra instalado o Centro de



Ensino da Tecnologia de Cervejaria da Universidade Técnica de Munique.

Com o tempo, o modo de fabrico da cerveja foi sendo aprimorado, quer relativamente aos ingredientes utilizados, quer relativamente ao seu modo de fabrico. A cerveja, originalmente uma bebida obtida pela fermentação de cereais, é hoje obtida a partir de uma mistura de malte, lúpulo, água e leveduras. Os métodos artesanais foram sendo progressivamente substituídos - sobretudo após a Revolução Industrial - e hoje, o fabrico da cerveja é quase todo automatizado e realizado em grandes unidades fabris.

## **1.2. – O processo de fabrico da cerveja [1]**

### **1.2.1. – Matérias primas usadas no fabrico da cerveja**

As matérias primas utilizadas no fabrico da cerveja são essencialmente a água, a cevada, o lúpulo e a levedura. Descreve-se, sucintamente, a importância e a função de cada uma destas matérias primas no fabrico da cerveja.

**Água** – a água é o principal ingrediente da cerveja constituindo mais de 90% desta bebida, pelo que, a qualidade da água utilizada no processo de fabrico da cerveja assume, evidentemente, uma importância vital. Por exemplo, a dureza da água influencia imenso a qualidade da cerveja; o pH inicial da água condiciona, igualmente, todos os equilíbrios químicos que ocorrem durante o processo de fabrico da cerveja.

**Cevada** – a cevada constitui a matéria prima chave na produção de cerveja. Relativamente a outros cereais, o malte de cevada confere à cerveja um sabor único. Igualmente, a cor final da cerveja depende em grande parte da cor adquirida pelos grãos de cevada durante o processo de maltagem.

**Lúpulo** - o lúpulo é outro ingrediente chave na produção da cerveja. O lúpulo é uma planta trepadeira da família das moráceas, originária das regiões temperadas do norte da Europa, Ásia e América. Habitualmente, adiciona-se à cerveja um extracto do lúpulo, que contém a substância responsável pelo amargor característico da cerveja, a lupulina, e óleos essenciais, que são uma mistura de diversos compostos igualmente responsáveis por influenciar favoravelmente o aroma e sabor da cerveja. O lúpulo possui, igualmente, um papel auxiliar na formação da espuma, bem como, alguma actividade anti-séptica o que favorece a

estabilidade organoléptica da cerveja.

**Leveduras** – a levedura é uma bactéria que é adicionada à cerveja com o objectivo de transformar os açúcares provenientes do malte em álcool e dióxido de carbono. O paladar e as restantes características da cerveja final dependem em grande parte da levedura utilizada. A utilização de leveduras seleccionadas permite obter uma cerveja de sabor e aroma mais ou menos constantes, o que é essencial para uma produção industrial. Uma das leveduras mais utilizadas é a bactéria *Saccharomices cerevisiæ*.

### 1.2.2. – Etapas no processo de fabrico da cerveja

A cerveja é, conforme já foi referido atrás, o resultado da fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, por meio de leveduras. O cereal mais importante para a boa qualidade da cerveja é a cevada, podendo contudo usar-se mais do que um cereal, como por exemplo, milho, arroz, aveia ou trigo (estes cereais que são adicionados conjuntamente com a cevada denominam-se de adjuntos).

Sob a denominação de cerveja encontramos uma grande variedade de tipos desta bebida que são obtidos, quer por processos de fabrico caseiro, quer por processos de fabrico de escala industrial. As etapas que constituem o processo de fabrico da cerveja podem ser resumidas conforme se apresenta no esquema seguinte:

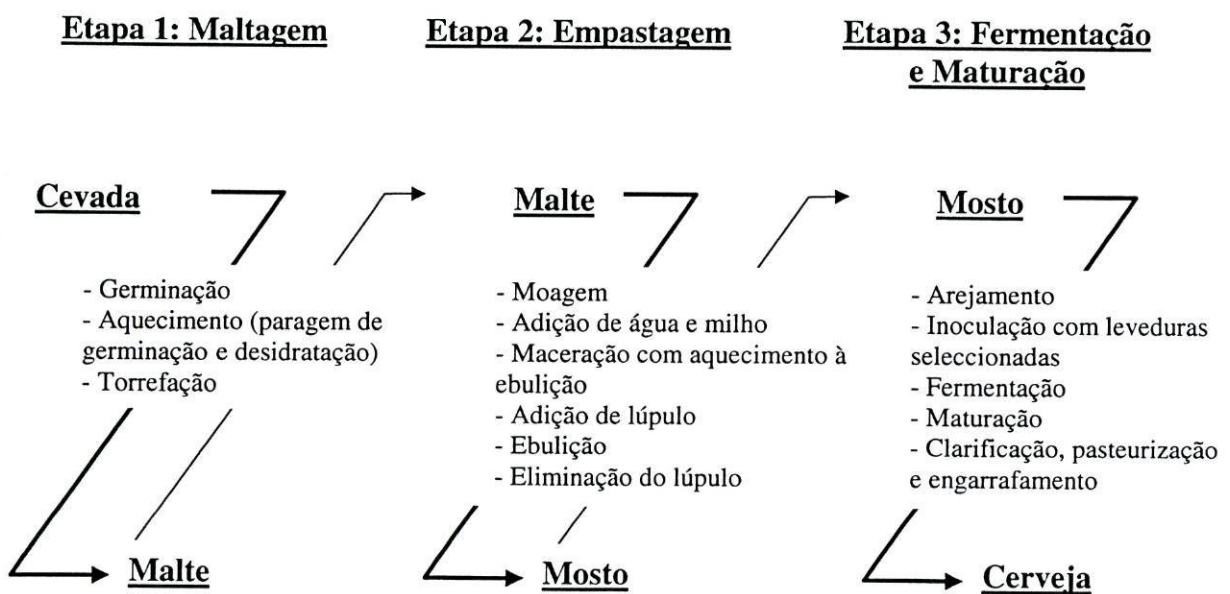


Figura 1.1. – Diagrama esquemático representativo dos principais passos do processo de fabrico da cerveja

O processo de fabrico da cerveja inicia-se com a preparação do malte a partir da cevada – etapa de maltagem. Este processo consiste, basicamente, em colocar o grão de cevada em condições favoráveis à sua germinação, deixar iniciar o processo, e interrompê-lo logo o grão tenha iniciado o processo de criação de uma nova planta. Nesta fase, o amido do grão encontra-se já degradado em cadeias menores, o que o torna mais solúvel em água. Ao mesmo tempo, no interior do grão, formam-se variadas enzimas (fundamentais para as fases seguintes do processo de fabricação de cerveja), e ainda, precursores de substâncias aromáticas, que se podem manter durante o fabrico da cerveja até à fase do engarrafamento. Para interromper o processo de germinação, a cevada é submetida a um aquecimento controlado, através do qual se procede, numa fase inicial, à desidratação, e por fim, à torrefacção. A etapa de preparação do malte tem uma forte influência na fermentação e, como tal, é um importante factor da qualidade final da cerveja.

Na etapa seguinte – etapa de empastagem – todo o malte é triturado e misturado com água<sup>1</sup> a uma temperatura relativamente elevada (entre 63°C e 75°C). Em seguida, procede-se à separação do líquido dos resíduos (constituídos das cascas do malte e outras matérias não solúveis) através de uma filtragem, obtendo-se um líquido turvo que é denominado mosto. O mosto é transferido para uma caldeira de ebulição para ferver durante aproximadamente uma hora, durante a qual é acrescentado o lúpulo (fase da lupulagem). Neste passo, devido à acção da temperatura, o lúpulo liberta as substâncias aromáticas e o princípio amargo que lhe é característico.

Terminada a fase de ebulição, o mosto é arrefecido e inoculado com as leveduras (também designadas de fermento cervejeiro) para dar início à etapa seguinte – etapa de fermentação. A fermentação industrial pode ser dividida em fermentação principal e fermentação secundária. Na fermentação principal, inoculam-se as leveduras que transformam as moléculas de açúcar existentes no mosto em álcool e dióxido de carbono. É neste momento que ocorre a formação da cerveja propriamente dita. Essa primeira etapa de fermentação estende-se, geralmente, durante 3 a 7 dias, sob temperaturas que podem variar entre 5 e 26°C. Completada a etapa de fermentação principal, passa-se para a etapa de fermentação secundária ou maturação. Assim, o mosto é transferido para tanques de maturação, onde a cerveja permanece por 12 a 20 dias "repousando" a baixa temperatura, a cerca de 0 °C. O objectivo principal desta fase é permitir um amadurecimento da cerveja, que deste modo

---

<sup>1</sup> o passo da mistura de água com o malte é designado de brassagem.

adquire um sabor e aroma mais apurado. No fim da maturação, pode-se considerar o fabrico da cerveja encerrado.

O tratamento final da cerveja "bruta" antes do engarrafamento, envolve um novo processo de filtragem e clarificação para a eliminação dos resíduos ainda em suspensão no líquido. Deste modo obtém-se o brilho e a translucidez da cerveja exigidos pelo consumidor. A cerveja engarrafada é, por fim, submetida ao processo de pasteurização. Este passo consiste em submeter a cerveja a uma temperatura de aproximadamente 60°C com a finalidade de interromper qualquer fermentação que ainda possa estar a ocorrer. Com este passo confere-se uma maior estabilidade ao produto.

Existem actualmente no circuito comercial mais de 150 tipos de cerveja que diferem entre si na selecção das matérias primas e nos processos de fabrico utilizados na sua produção. Como curiosidade, descrevem-se seguidamente e de forma resumida, as características de seis tipos de cerveja vulgares:

**Cerveja Alt** – Este tipo de cerveja é originário da Alemanha. O seu fabrico envolve dois processos de fermentação: alta e baixa<sup>2</sup>. Esta cerveja é caracterizada por possuir uma cor vermelha forte e um teor alcoólico que varia entre 4 e 5 graus.

**Cerveja Bock** – As cervejas deste tipo são encorpadas e possuem um teor alcoólico que varia normalmente entre 5 e 7 graus. O malte usado na sua preparação é mais torrado e caramelizado, o que transmite um sabor menos amargo. A sua espuma é cremosa e resulta do prolongado processo de maturação e fermentação.

**Cerveja Stout** – Este tipo de cerveja é originária da Irlanda e caracteriza-se por ser fabricada através de fermentação alta; é uma cerveja forte, escura e rica em lúpulo. Ao ser servida, oferece um bonito visual de cores combinando o branco da espuma com preto e um *marrom dégradé*. Possui um teor alcoólico que varia habitualmente entre 3 e 7 graus.

**Cerveja Kriek Lambic** – Este tipo de cerveja é originária da região de Bruxelas. Esta cerveja

---

<sup>2</sup> dependendo do tipo de levedura utilizada, as cervejas dividem-se em cervejas de fermentação baixa ou cervejas de fermentação alta. Nas cervejas de fermentação baixa o fermento deposita no fundo do tanque onde ocorre este processo resultando, habitualmente, uma cerveja mais clara e menos alcoólica. Nas cervejas que são produzidas por fermentação alta, a levedura fica em suspensão no mosto fermentado, dando origem a uma cerveja mais alcoólica, mais aromática e mais escura.

tem a particularidade de conter frutas imersas no seu interior, como por exemplo, cerejas, pêssegos ou framboesas. Possui entre 5 e 7 graus de álcool.

**Cerveja Lager** – A cerveja deste tipo tem a particularidade de no seu fabrico a etapa de fermentação decorrer a temperatura baixa, normalmente entre 0° C e 6° C, o que faz com que as leveduras se depositem no fundo, provocando uma fermentação muito lenta. Por tal facto, este tipo de cerveja possui uma graduação alcoólica muito fraca, que ronda os 3 e 5 graus.

**Cerveja Amstel** – Este tipo de cerveja é de origem holandesa. Detém um aroma espirituoso, rotundo e embriagador. Caracteriza-se, igualmente, por ser bastante equilibrada, levemente caramelizada e por possuir um ligeiro amargor com um final prolongado.

### **1.3. – A estabilidade organoléptica da cerveja**

O principal objectivo das empresas cervejeiras é o de possuir um processo de fabrico que lhes permita obter uma cerveja sempre com os mesmos padrões de qualidade e com características imutáveis ao longo do seu envelhecimento. O processo de envelhecimento da cerveja é um aspecto que tem preocupado as indústrias cervejeiras. Tem sido objecto de forte investigação na procura de identificar os compostos que são preponderantes na estabilidade organoléptica da cerveja e os compostos que resultam do processo de envelhecimento responsáveis pelas alterações organolépticas detectadas na cerveja envelhecida. O objectivo é reunir um conjunto apropriado de conhecimentos que permita actuar adequadamente sobre os mecanismos de formação desses compostos, de forma a minorar a sua influência sobre a estabilidade organoléptica da cerveja.

Como resultado desse esforço de investigação foram já caracterizados vários factores associados ao fabrico e armazenamento da cerveja que influenciam de forma notória a qualidade e estabilidade deste produto. Neste contexto, surgem como exemplos de factores relevantes:

**1. selecção adequada de matérias primas [2,3]** – a utilização de uma qualquer matéria prima menos própria para o fabrico da cerveja, inevitavelmente traduz-se na obtenção de uma cerveja de fraca qualidade ou com características diferentes das esperadas. Por exemplo, no passado, as fábricas de cerveja eram edificadas perto de nascentes de água que utilizavam para garantir a boa qualidade dessa matéria-prima. Este problema, actualmente não é tão



relevante pois é fácil tratar a água por forma a mantê-la com níveis de qualidade elevada e constante. O principal problema resulta da selecção da cevada. Admite-se que a actividade enzimática característica da cevada (ou malte), em particular a actividade da enzima lipoxigenase, possui um papel activo na formação de aldeídos<sup>3</sup> durante o processo de fabrico da cerveja, pelo que as características desta matéria prima poderão ser um factor importante na estabilidade organoléptica da cerveja.

**2. controlo sobre o nível de oxigénio presente durante o fabrico e envelhecimento da cerveja [3,4,5]** – vários estudos têm apontado o oxigénio como sendo o principal agente responsável pela degradação das características organolépticas da cerveja. O oxigénio é, habitualmente, associado à diminuição do teor de antioxidantes e à promoção de reacções radicalares responsáveis pela alteração da cerveja. Por estes motivos, têm sido recomendadas diversas estratégias que visam eliminar tanto quanto possível a presença do oxigénio nas diversas fases da preparação da cerveja e na sua armazenagem. Como exemplo, refira-se a promoção de uma atmosfera de dióxido de carbono no colo das garrafas imediatamente antes do encapsulamento desta bebida.

**3. condições de armazenamento da cerveja [4]** – a conservação da cerveja após o seu fabrico é, igualmente, um aspecto que tem merecido a atenção dos cervejeiros. Nas fábricas, a cerveja produzida é armazenada em armazéns refrigerados e ao abrigo da luz. Sabe-se que o condicionamento da cerveja a temperaturas baixas atrasa todos os fenómenos associados ao seu envelhecimento, e que, a protecção da cerveja da luz natural evita a ocorrência de fenómenos de foto-oxidação, associados ao desenvolvimento de aromas/gostos desagradáveis (p.e. *lightstruck flavor*).

#### **1.4. - Caracterização organoléptica da cerveja**

Atendendo que existe um variadíssimo número de tipos de cerveja, todas possuidoras de características particulares, como resultado da utilização de diferentes matérias primas ou de diferentes processos de fabrico, a caracterização sensorial de uma cerveja obriga à utilização de um conjunto de descrições sensoriais gerais e próprias desta bebida. O conjunto de descrições em questão foi compilado por Morten Meilgaard na década de 70 e ilustrada

---

<sup>3</sup> os aldeídos são compostos que em determinadas concentrações definem o aroma e gosto da cerveja.

numa roda de aromas e sabores. Esta roda dos aromas e sabores foi posteriormente adoptada e normalizada pelo EBC – *European Brewery Convention* –, pelo ASBC – *American Society of Brewing Chemists* –, e ainda pelo MBAA – *Master Brewers Association of the America* – como *The Flavor Wheel* (ver Figura 1.2.). A roda dos aromas e sabores serve de instrumento para a caracterização do conjunto de sensações gustativas e olfactivas que podem ser sentidas por qualquer provador de cerveja experiente.

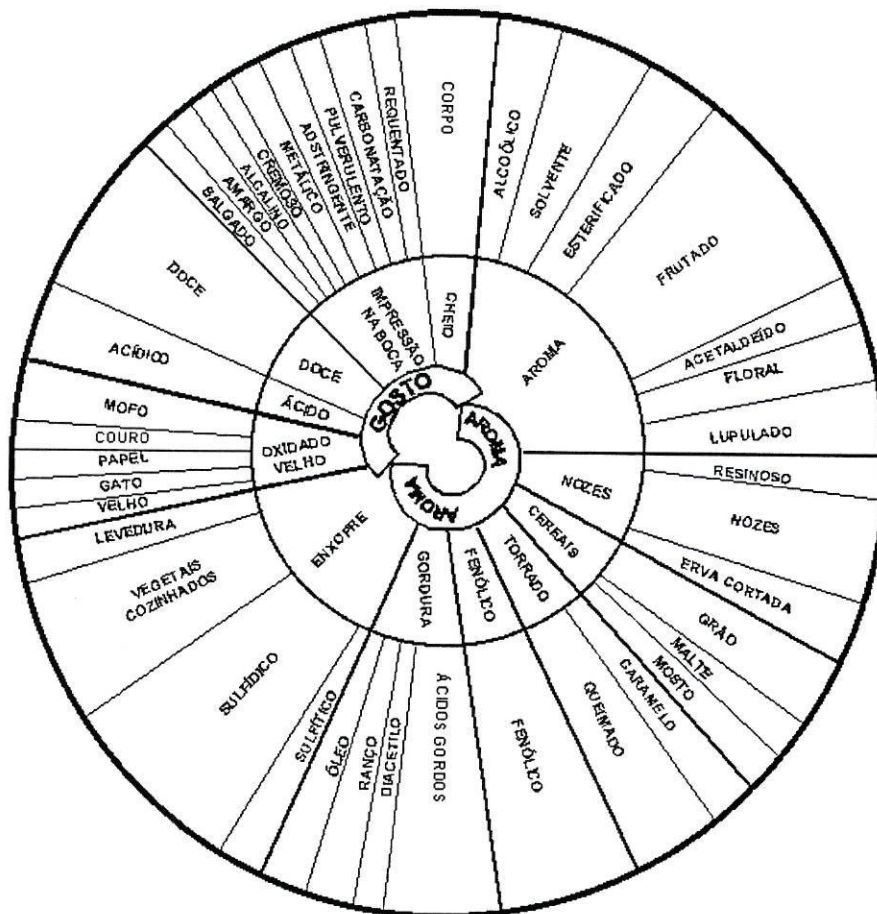


Figura 1.2. – A roda dos aromas e sabores - *The Flavour wheel*

As características organolépticas da cerveja vão-se alterando ao longo do seu envelhecimento. Segundo Dalglish, (ver Figura 1.3.) estas alterações incluem uma diminuição da intensidade do amargor e um aumento da intensidade das características doce e caramelo/torrado de forma contínua ao longo todo o envelhecimento da cerveja. Paralelamente, este autor refere ainda o aparecimento das características folha de groselha e papal/cartão, sensivelmente, a meio do termo de vida da cerveja. A característica folha de groselha, após surgir, diminui de intensidade no tempo, enquanto que a característica a papal/cartão aumenta continuamente.

Refira-se que o esquema proposto por Dalglish constitui um modelo genérico das

variações das características organolépticas que ocorrem ao longo do envelhecimento da cerveja. Embora este comportamento seja actualmente o admitido pela indústria cervejeira, é evidente que nem todas as cervejas sofrem este tipo de alterações.

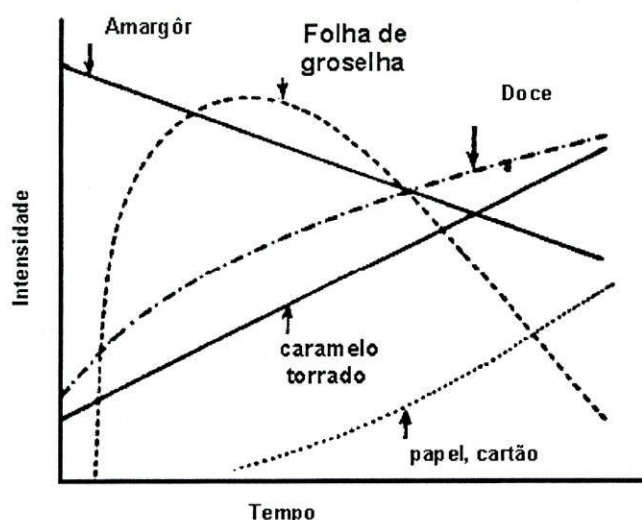


Figura 1.3. - Representação esquemática das alterações sensoriais da cerveja ao longo do seu envelhecimento [3] – Diagrama de Dalglish

### 1.5. – A influência dos compostos carbonílicos

O conjunto de transformações organolépticas que ocorrem ao longo do envelhecimento da cerveja está inevitavelmente associado a alterações da concentração de compostos que influem sobre o sabor/aroma da cerveja. O desenvolvimento de novas técnicas e novos métodos de análise têm contribuído para a identificação destes compostos e dos equilíbrios em que participam. Lustig [3] refere os seguintes compostos como sendo os principais responsáveis pela degradação da cerveja: 2-metilbutanal, 2-furfural, 5-metil-2-furfural, benzaldeído, 2-feniletanal, dietilsuccinato, etilfenilacetato, 2-propionilfurano e a  $\gamma$ -nonalactona.

Um outro conjunto de compostos que têm, igualmente, merecido atenção são os compostos carbonílicos. O aparecimento de características com aroma/sabor a papel/cartão (atribuído ao aldeído *trans*-2-nonenal), metal (atribuído ao aldeído 3-octa-1-enona) ou a folha de groselha (atribuído ao aldeído 4-mercaptopentano-2-ona), são apenas alguns exemplos de modificações organolépticas da cerveja que são atribuídos a compostos carbonílicos.

Meilgaard [5] realizou um estudo sobre o impacto organoléptico de alguns aldeídos e cetonas na estabilidade da cerveja. Consistiu em preparar várias alíquotas de cerveja

contaminadas individualmente com compostos desse tipo e na avaliação sensorial de cada alíquota por um painel de provadores especializado. Na tabela seguinte estão transcritos os resultados obtidos neste estudo.

**Tabela 1.1. – Limites de percepção e descrição sensorial de alguns compostos carbonilo em cerveja [5]**

<b>Aldeídos<sup>(***)</sup></b>	<b>N. carbonos</b>	<b>L. P. <sup>(*)</sup>/ppb</b>	<b>Aroma/Sabor</b>	<b>Aceitação<sup>(**)</sup></b>
<b>Formaldeído</b>	1	400 000	adstringente; frutado	3
<b>Acetaldeído</b>	2	25 000	folhas verdes; frutado	1
glioxal	2	7 000 000	Queimado	4
propanal	3	2 500	maça; folhas verdes	1
<b>trans-2-propenal</b>	3	15 000	doce; mel	1
<b>butanal</b>	4	1 000	melão; verniz	2
<b>trans-2-butenal</b>	4	8 000	maça; amêndoa	1
<b>furfural</b>	5	150 000	papel; folhas	4
<b>hexanal</b>	6	300-400	amargo; aldeído	2
<b>trans-2-hexenal</b>	6	500-750	amargo; alcoólico adstringente;	3
heptanal	7	50-100	amargo; aldeído; vinoso	5
<b>octanal</b>	8	40	casca de laranja; amargo	3
<b>trans-2-octenal</b>	8	0.3-0.5	oxidado; aldeído; amargo	4
<b>nonanal</b>	9	15-20	adstringente; oxidado; frutado	4
<b>trans-2-nonenal</b>	9	0.3-0.5	oxidado; cerveja velha; papel/cartão	4
decanal	10	5-7	amargo; casca laranja; frutado	2
<b>trans-2-decenal</b>	10	1	amargo; oxidado; aldeído; ranço	3
<b>undecanal</b>	11	3-4	amargo; laranja; vinoso	3
<b>dodecanal</b>	12	1.5	acido gordo; aldeído	2
<b>Cetonas<sup>(***)</sup></b>	<b>N. carbonos</b>	<b>L. P. <sup>(*)</sup>/ppb</b>	<b>Aroma/Sabor</b>	<b>Aceitação<sup>(**)</sup></b>
<b>diacetilo</b>	4	150	diacetilo; manteiga	3
<b>2-pentanona</b>	5	30 000	jasmim; cetona	2
2-hexanona	6	4 000	cetona; <i>Roquefort</i> (queijo)	3
2-heptanona	7	2 000	cetona; noz; verniz	3
2-octanona	8	250	álcool octílico; verniz;	3
<b>2-nonanona</b>	9	200	cetona; verniz	3
2-decanona	10	250	adocicado; flores	2
2-undecanona	11	400	plantas verdes	2

(\*) L. P. – limite de percepção

(\*\*) os valores obtidos estão compreendidos entre 1 e 5 e representam por ordem crescente uma medida de não aceitação para cada aldeído.

(\*\*\*) – a negrito identificam-se os compostos carbonílicos identificados por Hashimoto [6] em cerveja oxidada

Os resultados obtidos por este autor mostram que, dum modo geral, o limite de percepção dos compostos carbonílicos diminui com o aumento da cadeia carbonada. Foi também possível verificar que de entre o conjunto de compostos carbonilo ensaiados, os aldeídos monoinsaturados de cadeia longa mostraram ser os mais desagradáveis e com limite de percepção mais baixo.

Os ensaios de caracterização da fracção carbonílica realizados por N. Hashimoto e T. Eshima [6] em cerveja, permitiram identificar, entre outros, alguns aldeídos insaturados que os autores consideraram, tal como Meilgaard, como os principais responsáveis pelas características das cervejas envelhecidas.

Os estudos que têm sido desenvolvidos por muitos investigadores permitem, actualmente, identificar com muita confiança, as principais vias associadas à formação dos compostos carbonílicos. Este assunto irá ser retomado no ponto 3.

## 2.- Reactividade de compostos carbonílicos

- 2.1. – Introdução
- 2.2. – Algumas reacções de adição nucleófilas
- 2.3. – Tautomerismo entre as formas carbonilo e enol
- 2.4. – Oxidação / Redução de compostos carbonílicos

### 2. – Reactividade de compostos carbonílicos [7,8,9]

#### 2.1. - Introdução

Com o objectivo de se conhecer os principais equilíbrios em que, potencialmente, o *trans*-2-nonenal poderá estar envolvido na cerveja, far-se-á neste ponto uma breve abordagem sobre a reactividade dos compostos carbonílicos. Nesta abordagem, estão descritas as principais reacções características dos aldeídos. Embora não seja possível com esta descrição caracterizar a reactividade química do *trans*-2-nonenal na cerveja, poder-se-á inferir sobre quais os potenciais constituintes da matriz cerveja que podem interaccionar com este aldeído.

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



Figura 2.1. – Estrutura simplificada de compostos carbonílicos: a) aldeídos e b) cetonas

A reactividade dos compostos carbonílicos envolve, de um modo geral, o seu grupo funcional, cuja estrutura geral pode ser representada através de duas estruturas híbridas (ver figura 2.2.):

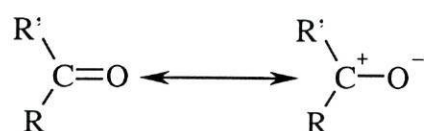


Figura 2.2. – Estruturas híbridas do grupo carbonilo

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

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. Assim, grupos que possam doar densidade electrónica ao carbono, tais como, grupos alquilo, atenuam o dipolo que existe entre o carbono e o oxigénio; pelo contrário, grupos R e R' aceitadores de densidade electrónica, tais como, grupos possuidores de átomos muito electronegativos, acentuam o dipolo que existe no grupo carbonilo. A intensidade do dipolo é, igualmente, dependente das condições de meio, em particular do pH. Por exemplo, em meio ácido, facilita-se a protonação do átomo de oxigénio do grupo carbonilo, o que por sua vez, provoca uma maior deslocalização da densidade electrónica responsável pela ligação do grupo carbonilo (ou seja, acentua a intensidade do dipolo).

É devido à existência deste dipolo que os compostos carbonílicos são relativamente reactivos. Descrevem-se seguidamente, e de uma forma resumida, as principais reacções associadas a compostos carbonílicos.

## 2.2. – Algumas reacções de adição nucleófilas

As reacções de adição nucleófilas consistem na adição de um composto com características nucleófilas ao carbono do grupo carbonilo, do modo como se encontra esquematizado na figura seguinte.

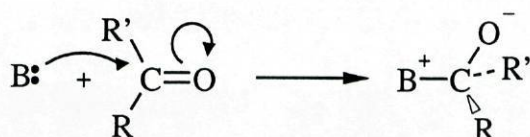


Figura 2.3. – Reacção genérica de adição nucleófila ao grupo carbonilo. “B:” representa um composto nucleófilo

Constituem potenciais nucleófilos todos os compostos que possuam na sua estrutura um átomo capaz de doar densidade electrónica, ou alternativamente, um átomo com excesso de densidade electrónica. A extensão da reacção de adição nucleófila dependerá da polarização da ligação C=O (que varia consoante os grupos que estão ligados ao grupo carbonilo), bem como, de um maior ou menor impedimento estereoquímico associado ao volume da espécie nucleófila e aos grupos adjacentes ao grupo carbonilo.

Consideram-se, seguidamente, algumas reacções de adição nucleófila envolvendo diferentes agentes nucleófilos.

### 2.2.1. - Adição da molécula de água

A adição de uma molécula de água ao composto carbonílico resulta na formação de um diol (ver figura 2.4.). Este processo é catalisado em meio ácido ou em meio alcalino.

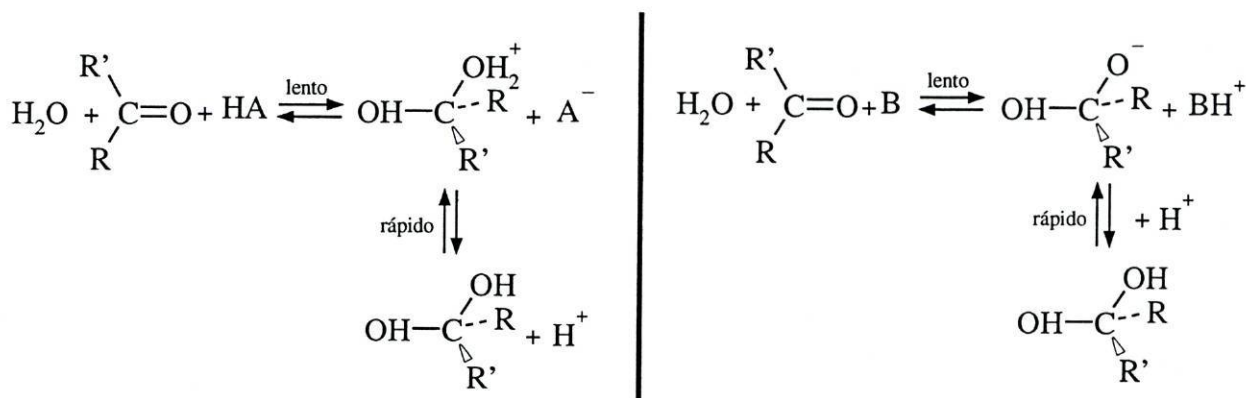


Figura 2.4. - Mecanismos propostos para a adição de água ao grupo carbonilo. a) reacção catalisada em meio ácido; b) reacção catalisada em meio alcalino



Esta reacção é reversível e apreciavelmente extensa para compostos carbonílicos de cadeia curta. Na tabela seguinte podem ser observados alguns valores termodinâmicos da constante de hidratação de alguns aldeídos e cetonas. Estes valores confirmam uma maior extensão da adição da molécula de água, para aldeídos cujo grupo funcional não está rodeado de grupos volumosos, e para aldeídos que possuem na sua estrutura átomos atractores de densidade electrónica (p.e. átomos de cloro).

**Tabela 2.1. – Valores de constantes de hidratação para alguns compostos carbonílicos**  
(Valores obtidos a 25°C) [7]

Composto Carbonílico (RR'CO)	$K = \frac{[RR'C(OH)_2]}{[RCOR']}$
HCHO	$2 \times 10^3$
CH <sub>3</sub> CHO	1,3
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CHO	0,71
(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CCHO	0,24
CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	$2 \times 10^{-3}$
CH <sub>3</sub> COCHCl <sub>2</sub>	2,9

Tal como a molécula de água, os álcoois também podem reagir com o grupo carbonilo através da reacção de adição nucleófila. A adição de álcoois ao grupo carbonilo envolve numa primeira fase a adição de uma molécula de álcool com a formação de um hemiacetal e, numa fase subsequente, a adição de uma nova molécula de álcool com a formação de um acetal. A formação de acetais é catalisada em meio ácido. Nestas condições, tal como foi anteriormente referido, é possível aumentar a deficiência electrónica do carbono do grupo carbonilo tornando-o mais vulnerável ao ataque de um nucleófilo. Está representada na figura 2.5. o mecanismo proposto para a reacção referida.

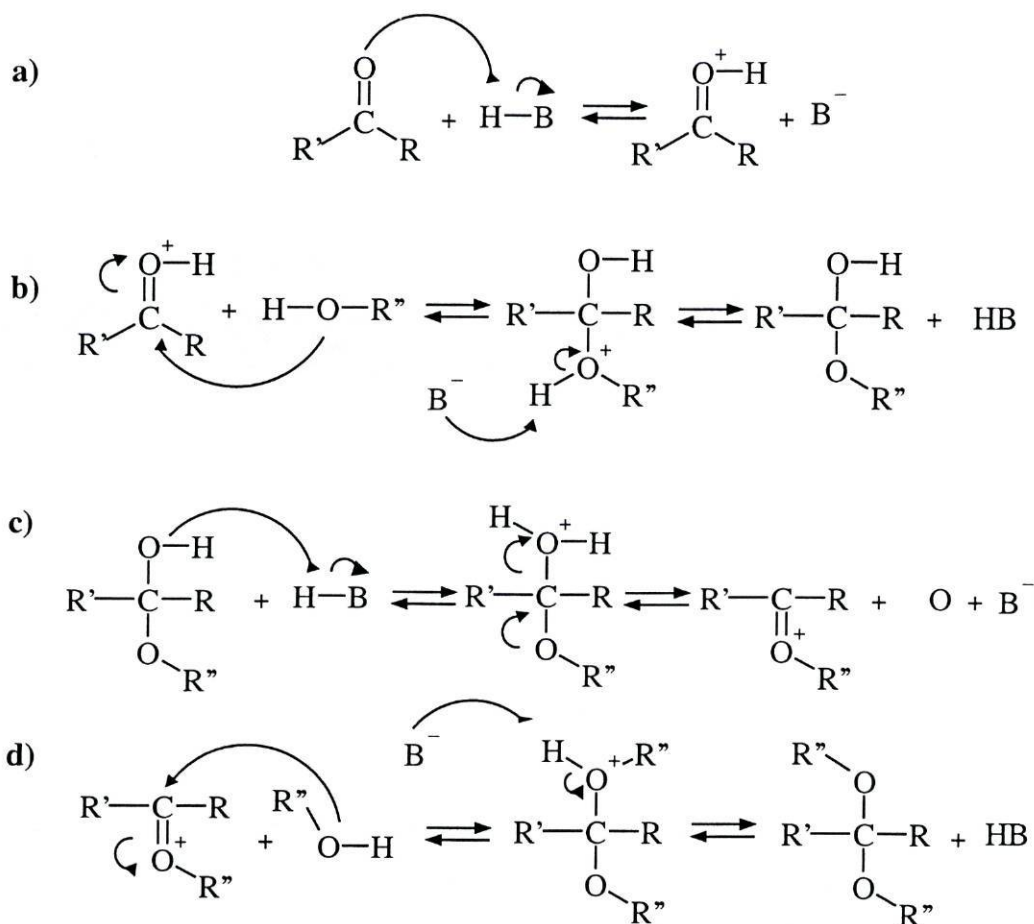


Figura 2.5. – Mecanismo proposto para a formação de acetais em meio ácido. a) protonação do grupo carbonilo; b) adição de uma molécula de álcool à estrutura anterior com formação de um hemiacetal; c) protonação do grupo hidroxilo do hemiacetal; d) adição de uma molécula de álcool à estrutura anterior com formação de um acetal

### 2.2.2. - Adição de aminas

Certos compostos contendo átomos de azoto, tais como, aminas, amoníaco, *etc.*, reagem com compostos carbonílicos conduzindo à formação de produtos de reacção que possuem uma ligação dupla entre o carbono (proveniente do grupo funcional do aldeído) e o azoto (proveniente do nucleófilo). Os compostos que possuem esta ligação são designados de iminas, ou alternativamente, de bases de *Schiff* (ver figura 2.6.).

O mecanismo que explica esta adição pode ser resumido do seguinte modo: numa primeira etapa ocorre o ataque nucleófilo ao carbono do grupo funcional pelo átomo de azoto, que conduz à formação de um composto de estrutura tetraédrica (este composto é,

habitualmente, muito instável); seguidamente, ocorre uma reacção de eliminação, em que, a estrutura atrás formada perde uma molécula de água originando uma imina (estes compostos são caracterizados por possuírem na sua estrutura uma ligação do tipo C=N). A estabilidade destes compostos depende dos átomos que estão ligados ao grupo funcional da imina: as iminas que possuem átomos de hidrogénio ou grupos alquilo ligados aos átomos de carbono ou azoto do grupo funcional são, regra geral, instáveis, ao passo que, as iminas que possuem na sua estrutura grupos arilo ou grupos com átomos de azoto ligados ao azoto nucleófilo são mais estáveis, podendo inclusive ser isoladas. Na figura seguinte está ilustrado o mecanismo proposto.

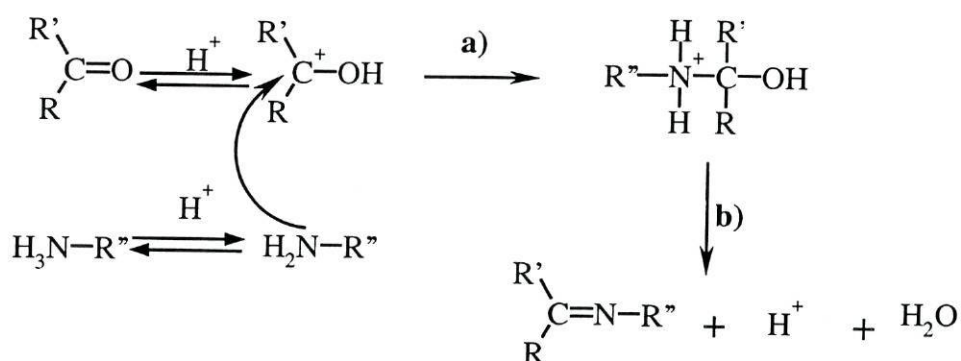
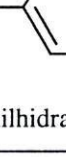
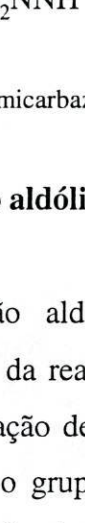

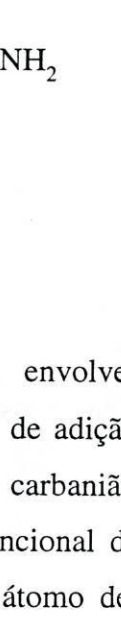



Figura 2.6. – Mecanismo proposto para a adição de aminas ao grupo carbonilo. a) ataque nucleófilo do composto azotado com formação de um  $\alpha$ -aminoálcool; b) eliminação de uma molécula de água com formação de uma imina

A reacção de formação de iminas é, habitualmente, bastante extensa e rápida. O passo lento da reacção é catalisado em meio medianamente ácido, pois, nestas condições, facilita-se a protonação do grupo hidroxilo e a subsequente eliminação de uma molécula de água. Refira-se ainda que, um meio demasiado ácido desacelera todo este processo pois conduz à formação da espécie  $-\text{NH}_3^+$ , por protonação do grupo nucleófilo  $-\text{NH}_2$ .

A título exemplificativo encontram-se referidos na tabela seguinte alguns compostos azotados que podem ser utilizados como agentes nucleófilos, bem como, os respectivos produtos resultantes da reacção de adição com compostos carbonilo.

**Tabela 2.2. – Exemplos de compostos azotados que podem formar bases de Schiff estáveis a partir de compostos carbonílicos**

Nome do nucleófilo/ Estrutura	Produto formado/ Estrutura
$\text{HONH}_2$ hidroxilamina	$\text{HON=CRR}'$ oxima
$\text{H}_2\text{NNH}_2$ hidrazina	$\text{H}_2\text{NNH=CRR}'$ hidrazona
$\text{H}_2\text{NNH}$ -  fenilhidrazina	 fenilhidrazona
$\text{H}_2\text{NNH}$ -  2,4-dinitrofenilhidrazina	 2,4-dinitrofenilhidrazona
$\text{H}_2\text{NNH}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ semicarbazida	 semicarbazona

### 2.2.3. – Condensação aldólica

A condensação aldólica envolve a formação de um  $\beta$ -hidroxialdeído ou  $\beta$ -hidroxicetona através da reacção de adição entre dois compostos carbonílicos. Esta reacção inicia-se com a formação de um carbanião a partir de um dos compostos carbonílicos, que posteriormente ataca o grupo funcional do outro composto carbonílico. O carbanião pode formar-se pela remoção de um átomo de hidrogénio por espécies presentes no meio, ou alternativamente, por equilíbrio tautomérico do próprio composto carbonílico inicial (o equilíbrio tautomérico está descrito no ponto 2.3.). Esta reacção é catalisada em meio ácido e em meio alcalino, sendo o último caso o mais comum.

O mecanismo proposto para esta reacção está representado na figura 2.7.

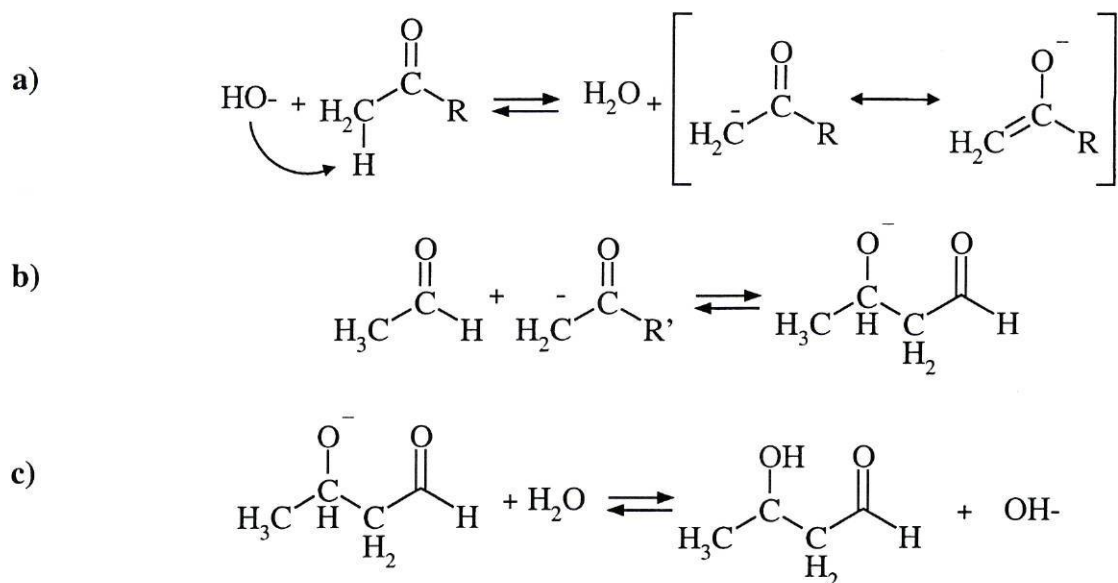


Figura 2.7. – Mecanismo proposto para a reacção aldólica em meio alcalino. a) formação do carbanião; b) adição nucleófila do enolato ao grupo carbonilo; c) formação do aldol

#### 2.2.4. - Adição de hidrogenossulfito

Alguns compostos que possuem átomos de enxofre são capazes de adicionar ao grupo carbonilo de aldeídos ou cetonas, como é o caso do anião hidrogenossulfito.

A reacção de adição do hidrogenossulfito ao grupo carbonilo conduz à formação de  $\alpha$ -hidroxissulfonatos (ver figura 2.8.). A adição do anião hidrogenossulfito ao grupo carbonilo é descrita como rápida, reversível e apreciavelmente extensa para aldeídos de cadeia curta.

Um aspecto importante que condiciona bastante a extensão da formação destes compostos é o factor estereoquímico. Tratando-se o anião hidrogenossulfito de um anião relativamente volumoso, se os grupos R e R' adjacentes ao carbono do grupo funcional forem igualmente volumosos, a extensão da reacção será apreciavelmente reduzida, uma vez que é dificultada a aproximação do nucleófilo ao grupo carbonilo.

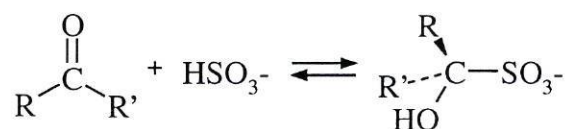


Figura 2.8. – Reacção de adição do anião hidrogenossulfito ao grupo carbonilo com formação de  $\alpha$ -hidroxissulfonato

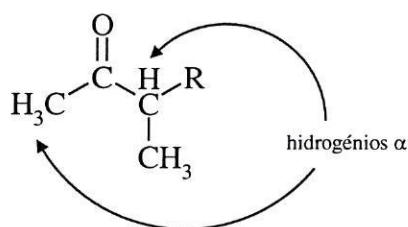
Na Tabela 2.3. apresentam-se alguns valores da constante de equilíbrio para a reacção de adição do anião hidrogenossulfito a alguns aldeídos e cetonas. Estes valores confirmam a influência que grupos volumosos na vizinhança do grupo carbonilo exercem sobre esta reacção de adição nucleófila.

**Tabela 2.3. – Valores de constantes de equilíbrio para a reacção de adição do anião hidrogenossulfito a aldeídos e cetonas (valores obtidos a 0°C) [7]**

Composto carbonílico RCOR'	$K = \frac{[RR'C(OH)SO^3-]}{[RCOR'] \times [HSO^3-]}$
CH <sub>3</sub> CHO	800
CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	200
CH <sub>3</sub> COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	40
CH <sub>3</sub> COC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	1,6

### 2.3. – Tautomerismo entre as formas carbonilo e enol

O equilíbrio entre a forma carbonílica (aldeído ou cetona) e a forma enólica (álcool insaturado) é passível de ocorrer nos compostos carbonilo possuidores de um hidrogénio  $\alpha$  (ver figura 2.9.).



**Figura 2.9. – Indicação de hidrogénios  $\alpha$  num composto carbonílico**

Estes hidrogénios possuem a particularidade de serem ligeiramente mais acídicos relativamente a outros hidrogénios que possam existir no mesmo composto. Esta maior acidez é devida à presença do grupo carbonilo adjacente, que polariza os electrões responsáveis pela ligação C-H, e que explica a maior facilidade com que estes hidrogénios podem ser removidos do composto.

Quando ocorre a remoção de um hidrogénio  $\alpha$ , forma-se um anião cujo excesso de carga negativa está deslocalizado entre os átomos de C-C=O (C-carbono onde inicialmente se

encontrava ligado o hidrogénio  $\alpha$ ). O equilíbrio que se estabelece entre a forma carbonílica e a forma enólica resulta do modo como ocorre a protonação, ora do carbanião (que, assim, conduz à formação da forma carbonílica), ora do anião enolato (que, assim, conduz à formação da forma enólica).

