**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO VERDE PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CUMARINAS EM CACHAÇAS ENVELHECIDAS**

**Daniel Andrade Rabelo Lima1;** Jeancarlo Pereira dos Anjos2

1 Graduando em Engenharia Química; Iniciação científica – CNPq; daniel.lima@aln.senaicimatec.edu.br

2 Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; jeancarlopanjos@gmail.com

**RESUMO**

A cachaça é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no Brasil. Diante do aumento do número de consumidores e das exigências do mercado interno e externo, tem-se investido cada vez mais na melhoria da qualidade da bebida. O envelhecimento da cachaça é uma prática que possibilita a modificação da sua cor, sabor e aroma. Para a identificação de tais compostos nas cachaças, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na qual, foram obtidos os dados das amostras e feita a validação do método em uso, visando diminuir o impacto ambiental de solventes orgânicos voláteis utilizados como fase móvel. Em vista disso, esse trabalho teve como objetivo propor a utilização de solventes verdes, como fase móvel para sistema de HPLC para a determinação de compostos fenólicos e cumarinas em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras.

**PALAVRAS-CHAVE:** Química verde; cachaça; madeiras; HLPC.

**1. INTRODUÇÃO**

 A cachaça é uma bebida que vem ganhando maior notoriedade e, com isso, o investimento na melhoria da qualidade da bebida é inevitável, chegando a ser um produto de exportação. A qualidade da cachaça depende de vários fatores e dentre estes está o seu envelhecimento, o qual está atrelado à madeira que vai ser utilizada para armazená-la nesse período.1

Dentre os compostos que são observados na cachaça envelhecida provenientes das madeiras utilizadas no barril, os compostos fenólicos e cumarinas tem grande destaque devido às suas propriedades antioxidantes, influenciar no *flavour* da bebida e agregar valor ao produto final. Tais compostos são incorporados à cachaça, uma vez que estão presentes nas madeiras utilizadas no envelhecimento da bebida.1,2

A cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC) tem sido a técnica analítica mais empregada na determinação de compostos fenólicos e cumarinas em cachaça, onde muitos dos solventes utilizados como fase móvel são compostos orgânicos voláteis, os quais são poluentes tóxicos para o meio ambiente. Dentre as ações necessárias para tornar as análises por cromatografia líquida em uma abordagem menos nociva ao meio ambiente está a busca pela substituição de acetonitrila e/ou metanol por fases móveis menos prejudiciais, expressando o objetivo de minimizar o impacto ambiental resultante de sua utilização no processo de separação, que há a geração de uma quantidade considerável de resíduos.1-7

Isto posto, o objetivo deste trabalho foi propor o uso de um solvente verde na composição da fase móvel para sistema de cromatografia liquida de alta eficiência, para determinação de compostos fenólicos e cumarinas em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras.

**2. METODOLOGIA**

 Para o trabalho, foram analisados 18 compostos fenólicos (ácido gálico, catequina, ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido elágico, rutina, miricetina, quercetina, ácido *trans*-cinâmico, naringerina, kaempferol, isoliquiritigenina, biochanina, epicatequina, ácido *trans*-ferúlico, piceatanol, resveratrol, e kaempferide), além de 4 cumarinas (cumarina, 7-hidroxicumarina, escopoletina e 4-metilumbeliferona). Para otimizar as separações cromatográficas, foram utilizadas diluições das soluções-estoque de cada substância, a fim de obter uma mistura com todos os compostos a uma concentração de 15 mg L-1.

Inicialmente, foram testadas diferentes composições de solventes como fase móvel, contendo misturas com Acetonitrila, Metanol ou Etanol (puro, 50% ou 70%), como solventes orgânicos, utilizando o método cromatográfico sugerido por Silva *et al*. (2021)8, com modificações. Com o intuito de empregar um solvente verde, menos agressivo para o meio ambiente, o etanol deveria ser utilizado, por meio da comparação da separação cromatográfica com os demais solventes testados. Devido a uma melhor separação dos compostos fenólicos e cumarinas, o etanol a uma concentração de 70% foi escolhido como o solvente orgânico para a composição da fase móvel do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Para o solvente aquoso, uma solução aquosa de ácido acético à uma concentração de 5% foi utilizada.