Este processo está esquematizado na figura 2.10.

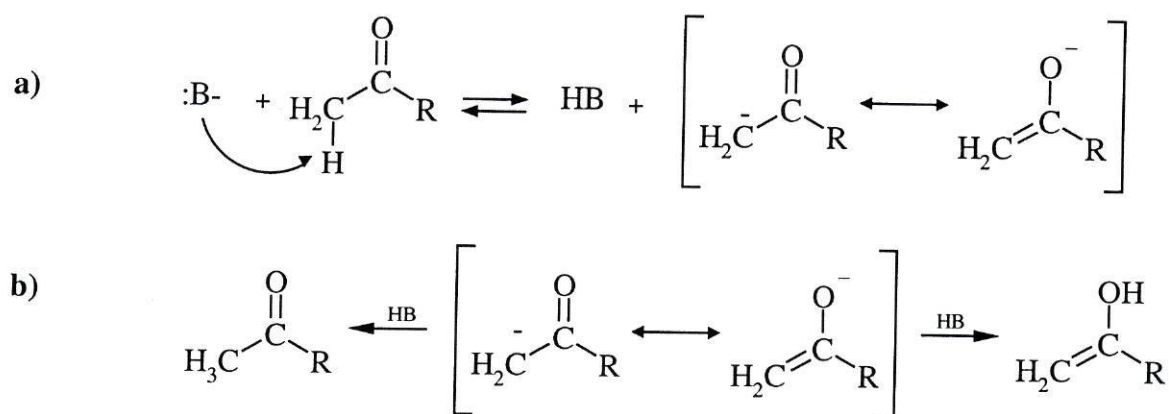


Figura 2.10. – Equilíbrio de tautomeria carbonilo – enol. a) remoção do hidrogénio  $\alpha$ ; b) protonação das formas enolato e carbanião.

Em todos os aldeídos e cetonas que possuem pelo menos um hidrogénio  $\alpha$ , existe um equilíbrio com a correspondente forma enólica. A interconversão destes isómeros é catalisada por ácidos ou bases. Dum modo geral, a posição do equilíbrio carbonilo-enol, está deslocada no sentido da forma carbonílica, devido ao facto de a ligação dupla que existe entre o carbono e o oxigénio deste grupo ser mais forte do que a ligação dupla que se estabelece entre os carbonos na forma enólica.

Na tabela seguinte, podem ser observadas algumas constantes de equilíbrio relativas ao equilíbrio carbonilo-enol que se estabelece em alguns compostos carbonílicos.

Tabela 2.4. – Valores de constante de equilíbrio carbonilo-enol para alguns compostos carbonílicos [7]

Forma carbonílica	Forma enólica	$K = [\text{enol}]/[\text{carbonilo}]$
$\text{CH}_3\text{CHO}$	$\text{CH}_2=\text{CH}_2\text{OH}$	$5 \times 10^{-6}$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}_2\text{OH}$	$1,2 \times 10^{-4}$
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCHO}$	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}_2\text{OH}$	$1,6 \times 10^{-3}$
$\text{CH}_3\text{COCH}_3$	$\text{CH}_2=\text{COHCH}_3$	$6,3 \times 10^{-8}$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCH}_3$	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{COHCH}_3$	$5 \times 10^{-9}$

## 2.4. – Oxidação / redução de compostos carbonílicos

Os aldeídos são oxidados a ácidos carboxílicos por uma variedade de agentes oxidantes, entre os quais se incluem, por exemplo, o ácido nítrico, o anião permanganato, o peróxido de hidrogénio ou ainda o oxigénio molecular. Neste ponto vai-se apenas referir a oxidação de aldeídos por acção do oxigénio molecular.

A reacção que traduz a oxidação de aldeídos pelo oxigénio pode ser esquematizada do seguinte modo:



Ao contrário do que acontece com os aldeídos, as cetonas apenas são oxidadas pelo  $\text{O}_2$  sob condições especiais. Este facto resulta da oxidação de cetonas envolver a quebra de uma ligação carbono-carbono de um grupo extracção de um grupo alquilo/arilo (que é bastante difícil de quebrar). Nos aldeídos é apenas necessária a quebra de uma ligação carbono-hidrogénio.

Relativamente ao processo de redução dos compostos carbonílicos, os aldeídos podem ser reduzidos a álcoois primários a as cetonas a álcoois secundários. De entre as vias possíveis para a redução dos compostos carbonílicos, destacam-se a hidrogenação catalítica ou o uso de compostos organometálicos, tais como, o tetra-hidretoaluminato de lítio ou o tetra-hidretoaluminato de sódio. A reacção dos compostos organometálicos com compostos carbonílicos é descrita como muito rápida e extensa num meio habitualmente aprótico.



## 3. – *O trans-2-nonenal na cerveja*

- 3.1. – Introdução
- 3.2. – Equilíbrios que condicionam o teor de *trans-2-nonenal* no processo de fabrico da cerveja
- 3.3. – Equilíbrios que condicionam o teor de *trans-2-nonenal* durante o envelhecimento da cerveja
- 3.4. – Efeito da temperatura de armazenamento na concentração de *trans-2-nonenal* na cerveja
- 3.5. – Efeito do pH da cerveja na concentração de *trans-2-nonenal* na cerveja
- 3.6. – Efeito do oxigénio na concentração de *trans-2-nonenal* na cerveja
- 3.7. – Metodologias analíticas para determinação de *trans-2-nonenal* na cerveja
- 3.8. – Conclusão

### 3.1. - Introdução

Os mecanismos responsáveis pelo aparecimento e/ou desaparecimento de aldeídos na cerveja não são inequivocamente conhecidos. Estudos sobre a origem destes compostos e sobre a sua evolução ao longo do armazenamento da cerveja têm o maior interesse para a indústria cervejeira, a fim de criar estratégias, a nível industrial, que possam minimizar os factores responsáveis pelo seu aparecimento.

As várias vias potenciais de formação de aldeídos podem decorrer durante a maltagem, empastagem, fervura do mosto e durante o envelhecimento da cerveja, englobando, por exemplo, a degradação de aminoácidos, a oxidação de álcoois superiores, a oxidação de

iso- $\alpha$ -ácidos (isohumulonas), a condensação aldólica ou a oxidação enzimática/não enzimática de ácidos gordos [10]. Contudo, tal como foi referido anteriormente, ainda não existe consenso sobre qual o mecanismo preponderante para a formação de aldeídos, ou mesmo sequer sobre o conjunto de factores que propiciam o aparecimento desses compostos.

Encontra-se esquematizado na figura 3.1. um diagrama que ilustra as principais vias de formação de aldeídos, durante as diferentes fases de preparação e durante o armazenamento da cerveja, que são responsáveis pela perda das características organolépticas da cerveja. A identificação dos factores que originam estes aldeídos não é isenta de dificuldades, já que a importância de cada uma destas vias de formação dependerá, não só das matérias primas usadas para o fabrico da cerveja, mas também do modo como se processa o fabrico da cerveja.

Um dos aldeídos que tem merecido maior atenção, por parte das indústrias cervejeiras, é o *trans*-2-nonenal, devido à sua reconhecida influência sobre as características organolépticas da cerveja. Este aldeído tem sido correlacionado com o aroma/sabor a papel/cartão que pode fazer-se notar logo a partir do primeiro mês de envelhecimento da cerveja.

Este aroma/sabor foi referenciado originalmente por Burger *et al.* durante a década de 50 em cervejas do tipo *lager* e caracterizado sensorialmente pelo mesmo investigador, do modo já referido. Em 1959, Barker e Stollberg avançaram com a hipótese de existência de precursores na cerveja responsáveis pelo aparecimento deste aroma/sabor.

A identificação do aldeído *trans*-2-nonenal na cerveja surgiu alguns anos mais tarde, em 1970 por A. Jamieson e J. van Gheluwe [11]. Estes investigadores foram os primeiros a correlacionar o aroma/sabor a papel/cartão que ocorre em cerveja envelhecida, com a presença deste aldeído. Em 1974, Wang e Siebert demonstraram que não é necessária a participação sinérgica dos outros compostos para, juntamente com o aldeído *trans*-2-nonenal, se sentir o aroma/sabor a papel/cartão. Segundo estes mesmos autores, uma concentração deste aldeído compreendida entre 0,05 ppb e 0,1 ppb é suficiente para fazer sobressair este aroma/gosto característico. Para concentrações próximas de 0,2 ppb são perceptíveis notas desagradáveis a papel, papel moído e cartão, e para concentrações ainda mais elevadas deste aldeído é perceptível um aroma a pepino [12].

Em conclusão, o aldeído *trans*-2-nonenal é, pelas razões apontadas, um composto determinante na qualidade organoléptica de uma cerveja.

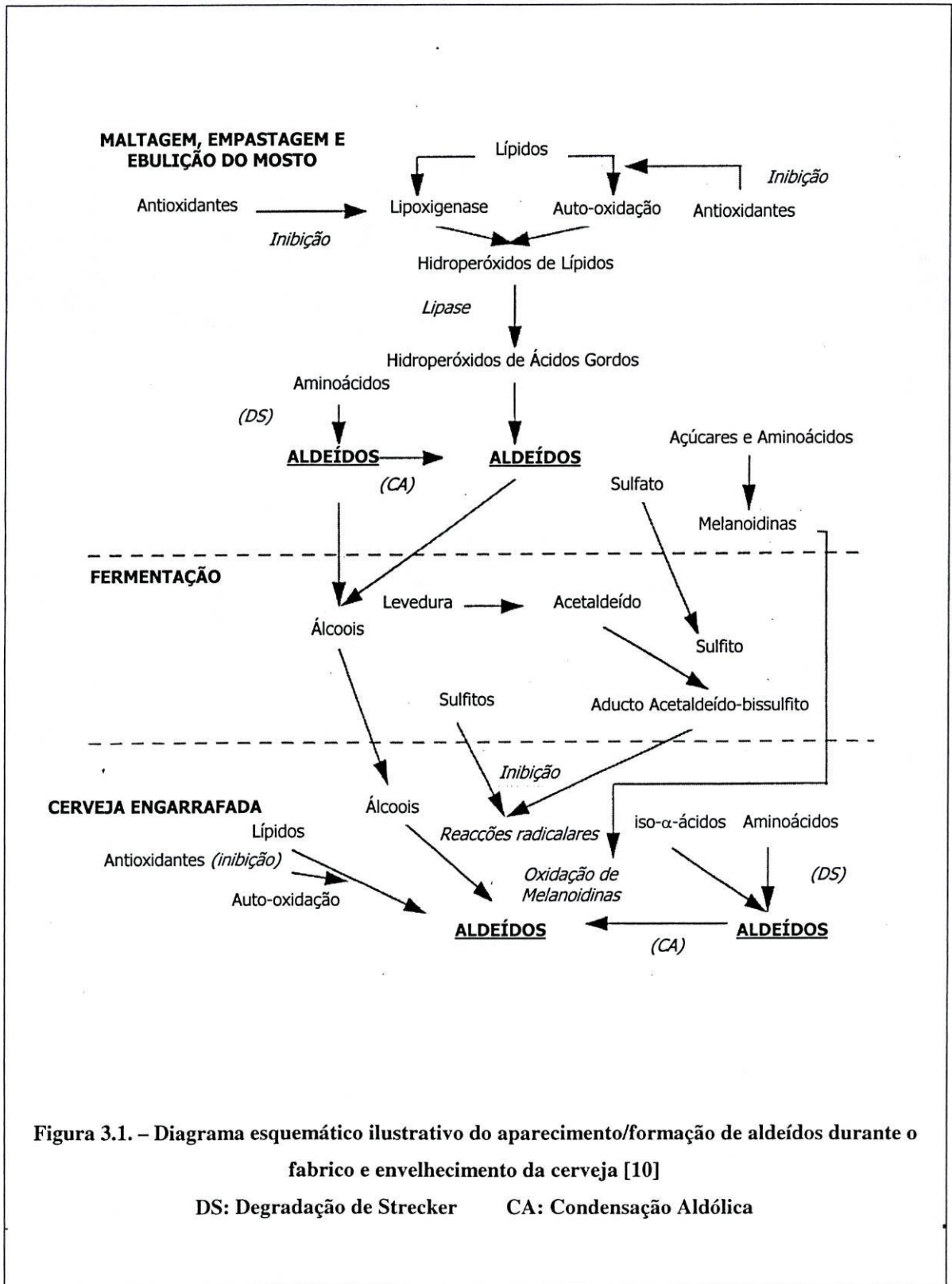


Figura 3.1. – Diagrama esquemático ilustrativo do aparecimento/formação de aldeídos durante o fabrico e envelhecimento da cerveja [10]

DS: Degradação de Strecker      CA: Condensação Aldólica

### 3.2. – Equilíbrios que condicionam o teor de *trans*-2-nonenal no processo de fabrico da cerveja

Os níveis de concentração de *trans*-2-nonenal variam continuamente durante o fabrico e envelhecimento de uma cerveja. O aparecimento de *trans*-2-nonenal, juntamente com outros aldeídos, cetonas e álcoois, ocorre na primeira etapa do processo de fabrico da cerveja correspondente ao processo de maltagem. Este aparecimento é explicado, segundo Drost [2], por via da degradação enzimática e/ou não enzimática de lípidos provenientes do malte (ver Figura 3.2.).

A degradação enzimática dos lípidos inicia-se com a libertação de ácidos gordos por actividade da enzima lipase e prossegue pela actividade da enzima lipoxigenase, que catalisa a formação de hidroperóxidos (a partir dos ácidos gordos), cuja degradação origina compostos conotados com o envelhecimento da cerveja, tal como, o *trans*-2-nonenal.

A influência da actividade enzimática na etapa de maltagem, sobre a estabilidade organoléptica da cerveja foi, igualmente, estudada por Sophie Noël *et al.*[13] através de ensaios com *trans*-2-nonenal deuterado. Nestes ensaios os autores adicionaram uma quantidade elevada de *trans*-2-nonenal deuterado na fase de empastagem e depois procederam à análise de *trans*-2-nonenal em cerveja fresca e em cerveja envelhecida. A análise efectuada a ambas as cervejas não revelou a existência de *trans*-2-nonenal deuterado, pelo que, os autores concluíram que o *trans*-2-nonenal formado até à fase de empastagem não é significativo para a estabilidade organoléptica na cerveja.

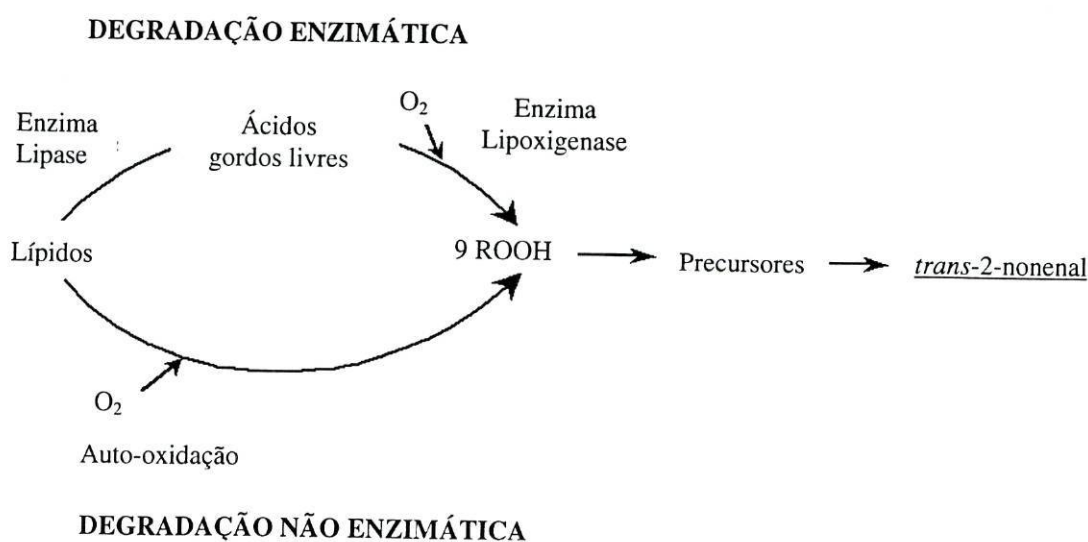


Figura 3.2. – Possíveis vias de formação de *trans*-2-nonenal que ocorrem durante a produção e envelhecimento da cerveja [2]

Durante a fase da empastagem, procede-se à filtração de todos os resíduos sólidos que se encontram em suspensão no meio e que derivam da mistura das matérias primas necessárias ao fabrico da cerveja. O processo de filtração conduz à eliminação de precursores de *trans-2-nonenal*, bem como de proteínas insolúveis e lípidos, que adsorvem preferencialmente à superfície desses sedimentos [13].

Durante a fervura do mosto e fermentação, o nível de *trans-2-nonenal* e dos aldeídos em geral, baixa, devido respectivamente, à evaporação que ocorre, principalmente para os aldeídos mais voláteis, e devido à acção redutora das leveduras presentes que transformam os aldeídos nos álcoois correspondentes. Apenas os aldeídos ligados a compostos existentes na matriz, como por exemplo, aminoácidos, proteínas e sulfito [13, 14], escapam a esta redução podendo surgir na cerveja final na forma livre por cisão desses aductos.

Outros estudos realizados por Sophie Noël *et al.* [15] referem que, cerca de 90% de *trans-2-nonenal* que existe na fase de empastagem desaparece até à fase da fermentação, devido aos equilíbrios em que participa, dos quais se destacam, a hidratação (que conduz à formação do 3-hidroxinonanal), a oxidação, (que conduz à formação do ácido 3-nonenóico), ou interacções com aminoácidos/proteínas, (que conduz à formação de bases de Schiff).

Em suma, o nível de *trans-2-nonenal* encontrado durante o envelhecimento da cerveja, dependerá da quantidade de *trans-2-nonenal* que provém da última etapa do processo de fabrico da cerveja e que envolve o *trans-2-nonenal* livre e ligado a compostos da matriz, e ainda, do *trans-2-nonenal* formado *de novo*, ou seja, o *trans-2-nonenal* que é formado à custa de precursores existentes na cerveja.

### **3.3. – Vias potenciais de formação e equilíbrios que condicionam o teor de *trans-2-nonenal* durante o envelhecimento da cerveja**

A quantidade de *trans-2-nonenal* presente numa cerveja fresca tende a aumentar ao longo do seu tempo de vida; no entanto, alguns autores verificaram experimentalmente que o nível de *trans-2-nonenal* pode diminuir numa fase avançada do envelhecimento (ver Figura 3.3.).

Os motivos para o aumento do teor de *trans-2-nonenal* durante o envelhecimento da cerveja não são consensuais.

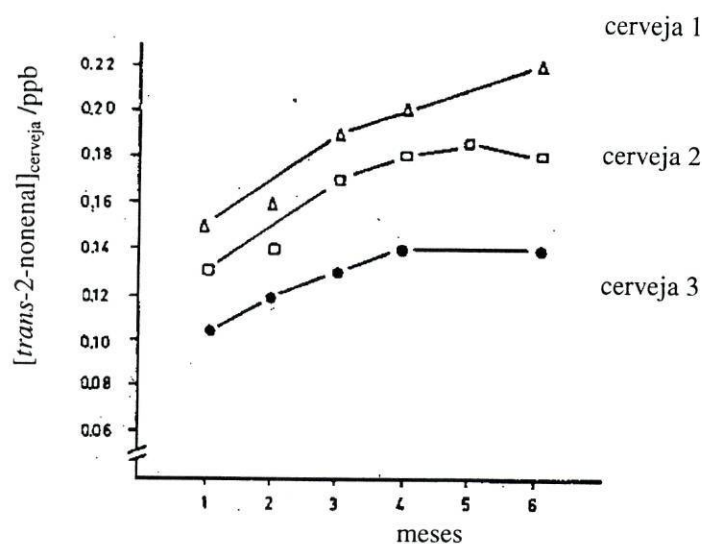


Figura 3.3. – Variação da concentração de *trans-2-nonenal* em diferentes cervejas envelhecidas a temperatura ambiente [2]

Descrivem-se seguidamente algumas vias e equilíbrios em que o *trans-2-nonenal* participa que poderão condicionam a concentração deste aldeído na cerveja.

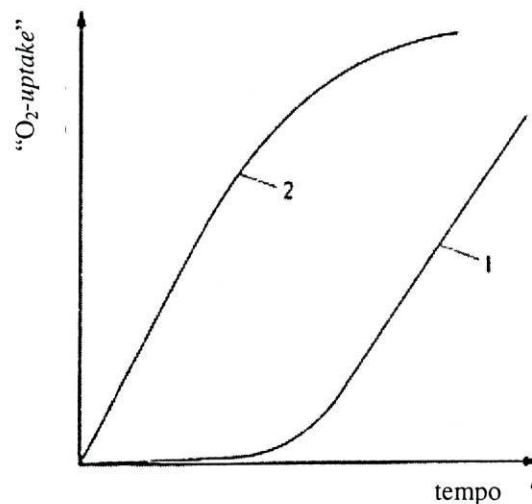
### 3.3.1. - Oxidação de ácidos gordos

Uma hipótese de mecanismo responsável pelo aumento do teor de *trans-2-nonenal* em cerveja, envolve a degradação de ácidos gordos [2, 16]. Os ácidos gordos, em particular os ácidos gordos insaturados, tais como o ácido oleico, linoleico ou linolénico, são introduzidos no processo de fabrico da cerveja pelo malte sob a forma de lípidos e libertados durante a maltagem e empastagem pela acção de enzimas.

A oxidação de ácidos gordos, varia de acordo com as condições de meio ou das espécies presentes. Condições de temperatura elevada, pH baixo, ou ainda, a presença de catiões metálicos ou espécies oxidantes aceleram a auto-oxidação de ácidos gordos. Pelo contrário, condições de temperatura baixa, ausência de catiões metálicos e de espécies oxidantes, e a presença de aditivos antioxidantes retardam a degradação de ácidos gordos [17].

A figura seguinte (Figura 3.4.) esquematiza dois perfis de "*O<sub>2</sub>-uptake*" que podem ser correlacionados com a velocidade de degradação oxidativa de ácidos gordos e que podem verificar-se em alimentos em função das condições de meio. O perfil (1) traduz o que habitualmente se verifica nos géneros alimentícios; existe uma primeira fase em que a absorção de oxigénio para o alimento é mínima, e uma fase posterior, em que, ocorre um

consumo rápido de oxigénio normalmente responsável pela degradação do alimento. Este perfil é justificado com base no desenvolvimento de reacções radicalares. Na primeira fase, não é possível a propagação destas reacções, normalmente devido à presença de conservantes e estabilizadores que bloqueiam os radicais; contudo, quando o nível dos conservantes ou estabilizadores baixa, ou deixa de estar disponível, observa-se o desenvolvimento de reacções radicalares no alimento. Este último comportamento corresponde ao perfil (2) quando à partida não existem conservantes e/ou estabilizadores.



**Figura 3.4.** – Velocidade de oxidação de ácidos gordos em função das condições de meio [17]; 1 – Concentração de espécies pró-oxidantes baixa; 2 – Concentração de espécies pró-oxidantes elevada

De acordo com o descrito na bibliografia, a oxidação dos ácidos gordos pode ocorrer por um mecanismo radicalar, nomeadamente por, auto-oxidação e por foto-oxidação, e ainda, por um mecanismo iónico.

### 3.3.1.1. - Auto-oxidação de ácidos gordos

O mecanismo de auto-oxidação de ácidos gordos inicia-se pela remoção homolítica de um hidrogénio do ácido gordo por uma espécie radicalar existente na matriz. Esta remoção ocorre com maior probabilidade no carbono alílico do ácido gordo, já que, conduz à formação de uma estrutura radicalar estabilizada por ressonância. O mecanismo da auto-oxidação prossegue pela adição de uma molécula de oxigénio ao ácido gordo radical, seguida de uma nova remoção homolítica de um hidrogénio de espécies presentes no meio conduzindo à

formação de um hidroperóxido. A reacção subsequente envolve a cisão do hidroperóxido com a formação dos produtos de degradação do ácido gordo. A figura 3.5. esquematiza o mecanismo descrito para a formação de *trans*-2-nonenal a partir da auto-oxidação do ácido linoleico. A formação de *trans*-2-nonenal resulta da combinação entre o radical hidroxilo e o radical 1,3-nonadienilo provenientes da degradação do hidroperóxido (9).

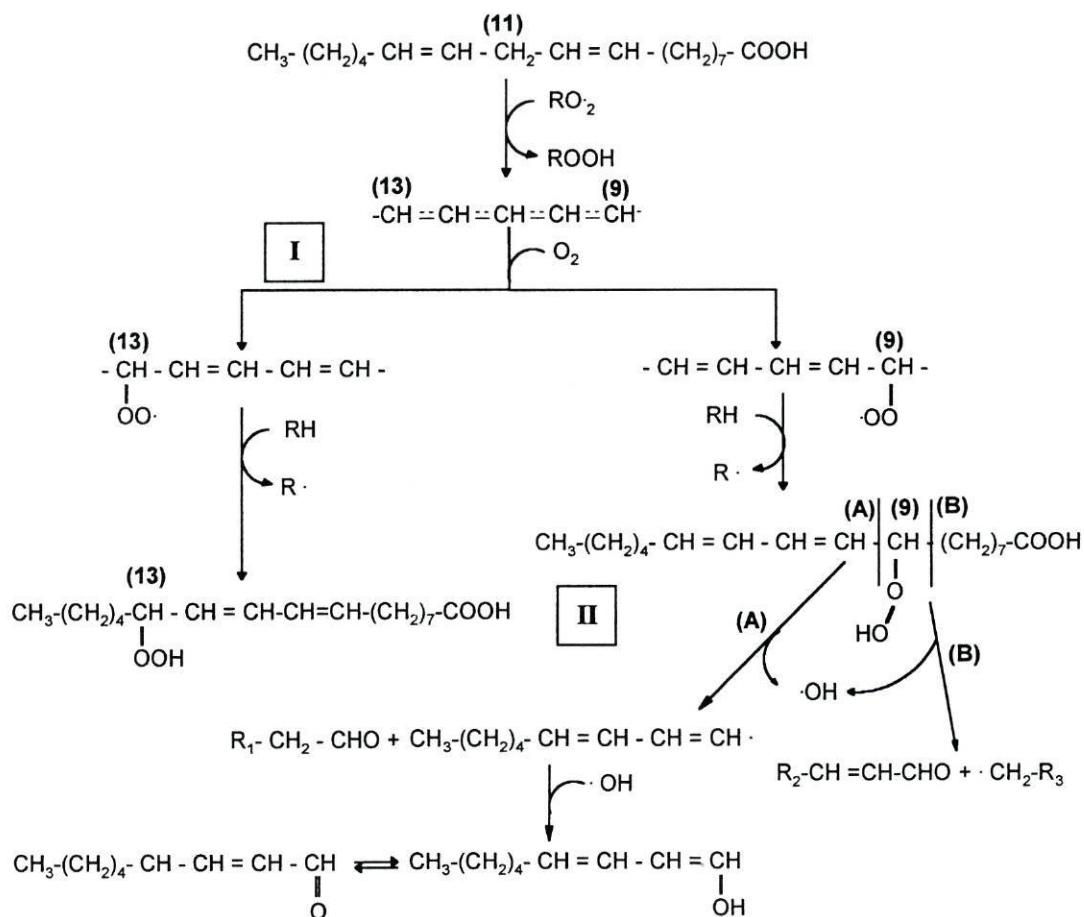


Figura 3.5. – Mecanismo radicalar proposto para a formação de *trans*-2-nonenal a partir da auto-oxidação do ácido linoleico; (I) – formação de monohidroperóxidos; (II) – cisão do monohidroperóxido. A cisão do monohidroperóxido(9) pela via (A) apresentada em (II), conduz à formação de *trans*-2-nonenal [17]

O mecanismo apresentado na figura anterior é apenas uma das muitas vias possíveis para a degradação do ácido linoleico por auto-oxidação. Efectivamente, a remoção inicial do hidrogénio do ácido linoleico pode ocorrer no carbono C8 ou no C14, por ambos possuírem hidrogénios alílicos. De igual modo, a adição do oxigénio ao ácido gordo radical também pode ocorrer no carbono C11. Estes mecanismos alternativos justificam a formação de diversos aldeídos saturados e insaturados, que podem igualmente afectar a estabilidade organoléptica da cerveja.



## 3.3.1.2. - Foto-oxidação de ácidos gordos

A degradação de ácidos gordos por foto-oxidação ocorre mais rapidamente do que o modo anteriormente descrito. Este mecanismo pressupõe a formação prévia de moléculas de O<sub>2</sub> no estado excitado singlete (a formação de oxigénio no estado excitado singlete resulta da interacção entre espécies excitadas pela acção da luz e o oxigénio no estado fundamental) que, ao contrário da moléculas de O<sub>2</sub> no estado fundamental, reage directamente com os ácidos gordos originando os hidroperóxidos correspondentes (ver Figura 3.6.).

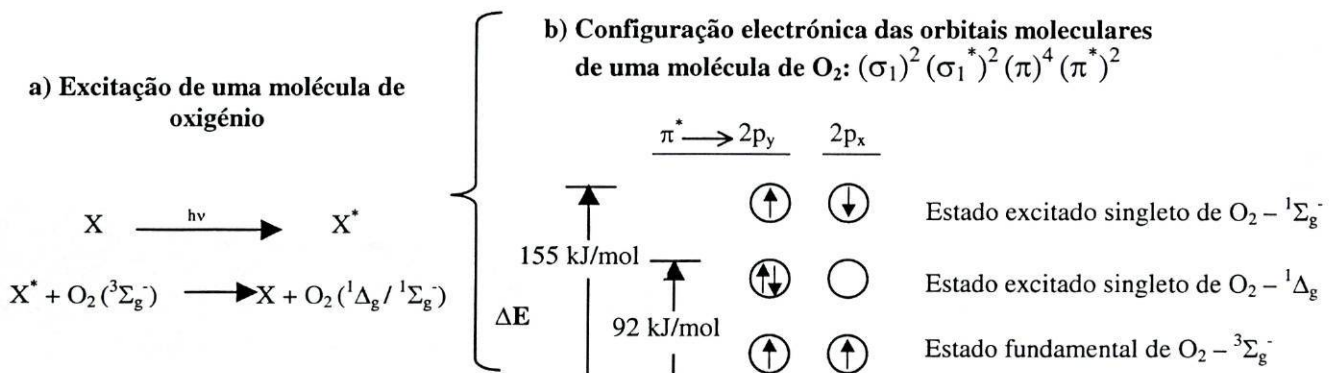


Figura 3.6. – a) Excitação de uma molécula de oxigénio. b) Configuração electrónica das orbitais 2p<sub>x</sub> e 2p<sub>y</sub> numa molécula de O<sub>2</sub> nos estados singlete ( $^1\Sigma_g^-$  e  $^1\Delta_g$ ) e no estado tripleto ( $^3\Sigma_g^-$ ) [17]

A interacção do O<sub>2</sub> no estado excitado singlete com os ácidos gordos conduz à formação dos hidroperóxidos através de um mecanismo de ciclo-adição conforme se ilustra na figura 3.7. No caso concreto do ácido linoleico, está referenciada a formação de 4 hidroperóxidos por foto-oxidação. Estes hidroperóxidos reagem, posteriormente, de forma análoga à já descrita.

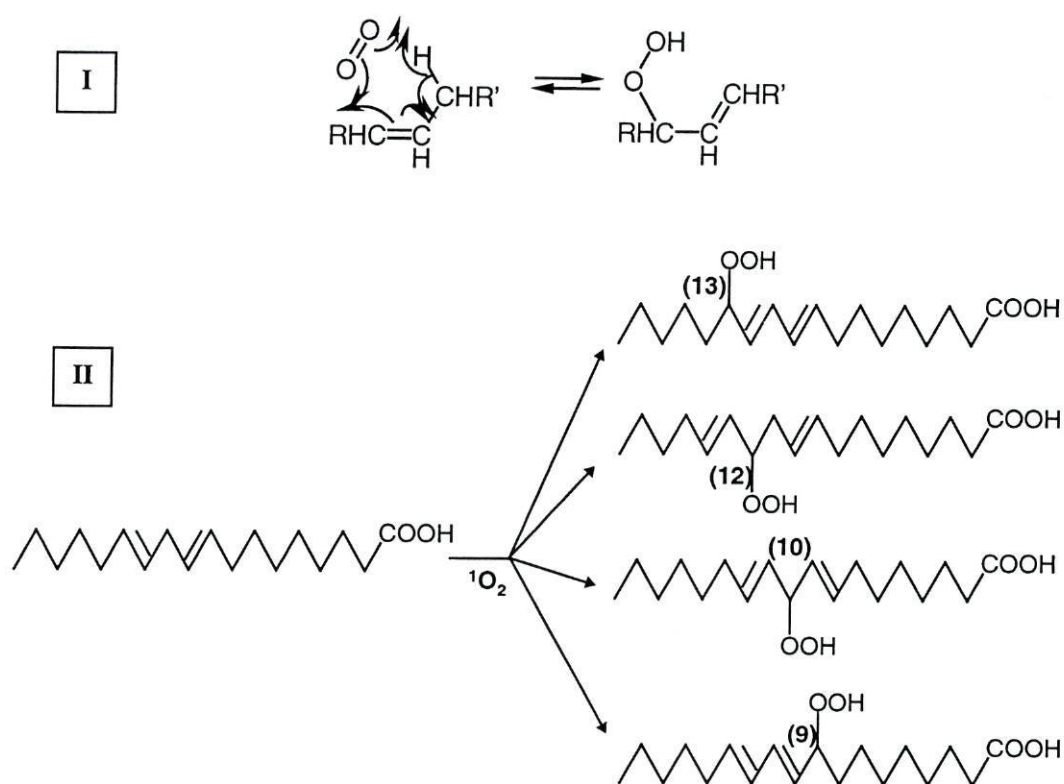


Figura 3.7. – (I) - Mecanismo proposto de adição de  $O_2$  no estado excitado singlete à ligação dupla do ácido linoleico com formação de um monohidroperóxido; (II) - Monohidroperóxidos formados por foto-oxidação a partir do ácido linoleico [17]

### 3.3.1.3. - Mecanismo iônico de degradação de ácidos gordos

Encontra-se também proposto um mecanismo iônico de degradação de monohidroperóxidos que admite-se que possa ocorrer em meios aquosos.

O mecanismo iônico começa com a protonação do grupo -OH do hidroperóxido e consequente perda de uma molécula de água. Forma-se um oxo-catião, altamente instável, que ataca a ligação simples C-C adjacente à ligação dupla C-C. Este rearranjo conduz à formação de um carbocatião, que por sua vez origina um aldeído e um enol. A figura 3.8. ilustra o mecanismo proposto que conduz à formação de *trans*-2-nonenal a partir do monohidroperóxido (9), formado a partir do ácido linoleico [17].

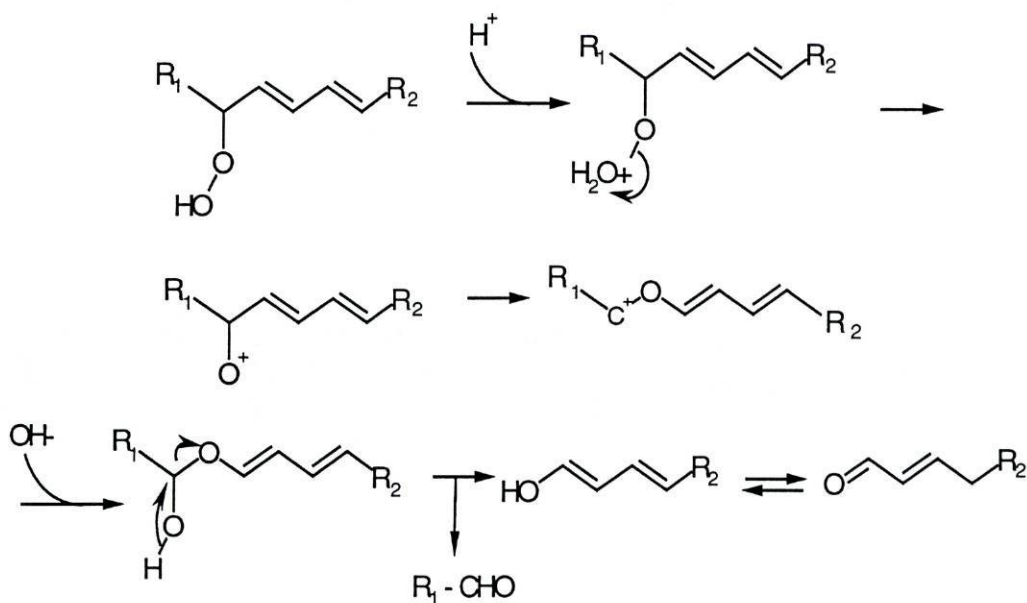


Figura 3.8. – Mecanismo iônico de degradação do monohidroperóxido (9) derivado do ácido linoleico. R<sub>1</sub>: COOH-(CH<sub>2</sub>)<sup>-</sup>; R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub><sup>-</sup> [17]

### 3.3.2. - Outras vias potenciais de formação de *trans*-2-nonenal

Hashimoto [6], estudou a influência da lupulação na estabilidade organoléptica da cerveja tendo concluído que os alcenais (onde se inclui o *trans*-2-nonenal) e alcadienais encontrados em cerveja envelhecida podem ser formados via oxidação de álcoois superiores e via oxidação de isohumulonas<sup>1</sup> provenientes do lúpulo, na presença de melanoidinas<sup>2</sup> e oxigênio.

A hipótese de o *trans*-2-nonenal se formar por oxidação de álcoois superiores, é no entanto, desvalorizada por outros autores [16] que afirmam não existir na cerveja o álcool 2-nonenol (que por oxidação formaria *trans*-2-nonenal).

Um outro mecanismo que pode contribuir para o aumento da concentração de *trans*-2-

<sup>1</sup> as isohumulonas são compostos formados a partir da degradação de humulonas existentes no lúpulo durante a fase de fervura do mosto [18]. As isohumulonas são responsáveis pelo amargor característico da cerveja.

<sup>2</sup> as melanoidinas são compostos formados através da denominada reacção de *Maillard* a partir de carboidratos e aminoácidos. Estes compostos ainda não estão claramente definidos estruturalmente, mas são caracterizados por possuírem elevado peso molecular. Relativamente à sua função, as melanoidinas participam em equilíbrios com iões metálicos, aminas, e compostos com importância organoléptica. As melanoidinas estão também associadas ao desenvolvimento de cor dos alimentos.

nonenal em cerveja é a condensação aldólica entre aldeídos. Foi possível verificar em soluções modelo que aldeídos de cadeia curta reagem com acetaldeído originando inicialmente um aldol, e posteriormente, por desidratação deste composto um aldeído insaturado sob condições de meio pouco acídicas ou em meio alcalino a quente. Contudo, ainda não se verificou a formação de *trans*-2-nonenal em cerveja a partir de acetaldeído e heptenal [16].

### 3.3.3. - Alguns equilíbrios prováveis que envolvem o *trans*-2-nonenal

#### 3.3.3.1. - Equilíbrios de isomerização entre o *trans*-2-nonenal e o *cis*-3-nonenal

O composto *cis*-3-nonenal foi identificado no mosto e em cerveja por Barker *et al.* [19] como produto da oxidação do ácido linoleico. Os estudos realizados por este investigador permitiram verificar que o *cis*-3-nonenal numa solução etanólica a 50°C rapidamente isomeriza originando o *trans*-2-nonenal. Estes resultados sugerem assim que o *cis*-3-nonenal pode constituir um precursor directo do *trans*-2-nonenal em cerveja.

#### 3.3.3.2. - Equilíbrios de formação de bases de *Schiff*

A formação de bases de *Schiff* foi estudada por Lermusieau *et al.* [20] relativamente à influência do pH e da temperatura em soluções modelo contendo *trans*-2-nonenal e a proteína lisina. Conforme se pode observar pelos gráficos representados nas figuras 3.9. e 3.10., à medida que a temperatura aumenta, o equilíbrio entre o *trans*-2-nonenal e a proteína lisina desloca-se no sentido da formação de bases de *Schiff*. Relativamente ao efeito do pH, verifica-se que à medida que este diminui, o equilíbrio das bases de *Schiff* desloca-se no sentido da sua dissociação.

Este comportamento pode ter um forte impacto no teor de *trans*-2-nonenal durante o fabrico e envelhecimento da cerveja. Durante as fases de ebulição do mosto (temperatura de ebulição do mosto  $\approx$  60-70°C) e fermentação (temperatura de fermentação  $\approx$  10-20°C) existe, respectivamente, uma tendência para a formação de bases de *Schiff* e uma posterior tendência para a sua dissociação (recorde-se também que, durante a fase de fermentação a maior parte dos aldeídos é reduzida pela acção das leveduras). Dada a baixa estabilidade das bases de *Schiff* em meio ácido, é de esperar que ao pH da cerveja haja uma tendência para a libertação do *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja, por esta via.

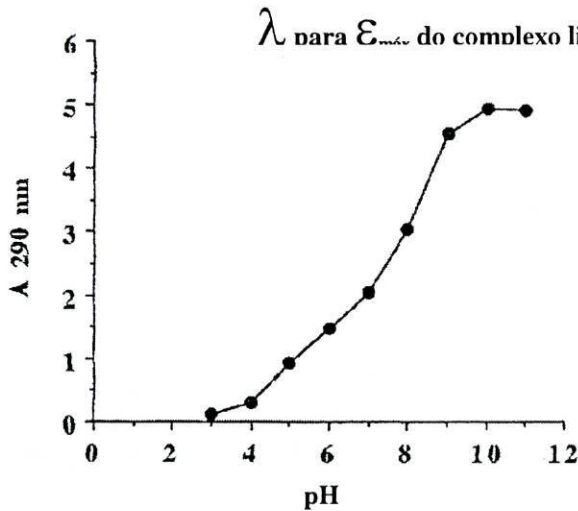


Figura 3.9. - Influência do pH na formação da base de Schiff *trans*-2-nonenal-lisina (temperatura de aquecimento = 100°C durante 30 minutos) [20]

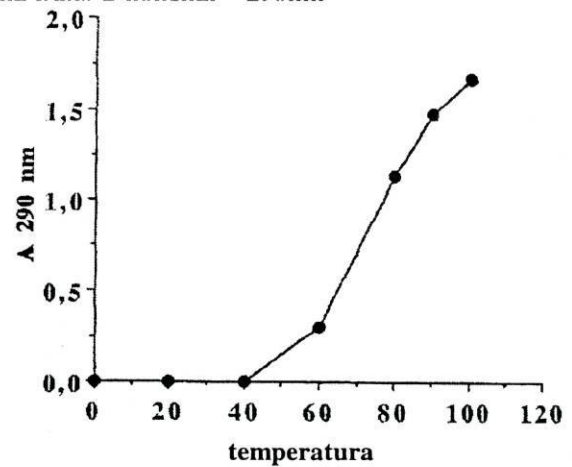


Figura 3.10. - Influência da temperatura na formação da base de Schiff *trans*-2-nonenal-lisina (pH 5,4; tempo de aquecimento = 30 minutos) [20]

### 3.3.3.3. - Equilíbrios de hidratação

Barker *et al.* [14], realizaram estudos sobre a estabilidade do *trans*-2-nonenal em meio aquoso através da análise de soluções modelo de *trans*-2-nonenal por cromatografia gasosa. Estes investigadores observaram o aparecimento de dois novos compostos, nestas soluções, que vieram a identificar de 3-hidroxinonanal e heptanal.

A formação do 3-hidroxinonanal resulta da reacção de hidratação do *trans*-2-nonenal (figura 3.11.), ao passo que, a formação do heptanal resulta da reacção retroaldólica do composto 3-hidroxinonanal.

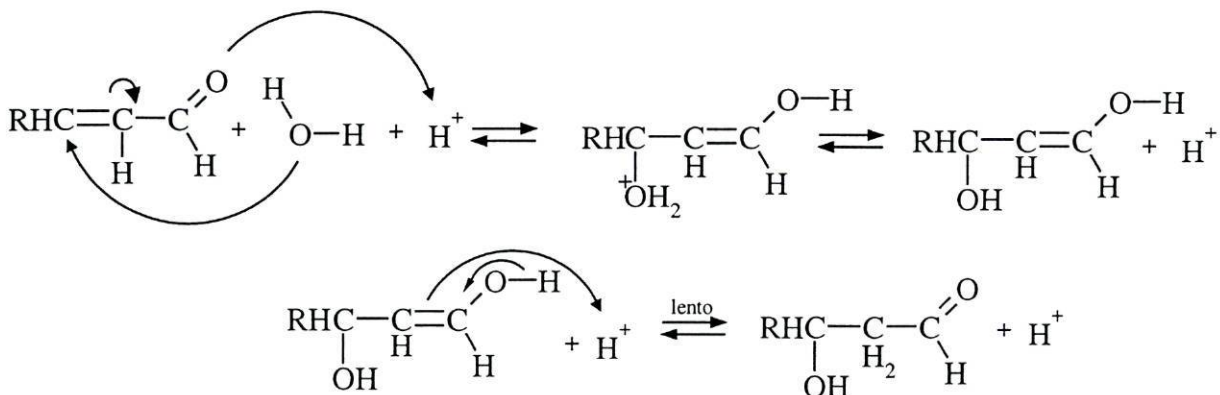


Figura 3.11. - Mecanismo proposto para adição de água à ligação dupla de um aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado com formação de um  $\beta$ -hidroxialdeído [14]

Os ensaios realizados para a caracterização da reacção de hidratação, também permitiram concluir que a extensão da hidratação de alcenais aumenta com o comprimento da cadeia do aldeído, em meio pouco ácido, como pode ser observado na tabela 3.1.

**Tabela 3.1.– Aldeídos detectados por cromatografia gasosa em soluções aquosas de 2-alcenais a pH 4,0 e a 20°C [14]**

Aldeído inicial <sup>(*)</sup>	Concentração relativa dos aldeídos em equilíbrio				Tempo de reacção <sup>(***)</sup> /dias
	2-Alcenal (X)	3-Hidroxicanal (Y)	Alcenal <sup>(**)</sup>	Razão X:Y	
2-octenal	8,4	85,0	6,6 (hexenal)	9:91	11
2-nonenal	4,8	95,1	1,4 (heptanal)	5:95	10
2-decenal	2,2	97,8	-	2:98	10

(\*) –  $[2\text{-alcenal}]_{\text{inicial}} = 37,5\text{mg/mL}$ , meio citrato, 0,05M, pH 4; solução preparada a partir de cristais puros do aducto 2-alcenal – bissulfito

(\*\*) – formado por reacção retroaldólica a partir de Y

(\*\*\*) – tempo necessário para atingir o equilíbrio

O composto 3-hidroxinonanal já foi identificado no mosto e em cerveja, pelo que, pode constituir um precursor directo do *trans*-2-nonenal.

### 3.3.3.4. - Auto-oxidação secundária de aldeídos

A auto-oxidação secundária de aldeídos constitui uma explicação possível para o abaixamento da concentração de *trans*-2-nonenal que por vezes se verifica em fases avançadas do envelhecimento da cerveja [16]. Neste processo, aldeídos insaturados originam aldeídos saturados de cadeia curta mais estáveis. Foi descrito por Hashimoto *et al.* [16] a formação de pentanal, hexenal, heptanal e octanal a partir do *trans*-2-nonenal, por esta via.

### 3.3.4. – Interacção do *trans*-2-nonenal com o sulfito em cerveja

A presença de antioxidantes em pequenas quantidades nos alimentos tem a função de prolongar o tempo de estabilidade do produto alimentar. Estes aditivos inibem os efeitos negativos de compostos oxidantes, em particular do oxigénio, evitando o desenvolvimento de reacções responsáveis pela alteração das características organolépticas desses alimentos. Vários antioxidantes têm sido utilizados pela indústria cervejeira, não sendo por vezes claro o

modo de actuação desses compostos.

Os antioxidantes mais vulgarmente conhecidos podem distribuir-se nos seguintes grupos [10]:

- 1) Ascorbatos (p.e. ácido ascórbico, ascorbato de sódio)
- 2) Sulfitos (p.e. metabissulfito de potássio, sulfito de sódio, hidrogenossulfito de sódio)
- 3) Enzimas (p.e. tirosinase, glucose-oxidase, polifenol-oxidase)
- 4) Fenóis e Polifenóis (p.e. ácido maleico, catequina, hidroquinona)

Um dos antioxidantes mais vulgarmente usados na indústria cervejeira é o sulfito. Como funções principais o sulfito apresenta:

1) actividade antioxidante - reage com agentes oxidantes da matriz, nomeadamente, com o oxigénio originando o ião sulfato.

2) capacidade de formação de aductos - esta propriedade é de extrema importância, já que certos aldeídos com baixo limiar de percepção e que estão continuamente a ser produzidos pela matriz formam, na presença de sulfito, compostos não voláteis muito estáveis, o que eleva o limite de percepção desses aldeídos. Certos investigadores referem que a presença do sulfito poderá, inclusivamente, evitar/retardar o aumento da concentração de compostos carbonílicos com o tempo, apresentando por isso um papel crucial na protecção ao envelhecimento da cerveja [21].

Relativamente à reactividade que se estabelece entre o sulfito e o *trans*-2-nonenal, é de esperar que ocorra uma dupla adição da molécula de sulfito, respectivamente, ao grupo carbonilo e à ligação dupla da cadeia carbonada. O estudo desta interacção foi efectuado por Nyborg [22] em soluções modelo e a nível sensorial em cerveja. Assim, a análise por cromatografia líquida com espectroscopia de massa e por ressonância magnética nuclear de uma solução modelo de *trans*-2-nonenal e sulfito ([*trans*-2-nonenal]=170ppm; [SO<sub>2</sub>]=770ppm; 10%, v/v, MeOH/H<sub>2</sub>O; pH=4,5), permitiu verificar que nestas condições ocorre a adição de sulfito quer ao grupo carbonilo, quer à ligação dupla com a formação dos aductos esquematizados na figura 3.12.

Os ensaios sensoriais para avaliação da formação de aductos inactivos organolepticamente, revelaram que o limite de percepção de *trans*-2-nonenal encontrado em cerveja aumentou de 0,046 ppb para 0,130 ppb na presença de respectivamente 3ppm e 6ppm de sulfito.

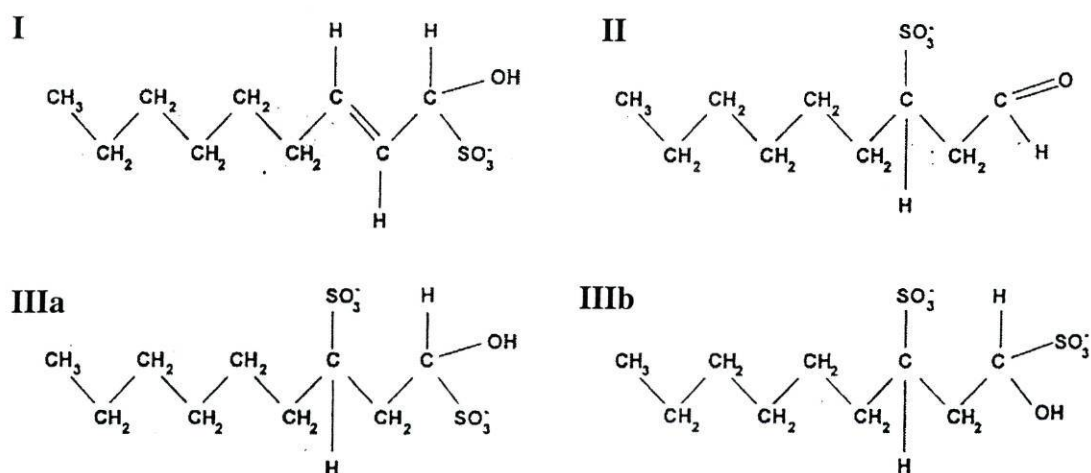


Figura 3.12. – Produtos da interacção entre o sulfito e o *trans*-2-nonenal; I – Adição do sulfito ao grupo carbonilo; II – Adição do sulfito à ligação dupla; IIIa – Dupla adição do sulfito, à ligação dupla e ao grupo carbonilo (configuração R); IIIb – Dupla adição do sulfito, à ligação dupla e ao grupo carbonilo (configuração S) [22]

A caracterização da interacção do sulfito com compostos carbonilo foi também efectuada por Dufour *et al.* [23], quanto ao comprimento da cadeia do aldeído e quanto ao grau de insaturação do aldeído. Conforme se pode verificar pela tabela 3.2., os ensaios realizados com butanal, butenal e acetaldeído, na presença de  $\text{HSO}_3^-$  permitiram concluir que a interacção entre o anião  $\text{HSO}_3^-$  e os aldeídos é tanto mais favorecida quanto menor o comprimento da cadeia carbonada, e quanto maior o grau de saturação da mesma cadeia.

Tabela 3.2. – Caracterização da reactividade do *trans*-2-butenal, butanal e acetaldeído com sulfito em soluções modelo por RMN [23]

Horas	Butanal, butenal(*)		Butenal, acetaldeído(*)		Butanal, acetaldeído(*)	
	Aducto Butanal- $\text{HSO}_3^-$ (%)	Aducto Butenal- $\text{HSO}_3^-$ (%)	Aducto Acetaldeído- $\text{HSO}_3^-$ (%)	Aducto Butenal- $\text{HSO}_3^-$ (%)	Aducto Acetaldeído- $\text{HSO}_3^-$ (%)	Aducto Butanal- $\text{HSO}_3^-$ (%)
1	62	38	84	16	52	48
100	100	0	100	0	53	47
150	100	0	100	0	53	47

(\*) - soluções modelo preparadas com uma quantidade equimolar de cada aldeído e com uma concentração de sulfito equivalente a metade da concentração de aldeídos total (400mM)

Até à data, não está identificado o aducto *trans*-2-nonenal-hidrogenossulfito em cerveja, pelo que é difícil inferir sobre a sua existência; a presença de outros aldeídos e demais



compostos da matriz (em quantidades muito superiores às de *trans*-2-nonenal) que interactivam em maior extensão com o sulfito apontam para a não formação do aducto ou para uma formação residual.

Independentemente da formação do aducto *trans*-2-nonenal-hidrogenossulfito, a concentração de sulfito presente na cerveja poderá influenciar indirectamente a concentração de *trans*-2-nonenal livre. Para explicar esta influência, tomemos o exemplo do envelhecimento da cerveja. Em cervejas frescas, altura em que o teor de sulfito é máximo, a maior parte dos aldeídos (em especial os de cadeia curta), encontram-se ligados ao sulfito, igualmente, sob a forma de aductos. À medida que a cerveja envelhece, o nível de sulfito baixa, e como consequência, o nível dos aldeídos sob a forma livre aumenta. Nestas condições, estes aldeídos poderão tomar a posição do *trans*-2-nonenal nos equilíbrios em que este participa, fazendo com que a sua concentração sob a forma livre aumente.

### **3.4. – Efeito da temperatura de armazenamento na concentração de *trans*-2-nonenal na cerveja**

Os ensaios publicados sobre o desenvolvimento do teor de *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento de cervejas condicionadas a diferentes temperaturas, permitem verificar que existem mecanismos preferenciais para a sua formação, de acordo com as diferentes condições de armazenamento da cerveja. Pela análise das figuras seguintes (figuras 3.13 e 3.14.), facilmente se conclui que a temperaturas baixas o teor de *trans*-2-nonenal na cerveja varia pouco ao longo do armazenamento, ao passo que, a temperaturas elevadas existe um aumento contínuo da sua concentração.

De entre os mecanismos propostos responsáveis pela variação da concentração de *trans*-2-nonenal livre em cerveja, existem alguns equilíbrios em que o *trans*-2-nonenal participa e que, são bastante influenciados pela temperatura, nomeadamente:

- a isomerização entre o *cis*-3-nonenal e o *trans*-2-nonenal. A discussão sobre este tipo de equilíbrio encontra-se no ponto 3.3.3.1.

- a degradação dos ácidos triidroxioctadecenoicos. Estes ácidos estão identificados como produtos resultantes da degradação enzimática do ácido linoleico. A capacidade de os ácidos A e B (indicados na figura 3.15.) formarem *trans*-2-nonenal em cerveja, foi estudada originalmente por Graveland *et al.*[25].

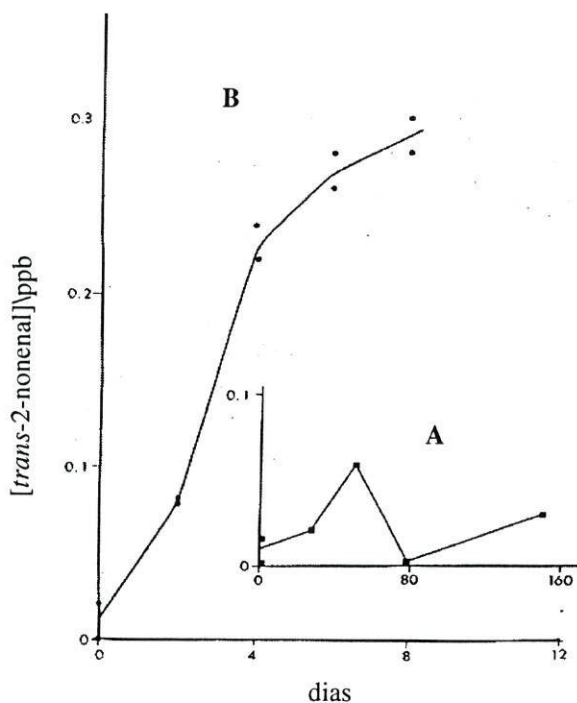


Figura 3.13. – Influência da temperatura de armazenamento da cerveja na concentração de *trans-2-nonenal*: A – 0°C; B – 38°C [24]

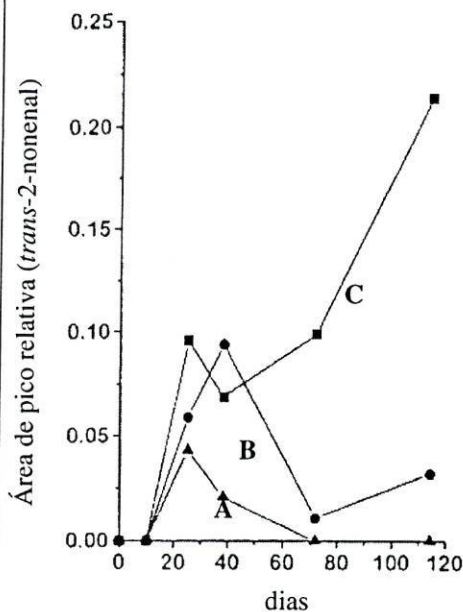
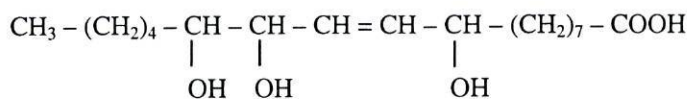


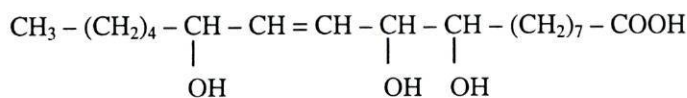
Figura 3.14. – Influência da temperatura de armazenamento da cerveja na concentração de *trans-2-nonenal*: A–0°C; B–25°C; C– 40°C [10]

Estes investigadores verificaram que aquecendo a cerveja a 60°C desenvolvia-se o característico sabor/aroma a papel/cartão, provocado pela formação de *trans-2-nonenal*. A formação deste aroma/sabor era mais pronunciado quando se aquecia a mesma cerveja com o pH ajustado a 2. Posteriormente, Stenroos *et al.* [25] estudaram a razão pela qual a cerveja, quando fervida a pH 2, desenvolve uma quantidade de *trans-2-nonenal* cerca de 1000 vezes superior ao seu limite de percepção, 0,1 ppb. Estes investigadores identificaram como precursores responsáveis pela formação de *trans-2-nonenal* nestas condições, os dois ácidos já descritos por Graveland, e ainda, o ácido 9,10,11-trihidroxi-12-octadecenóico. Estes ácidos são considerados estáveis ao pH da cerveja, e nas condições normais de armazenamento da cerveja; são, contudo, instáveis a pH 2 dando origem à formação de *trans-2-nonenal*.

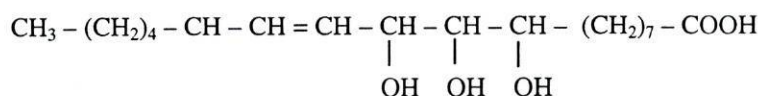
Não é, porém, certo que estes equilíbrios justifiquem por si só a diferença de concentrações de *trans-2-nonenal* encontrada durante o envelhecimento de cervejas a temperaturas de 0°C e 40°C, mas os níveis elevados de *trans-2-nonenal* que se observam para a temperatura mais elevada, poderá estar correlacionada com o aumento ligeiro da degradação parcial destes ácidos, nas condições de pH da cerveja (cerca de 4).



A – Ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenóico



B – Ácido 9,10,13-trihidroxi-11-octadecenóico



C – Ácido 9,10,11-trihidroxi-12-octadecenóico

**Figura 3.15.** – Ácidos carboxílicos identificados por Graveland e Stenroos como responsáveis pela formação de *trans*-2-nonenal em cerveja aquecida a pH 2 [25]

### 3.5. – Efeito do pH na concentração de *trans*-2-nonenal na cerveja

O pH influencia todos os equilíbrios químicos que decorrem durante o fabrico e envelhecimento de uma cerveja, nos quais se incluem, os equilíbrios que conduzem à formação de *trans*-2-nonenal e aldeídos em geral.

A influência do pH na estabilidade organoléptica da cerveja foi estudada por Kaneda *et al.* [26] por quimioluminescência<sup>3</sup> em cervejas frescas e em cervejas envelhecidas, às quais o pH foi alterado para valores mais ácidos, por adição de HCl. A figura 3.16. ilustra o efeito do pH no sinal quimioluminescente obtido para duas cervejas com pH de 4,3 e 3,8 envelhecidas a 37°C durante dois dias. É possível verificar que a variação mais acentuada do perfil do sinal quimioluminescente ocorre para a cerveja de pH mais baixo. Estes resultados levaram o autor a concluir que o decréscimo do pH acelera as reacções radiculares responsáveis pela degradação da cerveja.

<sup>3</sup> os ensaios de quimioluminescência constituem um teste rápido de previsão do tempo de vida útil de uma cerveja. Nestes ensaios, a amostra de cerveja é colocada numa câmara isolada de luz exterior e é aquecida a uma temperatura definida ao longo do tempo. Este aquecimento promove a formação de compostos em estados excitados a partir da reacção entre espécies activas de oxigénio (por exemplo, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO\*) e compostos existentes na matriz, em geral, polifenóis e isohumulonas. O sinal quimioluminescente que se obtém, resulta da emissão de radiação que ocorre durante a estabilização desses compostos excitados. As reacções radiculares, que como se sabe, contribuem para a degradação da cerveja, envolvem a formação de compostos excitados que originam sinais quimioluminescentes quando se estabilizam. A intensidade do sinal lido servirá, então, como indicador do número de reacções radiculares que ocorrem na amostra de cerveja durante o aquecimento e da capacidade das cervejas em estabilizar essas espécies activas.

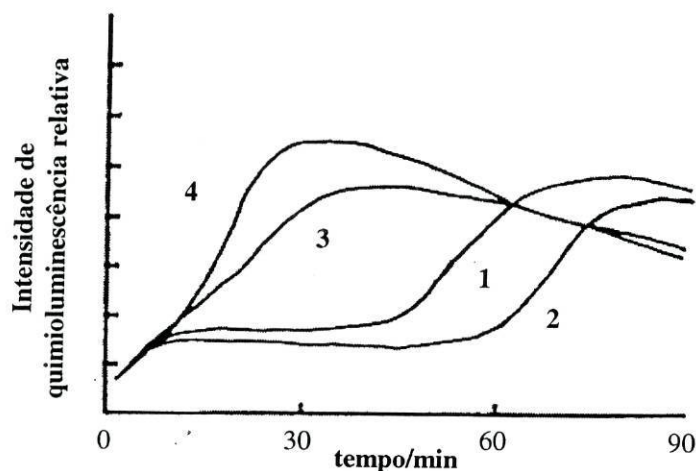
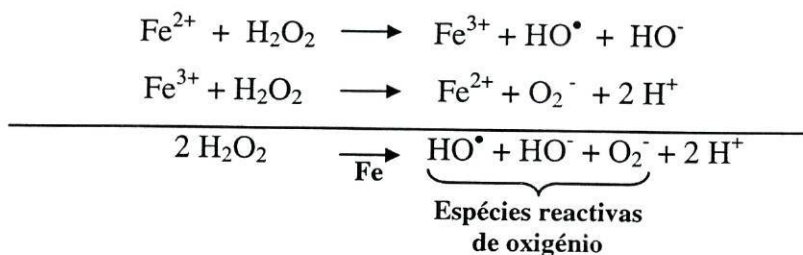


Figura 3.16. – Efeito do pH no sinal de quimioluminescência em amostras de cerveja; 1 – cerveja fresca a pH 4,3; 2 – cerveja fresca a pH 3,8; 3 – cerveja envelhecida durante 2 dias a 37°C a pH 4,3; 4 – cerveja envelhecida durante 2 dias a 37°C a pH 3,8 [26]

O acelerar das reacções radiculares em meio ácido pode ser justificado pela formação de espécies reactivas de oxigénio a partir da reacção de Fenton:

### Reacção de Fenton



Em meio ácido, a protonação da espécie  $\text{O}_2^-$  conduz à formação de  $\text{HO}_2^\bullet$ , que por sua vez, é ainda mais reactiva. Estas espécies reactivas de oxigénio são responsáveis pela degradação dos constituintes da cerveja, tais como, isohumulonas, polifenóis, ácidos gordos, açúcares, *etc.*, que por sua vez, também podem conduzir à formação de *trans*-2-nonenal [26].

### 3.6. – Efeito do oxigénio na concentração de *trans*-2-nonenal em cerveja

O oxigénio é considerado o principal agente responsável pela alteração das características organolépticas da cerveja. A nível sensorial, verifica-se que o envelhecimento de uma cerveja com um teor elevado em oxigénio, traduz-se num aumento do sabor a oxidado mas, principalmente, no aparecimento de um sabor doce/caramelizado [27]. Por vezes, a

cerveja poderá também escurecer ligeiramente.

Lermusieau *et al.* [20] conduziu estudos em amostras de cerveja para correlacionar o teor inicial em oxigénio com o desenvolvimento do teor em *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja. Para o efeito, os autores injectaram no colo da garrafa de cerveja um volume de O<sub>2</sub><sup>18</sup> equivalente a uma concentração de oxigénio de 96ppm (o teor habitual de oxigénio em garrafas de cerveja é inferior a 0,1ppm). As cervejas foram submetidas a envelhecimento forçado (durante 5 dias a 40°C) e a envelhecimento natural (durante 3 meses a temperatura ambiente). No final dos ensaios, quantificaram o teor de *trans*-2-nonenal nas cervejas e a fracção de O<sub>2</sub><sup>18</sup> incorporada no *trans*-2-nonenal. Os resultados obtidos pelos autores encontram-se na tabela 3.3.

Com base nos resultados obtidos, verificaram que o excesso em oxigénio não parecia conduzir à formação de teores mais elevados de *trans*-2-nonenal, durante o envelhecimento da cerveja. Os autores verificaram ainda que, o *trans*-2-nonenal formado nas cervejas com teor elevado em O<sub>2</sub><sup>18</sup> não incorporava no grupo carbonílico esse isótopo O<sup>18</sup>. Deste modo, os autores concluíram que os mecanismos oxidativos propostos para a formação de *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja deverão ser pouco relevantes.

**Tabela 3.3. – Teores médios de *trans*-2-nonenal encontrado em cervejas frescas e em cervejas envelhecidas, com teor normal e teor elevado em oxigénio [20]**

<u>Amostra</u>	<u>[<i>trans</i>-2-nonenal] / ppb</u> <u>(teor normal em O<sub>2</sub>)</u>	<u>[<i>trans</i>-2-nonenal] / ppb</u> <u>(teor elevado em O<sub>2</sub>)</u>
Cerveja fresca	0,09	0,09
Cerveja submetida a envelhecimento natural	0,21	0,23
Cerveja submetida a envelhecimento forçado	0,35	0,29

Os resultados obtidos por estes investigadores são surpreendentes. Vários autores [2, 3, 26, 28] apresentaram mecanismos de formação de *trans*-2-nonenal, nos quais o oxigénio desempenha um papel directo na formação desse aldeído (por exemplo, quando participa na oxidação directa de componentes da matriz, como ácidos gordos, isohumulonas, álcoois, *etc.*), ou condiciona os equilíbrios em que o *trans*-2-nonenal participa (por exemplo, quando interactiva com o sulfito. Em face destes resultados, poder-se-á concluir que o aumento da concentração de *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja, resulta do deslocamento dos equilíbrios em que o *trans*-2-nonenal participa, no sentido da sua libertação, em detrimento dos mecanismos que envolvem a oxidação de compostos da matriz. Neste sentido, este estudo relança a importância de controlar a formação de *trans*-2-nonenal e

respectivos precursores durante o processo de fabrico da cerveja, já que, segundo este estudo, é este *trans*-2-nonenal que é preponderante na cerveja final.

### 3.7. – Metodologias analíticas para determinação de *trans*-2-nonenal na cerveja

O desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam a quantificação do *trans*-2-nonenal na cerveja, de execução rápida e pouco trabalhosa, que envolvam equipamentos acessíveis e que não utilizem reagentes perigosos na sua execução, tem grande interesse para a indústria cervejeira.

A complexidade dos equilíbrios em que o *trans*-2-nonenal participa na cerveja e os baixos níveis encontrados, dificultam a sua quantificação rigorosa e faz com que, ainda hoje, não exista um método analítico que reúna consenso relativamente à fiabilidade dos resultados obtidos. A importância de quantificar o *trans*-2-nonenal resulta de esse valor permitir estabelecer uma correlação com as características organolépticas da cerveja e permitir prever o perfil da evolução deste composto em condições normais de armazenamento. Assim, será possível inferir sobre um período de validade seguro de uma cerveja, sem que tal defeito organoléptico seja detectado pelo consumidor.

Encontrar uma metodologia que permita a determinação do *trans*-2-nonenal tem desde logo uma dificuldade, já que, o nível de *trans*-2-nonenal existente em amostras de cerveja fresca é extremamente baixo (entre 0,1 e 0,03 ppb); por outro lado, o processo de preparação a que se sujeita a amostra antes da análise inevitavelmente modifica os equilíbrios onde o *trans*-2-nonenal está envolvido, podendo inclusivamente, conduzir à sua formação conforme se discutiu nos pontos anteriores.

Citam-se seguidamente, de forma sucinta, algumas metodologias encontradas na literatura para a determinação de *trans*-2-nonenal em cerveja.

#### **Metodologia proposta por P. S. Wang (1974) [29]**

O método proposto consiste na extracção da fracção carbonílica da cerveja através de extracções líquido-líquido com diclorometano, seguindo-se a derivatização da fracção extraída com 2,4-DNPH para formar hidrazonas, com os compostos carbonilo.

A análise final das hidrazonas é feita por CLAE com detecção espectrofotométrica.

De acordo com a descrição experimental, este método é moroso e pouco prático nos

passos de preparação do extracto de cerveja (extracto que contém a fracção carbonílica) e de derivatização da fracção carbonílica. Efectivamente, a obtenção do extracto de cerveja envolve um processo de extracção líquido-líquido de 10 soluções distintas com 200 mL de cerveja e 30 mL de diclorometano (estas soluções são agitadas durante 90 minutos e posteriormente arrefecidas por 1 hora a 0°C), seguindo-se a mistura de todas as fracções orgânicas e subsequente concentração da solução obtida num evaporador rotativo até um volume de 2 mL.

O procedimento para a derivatização da fracção carbonílica, requer a solubilização do extracto de cerveja em 5mL de etanol seguindo-se a adição de 200 mL de uma solução saturada em 2,4-DNPH em etanol/água, 50/50, v/v, pH 4. Esta mistura é agitada durante 4 horas e deixada a equilibrar durante meio dia. Por fim, é efectuada uma nova extracção líquido-líquido com clorofórmio (primeiro com um volume de 40 mL e depois com dois volumes de 30 mL) e é concentrada a solução orgânica num evaporador rotativo. O extracto derivatizado é, por fim, analisado por CLAE a 254 nm.

A metodologia proposta por estes autores usa um padrão interno, o 2-undecenal, com vista a aumentar a robustez do método. Segundo os mesmos autores, o 2-undecenal mostrou ser o mais indicado para esta função por comportar-se de forma semelhante ao *trans*-2-nonenal em todos os passos do método e não se desenvolver com o envelhecimento da cerveja.

#### **Metodologia proposta por N. Hashimoto, (1977) [6]**

O método proposto baseia-se na destilação da cerveja sob vácuo. A fracção carbonílica é recolhida no destilado e em seguida faz-se uma derivatização com 2,4-DNPH. A análise das hidrazonas formadas é feita por cromatografia líquida em coluna e cromatografia em camada fina.

Esta metodologia apresenta como principais desvantagens o uso de uma quantidade de amostra elevada para análise (5 litros) e o tempo de derivatização da fracção carbonílica. Neste passo, é adicionado 1L de uma solução acídica de 2,4-DNPH ao destilado (cerca de 400 mL) que fica a reagir durante 4 dias (2 dias à temperatura ambiente e 2 dias a 40°C).

Este método permite a identificação e quantificação de alcanonas, alcanais, alcenais (onde se inclui o *trans*-2-nonenal) e alcadienais na cerveja. Uma outra vantagem, está relacionada com o procedimento experimental adoptado para a extracção da fracção

carbonílica da cerveja. Para o efeito, realiza-se uma destilação sob vácuo que pretende evitar a formação de aldeídos durante este passo.

#### **Metodologia proposta por L. C. Verhagen, (1987) [30]**

O método proposto consiste na eluição de cerveja directamente por colunas de extracção em fase sólida do tipo C18 para a extracção e concentração do *trans*-2-nonenal da cerveja. Após a remoção do *trans*-2-nonenal adsorvido na coluna, procede-se à sua derivatização com dansilhidrazina.

A análise das amostras é feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.

Este método apresenta como principais vantagens o uso de uma baixa quantidade de amostra para análise, 10 gramas de cerveja, e o modo simples de extracção e concentração da fracção carbonílica da cerveja. Para o efeito, o autor utilizou a técnica de extracção em fase sólida.

Este método apresenta como principais desvantagens o tempo relativamente longo de derivatização da espécie em análise (cerca de duas horas), e a necessidade de utilizar um sistema de CLAE modificado para obtenção de uma maior sensibilidade. O sistema de CLAE utilizado pelos autores compreende duas pré-colunas para concentração e duas colunas de separação, alternadas entre si e em contínuo. Este sistema visa otimizar o processo de separação do *trans*-2-nonenal dos restantes compostos.

A quantificação é feita por fluorimetria.

#### **Metodologia proposta por G. Lermusieau, (1999) [18]**

O método proposto para a determinação do *trans*-2-nonenal em cerveja, baseia-se na recolha da fracção carbonílica da cerveja através de uma destilação por vácuo e na concentração da fracção carbonílica do destilado recolhido, por eluição numa coluna de extracção em fase sólida do tipo C18. A análise do teor de *trans*-2-nonenal em cerveja é feita por GC-MS .

O modo proposto para a realização da destilação sob vácuo, constitui a principal desvantagem deste método. Neste passo, destila-se 1,5L de cerveja e o destilado (cerca de 400mL), é recolhido numa *trap* com azoto líquido. Nestas condições, o destilado obtido é sólido e necessita ainda de se liquefazer para se proceder à fase de extracção e concentração



de *trans*-2-nonenal por colunas de extracção em fase sólida.

O método proposto envolve a utilização de um padrão interno, o nonano.

Os autores afirmam obter uma recuperação de *trans*-2-nonenal de, cerca de, 80% .

### 3.8. – Conclusão

Os factores que condicionam a estabilidade organoléptica da cerveja dependem, da natureza das matérias primas usadas para o fabrico da cerveja, do processo de fabrico da cerveja, e por fim, das condições de armazenamento da cerveja. Os mecanismos que podem ser responsáveis pela formação de aldeídos em cerveja, e em particular do *trans*-2-nonenal, são muitos, sendo difícil prever quais os mais relevantes durante o fabrico e envelhecimento da cerveja. A quantidade de *trans*-2-nonenal que existe livre na cerveja depende da quantidade de *trans*-2-nonenal que provém do mosto (livre ou ligado), dos precursores que existem na cerveja, e ainda, dos equilíbrios em que o *trans*-2-nonenal participa. O teor de *trans*-2-nonenal livre encontrado ao longo do envelhecimento da cerveja, é uma consequência da acção conjunta de variados factores, tais como, o teor em oxigénio, a temperatura de armazenamento, o pH e o nível de sulfito inicial. Estes factores influenciam os equilíbrios em que o *trans*-2-nonenal participa e/ou os mecanismos que conduzem à sua formação.

O desenvolvimento de um método analítico de determinação de *trans*-2-nonenal em cerveja, que seja rápido, rigoroso, e que permita estudar os mecanismos que induzem o seu aparecimento continua a ser um grande desafio analítico e poderá dar um grande contributo no sentido de esclarecer os mecanismos de formação do *trans*-2-nonenal e, desta forma, permitir criar condições para a minimização da formação deste aldeído.

## ***4. – Aspectos gerais sobre a técnica cromatográfica e sobre a técnica de extracção em fase sólida***

- 4.1. – Introdução
- 4.2. – Breve história da cromatografia
- 4.3. – Classificação das técnicas cromatográficas
- 4.4. – Descrição genérica da cromatografia de eluição como técnica analítica
- 4.5. – Cromatografia líquida de alta eficiência
- 4.6. – Aspectos gerais sobre a técnica de extracção em fase sólida

### **4. – Aspectos gerais sobre a técnica cromatográfica e sobre a técnica de extracção em fase sólida [31 - 34]**

#### **4.1. – Introdução**

Como será discutido na Parte II deste trabalho, para o desenvolvimento de uma metodologia para a análise do *trans*-2-nonenal em cerveja, foi necessário estudar e otimizar um procedimento experimental que permitisse concentrar este aldeído e isolá-lo da matriz cerveja. Na metodologia adoptada a cerveja é, numa primeira etapa, destilada por arrastamento de vapor para extracção do aldeído desta matriz e, em seguida, faz-se passar o destilado recolhido por uma coluna de extracção em fase sólida do tipo C18 para concentrar o

aldeído. Por fim, procede-se à análise do concentrado obtido por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

Neste ponto, far-se-á uma breve abordagem sobre a técnica cromatográfica como técnica de separação, e mais em particular sobre a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Igualmente, serão aqui descritos alguns aspectos gerais sobre a técnica de extração em fase sólida, como técnica de extração /concentração.

#### 4.2. – Breve história da cromatografia

A primeira evidência da cromatografia como método de separação surgiu no século XIX, quando os tintureiros mergulhavam tecidos, cordas ou papeis em soluções coradas, e verificavam que o material adquiria uma coloração por bandas ao invés de adquirir a cor da solução em que estavam mergulhados. Vários químicos alemães estudaram este fenómeno mas nunca o conseguiram fundamentar da forma correcta.

A descoberta da cromatografia é atribuída ao botânico russo Mikhail Tswett (figura 4.1.) em 1903, pois foi o primeiro a reconhecer a base físico-química deste método de separação e a aplica-lo. Nos seus ensaios, Mikhail Tswett procedeu à eluição de uma solução com pigmentos de plantas em éter, através de uma coluna de vidro contendo carbonato de cálcio finamente dividido e observou que a adição de porções frescas de éter ao topo da coluna provocava o deslocamento de cada pigmento a uma velocidade diferente. Mikhail Tswett chamou o método de cromatografia (do grego *Chroma* = cor e *graphein* = escrita).



Figura 4.1. – Mikhail Tswett (1872-1919)

Passaram-se então 20 anos, desde a publicação dos trabalhos realizados por Mikhail Tswett, até surgir uma nova aplicação da cromatografia pelo químico alemão Richard Kuhn, também, na separação de pigmentos de plantas.

A cromatografia em coluna apresentava algumas dificuldades a nível prático, nomeadamente, a falta de reprodutibilidade das partículas que constituíam a fase estacionária, e a não uniformidade no seu empacotamento na coluna de vidro. A partir da década de 40 foram surgindo novas técnicas cromatográficas que visavam ultrapassar estas dificuldades. Em 1944, a química Erika Cremer iniciou estudos em cromatografia gasosa. Também nesta década, os químicos soviéticos Nikolay Izmaylov e Maria Shrayber, motivados pelas insuficiências da cromatografia em coluna, iniciaram o desenvolvimento da cromatografia em

camada fina. Martin Syngé em colaboração com o químico Anthony James, iniciaram estudos sobre cromatografia de partição gás-líquido, que valeram em 1952 o Prémio Nobel da Química a estes investigadores.

Foram, igualmente, surgindo desenvolvimentos ao nível dos materiais constituintes da fase estacionária e ao nível da concepção da instrumentação associada aos sistemas cromatográficos. T. Taylor e H. Urey realizaram as primeiras separações cromatográficas com uma fase estacionária permutadora de iões em 1938 utilizando um zeólito como fase estacionária. Na década de 50, Marcel Golay, verificou nos estudos realizados em cromatografia gasosa, que o uso de colunas muito compridas (90 a 180 metros) e com um diâmetro interno reduzido (0,25mm), permitia separações muito mais eficientes dos componentes de uma amostra; estas colunas actualmente designadas de colunas capilares tiveram um enorme impacto na cromatografia gasosa. Em 1952, Per Flodin e Jerker Porath desenvolveram materiais poliméricos de celulose que permitiram a separação de componentes de uma amostra em função do seu tamanho.

Em 1964, o químico Calvin Gidding resumiu as condições necessárias para conferir à cromatografia líquida o mesmo poder resolutivo que se obtinha por cromatografia gasosa: o desenvolvimento de bombas de fluxo capazes de desenvolver um caudal constante da fase móvel a elevada pressão, e ainda, o desenvolvimento de detectores sensíveis e estáveis em fluxo. Após o desenvolvimento das bombas de fluxo e dos detectores em fluxo, apenas se utilizavam como fase estacionária sólidos adsorventes, já que, o uso de líquidos suspensos sobre um sólido inerte era impraticável em cromatógrafos com bombas de fluxo. Foi então, que se desenvolveram as fases ligadas, em que, a fase estacionária é ligada quimicamente ao sólido de suporte, em vez de estar simplesmente suportada nesse sólido.

A concepção de fases ligadas permitiu o uso de bombas de fluxo e faz com que a cromatografia líquida de alta eficiência seja, actualmente, a técnica de separação mais versátil que existe.

Embora a relação entre a cromatografia moderna e a cor seja praticamente inexistente, o nome dado por Mikhail Tswett a esta técnica persistiu e é, ainda hoje, utilizado para descrever todas as técnicas de separação que envolvem a utilização de uma fase estacionária e de uma fase móvel.

### 4.3. – Classificação das técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas de diferentes modos: de acordo com o tipo de interacção que se estabelece entre a fase estacionária e os componentes da amostra, de acordo com a natureza física da fase móvel, ou ainda, atendendo ao suporte físico da fase estacionária.

Habitualmente, as técnicas cromatográficas classificam-se, de acordo com o mecanismo que se estabelece entre a fase estacionária e os componentes da amostra, podendo tratar-se de: cromatografia de partição, quando ocorre a distribuição do soluto entre a fase móvel e uma fase estacionária líquida; cromatografia de adsorção, quando o soluto é adsorvido à superfície de uma fase estacionária sólida; cromatografia de permuta iónica, quando ocorre atracção electrostática entre o soluto e grupos iónicos presentes à superfície de uma fase estacionária sólida; cromatografia de afinidade, quando se estabelece uma interacção específica entre um determinado componente do soluto e moléculas presentes na fase estacionária; e por fim, cromatografia de permeação gel. Neste último caso não há qualquer tipo de interacção entre a fase estacionária e a amostra, já que o fraccionamento da amostra ocorre mediante o percurso efectuado pelos seus componentes; os componentes menores são capazes de atravessar o interior da fase estacionária percorrendo uma distância maior, ao passo que os componentes de maiores dimensões, incapazes de penetrar no interior da fase estacionária, efectuam um percurso menor.

As técnicas cromatográficas também podem ser classificadas de acordo com a natureza física da fase móvel, podendo então dividir-se em cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou cromatografia de fluído supercrítico. Dentro da cromatografia líquida, pode-se subdividir os métodos cromatográficos, atendendo à natureza da fase estacionária, em cromatografia líquido-líquido, cromatografia de fase ligada, cromatografia líquido-sólido, cromatografia de permuta iónica, ou ainda, cromatografia de permeação gel. A cromatografia gasosa, pode-se subdividir em cromatografia gás-líquido ou cromatografia gasosa de fase ligada. Por sua vez, a cromatografia de fluído supercrítico também possui duas variantes conforme a natureza da fase estacionária (que pode ser líquida ou sólida).

As técnicas cromatográficas também podem classificar-se de acordo com o suporte físico em que a fase sólida se encontra, nomeadamente em, cromatografia em coluna e cromatografia plana. No primeiro caso, utiliza-se um tubo cilíndrico contendo a fase estacionária no seu interior e através do qual faz-se passar a fase móvel por pressão, capilaridade ou gravidade. Em cromatografia plana, a fase estacionária é suportada numa

superfície plana ou em papel, e a fase móvel desloca-se por gravidade ou por acção capilar ao longo desta superfície.

A tabela 4.1. resume a classificação das técnicas cromatográficas atendendo aos critérios de classificação descritos anteriormente.

**Tabela 4.1. – Classificação das técnicas cromatográficas**

Natureza da Fase Móvel	Natureza da Fase Estacionária	Mecanismo de Separação	Suporte da Fase Sólida	Nome da Técnica Cromatográfica
Cromatografia Gasosa	Líquida	Partição	Coluna	Cromatografia Gás-Líquido
	Fase Ligada	Partição Modificada	Coluna	Cromatografia Gás-Líquido Ligado
	Sólida	Adsorção	Coluna	Cromatografia Gás-Sólido
Cromatografia Líquida	Líquida	Partição	Coluna	Cromatografia Líquido-Líquido
			Plana	Cromatografia de Camada Fina
	Fase Ligada	Partição	Coluna	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
			Plana	Cromatografia de Camada Fina de Alta Eficiência
	Sólida	Adsorção	Coluna	Cromatografia Líquido-Sólido (clássica)
				Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
			Plana	Cromatografia de Camada Fina
				Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
		Permuta Iónica	Coluna	Cromatografia de Permuta Iónica
		Afinidade	Coluna	Cromatografia de Afinidade
Exclusão	Coluna	Cromatografia de Exclusão		
Fluído Supercrítico	Sólida	Adsorção	Coluna	Cromatografia de Fluídos Supercríticos
	Líquida	Partição	Coluna	Cromatografia de Fluídos Supercríticos

#### 4.4. – Descrição genérica da cromatografia de eluição como técnica analítica

Na cromatografia de eluição os componentes de uma amostra são continuamente deslocados ao longo da fase estacionária movidos pela fase móvel. Normalmente, a fase estacionária está disposta numa coluna; um pequeno volume de amostra é inserido no topo da coluna e em seguida, a fase móvel (ou eluente) que é continuamente adicionada ao topo dessa coluna, desloca os componentes da amostra pela fase estacionária num processo que habitualmente se denomina de eluição.

A separação dos componentes da amostra resulta das diferentes velocidades de deslocamento de cada componente ao longo da fase estacionária, devido às interacções mais ou menos fortes que estabelecem com as diferentes fases. Assim, se um determinado componente da amostra possuir menor afinidade para a fase estacionária, reside menos tempo nesta fase, e logo, é arrastado mais rapidamente. Pelo contrário, se um componente da amostra possuir maior afinidade para a fase estacionária, é arrastado mais lentamente. Deste modo, a separação entre ambos os componentes será maior ou menor consoante a diferença da intensidade das interacções que estabelecem com as fases móvel e estacionária.

Se se colocar no fim da coluna um detector que responda à concentração dos componentes e se se representar o sinal do detector em função do tempo (ou em função do volume da fase móvel) 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.

##### **Análise qualitativa**

A aplicação da técnica cromatográfica para a análise qualitativa de amostras é muito limitada. A única informação qualitativa que o sinal cromatográfico fornece sobre os componentes de uma amostra é o seu tempo de retenção (tempo que o componente leva a percorrer toda a fase estacionária até chegar ao detector; este tempo é característico de um qualquer componente). A análise qualitativa de amostras pode fazer-se por comparação directa entre os tempos de retenção obtidos no cromatograma com os tempos de retenção descritos na literatura, ou ainda, com os tempos de retenção obtidos com compostos padrão.

Um procedimento mais comum para avaliar a presença de um determinado composto, consiste em dopar a amostra com o padrão do composto suspeito. Se o sinal da amostra com adição de padrão originar um novo pico, pode-se concluir que o padrão e o componente a

analisar são distintos. Se pelo contrário, o pico do componente aumentar, há forte evidência de ambos os compostos serem iguais.

### **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 do picos cromatográficos, exige um controlo apertado 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 afectam 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.

A quantificação através da medição da área do pico cromatográfico é independente das condições experimentais atrás mencionadas, apresentando a vantagem de poder ser utilizada para picos assimétricos, ao contrário do caso anterior.

### **4.5. – 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.

A concepção da fase estacionária do modo referido, obriga à utilização de bombas de fluxo que sejam capazes de fazer passar a fase móvel através da fase estacionária. Assim, consegue-se aliar fluxos razoáveis da fase móvel ao elevado poder de separação associado à fase estacionária.

A CLAE é actualmente o método analítico de separação mais 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.



#### 4.5.1. – Componentes básicos de um sistema de cromatografia de alta eficiência

Um sistema de CLAE inclui os seguintes componentes básicos:

**Bomba de fluxo** - capaz de impulsionar a fase móvel a uma velocidade constante sob elevada pressão por todo o sistema cromatográfico;

**Injector** - permite introduzir com rigor uma quantidade fixa de amostra na coluna;

**Coluna cromatográfica** – onde decorre a separação dos componentes da amostra; habitualmente existe uma pequena coluna (pré-coluna), incorporada no início da coluna principal, que possui as mesmas características que a coluna principal. Estas pré-colunas têm como função reter impurezas físicas ou determinados compostos provenientes das amostras que ficariam fortemente retidos na coluna principal. Associado à coluna cromatográfica pode igualmente existir uma manga termostatizada, cuja função é melhorar a eficiência da coluna por ajuste de temperatura;

**Detector** - pode ser selectivo ou universal dependendo da propriedade que mede. Idealmente, o detector deve ser muito sensível, estável e reproduzível.

**Integrador/computador** – este módulo regista e integra a resposta proveniente do detector.

Na figura 4.2. estão representados esquematicamente os componentes básicos de um sistema de CLAE.

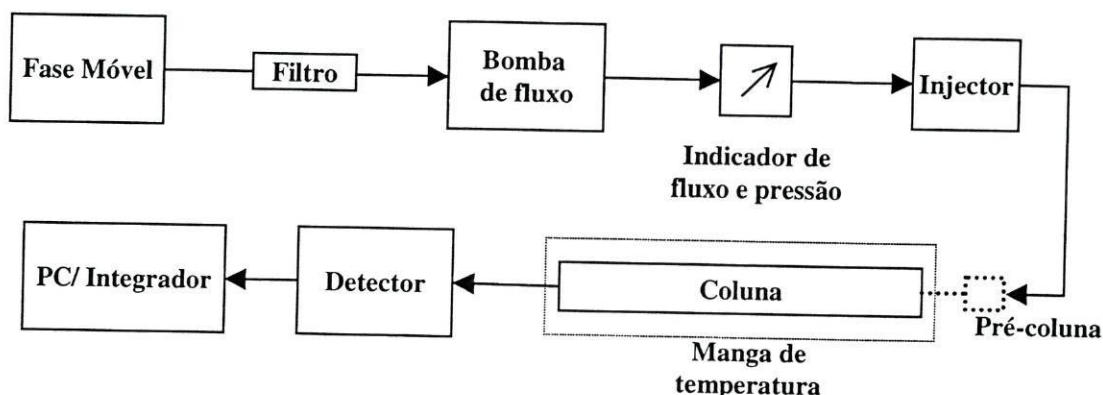


Figura 4.2. --Diagrama esquemático dos módulos que compõem sistema de cromatografia líquida de alta eficiência

#### 4.5.2. – Cromatografia líquida de alta eficiência de partição

A cromatografia líquida de alta eficiência de partição pode ser dividida em CLAE líquido-líquido e CLAE de fase ligada. A diferença entre estas duas técnicas reside no modo como a fase estacionária líquida é suportada no sólido inerte.

No primeiro caso, a fase estacionária líquida é retida na superfície do sólido por adsorção física, ao passo que, em cromatografia de fase ligada, a fase estacionária líquida é retida na superfície do sólido por ligações covalentes. A CLAE líquido-líquido caiu em desuso devido às desvantagens que apresentava, nomeadamente, pela perda da fase estacionária por dissolução na fase móvel, e ainda, pela não adequabilidade a sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência.

Far-se-á uma breve discussão sobre as colunas de partição de fase ligada.

#### 4.5.3. – Colunas para cromatografia de partição de fase ligada

O sólido de suporte para a fase líquida estacionária é habitualmente composto de partículas uniformes de sílica com um diâmetro interno que varia entre 3 a 10µm. A formação da fase ligada envolve uma primeira etapa em que a sílica é previamente tratada com HCl 0,1M a quente, com o objectivo principal de formar os grupos silanol. Posteriormente, a sílica é colocada em refluxo com dimetilclorosilano, que conduz à formação de uma fase ligada monomérica (figura 4.3.). O uso de diclorosilanos ou triclorosilanos conduz à formação de fases ligadas poliméricas. São preferíveis as fases ligadas monoméricas, já que, a sua estrutura é mais bem definida e reprodutível do que as fases ligadas poliméricas.

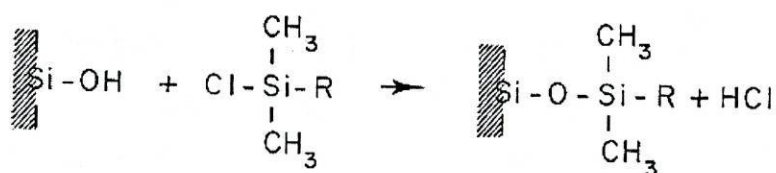


Figura 4.3. – Preparação de fases ligadas por reacção entre sílica e organosilanos com a formação de fases ligadas monoméricas

Quando se pretende que a fase estacionária tenha maior afinidade para compostos polares (cromatografia de fase normal) os grupos -R do organosilano são habitualmente grupos ciano -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>CN, amino -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> ou dimetilamino -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; quando se pretende que a fase estacionária tenha uma maior afinidade para compostos apolares (cromatografia de fase reversa) os grupos -R do organosilano são habitualmente hidrocarbonetos, como, n-butil -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, n-octil -C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> ou n-octadecil -C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>

Devido a impedimentos estereoquímicos, estima-se que apenas metade da superfície

da sílica é recoberta pelos compostos organosilanos. A polaridade inerente dos grupos silanol que permanecem por reagir, é responsável pela formação de picos assimétricos, ou ainda, por provocar elevados tempos de retenção, especialmente em análise de compostos básicos em colunas apolares.

Os grupos silanol são, habitualmente, eliminados por nova reacção com clorotrimetilsilano num processo denominado de “*end-capping*” (figura 4.4.).

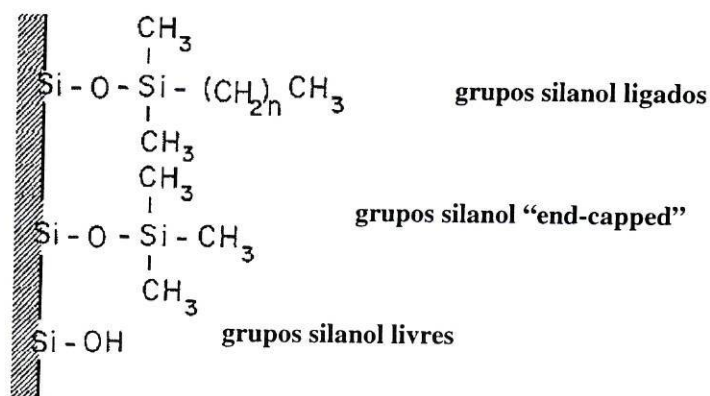


Figura 4.4. – Superfície de uma fase estacionária ligada para CLAE de fase reversa

O mecanismo pelo qual estas superfícies interactivam com a amostra não reúne total consenso entre os investigadores. Um possível mecanismo envolve a formação de uma fase modificada composta pelo hidrocarboneto ligado à fase estacionária e o constituinte mais apolar da fase móvel. Nesta fase, estabelece-se um equilíbrio de partição da amostra entre a fase estacionária e a fase móvel (considera-se deste modo que, a fase estacionária é uma fase líquida modificada). Outros investigadores defendem que a fase estacionária é uma superfície modificada de sílica onde ocorrem, simplesmente, fenómenos de adsorção com os componentes da amostra.

A cromatografia líquida de fase ligada apresenta como principais vantagens a aplicabilidade a uma vasta gama de compostos polares e apolares constituindo uma técnica analítica de aplicação fácil, rápida e mais reprodutível do que outros modos de cromatografia líquida. Como desvantagens, a fase estacionária só é estável na zona de pH compreendida entre pH 3 e pH 8 (um pH inferior a 3 provoca a remoção da fase líquida ligada enquanto que, para um pH superior a 8, a sílica é apreciavelmente solúvel na fase móvel).

## 4.6. – Aspectos gerais sobre a técnica de extracção em fase sólida

### 4.6.1. – Introdução

As colunas de extracção em fase sólida (figura 4.5.) são, actualmente, uma valiosa ferramenta analítica para a separação de compostos presentes em matrizes complexas. Estas colunas são habitualmente utilizadas com fins preparativos, em que, o objectivo da sua utilização é a extracção da(s) espécie(s) interferente(s) à análise de um determinado composto por retenção da(s) mesma(s) na coluna, ou alternativamente, a extracção de um determinado composto existente numa amostra por retenção do mesmo na coluna. O modo como se processa a separação/extracção nestas colunas é análogo ao já

descrito para a técnica de separação de cromatografia em coluna (ver ponto 2.4.), com uma particularidade: enquanto que em cromatografia em coluna todas as espécies são continuamente deslocadas ao longo da fase estacionária pela fase móvel, nestas colunas, a amostra é toda eluída pela coluna (a fase móvel é a própria amostra) e a(s) espécie(s) que é retida na fase estacionária só é eluída pela passagem de uma nova fase móvel adequada. Este procedimento é apresentado com mais detalhe no ponto 4.6.3.

### 4.6.2. – Enchimentos em colunas de extracção em fase sólida

Existem diversos tipos de enchimentos para colunas de extracção em fase sólida. Cada tipo de enchimento possui propriedades de retenção e selectividade próprias. A escolha de um determinado enchimento pressupõe um conhecimento prévio das espécies que constituem a interferência a eliminar, e/ou, obviamente, das substâncias que se pretendem purificar.

A fase estacionária de uma coluna de extracção em fase sólida é constituída por um sólido inerte (sílica), que possui ligado quimicamente à sua superfície um determinado tipo de moléculas que são responsáveis pelas interacções que se podem estabelecer com a amostra. Dum modo geral, existem três tipos de interacções possíveis (ver figura 4.6.):

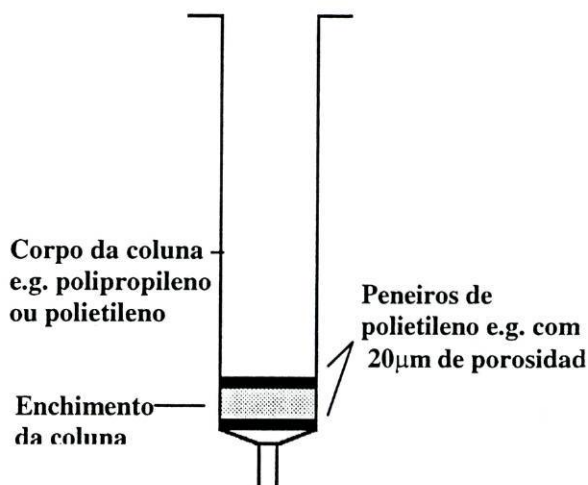


Figura 4.5. - Representação esquemática de uma coluna de extracção em fase sólida

- 1- Interações não polares – a fase estacionária é constituída por uma superfície inerte recoberta por moléculas orgânicas muito pouco polares, que retêm, sobretudo, compostos também pouco polares pelo estabelecimento de forças de *Van der Waals*.
- 2- Interações polares – a fase estacionária é constituída por um sólido inerte recoberto por moléculas orgânicas contendo grupos polares. Este tipo de moléculas retêm à sua superfície compostos polares devido à formação de interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido ou dipolo induzido-dipolo induzido.
- 3- Interações iónicas – a fase estacionária contém à sua superfície moléculas com grupos iónicos, capazes de interactuar com compostos igualmente iónicos existentes na amostra por interações electrostáticas.

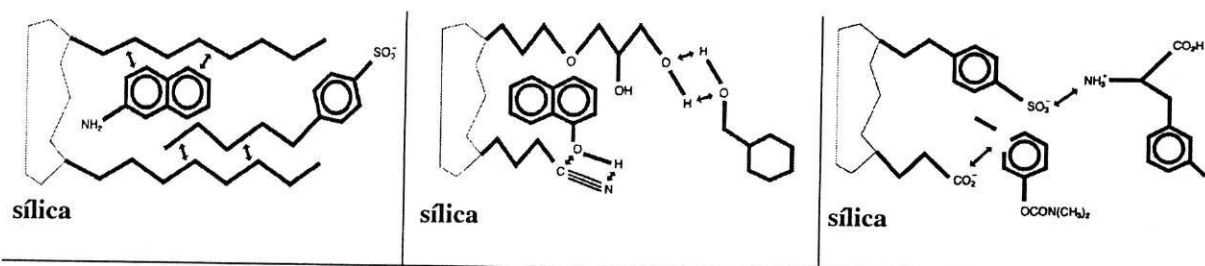


Figura 4.6. - Diferentes tipos de interações que se podem estabelecer entre o enchimento de uma coluna de extracção em fase sólida e os componentes de uma amostra. a) Interação não polar; b) Interação polar; c) Interação electrostática

#### 4.6.3. – Os 4 passos básicos na utilização de uma coluna de extracção em fase sólida

A utilização de uma coluna de extracção em fase sólida engloba 4 passos básicos (ver figura 4.7.):

1. – **Condicionamento da coluna:** em colunas polares ou apolares o condicionamento faz-se primeiro pela eluição de um volume de solvente de polaridade semelhante ao da fase estacionária da coluna (normalmente, 3 vezes o volume da coluna), e posteriormente, pela eluição de igual volume de uma solução de natureza similar ao solvente da amostra. O primeiro solvente que se faz passar pela coluna tem por objectivo limpar eventuais impurezas que esta possa conter e ainda, homogeneizar a fase estacionária para a eluição da amostra, ao passo que, o segundo solvente que se faz passar pela coluna tem por principal objectivo eliminar vestígios do solvente anterior cuja presença condicionaria o processo de extracção. O condicionamento de colunas de extracção em fase sólida de permuta iónica é feito

simplesmente pela eluição de água ou solução tampão pela coluna.

2. – **Retenção:** esta etapa consiste em fazer passar a amostra pela coluna. Independentemente da estratégia utilizada para a purificação da amostra (retenção da espécie a analisar ou retenção dos interferentes) este passo deve ser realizado de forma lenta (1-2gotas/segundo), para que toda a fase estacionária seja uniformemente utilizada e ainda, para garantir a extracção total das espécies da amostra a extrair.

3. – **Lavagem da coluna:** após a eluição da amostra faz-se atravessar pela coluna uma nova porção de solução similar ao solvente da amostra. Esta etapa tem por objectivo efectuar uma eliminação mais eficiente das espécies interferentes contidas na fase estacionária.

4. – **Eluição:** a eluição é o último passo na utilização de uma coluna de extracção em fase sólida quando se pretende extrair um determinado componente de uma amostra. A recolha desse componente é feita mediante a passagem de um solvente capaz de romper a interacção existente entre a fase estacionária e a espécie retida. A eluição deve ser feita com as mesmas precauções do passo da retenção (passo 2) para garantir uma recolha quantitativa do componente retido.

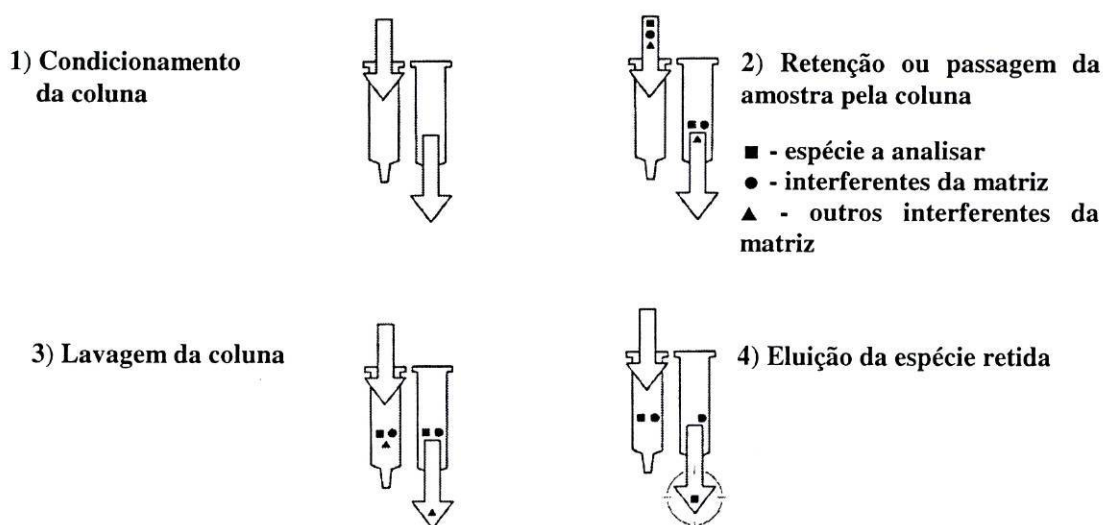


Figura 4.7. - Esquema ilustrativo do modo de utilização de uma coluna de extracção em fase sólida quando se pretende a extracção e recolha de uma espécie presente numa amostra. 1) Condicionamento da coluna; 2) Retenção; 3) Lavagem da coluna; 4) Eluição da espécie retida

## *Parte II*

### *Desenvolvimento do Método*

# 1. – Introdução

O trabalho experimental que se descreve a seguir, teve por objectivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação do *trans*-2-nonenal em cerveja. Este trabalho, vem no seguimento de estudos preliminares realizados no nosso laboratório [35], que mostraram ser possível identificar o *trans*-2-nonenal em amostras de cerveja contaminadas com este aldeído a partir da seguinte metodologia: (1) destilação por arrastamento de vapor da amostra de cerveja contaminada; (2) concentração do destilado recolhido em colunas de extracção em fase sólida do tipo C18; (3) análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica.

Neste trabalho procurou-se estudar com maior rigor e profundidade a metodologia acima descrita, para a determinação do *trans*-2-nonenal em cerveja. Numa primeira fase, estudou-se com soluções modelo de *trans*-2-nonenal, a eficiência do processo de destilação por arrastamento de vapor e a eficiência do processo de extracção por colunas de extracção em fase sólida. Numa segunda fase, estudou-se a aplicabilidade da metodologia desenvolvida a amostras de cerveja. Igualmente, se estudou a influência da matriz da cerveja na indução da formação de *trans*-2-nonenal nas condições em que o *trans*-2-nonenal é extraído, e ainda, o efeito da presença do sulfito na extracção desse aldeído.



## ***2. –Instrumentação e reagentes utilizados***

2.1. – Instrumentação

2.2. – Reagentes

2.3. – Preparação de soluções

### **2. – Instrumentação e reagentes utilizados**

#### **2.1. – Instrumentação**

Durante a realização deste trabalho utilizou-se a seguinte instrumentação na preparação de soluções: balança analítica *Mettler*, modelo AE50, para pesagem rigorosa dos reagentes, balança *Mettler*, modelo PE2000, para pesagem de reagentes, banho de ultra-sons *Bandelin Sonorex*, modelo TK30, para a homogeneização/desgaseificação das soluções e um medidor de pH *Metrohm*, modelo 605, equipado com um eléctrodo de vidro combinado *Metrohm*, Ref.: 6.02.02.000.

A medição de volumes de solução inferiores/iguais a 1000  $\mu\text{L}$  foi efectuada com micropipetas *Gilson Pipetman* (P1000 – capacidade máxima de 1000  $\mu\text{L}$ ; P200 – capacidade máxima de 200  $\mu\text{L}$ ). A medição de volumes de solução superiores a 1,00 mL foi efectuado com material de vidro aferido.

A análise das amostras foi efectuada num cromatógrafo líquido de alta eficiência com as seguintes características:

1. – Bomba de fluxo – *Gilson*, modelo 307 (sistema isocrático)

2. – Válvula de injeção manual – *Rheodyne*, modelo 7125 (volume do *loop*, 20 $\mu$ L)  
Seringa de injeção *Hamilton* 250 $\mu$ L
3. – Detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável, *Gilson*, modelo 115 (volume de célula de fluxo – 11 $\mu$ L ; comprimento óptico da célula de fluxo – 10 mm)
4. – Integrador *Spectra-Physics*, modelo DataJet CH1
5. – Colunas de CLAE (na tabela 2.1. especificam-se as características das colunas de CLAE utilizadas)

**Tabela 2.1. – Características das colunas de CLAE utilizadas**

Conjunto pré-coluna e coluna, C8	Conjunto pré-coluna e coluna, C18
<u>Pré-coluna</u> Nucleosil, C8, Macharey – Nagel Ref.: 721787.40	<u>Pré-coluna</u> Nucleosil, C18, Macharey – Nagel Ref.: 721602.40
Comprimento – 11 mm	Comprimento – 8 mm
Diâmetro interno – 4 mm	Diâmetro interno – 4 mm
Diâmetro de partícula – 5 $\mu$ m	Diâmetro de partícula – 5 $\mu$ m
Tamanho do poro – 120 Å	Tamanho do poro – 100 Å
<u>Coluna</u> Nucleosil, C8, Macharey – Nagel Ref.: 720052.46	<u>Coluna</u> Nucleosil, C18, Macharey – Nagel Ref.: 720014.46
Comprimento – 250 mm	Comprimento – 250 mm
Diâmetro interno – 4,6 mm	Diâmetro interno – 4,6 mm
Diâmetro de partícula – 5 $\mu$ m	Diâmetro de partícula – 5 $\mu$ m
Tamanho do poro – 120 Å	Tamanho do poro – 100 Å

Os estudos espectrofotométricos foram efectuados num Espectrofotometro *Hitachi*, modelo U-2000.

O condicionamento de soluções/amostras a temperatura controlada foi realizado numa estufa *Memmert*, modelo Tv10.

Na preparação de amostras foram utilizadas colunas de extracção em fase sólida, Macharey – Nagel do tipo *Chromabond* C18, 200mg, Ref.: 730002.

## 2.2. – Reagentes

Os diversos aldeídos e reagentes utilizados na preparação de soluções e respectivas características gerais encontram-se indicados nas tabelas 2.2. e 2.3.

Tabela 2.2. – Aldeídos utilizados na realização do trabalho experimental

Aldeído	Marca	Pureza
<i>trans</i> -2-hexenal	Aldrich	98%
<i>trans</i> -2-heptenal	Aldrich	90%
<i>trans</i> -2-octenal	Aldrich	94%
<i>trans</i> -2-nonenal	Aldrich	97%
<i>trans</i> -2-decenal	Fluka	97%
<i>trans, trans</i> -2,4-nonadienal	Aldrich	85%
<i>trans, trans</i> -2,4-decadienal	Aldrich	85%

Tabela 2.3. – Reagentes gerais utilizados na realização do trabalho experimental

Reagente	Marca	Pureza
Metabissulfito de potássio	Riedel-deHaën	96%
Ácido clorídrico	Pronalab	37%
Hidróxido de sódio	Merck	p.a.
Cloreto de sódio	Merck	p.a.
Dihidrogenofosfato de sódio	Merck	p.a.
Acetato de sódio	Merck	p.a.
Hidrazina	Aldrich	98%
Acetonitrilo	Merck	para cromatografia líquida de gradiente
Etanol	Pronalab	99,8%

Toda a água utilizada no decorrer deste trabalho, para a preparação de soluções e para a realização das destilações por arrastamento de vapor, foi purificada do seguinte modo:

- 1 – passagem da água de abastecimento público por resinas permutadoras de leito misto;
- 2 – destilação da água obtida num sistema *Autostill* Ref.: 951075
- 3 – passagem da água desionizada e destilada pelo sistema de purificação de água "*Simplicity*" da Millipore®

As amostras de cerveja utilizadas durante a realização deste trabalho foram cedidas pela Unicer, Bebidas de Portugal, S.A.

### 2.3. – Preparação de soluções

As soluções de partida dos aldeídos foram preparadas a partir do respectivo reagente

comercial conforme se descreve na tabela 2.4. Estas soluções de partida foram preparadas semanalmente em meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v), devido à reduzida solubilidade dos aldeídos em meio aquoso. As soluções de menor concentração destes aldeídos foram preparadas por diluição das respectivas soluções de partida.

**Tabela 2.4 - Modo de preparação das soluções de partida dos aldeídos**

Solução	Procedimento experimental para a preparação das soluções	Solvente	Concentração
<i>trans</i> -2-hexenal	Pipetaram-se 29,6 µL do reagente para um balão volumétrico de 25 mL	Água/Acetonitrilo, 50:50, v/v	1,00 x 10 <sup>-2</sup> M
<i>trans</i> -2-heptenal	Pipetaram-se 36,4 µL do reagente para um balão volumétrico de 25 mL		
<i>trans</i> -2-octenal	Pipetaram-se 39,7 µL do reagente para um balão volumétrico de 25 mL		
<i>trans</i> -2-nonenal	Pipetaram-se 42,7 µL do reagente para um balão volumétrico de 25 mL		
<i>trans</i> -2-decenal	Pipetaram-se 46,8 µL do reagente para um balão volumétrico de 25 mL		
<i>trans, trans</i> -2,4-nonadienal	Pipetaram-se 47,2 µL do reagente para um balão volumétrico de 25 mL		
<i>trans, trans</i> -2,4-decadienal	Pipetaram-se 51,9 µL do reagente para um balão volumétrico de 25 mL		

As soluções de partida dos restantes reagentes utilizados no decorrer deste trabalho foram preparadas conforme se descreve na tabela 2.5.

**Tabela 2.5. - Modo de preparação das soluções de partida dos reagentes gerais**

Solução	Procedimento experimental para a preparação das soluções
Metabissulfito de potássio, 1,00 x 10 <sup>-2</sup> M	Pesaram-se rigorosamente 0,222 g do reagente para um balão volumétrico de 100,00 mL. Homogeneizou-se a solução com água até perfazer o volume.
Hidrazina, 1 M	Pesaram-se 2,1 g do reagente para um balão volumétrico de 20,00 mL. Homogeneizou-se a solução com água até perfazer o volume.
Tampão acetato, 0,025 M, pH 4	Pesaram-se 1,7 g de acetato de sódio para um frasco de 500 mL. Homogeneizou-se a solução com água até perfazer o volume. O pH da solução foi ajustado com HCl, 6 M
Tampão fosfato, 0,025 M, pH 8	Pesaram-se 1,8 g de dihidrogenofosfato de sódio para um frasco de 500 mL. Homogeneizou-se a solução com água até perfazer o volume. O pH da solução foi ajustado com NaOH, 6 M

## **3. – Estudos preliminares com *trans-2-nonenal***

- 3.1. – Caracterização do comportamento do *trans-2-nonenal* por CLAE com detecção espectrofotométrica
- 3.2. – Estudos de estabilidade de soluções de *trans-2-nonenal*

### **3. – Estudos preliminares com *trans-2-nonenal***

#### **3.1. – Caracterização do comportamento do *trans-2-nonenal* por CLAE com detecção espectrofotométrica**

Este estudo teve por objectivo avaliar a aplicabilidade da técnica de CLAE com detecção espectrofotométrica como técnica analítica para a identificação e quantificação do aldeído *trans-2-nonenal*.

Para tal, começou-se por realizar o estudo espectrofotométrico do *trans-2-nonenal* na zona do U.V.-Visível. Preparou-se uma solução aquosa de *trans-2-nonenal*,  $25 \times 10^{-6}$  M, e procedeu-se à análise espectrofotométrica desta solução.

O espectro obtido pode ser observado na figura 3.1.

Este ensaio permitiu verificar que o *trans-2-nonenal* absorve na zona do ultravioleta,

apresentando um máximo de absorção a 226 nm. A absorção de radiação U.V. a este comprimento de onda ou próximo, é característico de compostos que possuem uma ligação dupla entre carbonos, conjugada com um grupo carbonilo, como é o caso do *trans*-2-nonenal [36, 37].

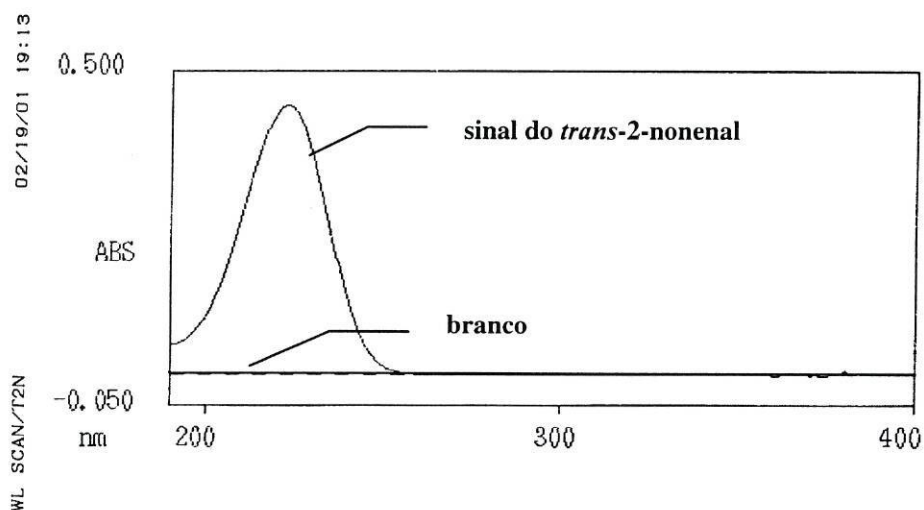


Figura 3.1. – Espectro de absorção de uma solução aquosa de *trans*-2-nonenal,  $25 \times 10^{-6}$  M

Uma vez determinado o comprimento de onda de absorção máxima do *trans*-2-nonenal, realizou-se uma curva de calibração por CLAE com detecção espectrofotométrica por injeção de soluções modelo de *trans*-2-nonenal, preparadas rigorosamente, com as seguintes concentrações,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M e  $1 \times 10^{-6}$  M. Neste ensaio foram utilizadas as condições cromatográficas que estão descritas no Quadro I.

### Quadro I

#### Condições cromatográficas utilizadas na análise de soluções de *trans*-2-nonenal

**Fase estacionária –**

Conjunto pré-coluna e coluna, C8 (ver características da fase estacionária no ponto 1.1)

**Fase móvel –**

Composição do eluente, água/acetonitrilo, 50:50 (v/v); Fluxo,  $1,00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

**Parâmetros de integração –**

Sensibilidade 0,02AUFS; Velocidade do papel,  $1,00 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Atenuação, 1

**Comprimento de onda de detecção –**

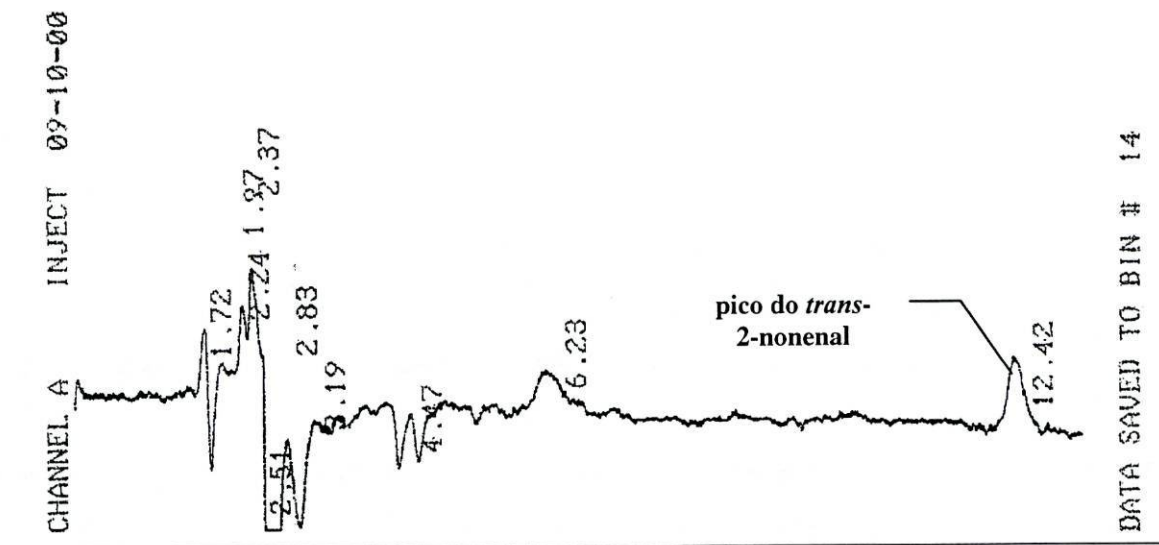
226 nm

Os valores de área de pico e respectivos tempos de retenção obtidos após injeção de cada solução de *trans*-2-nonenal estão resumidos na tabela 3.1.

**Tabela 3.1. – Valores de área de pico e tempo de retenção obtidos por análise de soluções modelo de *trans*-2-nonenal por CLAE com detecção espectrofotométrica**

[ <i>trans</i> -2-nonenal]/ M	Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal	tempo de retenção
$1 \times 10^{-8}$	452	12.45
$5 \times 10^{-8}$	1 506	12.42
$1 \times 10^{-7}$	2 184	12.42
$5 \times 10^{-7}$	10 770	12.43
$1 \times 10^{-6}$	23 898	12.42

Conforme seria de esperar, para cada injeção das soluções modelo no sistema CLAE verificou-se o aparecimento de um sinal cromatográfico com um tempo de retenção característico e cuja intensidade aumentou com o aumento da concentração do aldeído na solução injectada. A figura 3.2. ilustra um cromatograma típico obtido neste ensaio.



**Figura 3.2. - Cromatograma de uma solução modelo de *trans*-2-nonenal,  $5 \times 10^{-8}$  M. As condições cromatográficas utilizadas para a análise desta solução encontram-se descritas no Quadro I**

A representação gráfica dos valores de área de pico em função da concentração de aldeído injectada (figura 3.3.) permitiu verificar que é possível estabelecer uma razoável correlação linear entre o sinal lido e a concentração de solução de aldeído injectada.

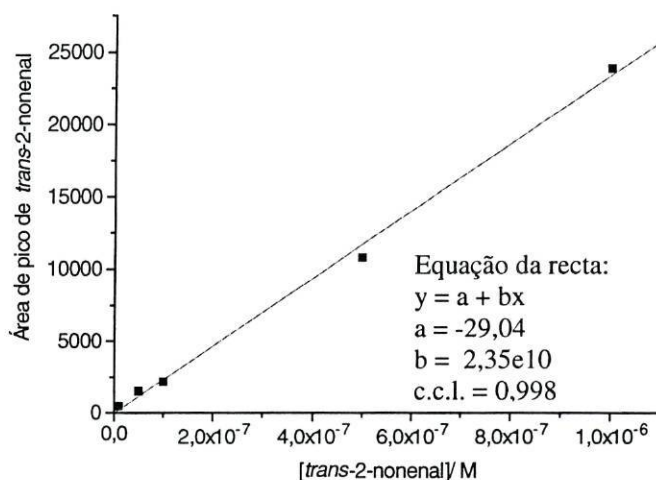


Figura 3.3. - Curva de calibração para o *trans*-2-nonenal obtida por CLAE com detecção espectrofotométrica

### 3.2. – Estudos de estabilidade de soluções de *trans*-2-nonenal

Estes ensaios tiveram por objectivo avaliar a estabilidade das soluções de *trans*-2-nonenal em duas condições de meio distintas, em solução aquosa e em meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v).

Para a realização deste estudo de estabilidade prepararam-se três soluções de *trans*-2-nonenal com concentrações,  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  e  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , nos dois meios referidos, água e água/acetonitrilo. Em seguida, condicionaram-se as soluções em duas situações distintas: (1) na estufa a  $22^\circ\text{C}$  e no escuro; (2) à temperatura ambiente e expostas à luz.

Efectuaram-se análises diárias destas soluções, por CLAE com detecção espectrofotométrica, por forma a acompanhar a evolução do sinal de *trans*-2-nonenal.

Dada a baixa solubilidade do *trans*-2-nonenal em água, prepararam-se as soluções aquosas por diluição de soluções mais concentradas ( $1,00 \times 10^{-2} \text{M}$ ) preparadas num meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v). Devido à elevada diluição que era efectuada, a quantidade do solvente orgânico na solução final pode ser considerada desprezável.

Nas tabelas 3.2. e 3.3. são apresentados resultados obtidos dos diferentes ensaios realizados.



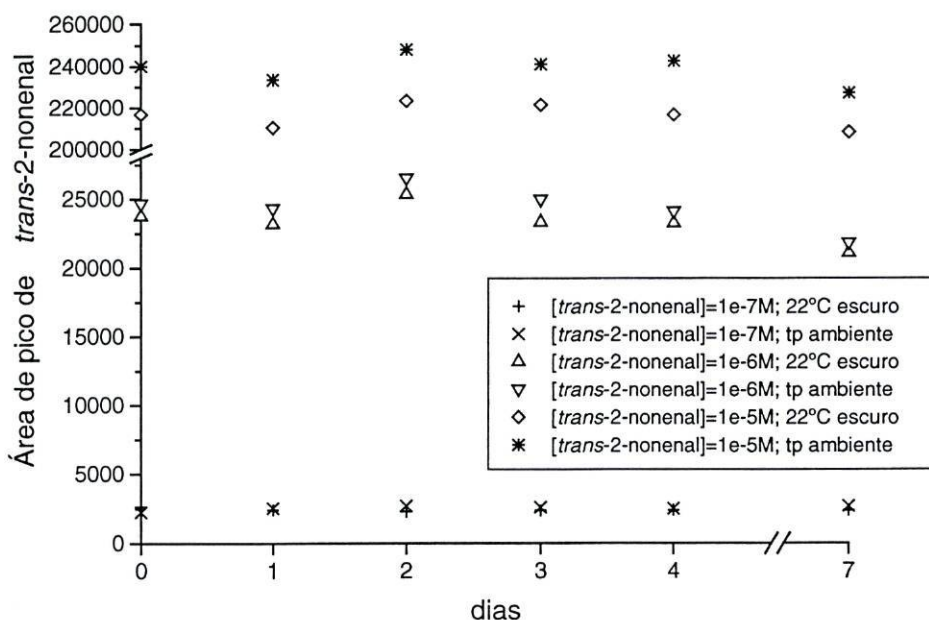
Tabela 3.2. – Estudo de estabilidade de soluções de *trans*-2-nonenal em meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v)

Tempo	Valores de áreas de pico de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal condicionadas a 22,0 ± 1°C no escuro			Valores de áreas de pico de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal condicionadas a temperatura ambiente e expostas à luz		
	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-7</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-6</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-5</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-7</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-6</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-5</sup> M
0 dias	2 653	23 735	216 678	2 258	24 660	240 063
1 dia	2 399	23 140	210 176	2 533	24 260	233 338
2 dias	2 272	25 308	223 189	2 686	26 487	247 846
3 dias	2 348	23 267	221 110	2 576	24 911	240 717
4 dias	2 396	23 204	216 333	2 489	24 054	242 258
7 dias	2 355	21 056	207 941	2 666	21 772	226 838

Tabela 3.3. – Estudo de estabilidade de soluções aquosas de *trans*-2-nonenal

Tempo	Valores de áreas de pico de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal condicionadas a 22,0 ± 1°C no escuro			Valores de áreas de pico de soluções de <i>trans</i> -2-nonenal condicionadas a temperatura ambiente e expostas à luz		
	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-7</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-6</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-5</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-7</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-6</sup> M	C <sub>12n</sub> =1x10 <sup>-5</sup> M
0 dias	2 712	27 740	275 736	2 678	26 565	275 960
1 dia	2 150	24 274	245 947	324	25 775	278 715
2 dias	1 809	22 231	225 308	0	15 475	253 495
3 dias	109	14 950	200 834	0	6 480	235 255
4 dias	0	4 347	166 881	0	2 740	217 285
7 dias	0	0	40 567	0	0	142 990

Sensibilidade: 0,02 AUFS

Figura 3.4. - Valores de área de pico de soluções de *trans*-2-nonenal em meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v)

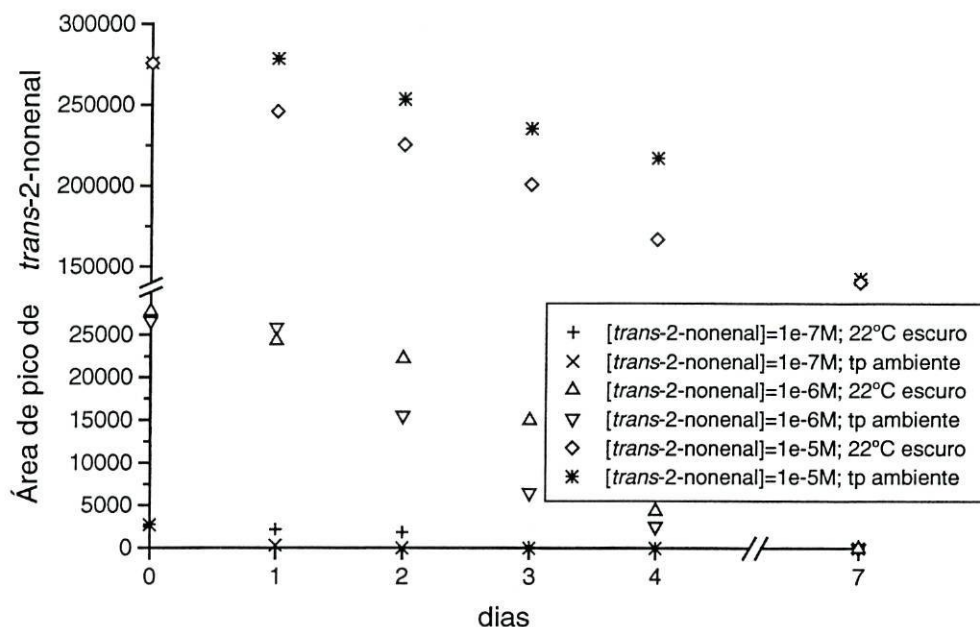


Figura 3.5. - Valores de área de pico de soluções de *trans*-2-nonenal em meio aquoso.

É possível verificar pelos resultados apresentados na figura 3.4., que as soluções de *trans*-2-nonenal preparadas em água/acetonitrilo 50:50 (v/v), mantiveram a sua concentração nas duas condições em que foram testadas. Pelo contrário, as soluções de *trans*-2-nonenal preparadas em água mostraram ser instáveis em ambas as situações testadas (figura 3.5.). Verifica-se, igualmente, que não existe um comportamento distinto entre as soluções armazenadas ao abrigo da luz e as soluções expostas à luz.

No ponto 2 - Parte I, foram discutidas algumas reacções/mecanismos que poderão justificar o abaixamento do sinal deste aldeído em meio aquoso, nomeadamente, a adição de água ao grupo carbonilo, a reacção aldólica, ou o equilíbrio tautomérico.

Uma outra reacção que poderá, igualmente, ser responsável pelo abaixamento do sinal observado encontra-se descrita por Collin e Noël [15]. Estes autores referem que o *trans*-2-nonenal em água, rapidamente origina o composto 3-hidroxinonanal. Esta reacção foi igualmente estudada por Barker e colaboradores [14] (figura 3.13. Parte I), que verificaram que a adição de água é apreciavelmente extensa para aldeídos de cadeia longa.

A principal conclusão a retirar dos resultados obtidos neste estudo é a de que as soluções aquosas de *trans*-2-nonenal não são estáveis, e devem ser preparadas em meio água/acetonitrilo, 50:50 (v/v) para aumentar a sua estabilidade.

## ***4. – Desenvolvimento da metodologia experimental para a determinação de trans-2-nonenal em soluções modelo***

- 4.1. – Estudo e optimização de um sistema de destilação por arrastamento de vapor para extracção do *trans-2-nonenal*
- 4.2. – Estudo da eficiência de colunas C18 na extracção e concentração de *trans-2-nonenal* em soluções aquosas

### **4. – Desenvolvimento da metodologia experimental para a determinação de *trans-2-nonenal* em soluções modelo**

#### **4.1. – Estudo e optimização de um sistema de destilação por arrastamento de vapor para extracção do *trans-2-nonenal***

O desenvolvimento do método para a determinação de *trans-2-nonenal* na cerveja, iniciou-se pelo estudo e optimização dos vários passos envolvidos na metodologia adoptada, em soluções modelo. Deste modo, começou-se por estudar o grau de extracção do *trans-2-nonenal* usando o processo de destilação por arrastamento de vapor num sistema como o representado na figura 4.1. Estudou-se a influência da força iónica da solução a ser destilada, o volume da solução a destilar, o volume de destilado a recolher, e por fim, a repetibilidade do processo de destilação.

Os procedimentos experimentais seguidos, os resultados e as conclusões respectivas a cada estudo, encontram-se descritos seguidamente.

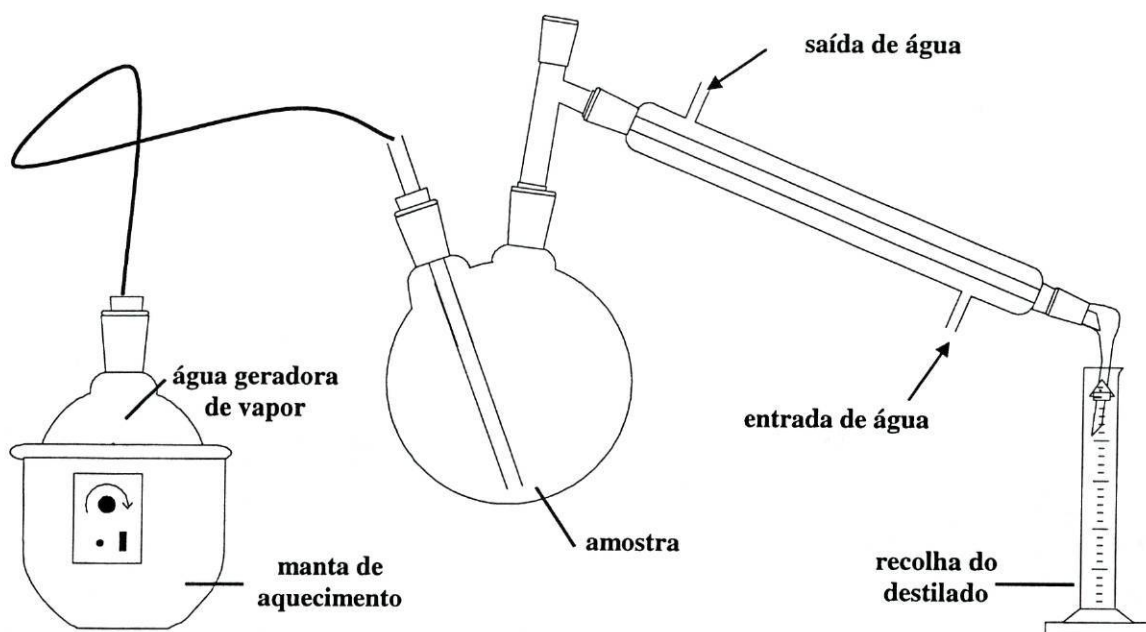


Figura 4.1. - Representação esquemática da montagem experimental efectuada para uma destilação por arrastamento de vapor

#### 4.1.1. – Estudo da força iónica na extracção de *trans*-2-nonenal

Atendendo a que o *trans*-2-nonenal é um composto muito pouco polar, estudou-se a influência da força iónica da solução a destilar no grau de extracção do *trans*-2-nonenal.

Para o estudo do efeito da força iónica na extracção de *trans*-2-nonenal realizaram-se dois conjuntos de ensaios distintos do seguinte modo: num ensaio prepararam-se cinco soluções aquosas de *trans*-2-nonenal,  $1 \times 10^{-6}$  M, de 100 mL cada, contendo, respectivamente, uma concentração em NaCl de 0, 0,2, 0,3, 0,5 e 1,0 M. Estas soluções foram destiladas individualmente por arrastamento de vapor tendo-se fixado como volume a recolher em cada destilação, 20,0 mL. O volume recolhido foi posteriormente diluído a 100 mL e analisado por CLAE.

O segundo conjunto de ensaios foi realizado do mesmo modo que o primeiro, com a diferença de terem sido destiladas soluções de *trans*-2-nonenal,  $2,5 \times 10^{-6}$  M, com as seguintes concentrações de NaCl, 0, 0,2, 0,7, 1,5 e 3,0 M.

Para o cálculo da percentagem de recuperação de *trans*-2-nonenal de cada ensaio, preparam-se, em paralelo, soluções de controlo de *trans*-2-nonenal com concentrações  $1 \times 10^{-6}$  e  $2,5 \times 10^{-5}$  M, que foram analisadas sem serem destiladas. A percentagem de extracção é

calculada pela razão entre a área de pico obtida na análise da solução diluída do destilado e a área de pico da solução de controlo que não sofreu destilação.

Os resultados obtidos para cada um dos ensaios realizados estão descritos na tabela 4.1.

**Tabela 4.1. - Estudo do efeito da força iónica na extracção de *trans*-2-nonenal de soluções aquosas com diferentes concentrações em NaCl**

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra} = 1 \times 10^{-6} M$			
[NaCl] /M	Área de pico obtida com solução destilada	Área de pico obtida com solução de controlo	Recuperação / %
0	20 482	30 992	<b>66,1</b>
0,2	24 173		<b>78,0</b>
0,3	18 019		<b>58,1</b>
0,5	18 597		<b>60,0</b>
1,0	18 702		<b>60,3</b>
$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra} = 2,5 \times 10^{-6} M$			
[NaCl]/M	Área de pico obtida com solução destilada	Área de pico obtida com solução de controlo	Recuperação /%
0	39 355	70 165	<b>56,5</b>
0,2	57 160		<b>82,0</b>
0,7	46 620		<b>66,9</b>
1,5	53 000		<b>76,0</b>
3,0	39 475		<b>56,6</b>

Sensibilidade: 0,02 AUFS

De acordo com as percentagens de recuperação de *trans*-2-nonenal obtidas, para as soluções de menor concentração no aldeído não é possível distinguir uma tendência clara sobre um aumento ou diminuição da extracção utilizando NaCl; contudo, o estudo realizado para as soluções mais concentradas de *trans*-2-nonenal parece indicar que ocorre uma melhor extracção deste aldeído na presença de NaCl relativamente à situação em que não é adicionado o sal.

Verifica-se igualmente, em ambos os estudos efectuados, que a destilação de soluções de *trans*-2-nonenal com uma concentração de NaCl, 0,2M, mostrou ser a mais vantajosa para a recuperação do analíto em estudo, pelo que, optou-se por fixar esta concentração de NaCl nas soluções a destilar.

#### 4.1.2. – Estudo do efeito do volume de amostra a destilar na extracção do *trans*-2-nonenal

Com este estudo pretendeu-se verificar qual a influência do volume inicial de solução a destilar no grau de recuperação de *trans*-2-nonenal.

Este estudo foi realizado para três concentrações distintas de *trans*-2-nonenal na solução a destilar, respectivamente,  $1 \times 10^{-7}M$ ,  $1 \times 10^{-6}M$  e  $1 \times 10^{-5}M$ , em meio aquoso, 0,2M em NaCl. Para cada concentração ensaiaram-se cinco volumes de amostra diferentes, respectivamente, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 mL. Recolheram-se em todos os ensaios o mesmo volume de destilado 25,0 mL. Por fim, antes de proceder à análise por CLAE, diluiu-se o destilado recolhido ao volume inicial respectivo. Para o cálculo da percentagem de recuperação de *trans*-2-nonenal de cada ensaio, prepararam-se paralelamente soluções controlo de *trans*-2-nonenal, com concentrações de  $1 \times 10^{-7}M$ ,  $1 \times 10^{-6}M$  e  $1 \times 10^{-5}M$ . Calculou-se este valor do modo descrito nos ensaios anteriores.

Os resultados obtidos para cada ensaio realizado e a percentagem das recuperações de *trans*-2-nonenal respectivas estão descritas na tabela 4.2.

**Tabela 4.2. - Estudo do efeito do volume de solução a destilar na extracção de *trans*-2-nonenal**

[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = $1 \times 10^{-7}M$			
Volume inicial no balão / mL	Área de pico obtida com solução destilada (*)	Área de pico obtida com solução de controlo (*)	Recuperação/%
25,00	1 496	2 849	52,5
50,00	1 847		64,8
100,0	2 685		94,2
200,0	2 017		70,8
300,0	2 169		76,1
[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = $1 \times 10^{-6}M$			
Volume inicial no balão / mL	Área de pico obtida com solução destilada (*)	Área de pico obtida com solução de controlo (*)	Recuperação/%
25,00	17 239	29 080	60,6
50,00	20 008		70,3
100,0	23 020		80,1
200,0	21 854		76,8
300,0	20 533		72,2

## Continuação da tabela 4.2.

[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = 1 x 10 <sup>-5</sup> M			
Volume inicial no balão / mL	Área de pico obtida com solução destilada (**)	Área de pico obtida com solução de controlo (**)	Recuperação/%
25,00	29 508	54 190	54,4
50,00	34 577		63,8
100,0	32 465		59,9
200,0	38 785		71,6
300,0	34 947		64,5

(\*)Sensibilidade: 0,02 AUFS

(\*\*)Sensibilidade: 0,1 AUFS

Os resultados experimentais obtidos mostram que, a destilação de volumes reduzidos de amostra (25 mL e 50 mL) proporcionam níveis de recuperação de *trans*-2-nonenal mais baixos, do que quando são destilados volumes de amostra compreendidos entre 100 mL e 300mL (nestas condições, obtiveram-se níveis de recuperação de *trans*-2-nonenal superiores e aproximadamente constantes para as três concentrações ensaiadas do aldeído). Este comportamento pode ser observado na figura 4.2.

A interpretação dos resultados obtidos não é simples porque a percentagem de recuperação do *trans*-2-nonenal não depende claramente da sua concentração inicial. Contudo, o aspecto experimental mais importante que se pode concluir dos resultados obtidos é que o *trans*-2-nonenal é recuperado num volume pequeno de destilado recolhido, mesmo quando o volume a destilar é elevado.

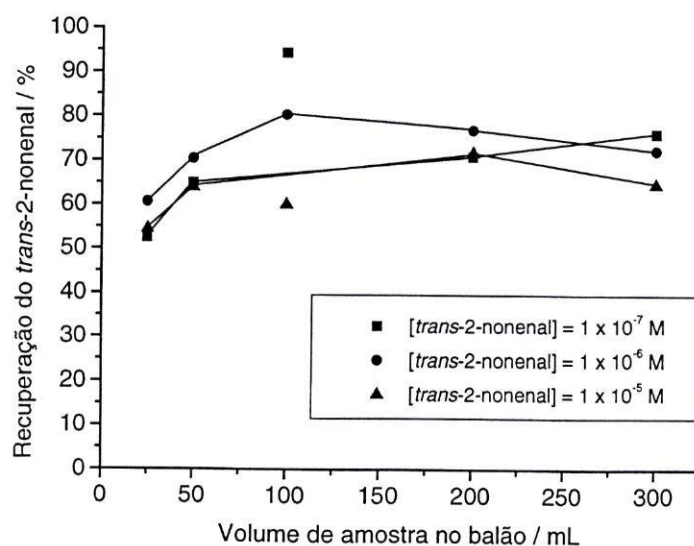


Figura 4.2. - Representação gráfica das recuperações de *trans*-2-nonenal obtidas no estudo da variação do volume de amostra a destilar na extração de *trans*-2-nonenal.

### 4.1.3. – Estudo da evolução da extracção de *trans*-2-nonenal ao longo da recolha de destilado em soluções modelo

Neste estudo, pretendeu-se averiguar o modo como o *trans*-2-nonenal é recuperado no destilado recolhido ao longo da destilação por arrastamento de vapor, com vista à determinação do volume mais adequado a destilar, para a recolha óptima de *trans*-2-nonenal nesse processo.

Este estudo foi realizado com soluções aquosas de *trans*-2-nonenal e com soluções de *trans*-2-nonenal contendo 6% (v/v) em etanol, esta última para simular a percentagem de etanol existente na cerveja.

Procedeu-se à destilação das soluções modelo de *trans*-2-nonenal (volume amostra de 100mL), em meio NaCl 0,2M, com diferentes concentrações deste aldeído, respectivamente,  $1 \times 10^{-5}$ M,  $1 \times 10^{-6}$ M e  $1 \times 10^{-7}$ M. Durante a destilação recolheram-se fracções sucessivas de destilado de 5,0 mL, tendo-se diluído rigorosamente cada fracção recolhida a 100mL para posterior análise por CLAE. O cálculo da percentagem de recuperações obtidas foi feito de modo semelhante ao indicado nos ensaios anteriores.

Os resultados obtidos para os ensaios realizados em meio aquoso e em meio água/etanol, 6% (v/v) estão descritos nas tabelas 4.3. e 4.4.

**Tabela 4.3. – Estudo da evolução da extracção do *trans*-2-nonenal ao longo da destilação de soluções aquosas**

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{\text{amostra}} = 1 \times 10^{-7}\text{M}$				
Fracção recolhida /mL	Área de pico obtida com solução destilada (*)	Área de pico obtida com solução de controlo (*)	Recuperação parcial /%	Recuperação total /%
0-5	1512	2 876	52,6	52,6
5-10	70		2,5	55,1
10-15	0		0	55,1
15-20	0		0	55,1
20-25	0		0	55,1



Continuação tabela 4.3.

[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = 1 x 10 <sup>-6</sup> M				
Fracção recolhida /mL	Área de pico obtida com solução destilada (*)	Área de pico obtida com solução de controlo (*)	Recuperação parcial /%	Recuperação total /%
0-5	22 642	29 989	75,5	75,5
5-10	2 381		7,9	73,4
10-15	147		0,5	83,9
15-20	0		0	83,9
20-25	0		0	83,9
[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = 1 x 10 <sup>-5</sup> M				
Fracção recolhida /mL	Área de pico obtida com solução destilada (**)	Área de pico obtida com solução de controlo (**)	Recuperação parcial /%	Recuperação total /%
0-5	38 923	57 556	67,6	67,6
5-10	2 936		5,1	72,7
10-15	787		1,4	74,1
15-20	378		0,7	74,8
20-25	121		0,2	75,0

(\*) - Sensibilidade: 0,02 AUFS; (\*\*) - Sensibilidade: 0,1 AUFS

Tabela 4.4. – Estudo da evolução da extracção do *trans*-2-nonenal ao longo da destilação de soluções água:etanol, 6% v/v

[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = 1 x 10 <sup>-7</sup> M				
Fracção recolhida /mL	Área de pico obtida com solução destilada (*)	Área de pico obtida com solução de controlo (*)	Recuperação parcial /%	Recuperação total /%
0-5	2 521	2 876	78,2	78,2
5-10	224		6,9	85,1
10-15	0		0	85,1
15-20	0		0	85,1
20-25	0		0	85,1
[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = 1 x 10 <sup>-6</sup> M				
Fracção recolhida /mL	Área de pico obtida com solução destilada (*)	Área de pico obtida com solução de controlo (*)	Recuperação parcial /%	Recuperação total /%
0-5	30 254	40 268	75,1	75,1
5-10	3 301		8,2	83,3
10-15	528		1,3	84,6
15-20	283		0,7	85,3
20-25	0		0	85,3

Continuação da tabela 4.4.

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{\text{amostra}} = 1 \times 10^{-3} \text{M}$				
Fracção recolhida /mL	Área de pico obtida com solução destilada (*)	Área de pico obtida com solução de controlo (*)	Recuperação parcial /%	Recuperação total /%
0-5	49 619	70 289	70,6	70,6
5-10	9 209		13,1	83,7
10-15	1 908		2,7	86,4
15-20	522		0,7	87,1
20-25	72		0,1	87,2

(\*) - Sensibilidade: 0,02 AUFS

(\*\*) - Sensibilidade: 0,1 AUFS

O perfil de recuperações obtido (figura 4.3.) revela que o *trans*-2-nonenal é extraído logo nas primeiras fracções de destilado recolhidas, quer nas soluções aquosas, quer nas soluções contendo etanol. Verifica-se, igualmente, que a recolha de 25 mL de destilado é suficiente para a extracção completa de *trans*-2-nonenal em todos os casos estudados.

Por comparação entre as recuperações obtidas no processo de destilação por arrastamento de vapor das soluções aquosas e das soluções de água/etanol, 6% (v/v), verifica-se que a extracção do aldeído é mais extensa na presença de etanol. Estes resultados compreendem-se se atendermos ao facto de o *trans*-2-nonenal ser praticamente insolúvel em água e durante a destilação (das soluções aquosas), poder ficar retido na superfície do sistema, nomeadamente nas paredes do vidro do sistema de destilação. Pelo contrário, quando são destiladas soluções contendo etanol, é possível que o álcool ajude à remoção do aldeído da superfície do sistema, contribuindo assim para uma maior eficiência de extracção do *trans*-2-nonenal. Este facto, constitui uma vantagem para a destilação por arrastamento de vapor de amostras de cerveja que contêm etanol.

Relativamente à eficiência de extracção do *trans*-2-nonenal para soluções com diferentes concentrações deste aldeído, através dos resultados obtidos com soluções aquosas, não foi possível estabelecer uma tendência clara para um aumento ou diminuição da eficiência da destilação. Contudo, de acordo com os valores de percentagem de recuperação do *trans*-2-nonenal obtidos para as soluções etanólicas, verificou-se que a eficiência do processo de destilação é independente da concentração inicial deste aldeído; estes resultados vão de encontro aos obtidos no estudo do ponto 4.1.2.

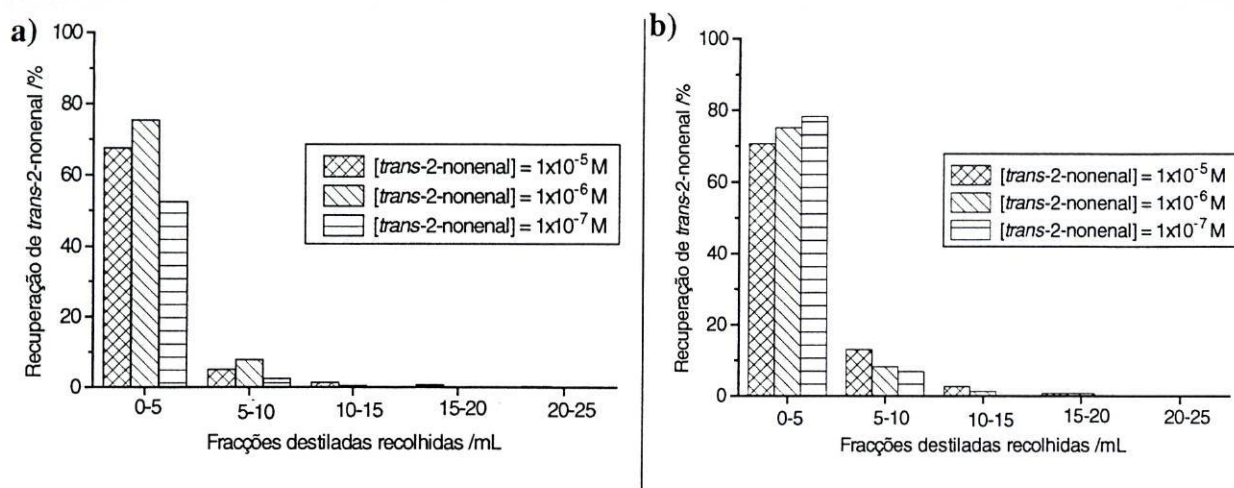


Figura 4.3. - Perfil de extração de *trans*-2-nonenal durante uma destilação por arrastamento de vapor em soluções modelo a) aquosas b) água/etanol, 6% (v/v)

## 4.2. - Estudo da eficiência de colunas C18 na extração e concentração de *trans*-2-nonenal em soluções aquosas

Para isolar e concentrar o aldeído *trans*-2-nonenal utilizaram-se colunas de extração em fase sólida do tipo C18. Neste passo, estudou-se em soluções modelo, a eficiência de extração de *trans*-2-nonenal e a influência do etanol, no processo de retenção do *trans*-2-nonenal nessas colunas.

O procedimento seguido e os resultados obtidos correspondentes ao estudo individual de cada um dos aspectos referidos, encontram-se descritos nos pontos seguintes.

### 4.2.1. - Estudo da eficiência da extração de *trans*-2-nonenal em colunas C18

Este estudo pretendeu avaliar o nível de recuperação de *trans*-2-nonenal em colunas de extração em fase sólida C18. Utilizaram-se soluções com diferentes concentrações de *trans*-2-nonenal que se submeteram ao tratamento com a coluna C18, e no fim se analisaram por CLAE.

Neste estudo prepararam-se três soluções de *trans*-2-nonenal em água com as seguintes concentrações de  $4 \times 10^{-9}$  M,  $16 \times 10^{-9}$  M e  $4 \times 10^{-8}$  M. Em seguida, fez-se atravessar 25,00 mL de cada solução de *trans*-2-nonenal pelas colunas C18, e posteriormente, fez-se a eluição do *trans*-2-nonenal retido na coluna com duas frações de 1,00 mL de acetonitrilo sucessivas, que se mantiveram separadas. No fim, cada uma dessas frações foi analisada por CLAE.

Paralelamente, prepararam-se do mesmo modo, três soluções de *trans*-2-nonenal com uma concentração 25 vezes superior (correspondente ao factor de concentração resultante do modo de extracção) como soluções de controlo para cálculo da eficiência deste processo.

Dada a baixa estabilidade deste aldeído em meio aquoso, após a preparação das respectivas soluções, procedeu-se à realização imediata do ensaio.

Para cada concentração de *trans*-2-nonenal estudada foram realizados três ensaios independentes.

Os valores obtidos da percentagem de recuperação após extracção do *trans*-2-nonenal das soluções modelo, encontram-se tabelados seguidamente (ver tabela 4.5).

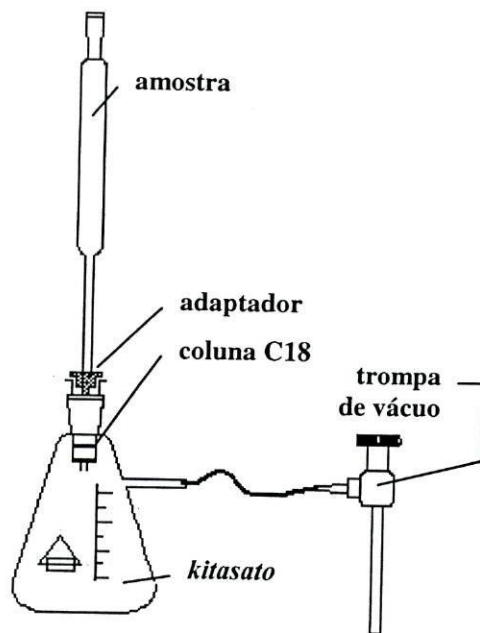


Figura 4.4. - Representação esquemática da montagem experimental utilizada para a eluição de soluções por colunas C18.

**Tabela 4.5. – Estudo da eficiência da extracção de *trans*-2-nonenal de soluções aquosas em colunas C18**

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{\text{amostra}}=4 \times 10^{-9} \text{ M}$  — concentração de 25 vezes  $\rightarrow [trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{\text{eluato}}=1 \times 10^{-7} \text{ M}$

Ensaio	Fracção de acetonitrilo /mL	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação/%	Recuperação média /%
1	0-1	2 056	3 002	68,5	67,2
	1-2	0			
2	0-1	1 985			
	1-2	0			
3	0-1	2 050			
	1-2	0		68,3	

## Continuação da tabela 4.5.

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra}=16 \times 10^{-9} \text{ M}$  — concentração de 25 vezes  $\rightarrow [trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{eluatado}=4 \times 10^{-7} \text{ M}$

Ensaio	Fracção de acetonitrilo /mL	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação/%	Recuperação média /%
1	0-1	8 808	10 543	83,5	81,9
	1-2	0			
2	0-1	8 774			
	1-2	0			
3	0-1	8 331			
	1-2	0			

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra}=4 \times 10^{-8} \text{ M}$  — concentração de 25 vezes  $\rightarrow [trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{eluatado}=1 \times 10^{-6} \text{ M}$

Ensaio	Fracção de acetonitrilo /mL	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação/%	Recuperação média /%
1	0-1	26 606(*)	24 919	106,8(*)	85,0
	1-2	0			
2	0-1	20 390			
	1-2	0			
3	0-1	21 945			
	1-2	0			

(\*) – valor desprezado

Sensibilidade: 0,02 AUFS

Os resultados obtidos para a extracção e concentração de *trans*-2-nonenal nas condições atrás descritas, mostram que as perdas relativas deste aldeído são superiores quando se utilizam soluções menos concentradas, ou seja, parece haver uma perda sistemática e constante de *trans*-2-nonenal que se torna percentualmente mais significativa quanto menor a concentração da solução inicial de *trans*-2-nonenal.

Verificou-se também que, na primeira fracção de 1,00mL de acetonitrilo o *trans*-2-nonenal retido é todo eluído.

#### 4.2.2. - Estudo da eficiência das colunas C18 na extracção de *trans*-2-nonenal em soluções etanólicas

A importância da influência do etanol no passo de extracção e concentração de *trans*-2-nonenal por colunas C18, deriva do facto de este álcool ser volátil e, portanto, será de esperar que seja co-distilado com o *trans*-2-nonenal durante a destilação por arrastamento de vapor da amostra de cerveja. Pretende-se, assim, verificar se a passagem de uma solução de

*trans*-2-nonenal contendo etanol afecta a retenção deste aldeído na coluna C18, já que o etanol influencia a polaridade do meio e pode, por isso, diminuir a retenção.

Este estudo foi realizado para três conjuntos de soluções aquosas de *trans*-2-nonenal, com concentrações respectivas de  $4 \times 10^{-9} \text{M}$ ,  $16 \times 10^{-9} \text{M}$  e  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ , e com diferentes teores em etanol, respectivamente, 1, 5, 10, 20 e 40% v/v . Como nos primeiros ensaios se verificou que a influência do etanol era observada quando se eluíam soluções com teores deste álcool entre 20% e 40%, realizou-se um novo ensaio em que se estudou a influência do etanol para soluções com teores em etanol de, 20, 25, 30, 35 e 40% (v/v).

De cada solução fez-se atravessar por uma coluna C18 um volume de 25,00 mL, tendo-se eluído a fracção de *trans*-2-nonenal retida na coluna com 1,00 mL de acetonitrilo. Realizou-se em simultâneo a análise de soluções aquosas padrão de *trans*-2-nonenal (com concentração 25 vezes superior, correspondentes ao factor de concentração) para o cálculo da recuperação obtida nestes ensaios.

Os resultados obtidos para cada um dos estudos efectuados encontram-se na tabela 4.6. e na tabela 4.7.

**Tabela 4.6. - Estudo da eficiência da extracção do *trans*-2-nonenal de soluções etanólicas (1, 5, 10, 20 e 40 % de EtOH v/v) em colunas C18**

[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = $4 \times 10^{-9} \text{M}$ — concentração de 25 vezes → [ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>eluato</sub> = $1 \times 10^{-7} \text{M}$			
[EtOH] / % (v/v)	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação / %
1	1 656	2 499	66,3
5	1 866		74,7
10	1 274		51,0
20	1 775		71,0
40	472		18,9
[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>amostra</sub> = $16 \times 10^{-9} \text{M}$ — concentração de 25 vezes → [ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>eluato</sub> = $4 \times 10^{-7} \text{M}$			
[EtOH] / % (v/v)	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação / %
1	8 618	11 479	75,1
5	8 121		70,7
10	7 777		67,7
20	7 765		69,5
40	2 668		23,2

Continuação da tabela 4.6.

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra}=4 \times 10^{-8} \text{ M}$ — concentração de 25 vezes $\rightarrow [trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{eluatado}=1 \times 10^{-6} \text{ M}$			
[EtOH] / % (v/v)	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação / %
1	18 194	25 310	71,9
5	19 436		76,8
10	22 369		88,4
20	21 864		86,4
40	7 106		21,6

**Tabela 4.7. - Estudo da eficiência da extração do *trans*-2-nonenal de soluções etanólicas (20, 25, 30, 35 e 40 % de EtOH v/v) em colunas C18**

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra}=4 \times 10^{-9} \text{ M}$ — concentração de 25 vezes $\rightarrow [trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{eluatado}=1 \times 10^{-7} \text{ M}$			
[EtOH] / % (v/v)	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação / %
20	2 357	2 402	98,1
25	2 044		85,1
30	2 212		92,1
35	1 785		74,3
40	617		25,7
$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra}=16 \times 10^{-9} \text{ M}$ — concentração de 25 vezes $\rightarrow [trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{eluatado}=4 \times 10^{-7} \text{ M}$			
[EtOH] / % (v/v)	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação / %
20	9 341	11 070	84,4
25	9 177		82,9
30	8 346		75,4
35	9 215		83,2
40	4 279		38,7
$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{amostra}=4 \times 10^{-8} \text{ M}$ — concentração de 25 vezes $\rightarrow [trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{eluatado}=1 \times 10^{-6} \text{ M}$			
[EtOH] / % (v/v)	Área de pico obtida com solução concentrada	Área de pico prevista	Recuperação / %
20	21 217	25 294	83,8
25	22 481		88,8
30	21 576		85,2
35	14 861		58,7
40	6 884		27,2

Sensibilidade: 0,02 AUFS

Conforme se pôde verificar pelos resultados obtidos para o primeiro conjunto de ensaios realizados (eluição de soluções de *trans*-2-nonenal com um teor em etanol de 1, 5, 10, 15, 20 e 40% v/v), as soluções com teores de etanol compreendidos entre 1% e 20% apresentaram índices de recuperação do aldeído elevados e relativamente próximos. Por sua vez, quando se eluiu a solução com o teor mais elevado em etanol, 40% v/v, verifica-se uma acentuada perda do sinal do *trans*-2-nonenal, o que indica que parte deste aldeído é eluído durante a passagem da amostra.

O estudo mais detalhado do efeito do etanol na eluição das soluções de *trans*-2-nonenal ensaiadas (soluções com um teor em etanol de 20, 25, 30, 35 e 40% v/v), permitiu concluir que o teor em etanol na solução que se faz eluir pela coluna afecta a retenção deste aldeído, apenas para percentagens superiores a 30% v/v, nestas condições experimentais.

No gráfico 4.5. estão representadas as recuperações obtidas para todas as situações ensaiadas. É possível observar pelo perfil de recuperações obtido a existência de um patamar de recuperações de *trans*-2-nonenal que é independente quer do teor inicial do analíto, quer do teor inicial de etanol (neste último caso até cerca de 30% v/v).

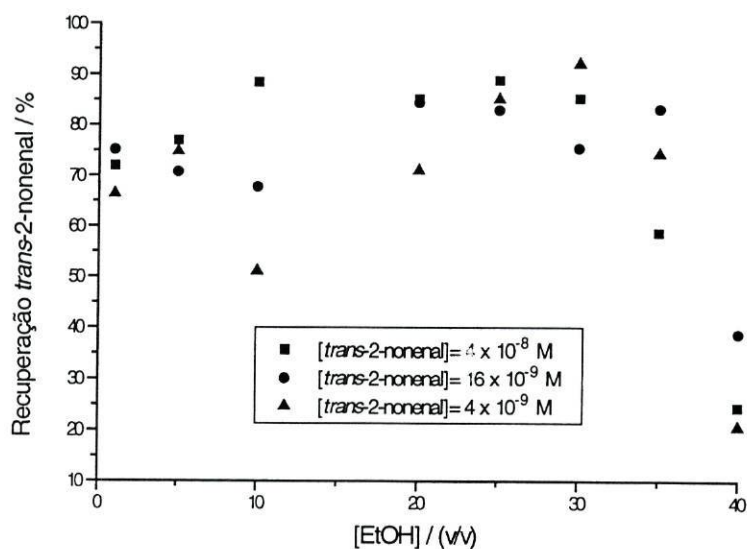


Figura 4.5. - Representação gráfica do efeito do teor em etanol na percentagem de recuperação de *trans*-2-nonenal para diferentes concentrações deste composto

#### 4.2.3. – Estudo da influência da diluição de soluções de *trans*-2-nonenal de meio água e etanol na extracção de *trans*-2-nonenal em colunas C18

Este estudo vem no seguimento dos resultados obtidos no ensaio anterior, onde se verificou que soluções de *trans*-2-nonenal com percentagens de etanol superiores a 30% (v/v) alteravam a retenção deste aldeído em colunas C18. Assim, este estudo pretende simular qual



a diluição mais adequada a fazer após a destilação por arrastamento de vapor de uma solução com aproximadamente 6% (v/v) em etanol, por forma a diminuir a percentagem de etanol da solução que é feita passar pela coluna C18, e assim, diminuir a possibilidade do *trans*-2-nonenal ser eluído durante a passagem da amostra.

Neste ensaio prepararam-se três soluções de concentração distinta de *trans*-2-nonenal, respectivamente,  $4 \times 10^{-9} \text{M}$ ,  $16 \times 10^{-9} \text{M}$  e  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ , com um teor em etanol de 60% (v/v) (este será o teor em etanol que existe em 25mL de destilado recolhido por destilação de 250mL da solução modelo contendo 6% de etanol, se todo o etanol for destilado). Mediram-se alíquotas de 25,00mL de cada uma destas soluções e procedeu-se a diluições de 2, 3 e 4 vezes com água, para se obter respectivamente, 50, 75 e 100mL de solução final. Seguidamente, procedeu-se à passagem de cada uma destas soluções por colunas C18, eluiu-se a fracção retida com 1,00mL de acetonitrilo e analisou-se por CLAE.

Paralelamente, preparam-se três soluções de *trans*-2-nonenal de concentração  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ,  $4 \times 10^{-7} \text{M}$  e  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ , para o cálculo da recuperação do aldeído nas diferentes situações ensaiadas. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 4.8.

**Tabela 4.8. – Estudo da influência da diluição de soluções etanólicas de *trans*-2-nonenal na extracção em colunas C18**

$[\textit{trans}\text{-}2\text{-nonenal}]_{\text{amostra}} = 4 \times 10^{-9} \text{M}$						
Vol. amostra diluída que atravessa a coluna C18/mL	Volume de EtOH que atravessa a coluna/mL	Percentagem em EtOH na solução	$[\textit{trans}\text{-}2\text{-nonenal}]$ da solução diluída/ <u>M</u>	Área de pico obtida com solução concentrada	Área Prevista $[\textit{trans}\text{-}2\text{-nonenal}] = 1 \times 10^{-7} \text{M}$	Recuperação/%
25,00	15	60 %	$4 \times 10^{-9}$	0	2 142	0 %
50,00		30 %	$2 \times 10^{-9}$	220		10,3 %
75,00		20 %	$1,33 \times 10^{-9}$	1 536		71,7 %
100,0		15 %	$1 \times 10^{-9}$	1 650		77,0 %
$[\textit{trans}\text{-}2\text{-nonenal}]_{\text{amostra}} = 1,6 \times 10^{-8} \text{M}$						
Vol. amostra diluída que atravessa a coluna C18/mL	Volume de EtOH que atravessa a coluna/mL	Percentagem em EtOH na solução	$[\textit{trans}\text{-}2\text{-nonenal}]$ da solução diluída/ <u>M</u>	Área de pico obtida com solução concentrada	Área Prevista $[\textit{trans}\text{-}2\text{-nonenal}] = 4 \times 10^{-7} \text{M}$	Recuperação/%
25,00	15	60 %	$4 \times 10^{-9}$	0	9 112	0 %
50,00		30 %	$2 \times 10^{-9}$	7 083		77,7 %
75,00		20 %	$1,33 \times 10^{-9}$	9 829		>100 %
100,0		15 %	$1 \times 10^{-9}$	8 746		93,0 %

Continuação da tabela 4.8.

$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]_{\text{amostra}} = 4 \times 10^{-8} \text{ M}$						
Vol. amostra diluída que atravessa a coluna C18/mL	Volume de EtOH que atravessa a coluna/mL	Porcentagem em EtOH na solução	$[trans\text{-}2\text{-nonenal}]$ da solução diluída/M	Área de pico obtida com solução concentrada	Área Prevista $[trans\text{-}2\text{-nonenal}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$	Recuperação/%
25,00	15	60 %	$4 \times 10^{-8}$	513	27 720	1,85 %
50,00		30 %	$2 \times 10^{-8}$	17 394		62,7 %
75,00		20 %	$1,33 \times 10^{-8}$	22 737		82,0 %
100,0		15 %	$1 \times 10^{-8}$	23 226		83,8 %

Sensibilidade: 0,02AUFS

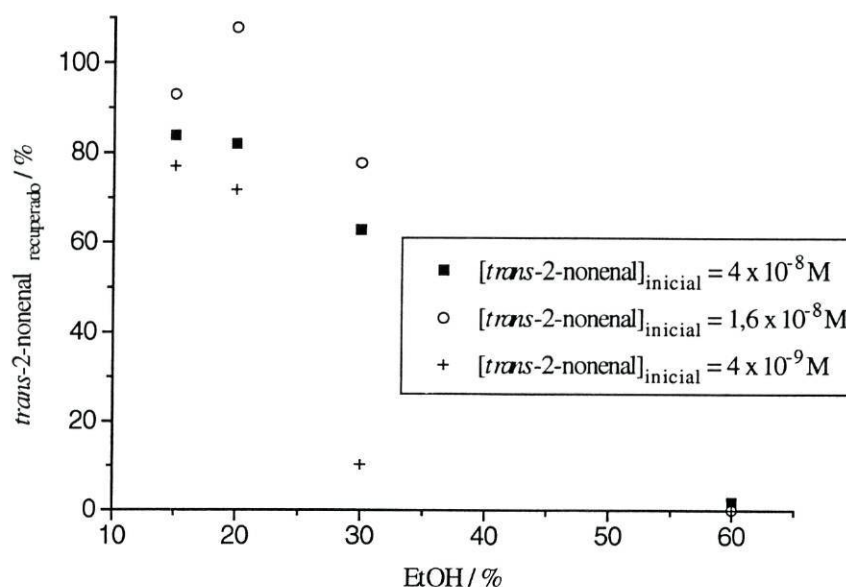


Figura 4.6. - Representação gráfica da percentagem de recuperação de *trans*-2-nonenal em função da percentagem de etanol da solução. Volume total de etanol que atravessa a coluna = 15 mL; Volume de solução variável

Conforme se pode verificar pelos resultados acima descritos, existe um efeito de eluição do *trans*-2-nonenal pelo etanol, que é tão mais significativo quanto maior o teor em etanol presente. Contudo, verificou-se igualmente, que quando se procede à diluição da mesma solução antes de a fazer passar pela coluna C18, é possível evitar as perdas deste aldeído por essa via; ou seja, neste processo é mais acentuada a perda por eluição do *trans*-2-nonenal quando o teor em etanol é elevado e o volume total da solução que atravessa a coluna é baixo, do que quando o volume da solução que atravessa a coluna é elevado e a concentração em etanol é baixa.

Em face dos resultados obtidos, optou-se por diluir as amostras provenientes do destilado, até um teor de etanol de, cerca de, 15 % (v/v).

## **5. – Desenvolvimento da metodologia experimental para a separação e quantificação de *trans*-2-nonenal na cerveja**

- 5.1. – Identificação do sinal do *trans*-2-nonenal na cerveja
- 5.2. – Optimização das fases cromatográficas para a resolução do sinal do *trans*-2-nonenal em cerveja
- 5.3. – Estudo da influência de alguns factores na determinação de *trans*-2-nonenal

### **5. – Desenvolvimento da metodologia experimental para a separação e quantificação de *trans*-2-nonenal na cerveja**

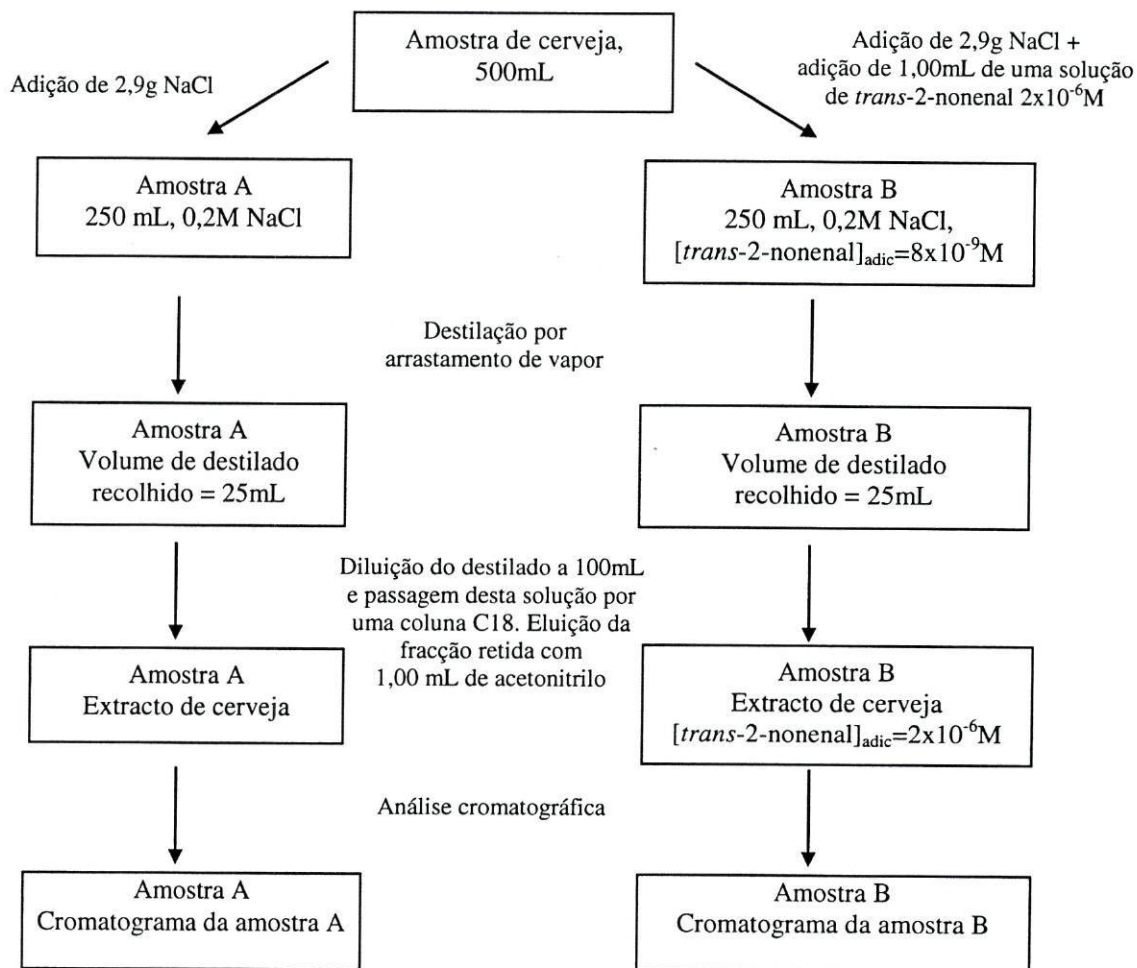
#### **5.1. – Identificação do sinal do *trans*-2-nonenal na cerveja**

Após o estudo das condições experimentais para a extracção e quantificação do *trans*-2-nonenal em soluções modelo, aplicou-se essa metodologia para identificar o sinal relativo a este aldeído em amostras de cerveja.

Para o efeito, prepararam-se dois extractos de cerveja seguindo o planeamento experimental ilustrado no Esquema 1. A identificação do sinal do *trans*-2-nonenal em cerveja, foi realizada por comparação entre o cromatograma do extracto de cerveja não contaminada (amostra A) e o cromatograma do extracto de cerveja contaminada *a priori* com *trans*-2-

nonenal (amostra B).

**Esquema 1**



Neste ensaio foram utilizadas cervejas previamente submetidas a envelhecimento forçado. Estas cervejas possuem, em princípio, um teor em *trans*-2-nonenal mais elevado do que cervejas frescas, o que contribuiu para facilitar a identificação do sinal.

Pela comparação dos cromatogramas respectivos à amostra A e à amostra B, foi possível verificar que a contaminação da amostra B com *trans*-2-nonenal provocou o aumento de um pico com o tempo de retenção de, cerca de, 15 min (figura 5.1.). Admitiu-se que este pico é correspondente ao aldeído *trans*-2-nonenal embora, como é óbvio, seja impossível garanti-lo com base apenas nesta técnica.

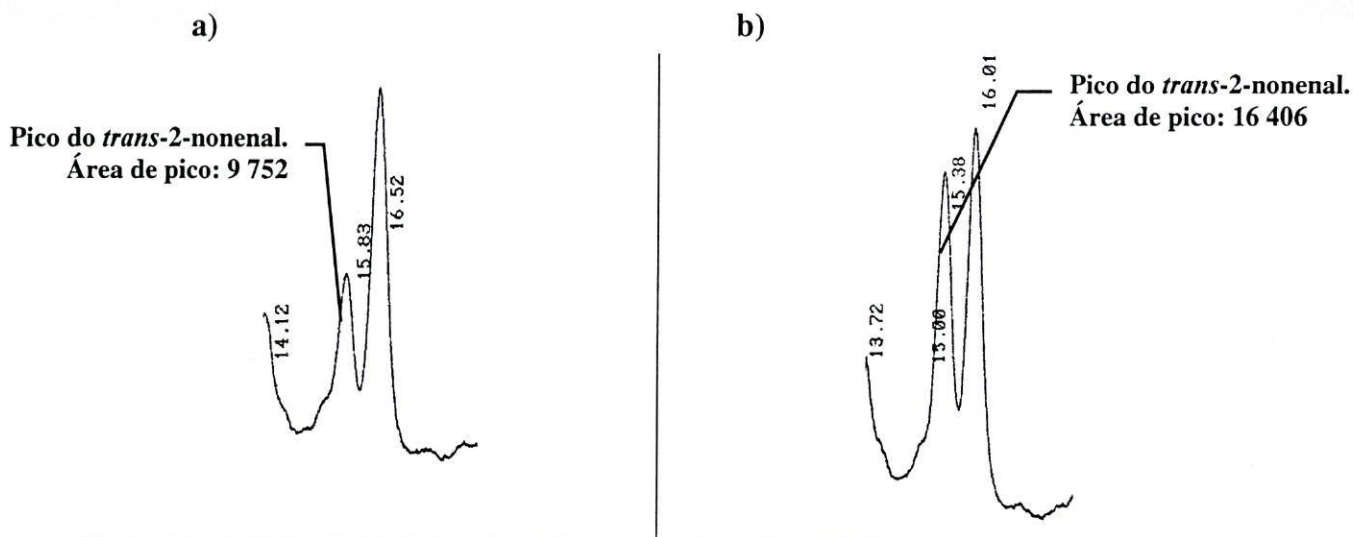


Figura 5.1. – Picos cromatográficos obtidos a partir de extractos de cerveja envelhecida para identificação do sinal de *trans*-2-nonenal. Em a) análise de um extracto de cerveja envelhecida; em b) análise de um extracto de cerveja envelhecida contaminada *a priori* com *trans*-2-nonenal. Condições cromatográficas descritas no Quadro I (Composição do eluente, água/acetoneitrilo, 55:45 (v/v)).

## 5.2. – Optimização das fases cromatográficas para a resolução do sinal do *trans*-2-nonenal em cerveja

Uma vez identificado o sinal relativo ao *trans*-2-nonenal em cerveja, estudaram-se as condições cromatográficas mais adequadas com vista à resolução deste sinal. Igualmente se procuraram condições de minimização do tempo de análise.

Para a determinação das condições cromatográficas que permitissem a resolução do pico do *trans*-2-nonenal, ensaiaram-se diferentes composições de fase móvel, mantendo a fase estacionária em uso (pré-coluna e coluna Nucleosil, C8), nomeadamente:

- água/acetoneitrilo, 60:40 (v/v);
- água/acetoneitrilo, 55:45 (v/v);
- água/acetoneitrilo, 50:50 (v/v);
- tampão acetato, pH 4, 25 mM/acetoneitrilo, 55:45 (v/v);
- tampão fosfato, pH 8, 25 mM/acetoneitrilo, 55:45 (v/v)

Foram, igualmente ensaiadas, diferentes composições de fase móvel para uma fase estacionária alternativa (pré-coluna e coluna Nucleosil, C18, Macherey-Nagel), nomeadamente:

- água/acetoneitrilo, 30:70 (v/v);
- água/acetoneitrilo, 40:60 (v/v);
- água/acetoneitrilo, 45:55 (v/v);
- água/acetoneitrilo, 50:50 (v/v);

O extracto de cerveja foi preparado de forma análoga à já descrita no ponto anterior para a amostra A. Este extracto foi posteriormente contaminado com 500 µL de uma solução padrão de *trans*-2-nonenal,  $6 \times 10^{-6}$  M, e diluído a um volume de 3,0 mL. Deste modo, foi possível a injeção de uma solução nas diferentes fases móveis ensaiadas, contendo uma concentração apreciável do aldeído em estudo.

Nas figuras 5.2. e 5.3. ilustram-se os picos cromatográficos obtidos para as diferentes situações ensaiadas.

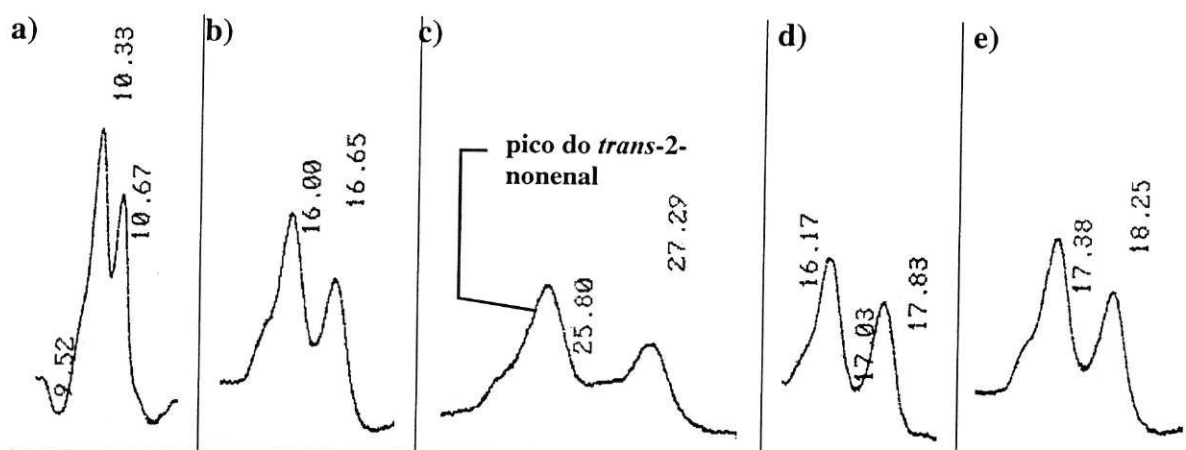


Figura 5.2. - Picos cromatográficos obtidos na análise de um extracto de cerveja com as seguintes composições de fase móvel: a) água/acetonitrilo, 50:50 (v/v); b) água/acetonitrilo, 55:45 (v/v); c) água/acetonitrilo, 60:40 (v/v); d) Tampão acetato, pH 4, 25mM/acetonitrilo, 55:45 (v/v); e) Tampão fosfato, pH 8, 25mM/acetonitrilo, 55:45 (v/v). Fase estacionária: Pré-coluna e coluna C8

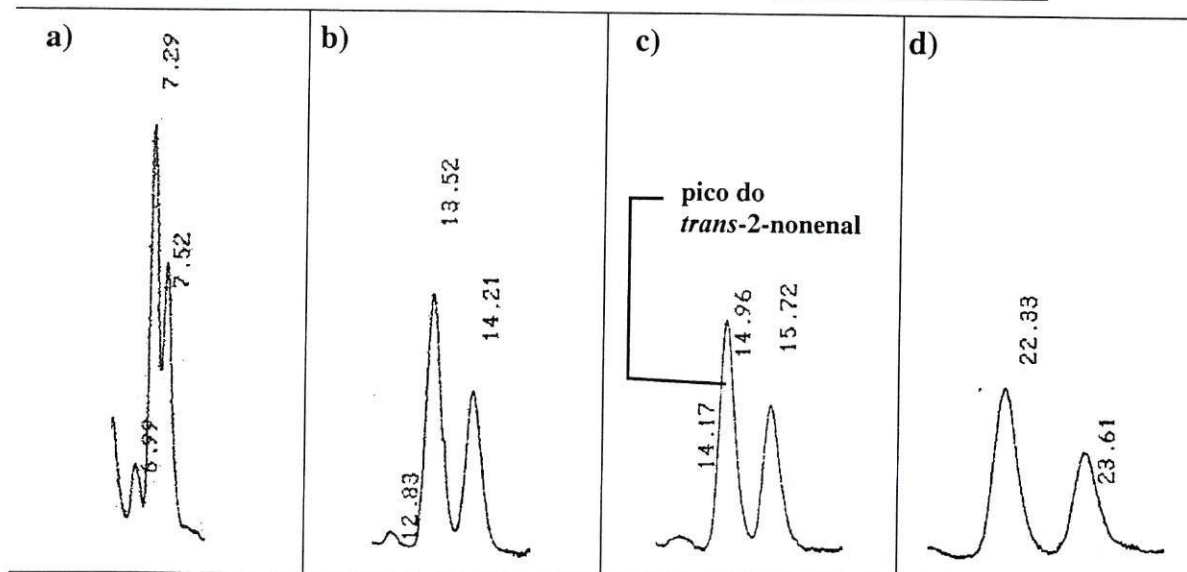


Figura 5.3. - Picos cromatográficos obtidos por análise de um extracto de cerveja com as seguintes composições de fase móvel: a) água/acetonitrilo, 30:70 (v/v); b) água/acetonitrilo, 40:60 (v/v); c) água/acetonitrilo, 45:55 (v/v); d) água/acetonitrilo, 50:50 (v/v). Condições cromatográficas descritas no Quadro 1. Fase estacionária: Pré-coluna e coluna C18

Conforme se pode observar na figura 5.2., não foi possível a resolução do pico do *trans*-2-nonenal por alteração da composição da fase móvel utilizando a coluna com fase estacionária do tipo C8. Nestas condições é possível observar que, aparentemente, existem dois compostos que eluem conjuntamente com sinal atribuído ao *trans*-2-nonenal, inviabilizando a quantificação rigorosa deste composto.

Os resultados obtidos utilizando fase estacionária diferente, do tipo C18, mostraram-se mais satisfatórios (figura 5.3.). Nestas condições, utilizando como fase móvel uma mistura água/acetonitrilo, 45:55 (v/v), parece conseguir-se resolver por completo o pico do *trans*-2-nonenal dos restantes sinais. A título exemplificativo, ilustra-se na figura 5.4. o cálculo do parâmetro  $R_s$  – parâmetro de resolução de picos cromatográficos – para um sinal deste aldeído obtido na análise de uma amostra de cerveja.

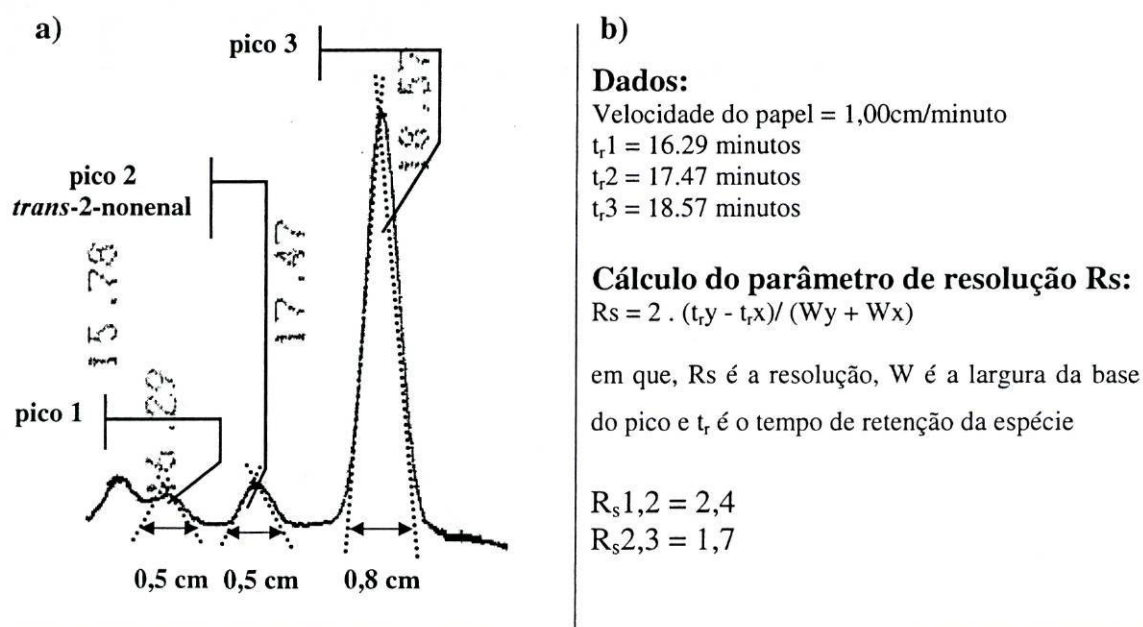


Figura 5.4. - a) Picos cromatográficos obtidos por análise de um extracto de cerveja (cromatograma apresentado no anexo A2, dia 0); b) cálculo do parâmetro  $R_s$ . Os valores de  $R_s$  obtidos (ambos superiores a 1,5), confirmam que as condições cromatográficas utilizadas permitem a resolução do sinal do aldeído em estudo

No Quadro II resumem-se as novas condições cromatográficas optimizadas para a análise de *trans*-2-nonenal em cerveja.

**Quadro II**

Condições cromatográficas optimizadas para a análise de *trans*-2-nonenal em cerveja

**Fase estacionária –**

Conjunto pré-coluna e coluna, C18

**Fase móvel –**

Composição do eluente, água/acetonitrilo, 45:55 (v/v); Fluxo, 1,00mL.min<sup>-1</sup>

**Parâmetros de integração –**

Sensibilidade 0,05AUFS; Velocidade do papel, 1,00cm.min<sup>-1</sup>; Atenuação, 1

**Comprimento de onda de detecção –**

226 nm

**5.3. – Estudo da influência de alguns factores na determinação de *trans*-2-nonenal**

**5.3.1. – Estudo da influência do pH na formação do *trans*-2-nonenal durante a etapa de destilação por arrastamento de vapor da cerveja**

A quantidade de *trans*-2-nonenal que se forma na cerveja é bastante influenciada pelo pH do meio. O pH condiciona todos os equilíbrios em que o *trans*-2-nonenal participa, e ainda, os mecanismos que conduzem à sua formação/degradação. Durante a etapa de destilação por arrastamento de vapor, a cerveja é submetida a uma temperatura elevada, e consequentemente, todas as reacções que definem a concentração de *trans*-2-nonenal na cerveja poderão ser aceleradas ou eventualmente modificadas.

Estudou-se, por isso, qual o efeito que o pH da amostra exerce sobre a formação de *trans*-2-nonenal durante o passo de destilação por arrastamento de vapor.

Para tal, destilaram-se amostras de 250 mL de cerveja, com os seguintes valores de pH: 2, 3, pH<sub>cerveja</sub>, 5, 6, 7 e 10 (o ajuste do pH da cerveja, prévio à destilação, foi efectuado após o estudo da influência da adição de solução de ácido forte e base forte à cerveja, conforme se encontra ilustrado na figura 5.5.).

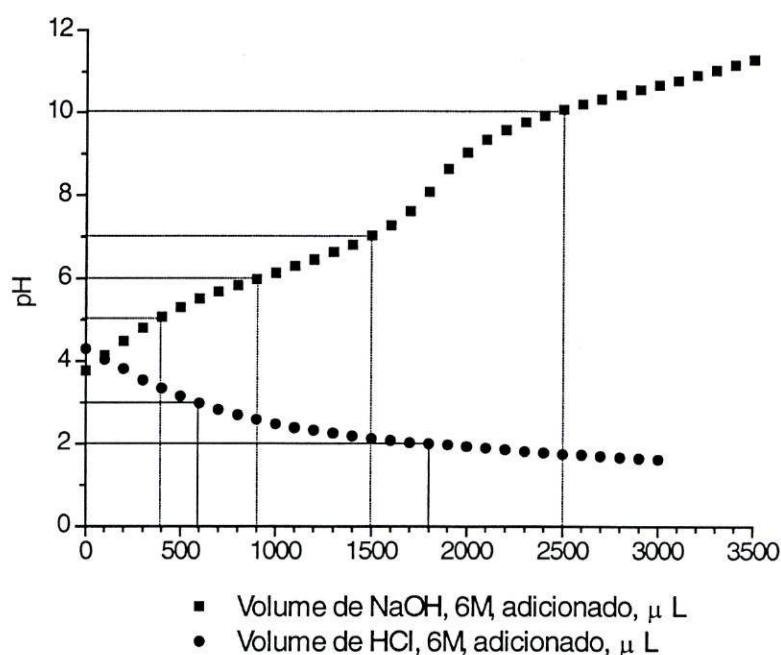
Após a recolha do destilado de cada cerveja ensaiada, realizou-se o procedimento experimental já referido, para a obtenção do extracto de cerveja. Em seguida, analisou-se cada um dos extractos por CLAE com detecção espectrofotométrica.



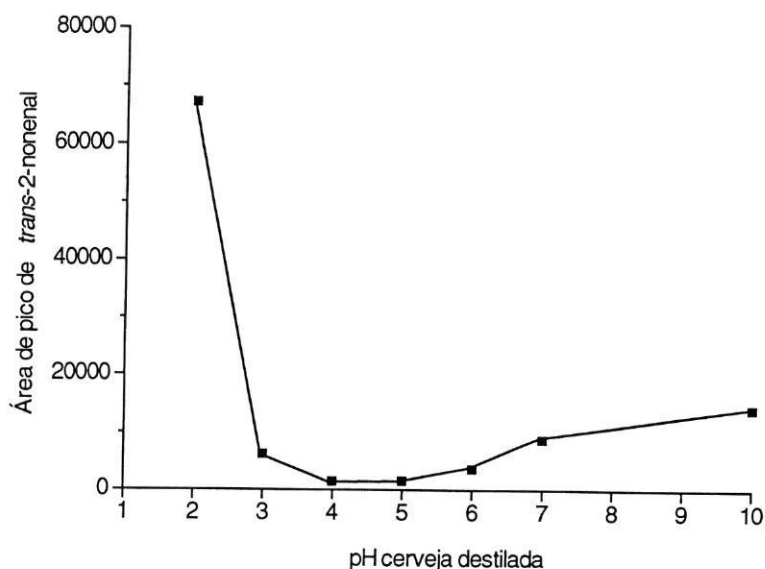
A tabela 5.1. resume os valores de áreas de pico de *trans*-2-nonenal obtidos para cada amostra de cerveja destilada neste ensaio. Estes valores encontram-se, também, representados graficamente na figura 5.6.

**Tabela 5.1. - Área do pico de *trans*-2-nonenal obtida após destilação de cervejas com valores de pH ajustados**

PH da cerveja ensaiada	Volume de ácido/base adicionado/ $\mu$ L	Área de pico
2	1800 $\mu$ L, HCl, 6M	67199
3	600 $\mu$ L, HCl, 6M	6192
4 (pH da cerveja)	-	1441
5	400 $\mu$ L NaOH, 6M	1567
6	900 $\mu$ L NaOH, 6M	3694
7	1500 $\mu$ L NaOH, 6M	8810
10	2500 $\mu$ L NaOH, 6M	14149



**Figura 5.5. – Estudo da influência de adição de soluções de ácido forte e de base forte no pH da cerveja. Volume de cerveja ensaiada, 250 mL**



**Figura 5.6. – Variação dos valores de área de pico de *trans*-2-nonenal após a destilação de cervejas com diferentes valores de pH inicial**

A representação gráfica da área de pico de *trans*-2-nonenal com o pH da cerveja destilada (figura 5.6.), revela a existência de um pH ótimo, para o qual, a formação de *trans*-2-nonenal durante a destilação por arrastamento de vapor (por efeito do aquecimento), é mínima. O forte aumento da quantidade de *trans*-2-nonenal que se observa para pH inferior ao pH da cerveja, já havia sido caracterizado por Graveland *et al.*[25] e ainda por Stenroos *et al.* [25]. Estes autores verificaram que a cerveja origina quantidades de *trans*-2-nonenal, cerca de 100 vezes superior ao seu limite de percepção, quando fervida em refluxo a pH 2. Atribuíram essa formação de *trans*-2-nonenal devido à degradação dos seguintes ácidos:

- ácido 9,12,13-triidroxi-10-octadecenóico
- ácido 9,10,13-triidroxi-11-octadecenóico
- ácido 9,10,11-triidroxi-12-octadecenóico

Relativamente ao aumento progressivo da área de pico do *trans*-2-nonenal que se verificou quando são destiladas cervejas com valores de pH superiores ao pH da cerveja, não foi encontrada na bibliografia pesquisada nenhum estudo que avançasse para uma explicação.

### 5.3.2. – Influência da adição de hidrazina ao destilado de cerveja

Perante a elevada intensidade do sinal que se obteve para as zonas extremas de pH, e numa tentativa de comprovar que o composto que origina este mesmo sinal é o *trans*-2-nonenal, realizou-se um novo ensaio, em que se adicionou hidrazina ao destilado de cerveja.

Como a hidrazina é um nucleófilo forte, que interaccua facilmente com compostos carbonílicos conduzindo à formação de hidrazonas (figura 5.7), pretendeu-se verificar se a adição de hidrazina ao destilado provoca o abaixamento do sinal atribuído ao *trans*-2-nonenal.

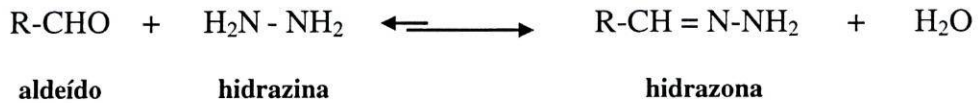


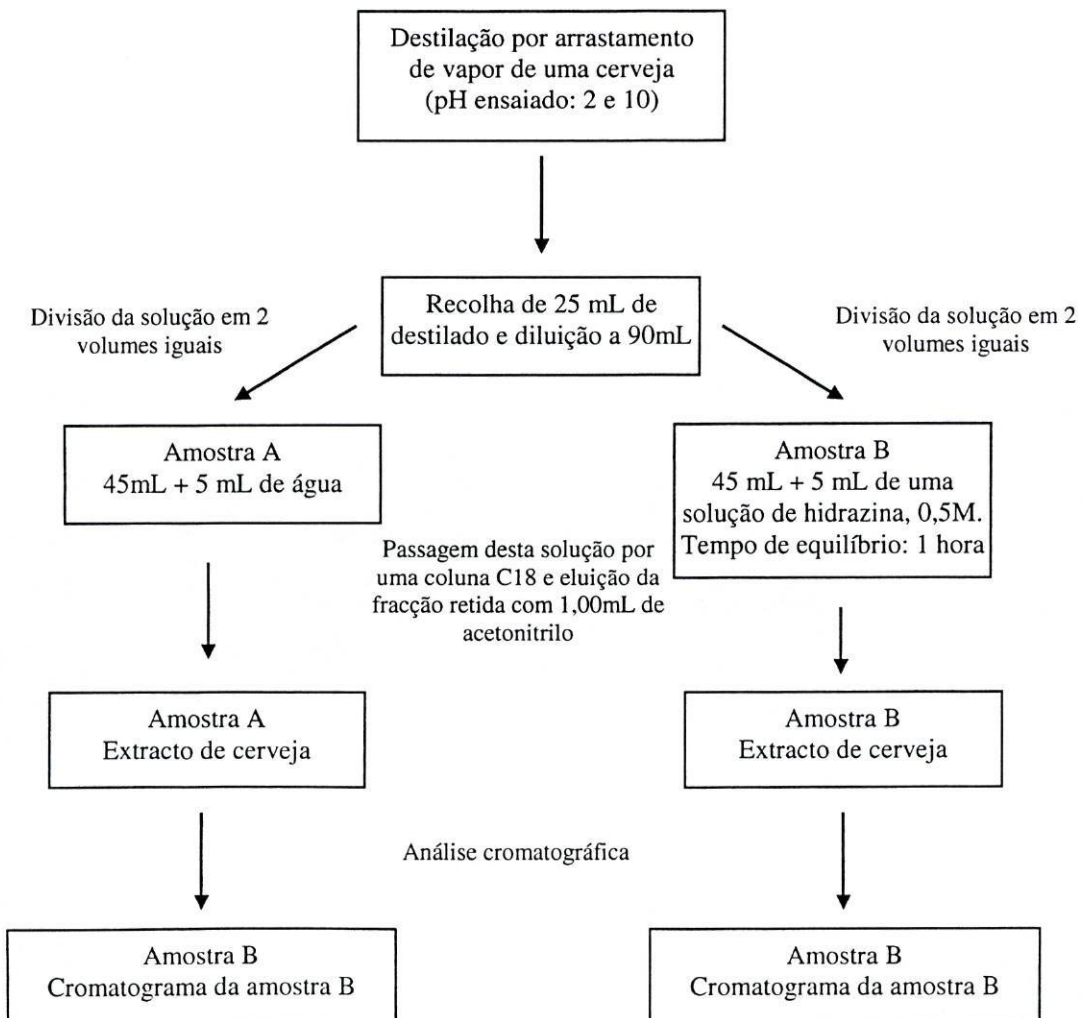
Figura 5.7. – Equação global da formação de hidrazonas

Este resultado poderá servir como indicador de que o sinal é representativo de um aldeído (*trans*-2-nonenal), embora não permita afirma-lo de forma inequívoca.

Com este ensaio pretendeu-se, igualmente, identificar outros sinais que aparecem no cromatograma do extracto de cerveja relativos a compostos carbonílicos que, de acordo com o referido, podem também diminuir de intensidade na presença de hidrazina.

Para a realização deste ensaio efectuou-se o seguinte planeamento experimental.

### Esquema 2



Na Tabela 5.2. estão descritos os valores de área de pico de *trans*-2-nonenal obtidos em extractos de cerveja destilada por arrastamento de vapor a pH 2 e a pH 10, com e sem hidrazina.

**Tabela 5.2. - Efeito da adição de hidrazina na área de pico do *trans*-2-nonenal**

Cerveja destilada a pH 2		Cerveja destilada a pH 10	
Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal no destilado sem hidrazina	Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal no destilado com hidrazina	Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal no destilado sem hidrazina	Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal no destilado com hidrazina
35 590	165	5 855	0

Na figura 5.8. pode observar-se a forma dos picos obtidos no extracto de uma cerveja destilada por arrastamento de vapor a pH 2 com e sem adição de hidrazina.

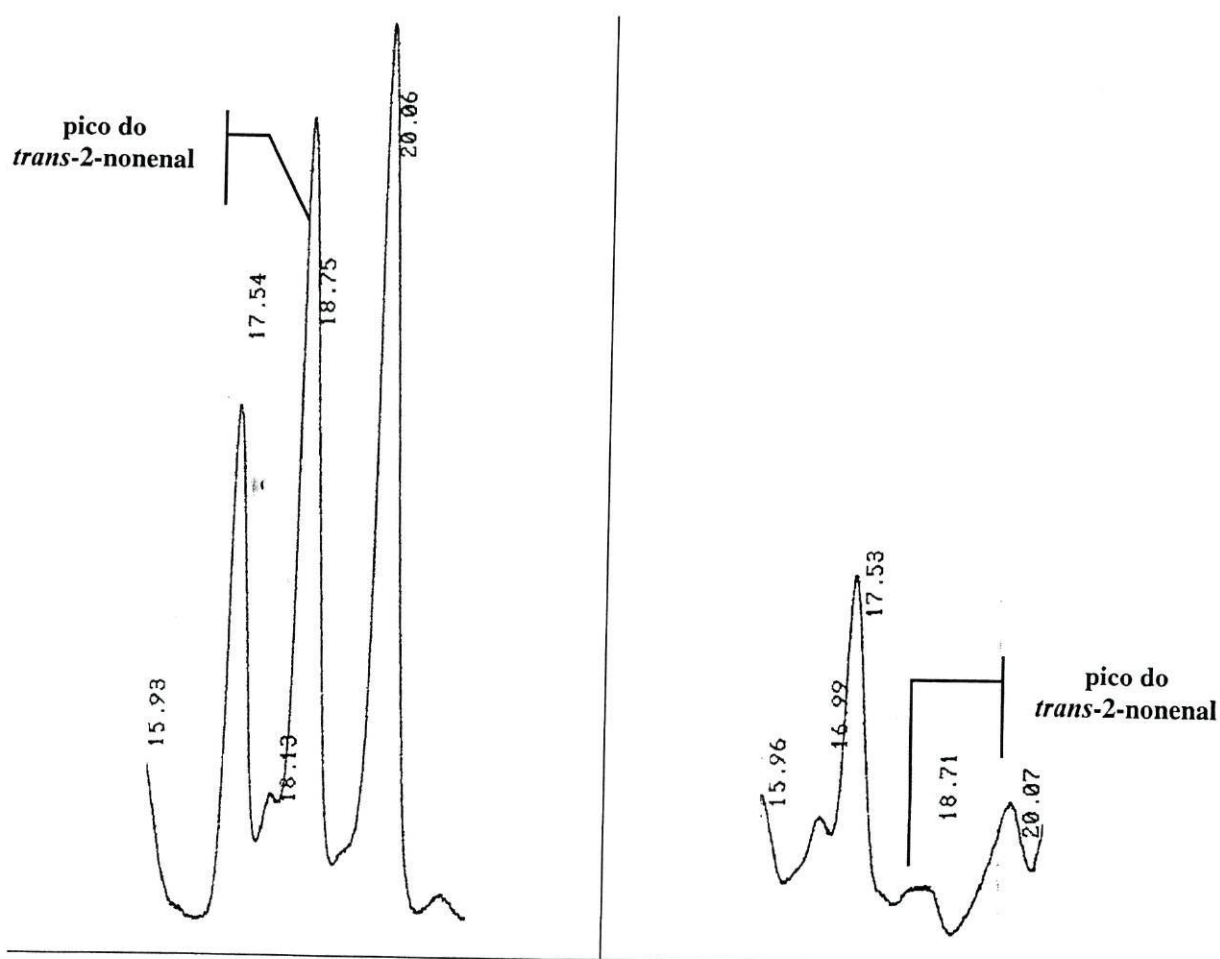


Figura 5.8. - Efeito da adição de hidrazina ao destilado de cerveja. a) pico do *trans*-2-nonenal no extracto de uma cerveja destilada a pH 2 sem adição de hidrazina ao destilado; b) pico do *trans*-2-nonenal no extracto de uma cerveja destilada a pH 2 com adição de hidrazina ao destilado

Pelos resultados obtidos, foi possível verificar que a adição de hidrazina ao destilado das cervejas ensaiadas com pH 2 e com pH 10, provocou o desaparecimento quase completo do sinal com o tempo de retenção igual ao tempo de retenção do *trans*-2-nonenal. Este resultado serve para reforçar a indicação que o sinal que é obtido por destilação de cervejas com diferentes valores de pH deverá ser relativo a este aldeído. Verificou-se, igualmente, por comparação entre os cromatogramas respectivos aos extractos dos destilados com e sem adição de hidrazina, o abaixamento de alguns sinais cromatográficos (pode ser observado no Anexo A1 a indicação desses sinais nos cromatogramas obtidos neste estudo). Estes sinais, conforme se indicou nos pressupostos deste ensaio, poderão ser representativos de certos compostos carbonílicos que são, igualmente, extraídos da cerveja nestas condições.

### 5.3.3. – Estudo da influência do teor em SO<sub>2</sub> na determinação de *trans*-2-nonenal

É conhecido que o sulfito pode interagir directamente com aldeídos (nos quais se inclui o *trans*-2-nonenal) conduzindo à formação de aductos. O equilíbrio de formação desses aductos é reversível e durante o envelhecimento da cerveja admite-se que, por desaparecimento do sulfito os aductos se quebrem, provocando o aumento da concentração de aldeídos livres na cerveja. Embora ainda não tenha sido identificado na cerveja o aducto formado entre o sulfito e o *trans*-2-nonenal, estudou-se a influência deste composto na metodologia desenvolvida, já que, uma eventual combinação entre estes dois compostos representa uma fracção de *trans*-2-nonenal que se encontra mascarada pela matriz que pode influenciar o processo de extracção.

Para o estudo da influência do teor de sulfito na determinação de *trans*-2-nonenal foi realizado o seguinte ensaio em cerveja: prepararam-se 4 amostras de cerveja de 250 mL cada. A três destas amostras adicionaram-se, respectivamente, 10, 20 e 30 ppm de sulfito, permanecendo a amostra restante como controlo do ensaio. Todas as soluções foram equilibradas durante 3 horas, tendo-se procedido posteriormente, à análise do teor de *trans*-2-nonenal em cada uma das soluções pelo modo já descrito.

A cerveja utilizada na realização destes ensaios foi produzida propositadamente sem a adição de sulfito e foi posteriormente submetida a envelhecimento forçado. Deste modo, foi possível realizar este estudo em amostras de cerveja sem sulfito e com um teor em *trans*-2-nonenal elevado.

Os resultados obtidos neste ensaio estão descritos na tabela 5.3.

**Tabela 5.3. - Variação do sinal de *trans*-2-nonenal com a concentração de sulfito na cerveja**

[SO <sub>2</sub> ] <sub>cerveja</sub> /ppm	Área de pico do <i>trans</i> -2-nonenal
0	3 101
10	3 315
20	2 959
30	2 154

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que apenas na última situação ensaiada (teor de sulfito igual a 30 ppm) se observou uma tendência de abaixamento do sinal relativo ao *trans*-2-nonenal. Contudo, níveis de sulfito da ordem de 30 ppm em cervejas comerciais são uma situação extrema que na prática não se verifica. O teor de sulfito em cerveja é máximo para cervejas frescas, variando habitualmente entre 10 e 15 ppm.

Os resultados obtidos não foram de todo inesperados existindo várias razões que apontavam para que o sulfito não constituísse uma interferência na determinação do *trans*-2-nonenal por esta metodologia. Destaca-se o facto de, (1) a reactividade entre o sulfito e o *trans*-2-nonenal ser baixa quando comparada com, por exemplo, a reactividade entre o sulfito e certos aldeídos de cadeia curta que existem na cerveja em quantidades muito superiores (entre os quais se destaca o acetaldeído), e ainda, (2) o facto de, se o aducto existir, ser poder continuar a ocorrer a extracção do *trans*-2-nonenal por deslocamento do equilíbrio no sentido da rotura do aducto.

Em conclusão, pode-se afirmar que o sulfito não parece constituir uma interferência na aplicação da metodologia proposta.

#### **5.3.4.– Estudo da etapa de destilação por arrastamento de vapor em amostras de cerveja na indução da formação de *trans*-2-nonenal**

Sabendo que a concentração de *trans*-2-nonenal em cerveja está relacionada com a temperatura a que a cerveja é submetida, perante a metodologia proposta para a determinação de *trans*-2-nonenal, decidiu-se estudar a influência da temperatura na quantidade de *trans*-2-nonenal determinada durante o processo de destilação por arrastamento de vapor.

Para o estudo do efeito da temperatura sobre a formação de *trans*-2-nonenal pela matriz foram realizados dois ensaios distintos. Em primeiro lugar, estudou-se a influência do aquecimento em refluxo na formação de *trans*-2-nonenal em cerveja e em seguida, estudou-se a formação de *trans*-2-nonenal na destilação por arrastamento de vapor em função do volume

de destilado recolhido nessa destilação.

Estes ensaios são descritos seguidamente, assim como os respectivos resultados.

#### 5.3.4.1. – Estudo da formação de *trans*-2-nonenal em cerveja submetida a aquecimento por refluxo

Iniciou-se este estudo pela determinação da quantidade de *trans*-2-nonenal que é formada em cerveja submetida a refluxo. Para tal, ensaiaram-se 4 amostras de cerveja pertencentes ao mesmo fabrico do seguinte modo: 3 amostras foram submetidas a refluxo num sistema como o representado na figura 5.9., por três intervalos de tempo diferentes, respectivamente, 1, 2 e 3 horas. No fim do aquecimento por refluxo, deixou-se cada uma das amostras arrefecer e determinou-se o teor em *trans*-2-nonenal existente pela metodologia desenvolvida. A amostra restante serviu de controlo do ensaio (esta amostra não foi submetida a refluxo tendo-se apenas determinado o teor em *trans*-2-nonenal pelo modo já descrito).

Os resultados obtidos neste estudo estão descritos na tabela 5.4., e mostram, de forma clara, que a quantidade de *trans*-2-nonenal formada é dependente do tempo de aquecimento da cerveja a estas condições (a quantidade de *trans*-2-nonenal formada aumenta com o tempo a que a cerveja é submetida a elevadas temperaturas).

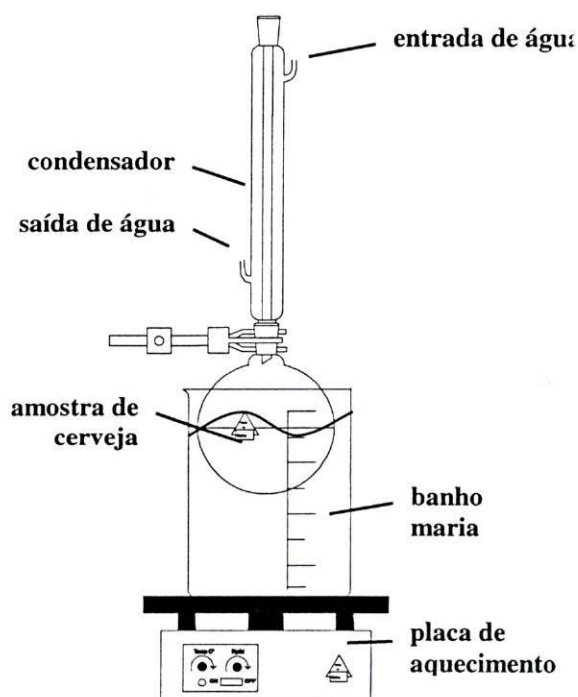


Figura 5.9. – Esquema da montagem experimental utilizada para refluxar a cerveja

Tabela 5.4. - Valores de área de pico obtidos em amostras de cerveja submetidas a refluxo por diferentes intervalos de tempo

Tratamento da amostra	Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal
sem refluxo	1 319
1 hora de refluxo	9 740
2 horas de refluxo	14 860
3 horas de refluxo	30 793

A partir dos cromatogramas obtidos neste estudo, foi possível verificar que o

aquecimento prolongado da cerveja proporciona a formação de muitos outros compostos que são detectados nas condições de análise utilizadas. De entre o conjunto destes sinais, observou-se que os que aparecem à esquerda e à direita do pico do *trans*-2-nonenal, apresentaram uma tendência para o aumento com o tempo de refluxo, conforme se observa na figura 5.10.

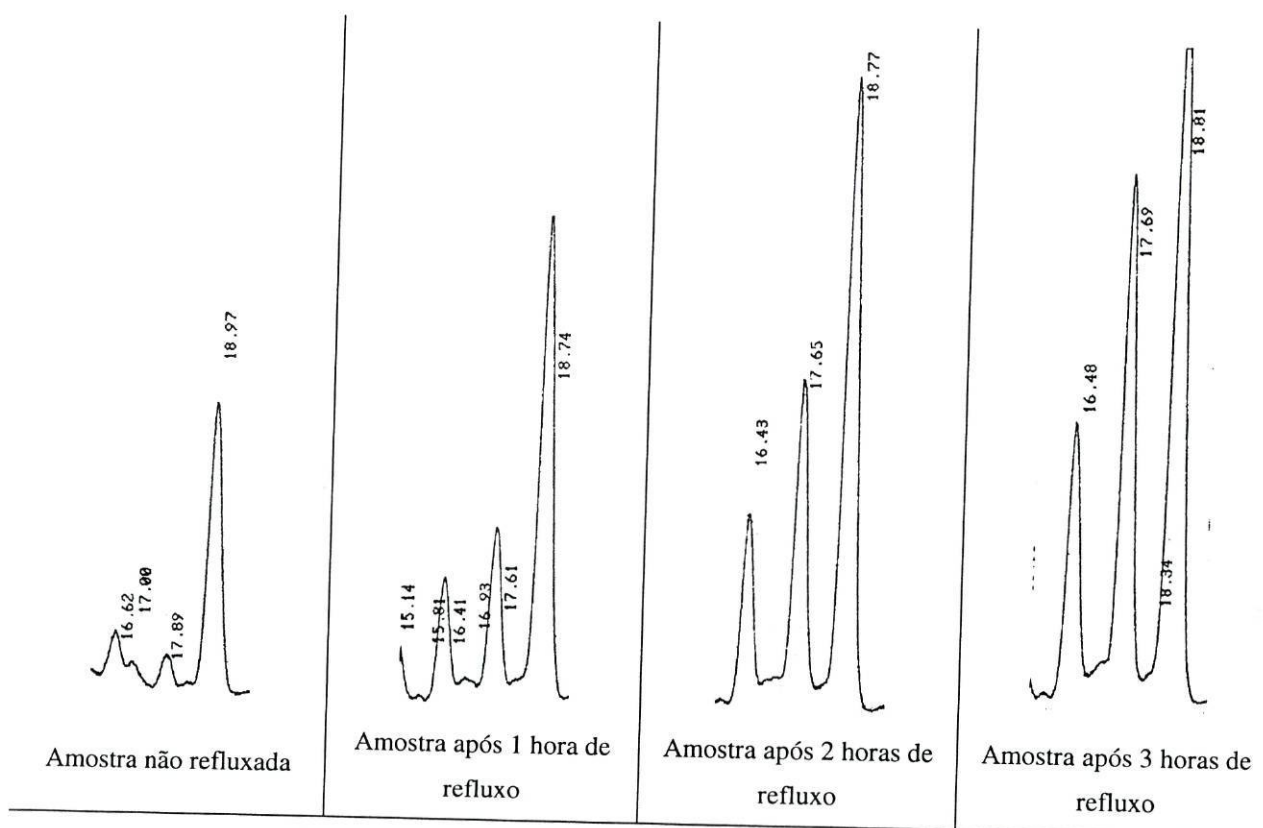


Figura 5.10. – Efeito do tempo de refluxo nos picos adjacentes ao do *trans*-2-nonenal no extracto da cerveja

#### 5.3.4.2. – Estudo da formação de *trans*-2-nonenal durante a destilação por arrastamento de vapor

Em face dos resultados obtidos em 5.3.3.1., estudou-se com mais detalhe as variações da concentração de *trans*-2-nonenal que ocorrem durante a execução da destilação por arrastamento de vapor na cerveja. Para o efeito, foram realizados dois estudos distintos, designados de “Estudo A” e “Estudo B” (ver Esquema 3). No estudo A, a partir de uma mesma amostra de cerveja, mediram-se quatro volumes de 250 mL cada e procedeu-se à sua destilação, tendo-se recolhido para cada volume ensaiado, respectivamente 25, 50, 75 e 100 mL de destilado. No estudo B, procedeu-se do mesmo modo que no estudo A, com a diferença de terem sido destilados cinco volumes de 250 mL e recolhido respectivamente para cada volume 5, 10, 15, 20 e 25 mL de destilado.



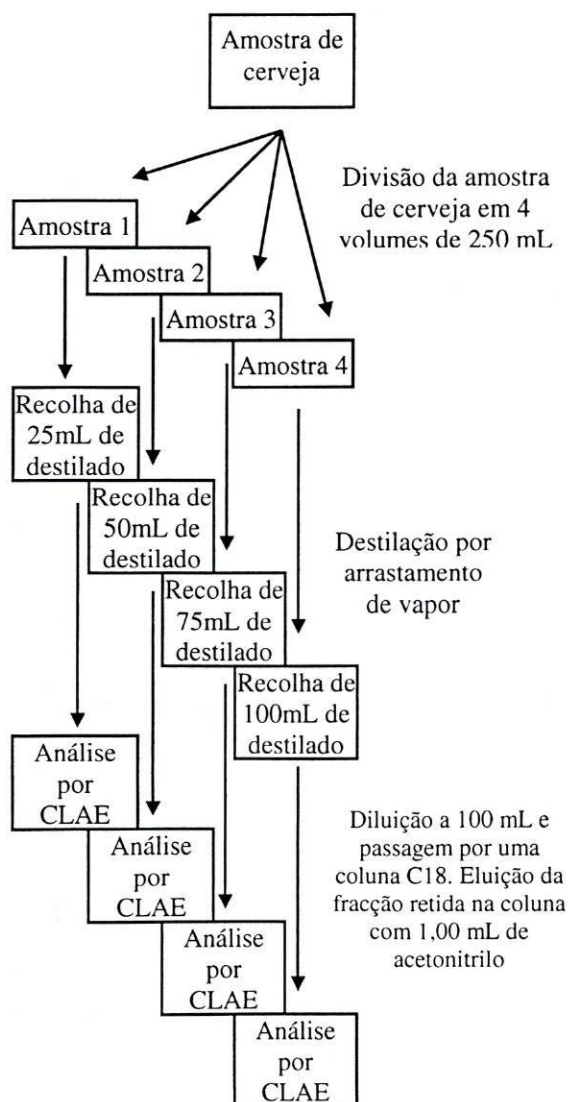
O estudo B foi repetido quatro vezes, sendo que numa das repetições, a amostra de cerveja foi deliberadamente contaminada com *trans*-2-nonenal.

Pretendeu-se com estes estudos caracterizar a evolução do sinal do *trans*-2-nonenal em função do volume de destilado recolhido durante a destilação por arrastamento de vapor, com a finalidade de tentar distinguir onde culmina o processo de extracção do aldeído da matriz e onde começa a influência do aquecimento na formação do aldeído durante a destilação.

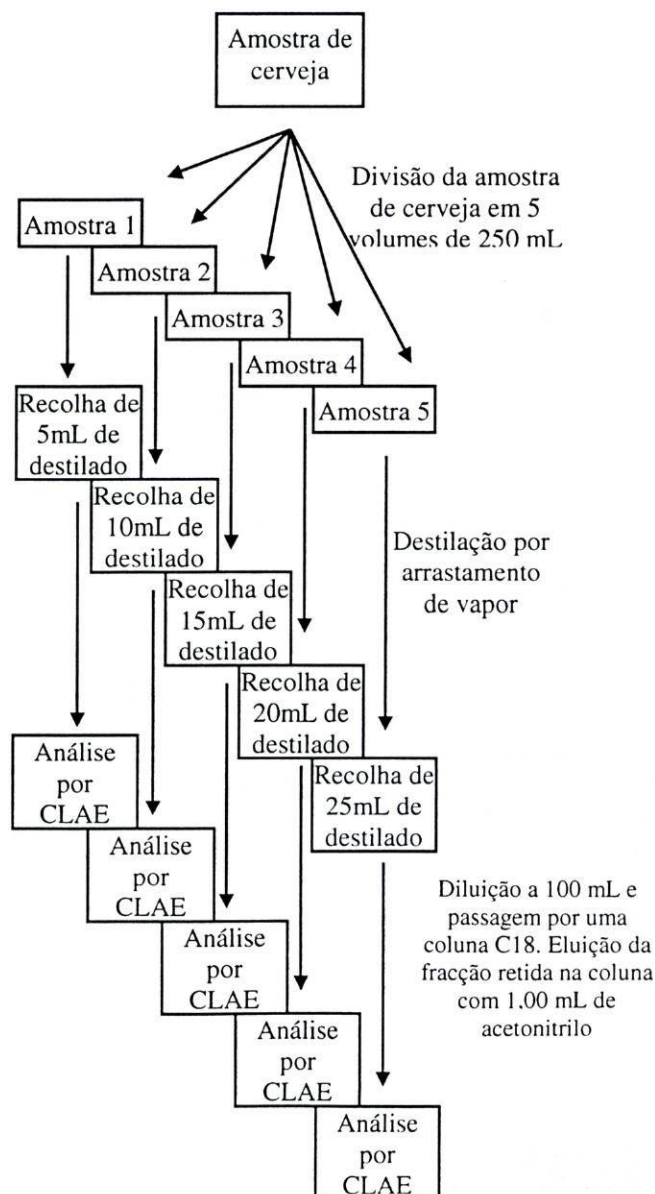
No esquema 3 mostra-se o planeamento experimental seguido.

### Esquema 3

**Estudo A- Estudo da formação de *trans*-2-nonenal em cerveja destilada por arrastamento de vapor:  
Volumes destilados: 25, 50, 75 e 100 mL**



**Estudo B- Estudo da formação de *trans*-2-nonenal em cerveja destilada por arrastamento de vapor:  
Volumes destilados: 5, 10, 15, 20 e 25 mL**



Na tabela 5.5. podem ser observados os valores de área de pico obtidos para cada ensaio realizado.

**Tabela 5.5. - Resultados experimentais obtidos para o estudo da formação de *trans*-2-nonenal durante a destilação por arrastamento de vapor de uma cerveja**

Estudo A		Estudo B				
Volume de destilado recolhido	Ensaio 1	Volume de destilado recolhido	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4 <sup>(*)</sup>
25 mL	1 589	5 mL	809	460	-	4 692
50 mL	1 952	10 mL	1 197	672	756	6 196
75 mL	2 826	15 mL	1 257	685	1 120	6 316
100 mL	3 755	20 mL	1 771	944	1 367	6 118
		25 mL	1 616	1 003	1 319	6 435

(\*) – neste ensaio foi adicionado previamente a todas as amostras 50µL de uma solução de *trans*-2-nonenal,  $1,5 \times 10^{-5}M$

Os resultados experimentais obtidos nestes ensaios permitem verificar que, em geral, quanto maior for o volume de destilado recolhido, maior será o valor de área de pico do *trans*-2-nonenal (Estudo A). Contudo, constata-se que, aparentemente, o aumento do sinal se deve numa primeira fase da destilação ao aumento da recuperação do *trans*-2-nonenal que existe em cerveja, e só numa fase posterior, é que o aumento, mais ligeiro, poderá ser atribuído à formação do aldeído à custa da degradação dos precursores existentes na cerveja. Trata-se, pois, de um processo dinâmico, onde os valores de pico de *trans*-2-nonenal encontrados até, sensivelmente, aos 15 mL de volume de destilado recolhido são pouco influenciados pela formação de *trans*-2-nonenal a partir dos precursores e representam o *trans*-2-nonenal existente na amostra que é possível extrair por destilação. Acima dos 15 mL, o aumento do pico começa a ter relevância e influencia a determinação de *trans*-2-nonenal inicialmente presente na cerveja.

Este comportamento é mais facilmente observado nos resultados obtidos no ensaio 4 do estudo B. Neste ensaio, as 5 amostras de cerveja destiladas para recolha de, respectivamente, 5, 10, 15, 20 e 25 mL de destilado foram previamente contaminadas com uma solução de *trans*-2-nonenal. De acordo com os resultados obtidos neste ensaio verificou-se que quando se recolhe, cerca de, 10 mL de destilado extrai-se todo o *trans*-2-nonenal da amostra. Por outro lado, quando são recolhidos volumes superiores de destilado observa-se

uma tendência para um aumento do sinal deste aldeído, possivelmente, devido à sua formação pela matriz (que nestes ensaios, devido à quantidade elevada de *trans*-2-nonenal é proporcionalmente pouco relevante para o resultado final).

Estão representados no gráfico da figura 5.11. os valores obtidos para a área de pico de *trans*-2-nonenal relativos aos diferentes ensaios realizados. É possível observar que o modelo proposto se ajusta ao perfil da extração de *trans*-2-nonenal encontrado neste processo.

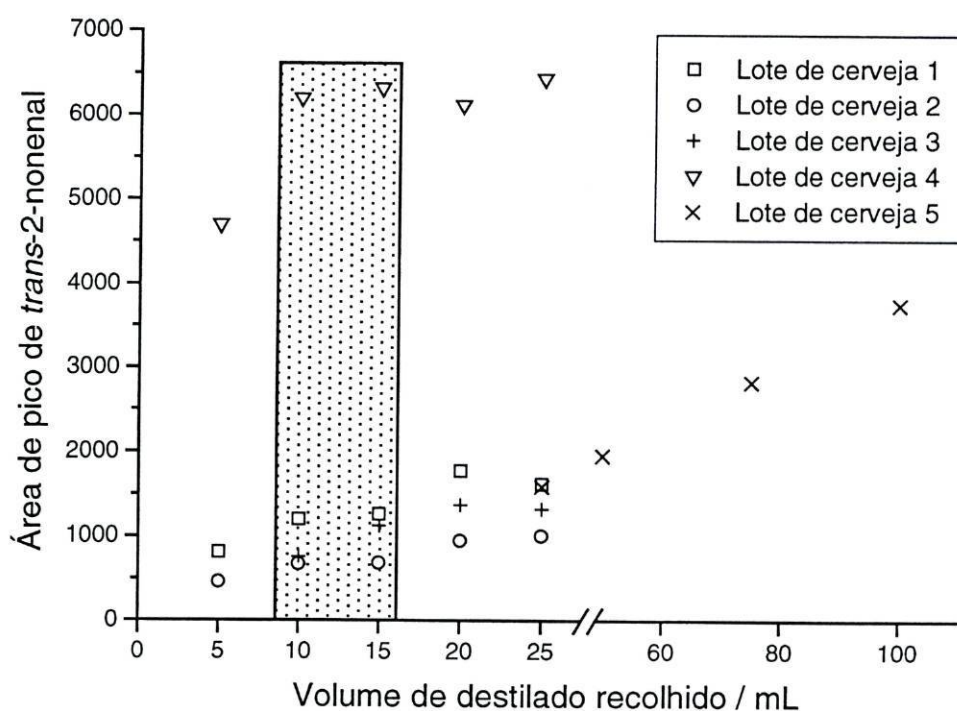


Figura 5.11. – Representação gráfica da variação do teor de *trans*-2-nonenal com o volume de destilado recolhido para vários conjuntos de cerveja. A zona a sombreado identifica o intervalo ideal do volume de destilado a recolher para a extração de *trans*-2-nonenal existente na cerveja, sem que ocorra formação apreciável deste aldeído pela matriz

## **6. – Aplicações da metodologia desenvolvida**

- 6.1. – Descrição detalhada da metodologia otimizada para a determinação do teor em *trans*-2-nonenal existente na cerveja
- 6.2. – Aplicação do método das adições de padrão na determinação do teor em *trans*-2-nonenal existente em cerveja
- 6.3. – Aplicação da metodologia desenvolvida na monitorização do teor de *trans*-2-nonenal em cervejas submetidas a envelhecimento forçado
- 6.4. – Aplicação da metodologia desenvolvida à identificação de outros aldeídos insaturados

### **6. – Aplicações da metodologia desenvolvida**

#### **6.1. – Descrição detalhada da metodologia otimizada para a determinação do teor em *trans*-2-nonenal existente na cerveja**

A metodologia proposta para a determinação do *trans*-2-nonenal em cerveja divide-se nas três seguintes etapas: (1) destilação da amostra de cerveja por arrastamento de vapor, para uma prévia separação do *trans*-2-nonenal dos compostos da matriz; (2) passagem do destilado recolhido por uma coluna de extracção em fase sólida do tipo C18 e recolha dos compostos retidos, para uma nova separação dos compostos da matriz e, ainda, para uma concentração do aldeído; (3) análise do concentrado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção

espectrofotométrica, para quantificação do aldeído.

Descrevem-se, seguidamente, de uma forma detalhada todos os passos atrás referidos que compõem esta metodologia.

### **(1) Destilação da cerveja por arrastamento de vapor**

Medem-se 250mL de cerveja para um balão de duas tubuladuras. De seguida, adicionam-se 2,9g de NaCl à cerveja e homogeneiza-se a solução. Quando a água geradora de vapor se encontrar em ebulição dá-se início à destilação. A destilação é terminada quando se encontram recolhidos 15 mL de destilado (tempo para a realização deste passo num sistema convencional de destilação por arrastamento de vapor: 19-20minutos).

É vulgar, durante esta etapa, a formação de espuma pela amostra, que em elevadas quantidades pode ser arrastada juntamente com o destilado, inviabilizando o ensaio. A formação de espuma é facilmente contrariada friccionando com gelo, por breves instantes, a parede exterior do balão aquando da formação de espuma.

### **(2) Passagem do destilado de cerveja por uma coluna de extração em fase sólida do tipo C18 - 200 mg**

#### Condicionamento da coluna C18

A etapa de passagem do destilado de cerveja por uma coluna C18 requer o prévio condicionamento da coluna. No presente caso, o condicionamento é feito fazendo passar em primeiro lugar, cerca de, 8-10 mL de acetonitrilo com o objectivo de remover impurezas existentes e, ainda, de activar o enchimento. Em seguida, passa-se pela coluna, cerca de, 8-10mL de água ultrapura para igualmente eliminar impurezas, e sobretudo, para eliminar vestígios de acetonitrilo.

#### Passagem do destilado pela coluna C18

Dilui-se o destilado anteriormente recolhido a 100 mL. Seguidamente, procede-se à passagem da solução anterior pela coluna de forma lenta, a um fluxo de 1-2gotas por segundo (tempo para a eluição da solução: 20-25 minutos). No fim da passagem lava-se a coluna com cerca de 8-10mL da água ultrapura e seca-se o seu enchimento por vácuo. A eluição da fracção de destilado retida na coluna é feita pela passagem e recolha de 1,00 mL de acetonitrilo (extracto de cerveja). Este passo deve ser feito com muito cuidado quer na medição do volume de acetonitrilo quer na sua eluição pela coluna, para garantir que este

eluente atravessa toda a fase estacionária de um modo homogéneo.

### (3) Análise do extracto de cerveja por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica

As características gerais do sistema de cromatografia utilizado para análises de extractos de cerveja estão descritas no ponto 2.1.

As condições cromatográficas optimizadas para a análise de *trans*-2-nonenal no extracto de cerveja foram as seguintes.

• Fase estacionária	Pré-coluna e coluna C18 <sup>(*)</sup>
• Fase móvel	Acetonitrilo:Água, 55:45, v/v
• Sensibilidade do detector	0,05 AUFS
• Fluxo do eluente	1,00 mL/min
• Comprimento de onda	226 nm
• Velocidade do papel	1,00 cm.min <sup>-1</sup>
• Atenuação	1

(\*) – as características da fase estacionária encontram-se descritas mais detalhadamente na tabela 2.1.

O tempo para a eluição do *trans*-2-nonenal nestas condições cromatográficas é de, cerca de, 20 minutos.

A montagem laboratorial efectuada para a realização da destilação por arrastamento de vapor e para a passagem do destilado pelas colunas C18 está esquematizada, respectivamente, nas figuras 4.1 e 4.4. desta Parte.

### 6.2. – Aplicação do método das adições de padrão na determinação do teor em *trans*-2-nonenal existente em cerveja

O método das adições de padrão é utilizado neste trabalho para compensar as perdas de *trans*-2-nonenal que ocorrem durando o processo de preparação da amostra.

Para a realização deste ensaio, mediram-se 4 volumes de 250 mL de cerveja aos quais se adicionaram rigorosamente diferentes quantidades de uma solução padrão de *trans*-2-nonenal,  $5 \times 10^{-6}$ M, conforme se descreve na tabela 6.1. Em seguida, procedeu-se à

determinação da concentração de *trans*-2-nonenal em cada amostra pela metodologia já descrita. Este ensaio foi realizado em duplicado, tendo-se utilizado em ambos os ensaios cerveja pertencente ao mesmo lote.

Para o cálculo da recuperação do *trans*-2-nonenal adicionado às diferentes amostras, prepararam-se diferentes soluções modelo de *trans*-2-nonenal, contendo uma concentração equivalente à adicionada, que foram directamente analisadas por CLAE.

Nas tabelas 6.1. e 6.2. encontram-se descritos, respectivamente, os resultados obtidos e os valores da recuperação de *trans*-2-nonenal obtidos para cada ensaio realizado.

**Tabela 6.1. - Resultados experimentais obtidos pelo método das adições de padrão**

Amostra	Volume de padrão adicionado/ $\mu$ L	[ <i>trans</i> -2-nonenal] <sub>extracto</sub> /M	Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal		
			Ensaio 1	Ensaio 2	Valores médios
1	0	x	1 140	1 123	1 132
2	20	x + 1x10 <sup>-7</sup>	1 785	1 787	1 786
3	40	x + 2x10 <sup>-7</sup>	2 230	1 986	2 108
4	80	x + 4x10 <sup>-7</sup>	3 142	3 190	3 166

**Tabela 6.2. - Recuperações de *trans*-2-nonenal obtidas após adições de padrão**

[ <i>trans</i> -2-nonenal]/M	Área obtida para as soluções padrão	Incremento de área obtida <sup>(*)</sup>	Recuperação média
1x10 <sup>-7</sup>	1 380	654	47,4 %
2x10 <sup>-7</sup>	2 468	976	39,5 %
4x10 <sup>-7</sup>	4 354	2 034	46,7 %

(\*) – diferença entre as áreas de pico médias respectivas aos ensaios 2,3 e 4 (ensaio em que se adicionou uma quantidade rigorosa de *trans*-2-nonenal) e a área média de pico respectiva ao ensaio 1 (ensaio em que não se adicionou *trans*-2-nonenal)

Na figura 6.1. apresenta-se o gráfico resultante da aplicação do método das adições de padrão a amostras de cerveja. Como se pode verificar, foi possível estabelecer uma correlação linear entre o sinal lido e as diferentes concentrações de *trans*-2-nonenal adicionadas em cada amostra. Verificou-se, igualmente, através dos valores do grau de recuperação de *trans*-2-nonenal, que ocorreu uma perda aproximadamente constante deste aldeído em todos os ensaios sujeitos à adição de padrão, o que viabiliza o uso do método das adições de padrão nas condições presentes. Essas perdas são passíveis de ocorrer durante a destilação, e poderão ser devidas a, degradação térmica do aldeído, inadequabilidade do sistema, ou a ineficiência

do processo de destilação para a extracção do aldeído. Igualmente, podem ocorrer perdas ocorrer durante o processo de eluição do destilado pelas colunas C18. No estudo realizado na fase inicial deste trabalho, com soluções modelo de *trans*-2-nonenal com concentrações próximas das que são encontradas em cerveja (descrito no ponto 4.2. da Parte II) verificou-se que cerca de 20 % do *trans*-2-nonenal é perdido durante esta etapa.

Os valores da concentração de *trans*-2-nonenal obtidos para a cerveja nos ensaios 1 e 2, revelaram-se bastante próximos e dentro da ordem de grandeza habitualmente encontrada para este aldeído em amostras de cerveja.

Este comportamento ilustra a boa capacidade de resposta que a metodologia possui para a determinação da concentração deste aldeído em cerveja.

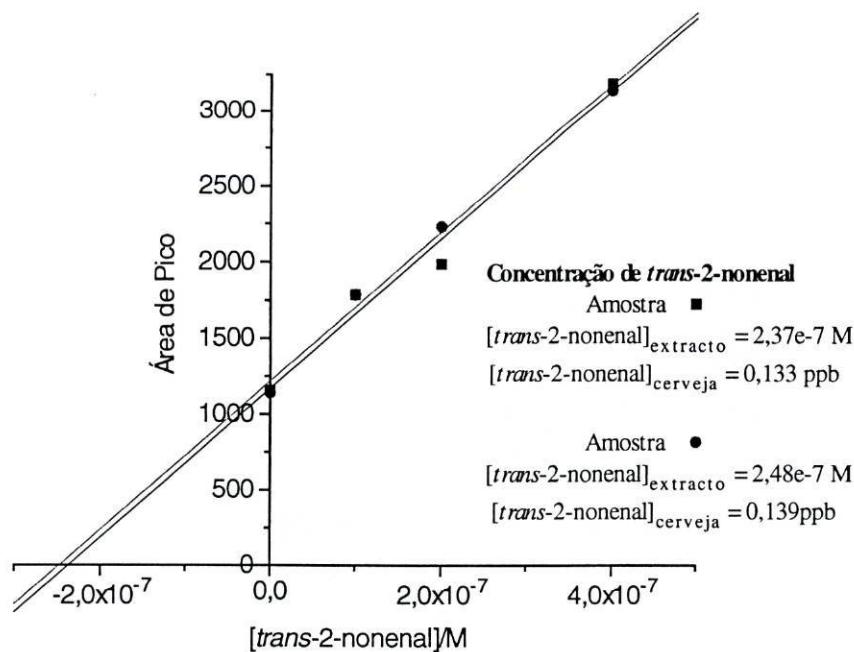


Figura 6.1. – Aplicação do método das adições de padrão na determinação de *trans*-2-nonenal em cerveja

### 6.3. – Aplicação da metodologia desenvolvida na monitorização do teor de *trans*-2-nonenal em cervejas submetidas a envelhecimento forçado

O ensaio de envelhecimento forçado consiste em submeter um conjunto de cervejas pertencentes a um mesmo fabrico a uma temperatura elevada, durante um determinado período de tempo. A maioria dos investigadores desta área realiza este ensaio submetendo as cervejas a uma temperatura de 37°C durante uma semana. Admite-se que este é o período de



tempo necessário à perda das características organolépticas da cerveja; por este motivo, é vulgar considerar-se que a exposição da cerveja a 37°C durante 1 semana é equivalente a armazenar a cerveja a temperatura ambiente durante 6 meses (período findo o qual, a cerveja perde igualmente as suas propriedades organolépticas normais).

Este tipo de estudo é extremamente importante no controlo de qualidade da cerveja, na medida em que fornece indicações sobre a capacidade que uma determinada cerveja possui em evitar/inibir a formação de compostos influentes na sua estabilidade organoléptica durante o seu envelhecimento.

Este estudo constitui, igualmente, um teste à capacidade de resposta desta metodologia. O perfil de concentração de *trans*-2-nonenal que é obtido em estudos de envelhecimento acelerado é bem conhecido e está descrito por vários autores [10, 24], podendo-se assim, comparar os resultados obtidos com os descritos.

Para a realização deste estudo submeteram-se um conjunto de 16 amostras de cervejas frescas a uma temperatura de 37°C, que ao longo de 14 dias foram sendo retiradas e analisadas pela metodologia proposta.

Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela seguinte, e em anexo – Anexo A2 – apresenta-se um cromatograma relativo a cada dia de análise.

**Tabela 6.3. – Valores de áreas de pico de *trans*-2-nonenal obtidos em amostras de cerveja submetidas a envelhecimento acelerado**

Dia do ensaio	Ensaio	Área de pico de <i>trans</i> -2-nonenal	Área média de pico de <i>trans</i> -2-nonenal
0	Ensaio 1	553	<b>544</b>
	Ensaio 2	534	
1	Ensaio 1	653	<b>664</b>
	Ensaio 2	674	
2	Ensaio 1	1 694 <sup>(*)</sup>	<b>838</b>
	Ensaio 2	838	
3	Ensaio 1	1 214	<b>1 214</b>
	Ensaio 2	— <sup>(**)</sup>	
5	Ensaio 1	1 202	<b>1 173</b>
	Ensaio 2	1 144	
7	Ensaio 1	944 <sup>(*)</sup>	<b>1 108</b>
	Ensaio 2	1 271	

Continuação da tabela 6.3.

9	Ensaio 1	1 612	1 528
	Ensaio 2	1 445	
12	Ensaio 1	1 410	1 476
	Ensaio 2	1 542	
14	Ensaio 1	1 550	1 550
	Ensaio 2	1 138 <sup>(*)</sup>	

(\*) – ensaio desprezado; (\*\*\*) – ensaio não realizado

Pelos resultados obtidos (figura 6.2.), foi possível observar uma tendência para o aumento da concentração do *trans*-2-nonenal ao longo do ensaio de envelhecimento forçado, que parece ser mais significativo nos primeiros dias do ensaio.

A comparação do perfil de concentração do *trans*-2-nonenal encontrado neste ensaio com os resultados que se encontram publicados por outros autores (figuras 3.14. e 3.15 - Parte I) confirma que a cerveja quando armazenada sob condições de temperatura elevada, apresenta uma maior propensão para a formação do *trans*-2-nonenal do que quando a cerveja é armazenada a temperatura mais baixa.

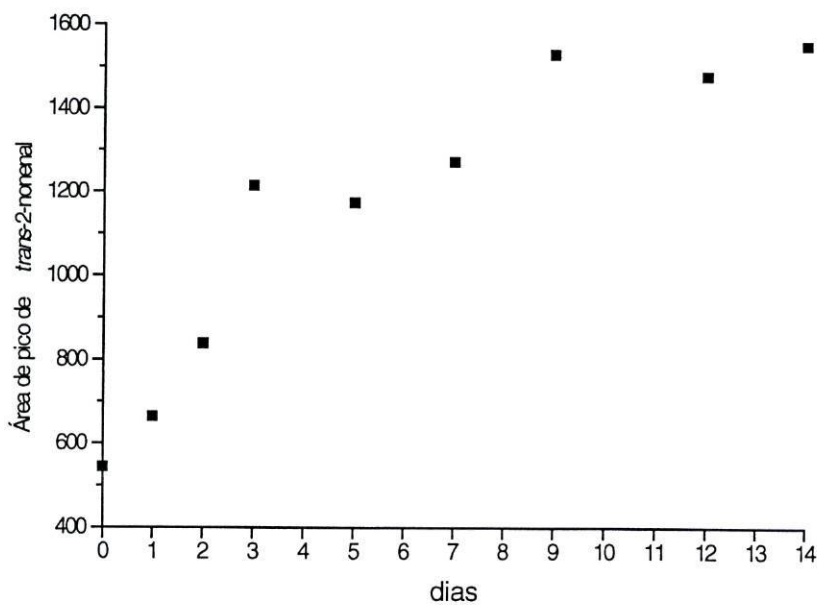


Figura 6.2. - Representação gráfica dos valores médios de área de pico de *trans*-2-nonenal obtidos para um conjunto de cervejas submetidas a envelhecimento forçado

Tal como foi anteriormente referido no ponto 3.4. Parte I, as reacções que justificam o perfil da evolução de concentração de *trans*-2-nonenal observado ao longo do envelhecimento acelerado da cerveja não estão totalmente esclarecidas. O aumento de concentração de *trans*-

2-nonenal que se observa durante este ensaio deverá ser resultado da aceleração de mecanismos de formação de *trans*-2-nonenal que já se estabelecem à temperatura ambiente e/ou do desenvolvimento de diferentes mecanismos. Mas por outro lado, o perfil que se observa na figura 6.2. mostra que existe um aumento apreciável do sinal do *trans*-2-nonenal no início do ensaio e uma tendência para a estabilização desse sinal no final do ensaio. Atendendo que a cerveja é uma matriz complexa, tal comportamento pode indicar que ocorrem simultaneamente vários fenómenos que condicionam a concentração deste aldeído: uns que envolvem a formação de *trans*-2-nonenal a partir dos seus precursores, e outros, em que o *trans*-2-nonenal participa directamente e que conduzem ao abaixamento da sua concentração.

A realização deste ensaio permitiu, além de monitorizar o nível de concentração do *trans*-2-nonenal, acompanhar os sinais cromatográficos dos outros compostos que são detectados nestas condições experimentais. A avaliação conjunta de todos os cromatogramas e respectivos picos cromatográficos, permitiu constatar que um certo sinal variou de forma regular ao longo do ensaio: o sinal que elui logo a seguir ao *trans*-2-nonenal e que tal como ele, aumentou de intensidade de forma contínua durante o envelhecimento acelerado.

#### **6.4. – Aplicação da metodologia desenvolvida à identificação de outros aldeídos insaturados**

Na tentativa de identificar o composto responsável pelo pico adjacente ao do *trans*-2-nonenal e de tentar identificar alguns dos outros picos cromatográficos que eram obtidos na análise do extracto de cerveja, fez-se a aplicação da metodologia desenvolvida à análise de outros aldeídos, para além do *trans*-2-nonenal, na medida em que, alguns desses compostos orgânicos são igualmente importantes na caracterização da estabilidade organoléptica da cerveja (tabela 1.1 - Parte I).

Estudou-se a aplicabilidade desta metodologia na análise dos seguintes aldeídos, *trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal, *trans*-2-octenal, *trans*-2-decenal, *trans*, *trans*-2,4-nonadienal e *trans*, *trans*-2,4-decadienal. Enquanto que para os três primeiros aldeídos referidos, pretendeu-se apenas identifica-los no extracto de cerveja, para os três últimos aldeídos pretendeu-se, igualmente, verificar se corresponderiam ao sinal que elui a seguir ao pico do *trans*-2-nonenal. Foram testados os aldeídos *trans*, *trans*-2,4-nonadienal e *trans*, *trans*-2,4-decadienal por serem compostos sobre os quais se sabe que a sua concentração aumenta ao

longo do envelhecimento da cerveja atingindo valores que excedem o respectivo (tabela 6.4.).

**Tabela 6.4. - Limites de percepção e descrição sensorial de alguns compostos carbonílicos em cerveja [38]**

Aldeído	Aroma	Limite percepção / ppb	Concentração em cerveja envelhecida / ppb
<i>trans, trans</i> -2,4-nonadienal	Pepino	0,5	0,7
<i>trans, trans</i> -2,4-decadienal	Oleo; ranço	0,3	0,8

Ao longo da realização deste trabalho experimental verificou-se que o composto que elui a seguir ao *trans*-2-nonenal comporta-se de um modo muito semelhante a este aldeído:

- é detectado ao mesmo comprimento de onda que o *trans*-2-nonenal após a execução da metodologia proposta para a determinação deste aldeído.
- é continuamente formado quando a cerveja é submetida a uma temperatura elevada
- apresenta grande intensidade quando a cerveja é destilada a pH 2 ou a pH 10
- na presença de hidrazina, o sinal praticamente desaparece
- possui um tempo de retenção muito semelhante ao tempo de retenção do *trans*-2-nonenal

Deste modo, a identificação do composto responsável por este sinal é interessante, porque: (1) correlaciona-se com o envelhecimento da cerveja, podendo assim servir de indicador para o tempo de vida útil restante da cerveja e (2) poderá ser um composto carbonílico de cadeia longa; como se sabe, os compostos carbonílicos de cadeia longa possuem propriedades organolépticas bem vincadas, pelo que, poderão ser influentes na estabilidade organoléptica da cerveja.

#### 6.4.1. - Estudo espectrofotométrico de aldeídos insaturados

Preparou-se individualmente uma solução de cada aldeído em meio aquoso com uma concentração de  $25 \times 10^{-6} \text{M}$ , a partir de cada padrão respectivo. Efectuou-se em seguida, um estudo espectrofotométrico de cada solução para averiguar a possibilidade de detectar estes compostos por esta técnica.

O varrimento espectrofotométrico das soluções de *trans*-2-alcenais, revelam que todos estes aldeídos possuem um máximo de absorvância ao mesmo comprimento de onda, 226nm, tal como o *trans*-2-nonenal Para os aldeídos *trans, trans*-2,4-nonadienal e *trans, trans*-2,4-decadienal verificou-se que ambos possuem um máximo de absorvância ao comprimento de

onda 280 nm e praticamente não absorvem a 226 nm.

Os espectros obtidos para os aldeídos referidos são apresentados na figura seguinte.

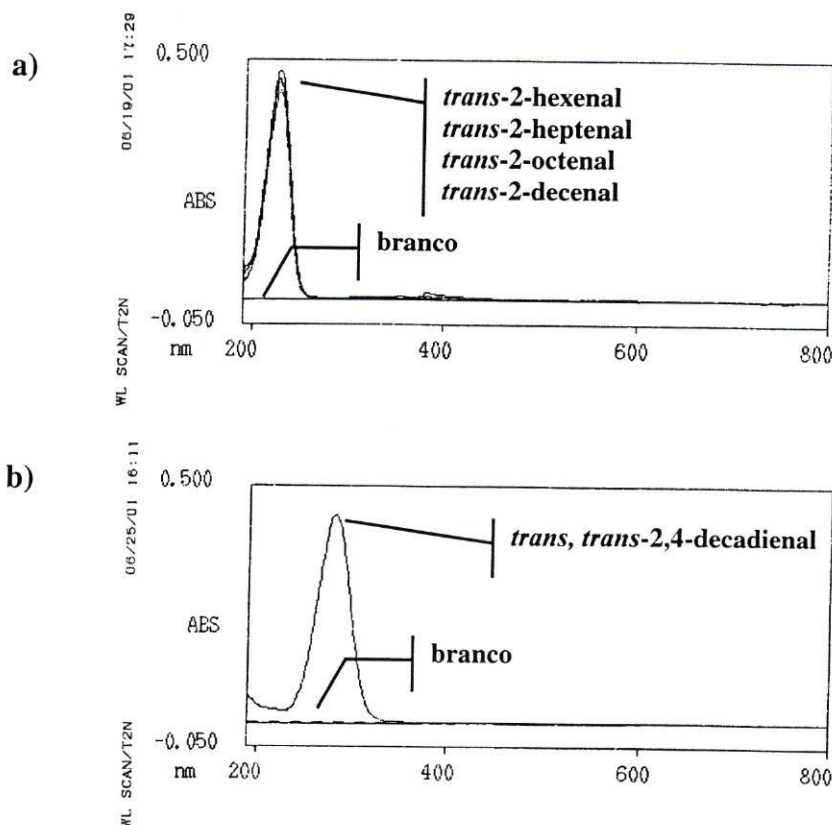


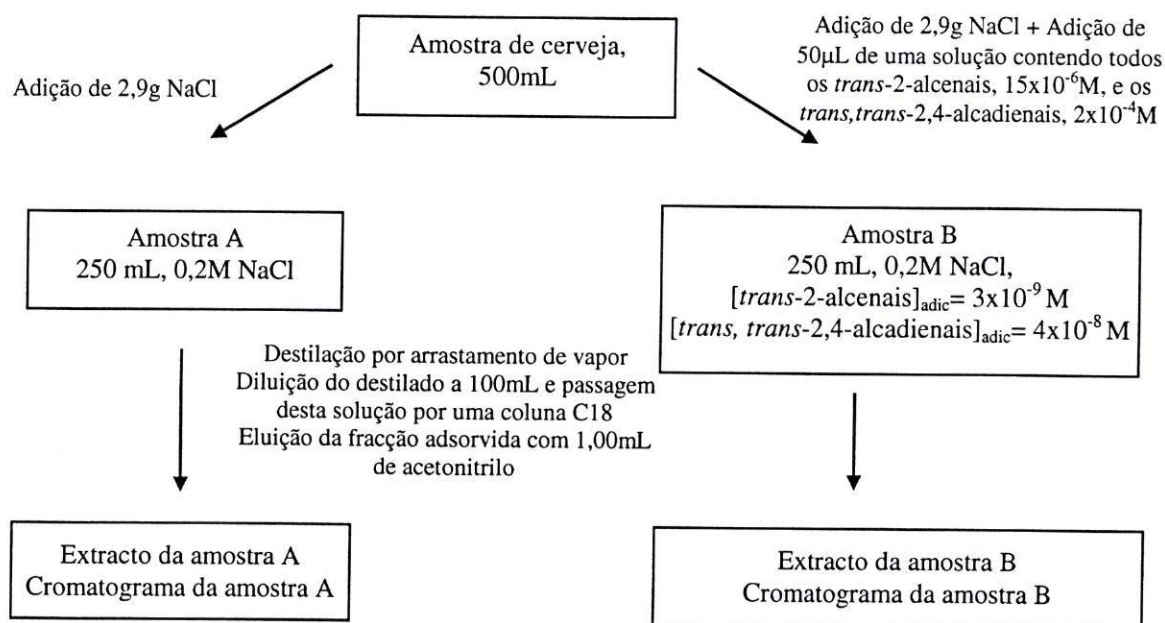
Figura 6.3. - a) Sobreposição dos espectros de absorção dos aldeídos *trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal, *trans*-2-octenal e *trans*-2-decenal. O comprimento de onda ao qual ocorre a absorção máxima de radiação é comum a todos os *trans*-2-alcenais (*trans*-2-nonenal inclusive): 226 nm. b) Espectro de absorção do aldeído *trans, trans*-2,4-nonadienal. O comprimento de onda ao qual ocorre a absorção máxima de radiação é comum ao aldeído *trans, trans*-2,4-decadienal: 280 nm

#### 6.4.2. - Identificação dos aldeídos em cerveja

O ensaio realizado para a identificação em cerveja dos aldeídos referidos, consistiu em analisar pela metodologia desenvolvida, duas amostras de cerveja, sendo que a uma delas foi adicionada 50µL de uma solução modelo contendo os aldeídos *trans*-2-alcenais e os aldeídos *trans, trans*-2,4-alcadienais, com uma concentração respectiva de  $15 \times 10^{-6} \text{M}$  e  $2 \times 10^{-4} \text{M}$ .

A identificação destes aldeídos fez-se por comparação dos sinais cromatográficos obtidos para uma amostra de cerveja não contaminada e para a amostra de cerveja contaminada.

O esquema 4 mostra o planejamento experimental seguido.

**Esquema 4**

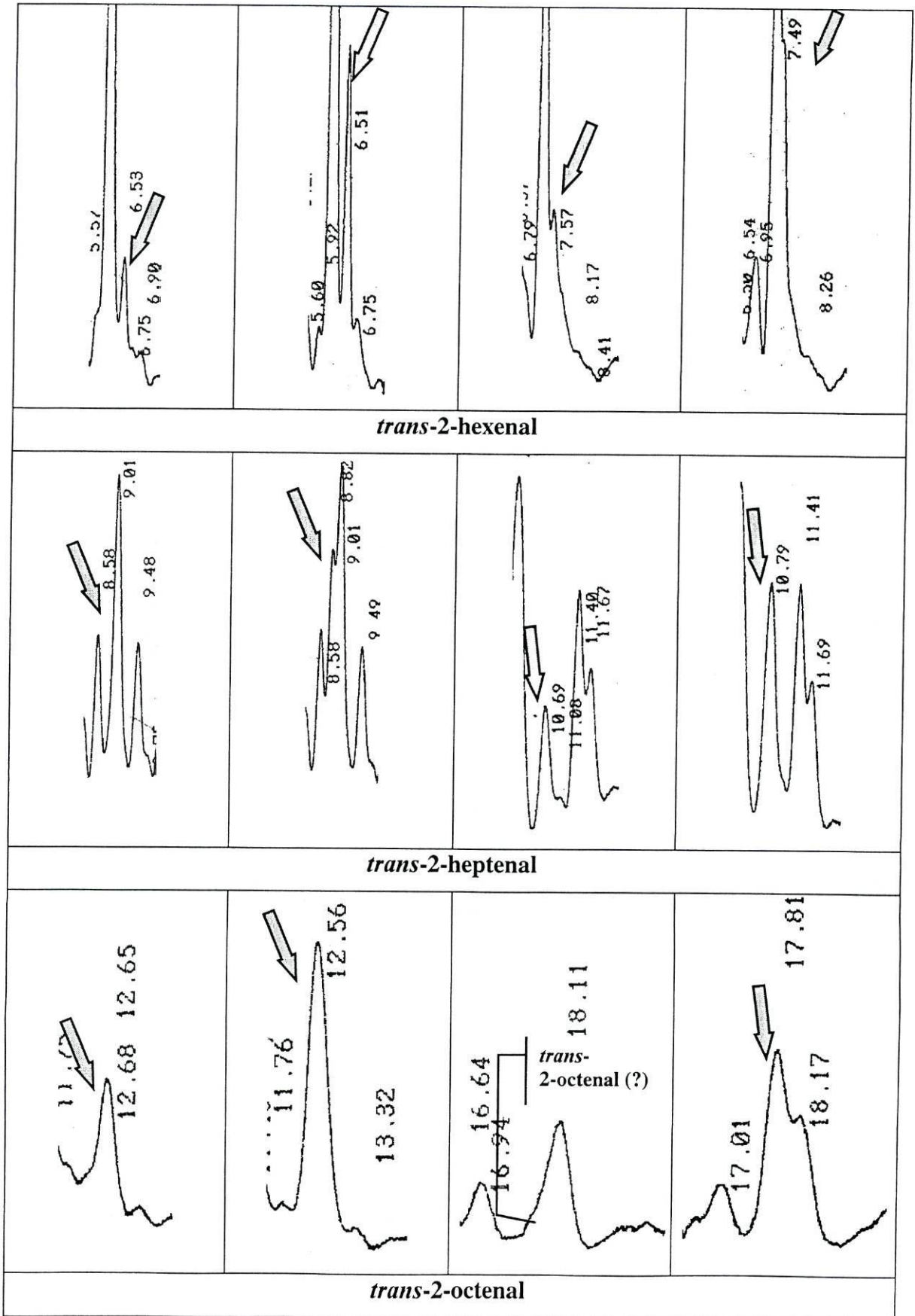
A análise cromatográfica de cada extracto foi realizada duas vezes, em duas fases móveis diferentes, respectivamente (1) água/acetonitrilo, 45:55 (v/v) e (2) água/acetonitrilo, 50:50 (v/v). Paralelamente, determinou-se os tempos de retenção de cada aldeído nas diferentes fases móveis ensaiadas, por injeção de soluções modelo contendo apenas um aldeído.

Na Tabela 6.5. podem ser observados os valores de tempo de retenção obtidos para ambas as fases móveis utilizadas.

**Tabela 6.5. - Tempos de retenção de diferentes aldeídos por eluição com diferentes composições de fase móvel**

Aldeído	Fase móvel água/acetonitrilo, 45:55 (v/v)	Fase móvel água/acetonitrilo, 50:50 (v/v)
<i>trans</i> -2-hexenal	6.49	7.51
<i>trans</i> -2-heptenal	8.81	10.83
<i>trans</i> -2-octenal	12.52	17.85
<i>trans</i> -2-decenal	28.23	41.46
<i>trans, trans</i> -2,4-nonadienal	12.93	20.26
<i>trans, trans</i> -2,4-decadienal	18.25	32.97

Os picos cromatográficos obtidos na realização do ensaio acima descrito podem ser observados seguidamente.



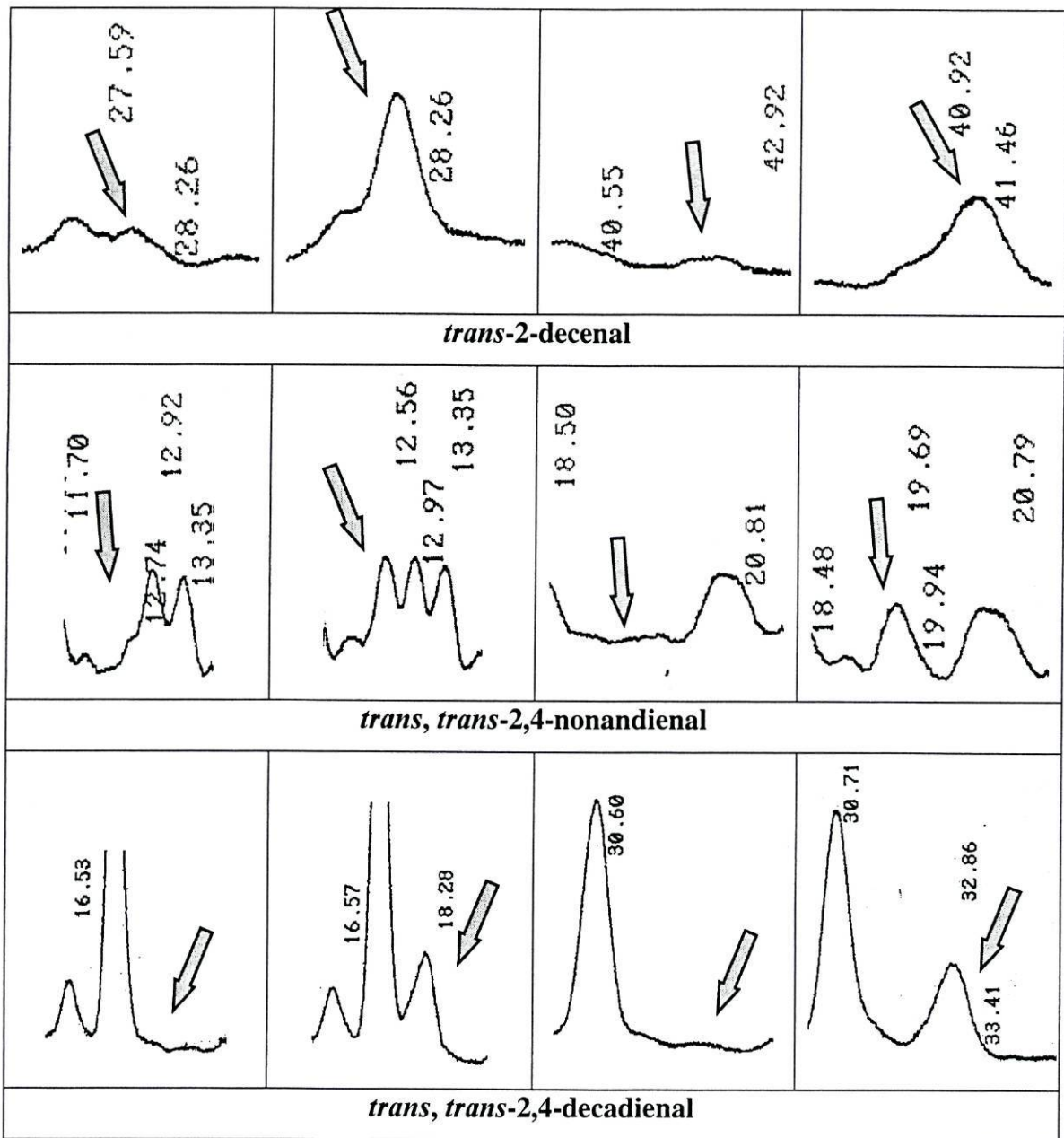


Figura 6.4. – Picos cromatográficos de extractos de cerveja com e sem adição *a priori* de aldeídos. Da esquerda para a direita: (1) análise ao extracto de cerveja com fase móvel água/acetonitrilo, 45:55 (v/v); (2) análise ao extracto de cerveja contaminada com fase móvel água/acetonitrilo, 45:55 (v/v); (3) análise ao extracto de cerveja com fase móvel água/acetonitrilo, 50:50 (v/v); (4) análise ao extracto de cerveja contaminada, com fase móvel água/acetonitrilo, 50:50 (v/v)

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a utilização da fase móvel água/acetonitrilo 45:55, (v/v) (fase móvel otimizada na determinação de *trans*-2-nonenal em amostras de cerveja), mostrou ser inadequada para a resolução de alguns dos picos que são eluídos mais cedo do que o *trans*-2-nonenal. Contudo, verificou-se nestas condições que a contaminação da cerveja com a solução modelo de aldeídos provocou um aumento claro dos sinais com tempo de retenção 28.26 e 6.49. A comparação destes valores com os tempos de



retenção obtidos na análise das soluções modelo dos aldeídos ensaiados revelam que estes sinais possuem o mesmo tempo de retenção que os aldeídos *trans*-2-decenal e *trans*-2-hexenal, respectivamente.

Relativamente à aplicabilidade do método desenvolvido para a identificação/extracção dos restantes aldeídos ensaiados, verificou-se que para os aldeídos (figura 6.4.):

- *trans*-2-heptenal, foi possível a identificação de um sinal bem definido no extracto de cerveja com o mesmo tempo de retenção obtido na análise da solução modelo deste aldeído quando se utilizou uma fase móvel água/acetonitrilo, 50:50 (v/v). Igualmente, o sinal obtido na análise da cerveja não contaminada aumentou de intensidade após a adição da solução modelo de aldeídos, podendo assim concluir-se com alguma certeza que, é possível identificar este aldeído em cerveja.

- *trans*-2-octenal, não foi clara a presença de um pico no extracto de cerveja não contaminada com o mesmo tempo de retenção verificado pela análise da solução modelo. Como pode ser observado no cromatograma obtido com uma fase móvel água/acetonitrilo, 50:50 (v/v), parece existir um sinal de muito baixa intensidade que elui conjuntamente com a espécie seguinte que aumentou de intensidade quando a amostra de cerveja foi contaminada com a solução modelo.

- *trans, trans*-2,4-nonadienal, não foi identificado nenhum sinal respectivo na amostra de cerveja não contaminada. A análise do extracto de cerveja contaminada com este aldeído resultou no aparecimento de um novo pico. O mesmo comportamento foi observado para o aldeído *trans, trans*-2,4-decadienal.

Ficou assim demonstrado que nenhum destes aldeídos é responsável pelo sinal que elui a seguir ao pico do *trans*-2-nonenal

Os resultados obtidos neste ensaio abrem boas perspectivas para a aplicação desta metodologia na determinação simultânea de vários aldeídos na cerveja. Torna-se evidente que a aplicação desta metodologia na determinação simultânea destes aldeídos obrigará à utilização de um sistema de cromatografia de gradiente, para assim melhorar a resolução de todos os picos a quantificar. É, igualmente, importante realizar um estudo (semelhante ao realizado para o *trans*-2-nonenal) com vista ao esclarecimento sobre as condições de validade que permitam a aplicação desta metodologia para cada um destes aldeídos.

## 7. – *Considerações finais e propostas de trabalho futuro*

A metodologia desenvolvida em soluções modelo para a extracção e concentração de *trans*-2-nonenal mostrou ser aplicável à determinação deste aldeído em cerveja. Verificou-se, contudo, a necessidade de rever as condições de destilação por arrastamento de vapor da cerveja, já que, nesta etapa pode ocorrer a formação de *trans*-2-nonenal a partir de precursores deste aldeído existentes na matriz. Determinaram-se, então, as condições experimentais mais adequadas para a extracção de *trans*-2-nonenal da cerveja durante a etapa da destilação por arrastamento de vapor, relativamente ao pH da cerveja a destilar (ponto 5.3.1.) e ao volume de destilado a recolher (ponto 5.3.3.), por forma a minimizar a formação de *trans*-2-nonenal.

A aplicação do método das adições de padrão a amostras de cerveja, para a determinação de *trans*-2-nonenal, mostrou que é possível obter uma boa correlação linear entre a quantidade adicionada/existente de *trans*-2-nonenal na cerveja e o sinal medido e ultrapassar o facto das recuperações obtidas após extracção serem de cerca de 40%.

A utilização da técnica cromatográfica para a identificação e quantificação do sinal do *trans*-2-nonenal permite, igualmente, a monitorização simultânea de outros compostos que se correlacionem com o envelhecimento da cerveja, ou que, eventualmente, possuam propriedades organolépticas determinantes para as características da cerveja.

A metodologia desenvolvida apresenta como principais vantagens relativamente à generalidade dos métodos existentes (ver ponto 3.7. Parte I):

- maior simplicidade e rapidez de análise; o método desenvolvido pode ser executado em, aproximadamente, 1 hora, e não requer um passo prévio de derivatização deste analíto. Muitas metodologias encontradas na bibliografia envolviam a prévia derivatização do *trans*-2-nonenal com vista a melhorar a sensibilidade do próprio método;
- o uso de um baixo volume de amostra; a destilação de um volume de 250 mL e posterior concentração de 250 vezes, mostrou ser suficiente para a quantificação do *trans*-2-nonenal;
- um baixo custo por análise.

A metodologia desenvolvida pode ainda ser melhorada no sentido de se reduzir o tempo de análise desta metodologia. Estas melhorias podem ser realizadas utilizando um destilador automático (em vez do sistema convencional de destilação por arrastamento de vapor usado) e um sistema de cromatografia de gradiente (que poderá permitir a eluição/determinação mais rápida do(s) aldeído(s) em estudo).

Uma outra proposta de trabalho futuro, envolve a realização de um estudo de comparação de métodos. Na bibliografia consultada surge uma metodologia de análise do *trans*-2-nonenal, proposta por Lermusieau [20], que assenta numa destilação sob vácuo a baixa temperatura (para extracção da fracção carbonílica) e posterior eluição do destilado recolhido numa coluna de extracção em fase sólida do tipo C18 (para concentração do *trans*-2-nonenal). De acordo com este autor, esta metodologia apresenta como principal vantagem a capacidade de extrair o *trans*-2-nonenal da cerveja sem motivar a sua formação já que a destilação sob vácuo é realizada quase à temperatura ambiente (cerca de 30°C). Esta metodologia apresenta, contudo, algumas desvantagens: é pouco prática (é destilado um volume de amostra de 1,5 L, e a recolha do destilado é feita numa *trap* com azoto líquido) e é apreciavelmente morosa (tempo de destilação, 90 minutos). Seria, pois, de grande interesse, verificar se é possível correlacionar a metodologia desenvolvida neste trabalho, que é bastante mais barata, rápida e simples de executar, com a metodologia proposta por Lermusieau.

Durante a realização deste trabalho e tendo em vista o objectivo proposto, não foi realizada uma abordagem específica sobre a precisão dos diversos passos que constituem esta metodologia. Este aspecto é, contudo, parte integrante do desenvolvimento de um método com vista à sua validação, e permite desenvolver ainda mais a própria metodologia numa perspectiva de a tornar mais precisa. Este tipo de estudo será mais conveniente numa fase de implementação do método quando este se encontra automatizado ou semi-automatizado.

## *Bibliografia*

- [1] – Hough, J. S., *The biotechnology of malting and brewing*, Cambridge, Cambridge University Press
- [2] – Drost, B. W., van der Berg, R., Freijee, F. J. M., van der Velde, E. G., Hollemans, M. (1990), Flavor Stability, *J. Am. Soc. Brew. Chem*, **48**, 124-130
- [3] – Bamforth, C. W. (2000), Making Sense of Flavor Change in Beer, *MBAA Technical Quaterly*, **37**, 165-171
- [4] – Hill, P. (1999), Six continents, one beer: the art of maintaining top beer quality all over the world, *Ferment*, 22-24
- [5] – Meilgaard, M., Elizondo, A., Moya, E. (1970), A study of carbonyl compounds in beer, Part II. flavor and flavor thresholds of aldehydes and ketones added to beer, *MBAA Technical Quarterly*, **7**, 143-149
- [6] – Hashimoto, N., Eshima, T. (1977), Composition and Pathway of Formation of Stale Aldehydes in Bottled Beer, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **35**, 145-150
- [7] – Lowry, T. H., Richardson, K. S. (1987), *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, 3ª Edição, Harper & Row Publishers, 661-731, New York
- [8] – Brown, W. H. (1994), *Organic Chemistry*, Saunders College Publishing, 641-693, Forth Worth
- [9] – Morrison, R., Boyd, R. (1994), *Química Orgânica*, 11º Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 887-921, Lisboa
- [10] – Walters, M. T. (1997), Natural Antioxidants and Flavour Stability, *J. Inst. Brew.*, **10**, 111-119
- [11] – Jamieson, A. M., van Gheluwe, J. E. A. (1970), Identification of a Compound Responsible for Cardboard Flavor in Beer, *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 192-197
- [12] – Collin, S., Noël, S. (1994), *Reactions Chimiques et Enzymatiques Productrices d'aromes au Brassage*, *Cervisiae & Biotechnology*, **19**, 25-32

- [13] – Noël, S., Liégeois, C., Lermusieau, G., Bodart, E., Badot, C., Collin, S. (1999), Release of Deuterated Nonenal during Beer Ageing from Labeled Precursors Synthesized in the Boiling Kettle, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4323-4326
- [14] – Gracey, D. E. F., Barker, R. L., Irwin, A. J., Pipasts, P., Leika, E. (1984), Chemical Equilibria of Beer Flavour Stability, *Proceedings of the 18<sup>th</sup> Convention of the Institute of Brewing*, 50
- [15] – Noël, S., Collin, S. (1995), Trans-2-nonenal degradation products during mashing, *EBC Congress*, 483-490
- [16] – Wackerbauer, K., Hardt, R. (1997), Radical Reactions and Flavour Stability of Beer, *Brauwelt International*, **IV**, 320-327
- [17] – Belitz, H.-D., Groseh, W. (1987), *Food Chemistry*, Springer Verlag, 644-654, London
- [18] – Michael Moir (2000), Hops – A millennium review, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **58**, 131-146
- [19] – Barker, R. L., Pipasts, P., Gracey, D. E. F. (1989), Examination of Beer Carbonyls as Their Oximes by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **47**, 9-14
- [20] – Lermusieau, G., Noël, S., Liégeois, C., Collin, S. (1999), Nonoxidative Mechanism for Development of trans-2-Nonenal, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57**, 29-33
- [21] – Barker, R. L., Gracey, D. E. F., Irwin, A. J., Pipasts, P., Leiska, E. (1983), Liberation of staling aldehydes during storage of beer, *J. Inst. Brew.*, **89**, 411-415
- [22] – Nyborg, M., Outtrup, H., Dreyer, T. (1999), Investigations of the Protective Mechanism of Sulfite Against Beer Staling and Formation of Adducts with trans-2-Nonenal, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57**, 24-28
- [23] – Dufour, J.-P., Baxter, A. J. (1988), Characterization of the reaction of bisulfite with unsaturated aldehydes in a beer model system using NMR spectroscopy, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57**, 138-144
- [24] – Wang, P. S., Siebert, K. J. (1974), The Influence of Various Storage Conditions on the Formation of 2-Nonenal in Bottled Beer, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **32**, 47-49
- [25] – Stenroos, L., Wang, P., Siebert, K., Meilgaard, M. (1976), Origin and Formation of 2-Nonenal in Heated Beer, *MBAA Technical Quarterly*, **13**, 227-232
- [26] – Kaneda, H., Takashio, M., Tamaki, T., Osawa, T. (1997), Influence of pH on Flavour Staling during Beer Storage, *J. Inst. Brew.*, **103**, 21-23
- [27] – Grigsby, J. H., Palamand, S. R., Hardwick, W. A. (1974), Further Studies on the Staling of Beer, *ASBC Proceedings*, 64-68

- [28] – Hashimoto, N. (1972), Oxidation of higher alcohols by melanoidins in beer, *J. Inst. Brew.*, **78**, 43- 50
- [29] – Wang, P. S., Siebert, K. J. (1974), Determination of Trans 2-Nonenal in Beer, *MBAA Technical Quaterly*, **11**, 110-117
- [30] – Verhagen L. C., Strating, J. (1987), Analysis of E-2-Nonenal in Beer at the Ultra Trace Level by High Performance Liquid Chromatography Using Precolumn Derivatization and Column Switching Techniques, *Journal of Chromatography*, **393**, 85-96
- [31] – Lindsay, S. (1989), *High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Chichester
- [32] – Sewell, P. A., Clarke, B. (1987), *Chromatografic separations*, John Wiley & Sons
- [33] – Skoog, D. A., West, D. M. (1996), *Fundamentals of analytical chemistry*, 7ªEd., Saunders college publishing, New York
- [34] – Queiroz, S. C. N., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F. (2001), Métodos de extracção e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quim. Nova*, **24**, 68-76
- [35] – Carneiro, J. R. C. (2000), *Determinação de Aldeídos na Cerveja por HPLC*, tema de Seminário em Química Analítica de Licenciatura em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
- [36] – Grasseli, J. G. (1973), *CRC Atlas of Spectral Data and Physical Constants for Organic Compounds*, CRC Press, Cleveland
- [37] – Solomons, T. W. G. (1992), *Organic chemistry*, 5ª Edição, John Wiley & Sons, New York
- [38] – Huige, N. J. (1993), Beer and wine production – Analysis, characterization and technological advances, *ASC Symposium series*, 64-97

# ***Anexos***

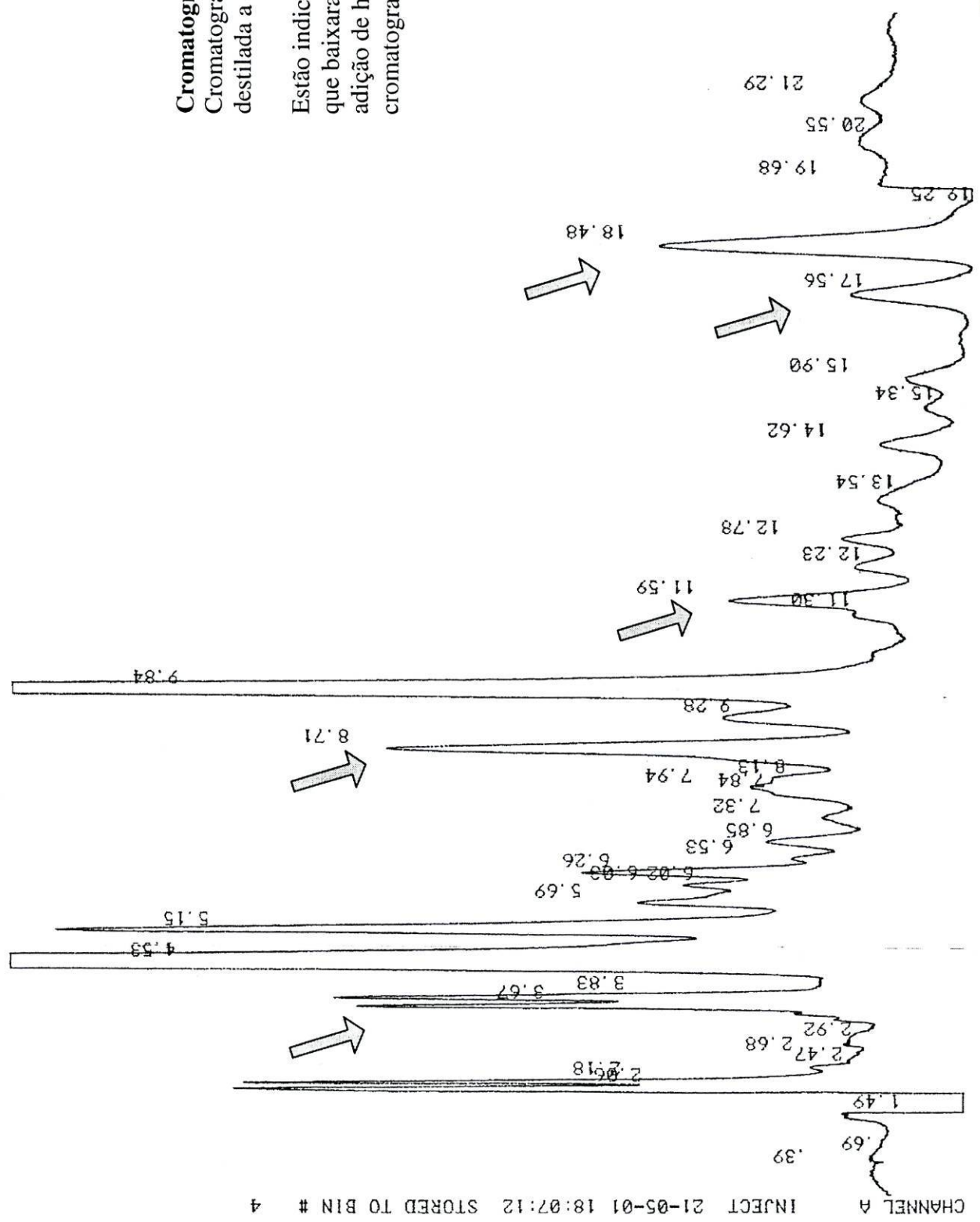
*Anexo A1 – Influência da adição de hidrazina ao destilado de cerveja*

*Anexo A2 – Ensaio de envelhecimento forçado da cerveja*

### Cromatograma 1

Cromatograma do extracto de cerveja destilada a pH 10

Estão indicados com uma seta os sinais que baixaram de intensidade após a adição de hidrazina ao destilado (ver cromatograma 2)

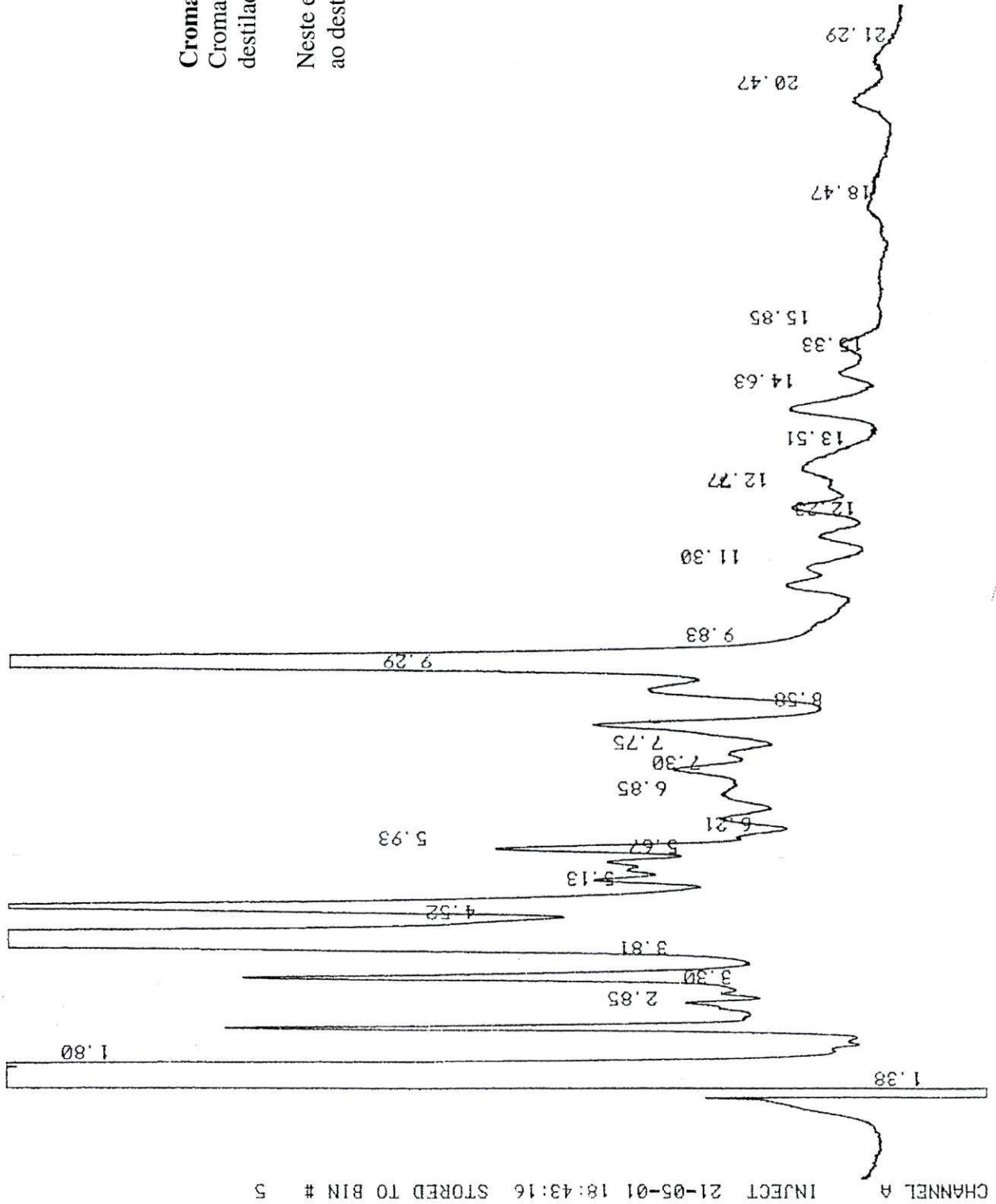


Influência da adição de hidrazina ao destilado de cerveja



**Cromatograma 2**  
Cromatograma do extracto de cerveja  
destilada a pH 10

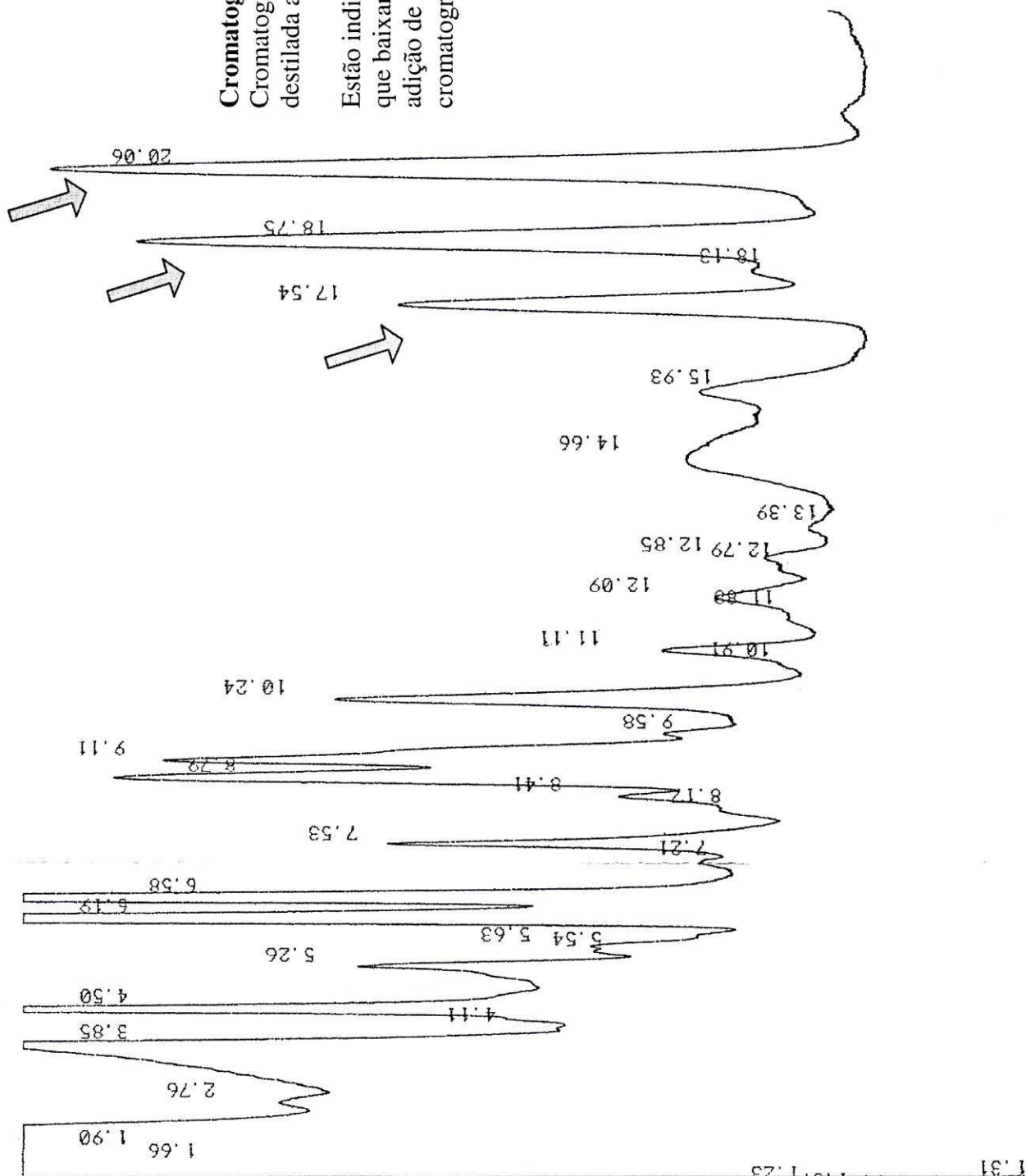
Neste ensaio foi adicionada hidrazina  
ao destilado da cerveja



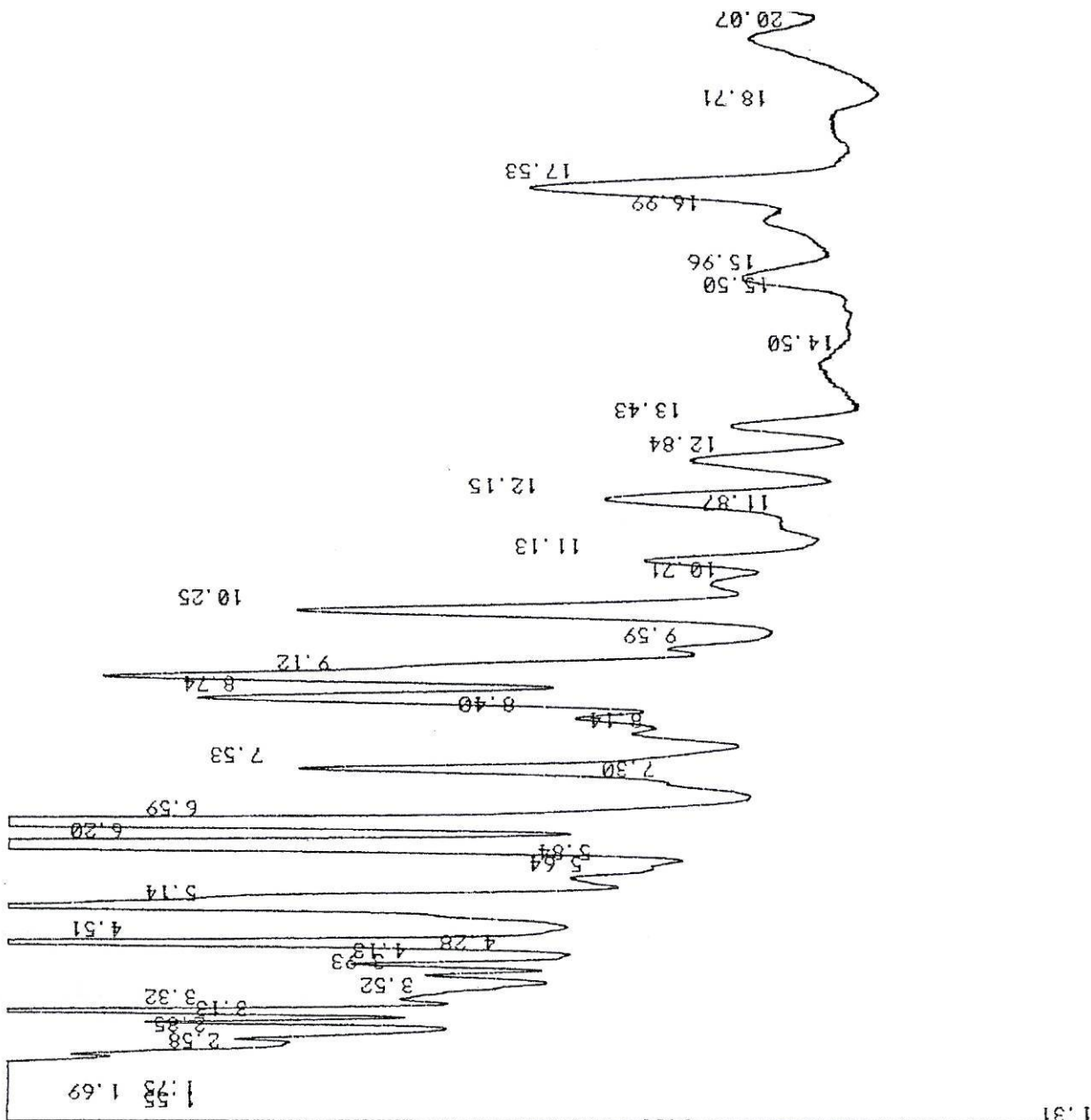
### Cromatograma 3

Cromatograma do extracto de cerveja destilada a pH 2

Estão indicados com uma seta os sinais que baixaram de intensidade após a adição de hidrazina ao destilado (ver cromatograma 4)



CHANNEL A INJECT 01-06-01 19:13:08 STORED TO BIN # 6

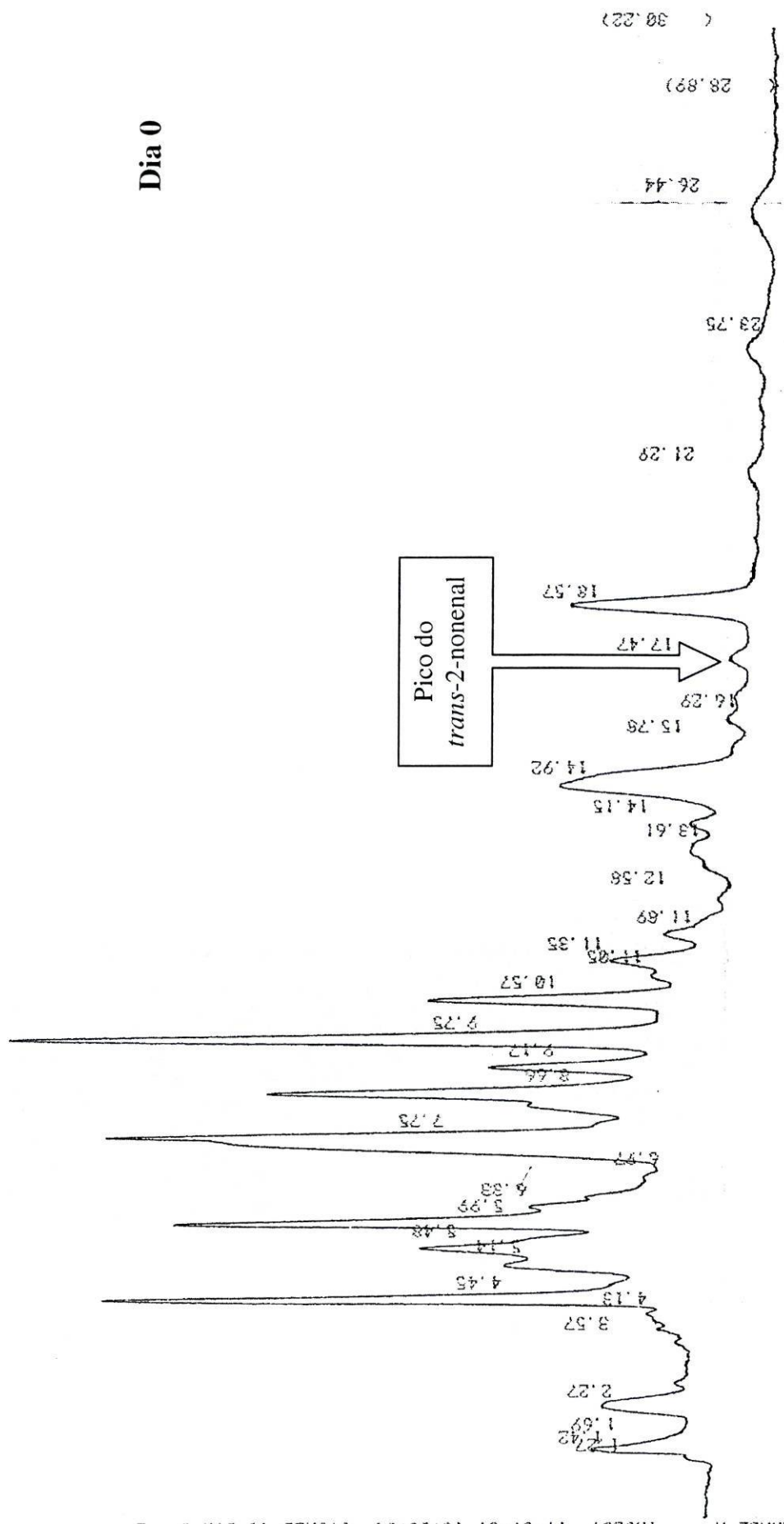


**Cromatograma 4**

Cromatograma do extracto de cerveja destilada a pH 2

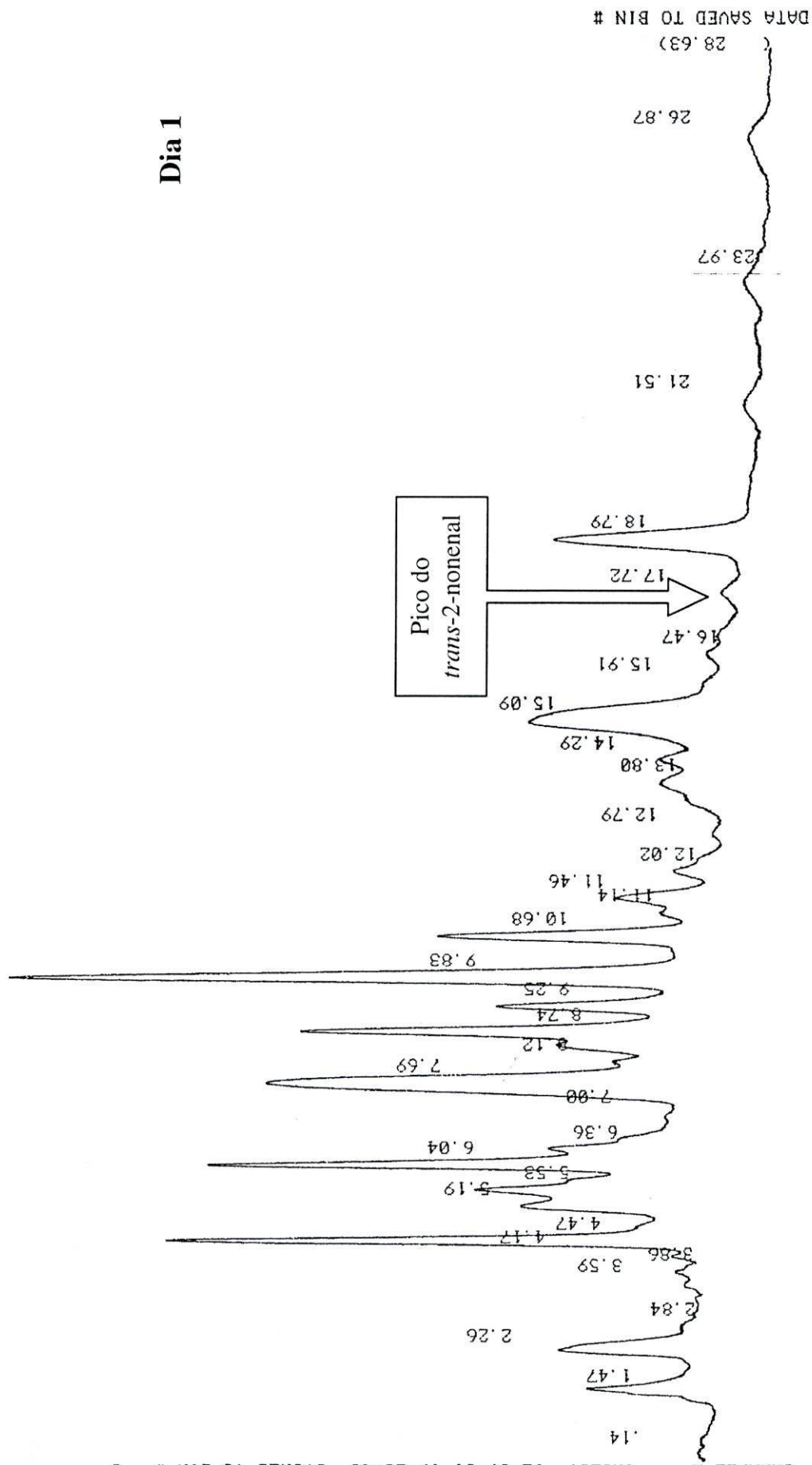
Neste ensaio foi adicionada hidrazina ao destilado da cerveja

CHANNEL A INJECT 11-07-01 18:58:34 STORED TO BIN # 2



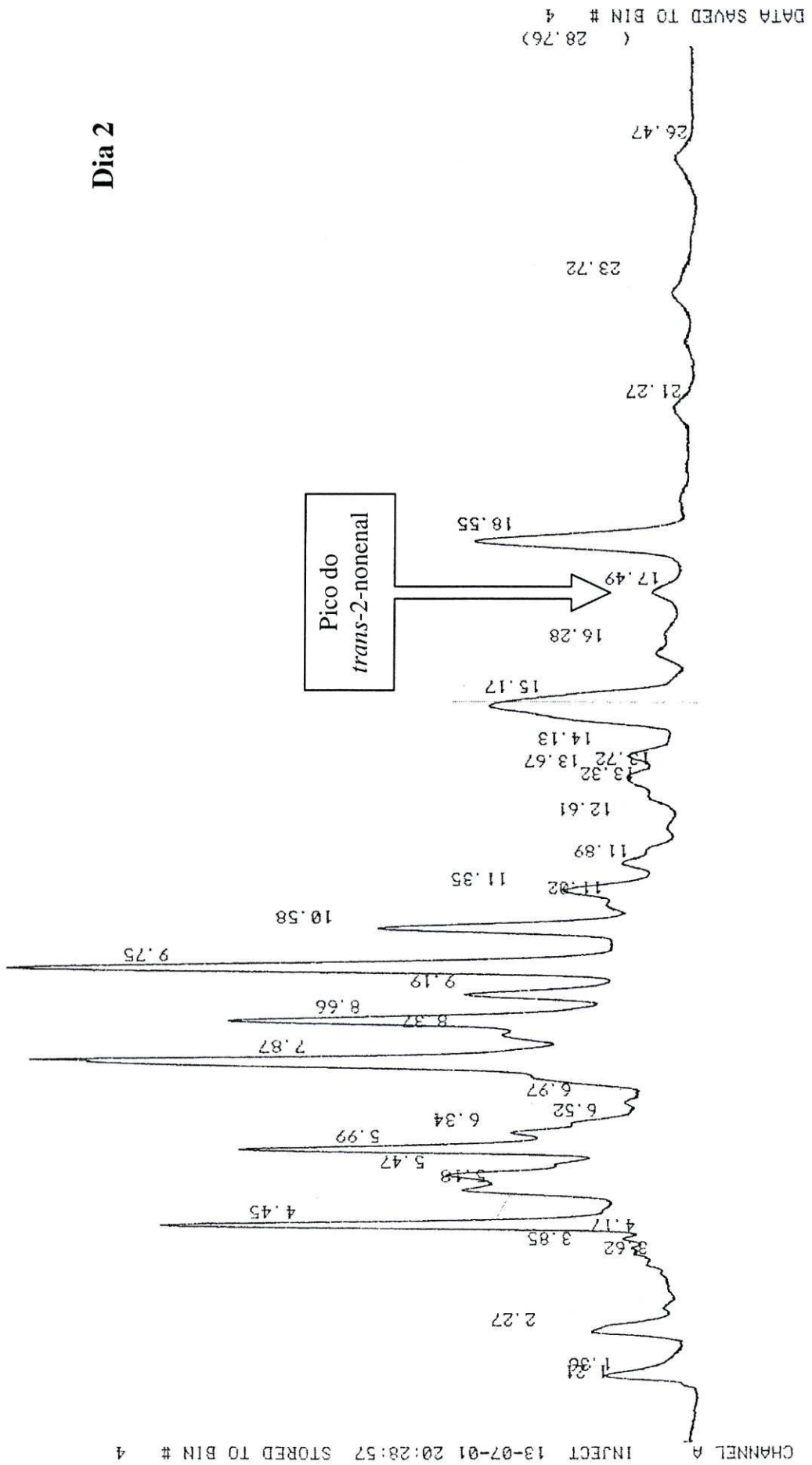
Dia 0

CHANNEL A INJECT 12-07-01 19:23:46 STORED TO BIN # 6

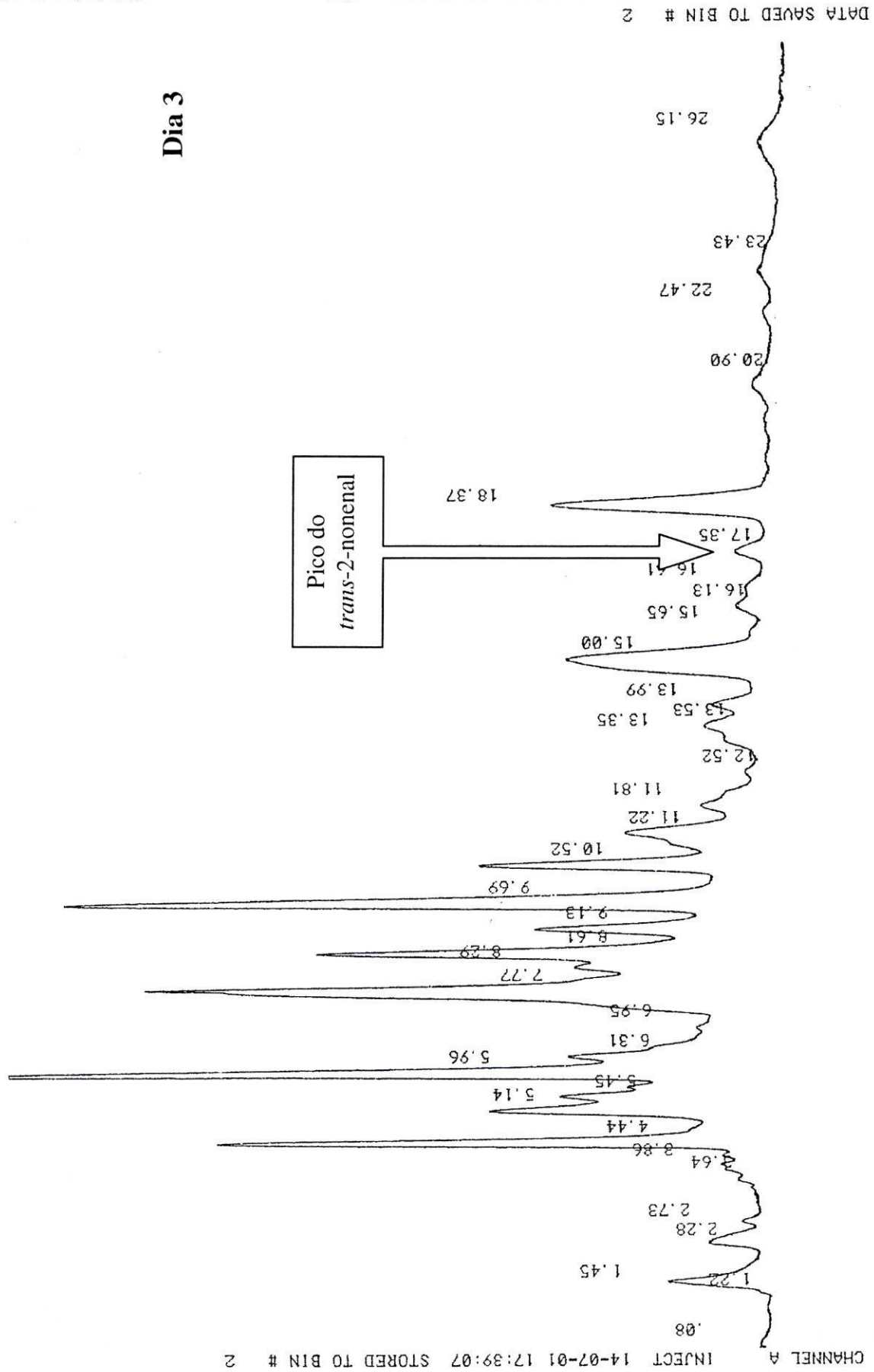


Dia 1

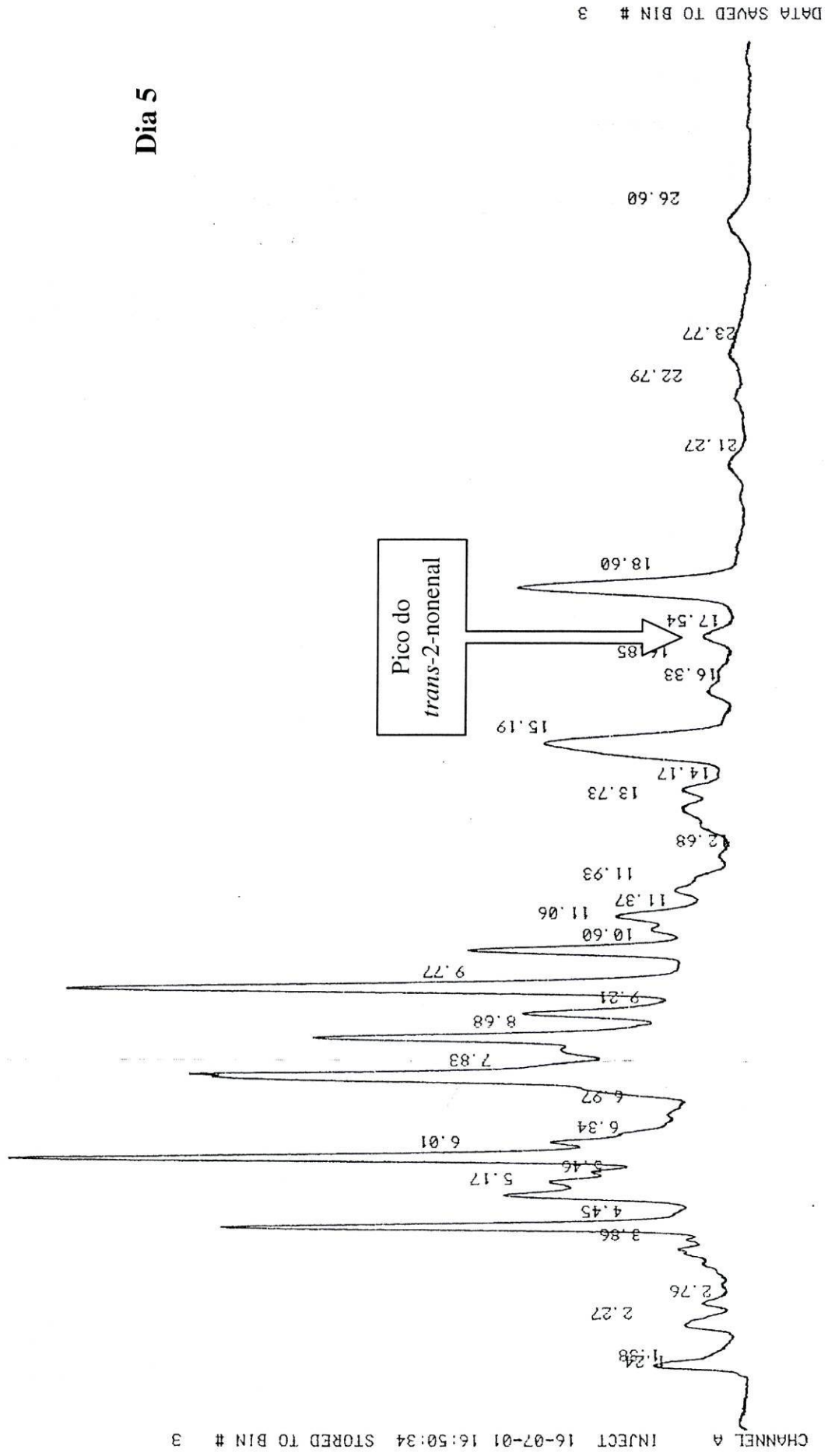
Dia 2



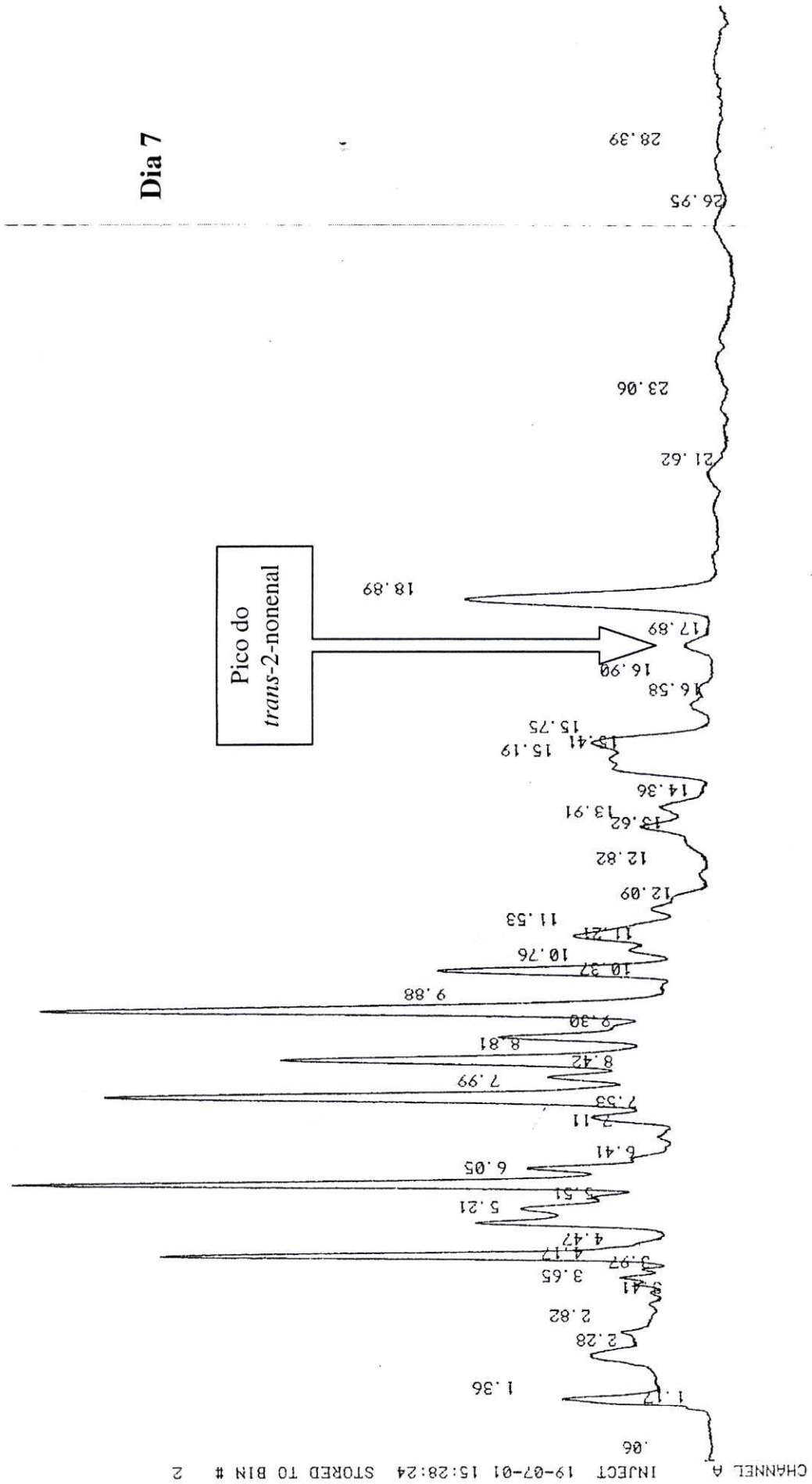
Dia 3



Dia 5



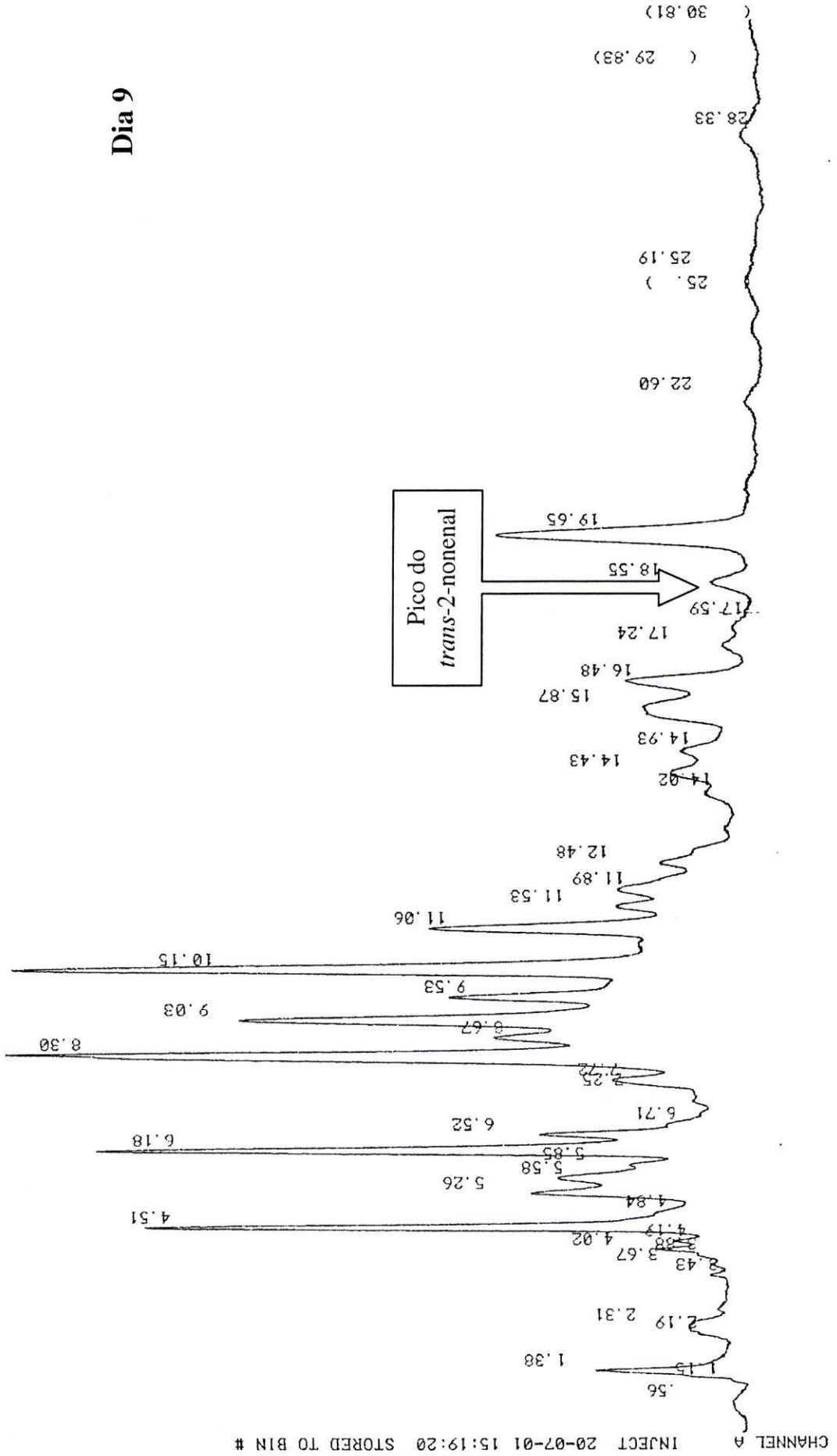




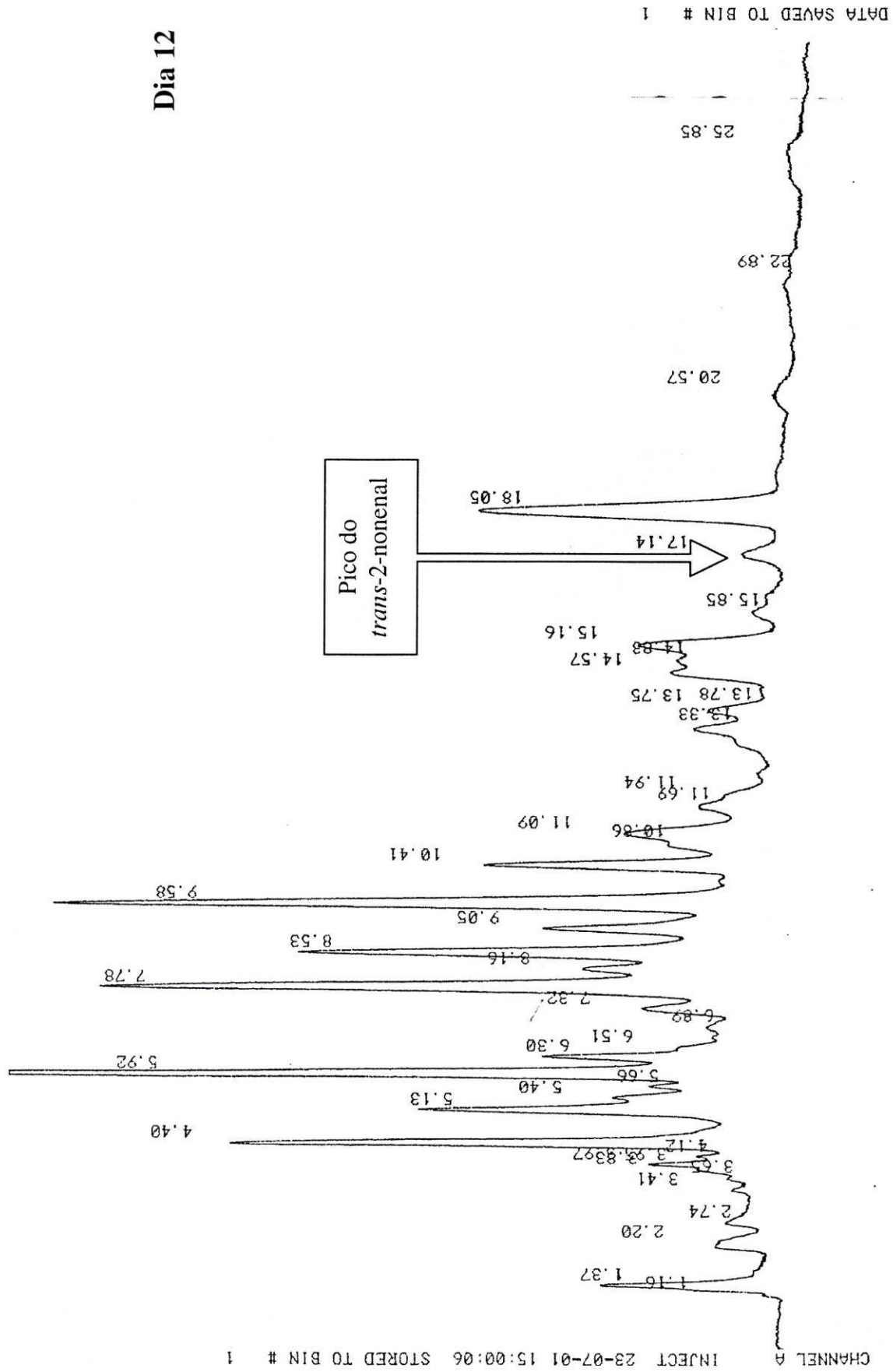
Dia 7

Pico do  
*trans*-2-nonenal

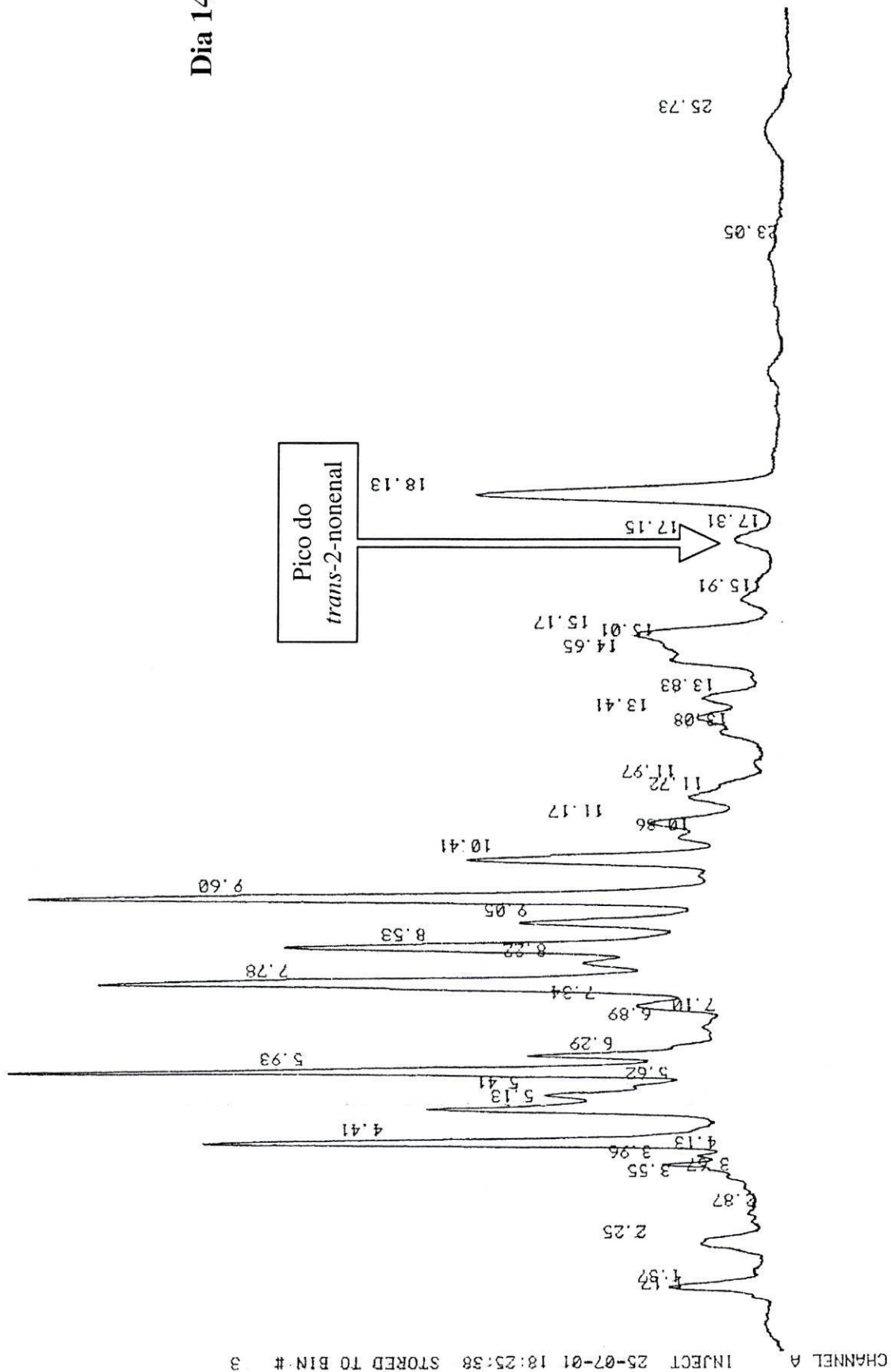
Dia 9



Dia 12



Dia 14



## *Errata*

na página	onde se lê...	deve ler-se...
5 (figura 1.1.)	Clarificação, pasteurização e engarrafamento	Clarificação, engarrafamento e pasteurização
10	...de forma contínua ao longo todo o envelhecimento...	...de forma contínua ao longo de todo o envelhecimento...
11	...metal (atribuído ao aldeído 3-octa-1-enona) ou a folha de groselha (atribuído ao aldeído 4-mercaptopentano-2-ona), são...	...metal (atribuído à cetona 3-octa-1-enona) ou a folha de groselha (atribuído à cetona 4-mercaptopentano-2-ona), são...
81	...o volume de destilado a recolher, e por fim, a repetibilidade do processo de destilação	... e o volume de destilado a recolher.
98	...com tempo de retenção de, cerca de, 15 min (figura 5.1.).	...com tempo de retenção de, cerca de, 15 minutos (figura 5.1.).
108	... se o aducto existir, ser poder continuar...	... se o aducto existir, se poder continuar...
120 (Tabela 6.3.)	1 108	1 271
123	...que excedem o respectivo (tabela 6.4.).	...que excedem o respectivo limite de percepção (tabela 6.4.).