O desenvolvimento do método cromatográfico para a determinação dos compostos fenólicos e cumarinas em amostras de cachaça foi feita utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência com os detectores de arranjo de diodos e fluorescência (HPCL-DAD-FLD) da marca Shimadzu, equipado com uma unidade de bombeamento de solvente quaternária (LC-20AT), um injetor automático (SIL-20AHT), desgaseificador (DGU-205), forno para coluna (CTO-20A), uma interface controladora (CBM-20A), detector de arranjo de diodos - DAD (SPD-M20A) e detector de fluorescência – FLD (RF-20A). A separação cromatográfica foi feita utilizando uma coluna NUCLEODUR® 100-5 C18 ec (150 mm x 4 mm ID; tamanho de partícula de 5 μm) acoplada à uma pré-coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Agilent (4.6 mm x 12.5 mm).

As corridas cromatográficas foram realizadas no modo gradiente. Todas as corridas tiveram um tempo total de 26 minutos, a um fluxo constante de 1,00 mL min-1 e temperatura de forno de 40°C.

Para o DAD, foram utilizados os seguintes comprimentos de onda, otimizados previamente: 270 nm, 280 nm, 323 nm, 310 nm, 367 nm, 354 nm, 372 nm, 370 nm, 290 nm, 365 nm e 260 nm. Para o FLD, os comprimentos de onda foram: 280/313 nm, 280/440 nm e 330/400 nm.

Após a otimização da separação cromatográfica, foram construídas curvas analíticas dos analitos, a partir da solução-padrão de 15 mg L-1, a partir da injeção dos analitos nas seguintes concentrações: 0,005 mg L-1; 0,01 mg L-1; 0,10 mg L-1; 0,25 mg L-1; 0,50 mg L-1; 1,00 mg L-1; 5,00 mg L-1; 7,50 mg L-1; 10,0 mg L-1; 12,5 mg L-1e 15,0 mg L-1, com injeção direta dos padrões no sistema cromatográfico. Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados por meio dos parâmetros das curvas analíticas.9

**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

 A Tabela 1 mostra os compostos estudados no trabalho, além de sua faixa linear e as variáveis presentes nas curvas analíticas, além dos limites de detecção e quantificação dos analitos.

Tabela 1 – Dados das curvas analíticas e limites de detecção e quantificação para os compostos fenólicos e cumarinas\*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Compostos fenólicos** | **Faixa linear****(mg L-1)** | **R²** | **a** | **b** | **SD** | **LD****(mg L-1)** | **LQ****(mg L-1)** |
| ácido gálico | 1,00-15,0 | 0,9901 | 39.664,20 | 47.037,60 | 7,331135x10³ | 0,55 | 1,85 |
| catequina | 5,00-15,0 | 0,9980 | 13.617,80 | -11.940,80 | 6,760928x10² | 0,15 | 5,00 |
| ácido caféico | 0,50-15,0 | 0,9997 | 119.298,00 | -8.181,10 | 3,872404x10³ | 0,10 | 0,50 |
| epicatequina | 5,00-15,0 | 0,9983 | 83.358,20 | -7.701,90 | 1,340502x10³ | 0,05 | 5,00 |
| ácido *p*-cumárico | 0,50-15,0 | 0,9994 | 86.069,30 | -7.029,10 | 1,654257x10³ | 0,06 | 0,50 |
| ácido *trans*-ferúlico | 0,25-7,50 | 0,9996 | 835.970,00 | -28.901,00 | 3,581888x104 | 0,13 | 0,43 |
| ácido elágico | 5,00-15,0 | 0,9947 | 715,2 | -533,8 | 3,971870x10 | 0,17 | 5,00 |
| rutina | 1,00-12,5 | 0,9996 | 16.654,20 | 713,8 | 2,934874x10² | 0,05 | 1,00 |
| piceatanol | 0,25-7,50 | 0,9996 | 994.447,00 | -44.685,30 | 5,046579x104 | 0,15 | 0,51 |
| miricetina | 5,00-15,0 | 0,9965 | 2.293,60 | 2.259,30 | 9,554767x10 | 0,12 | 5,00 |
| resveratrol | 0,25-7,50 | 0,9905 | 499.959,00 | -61.342,00 | 3,792139x104 | 0,23 | 0,76 |
| quercetina | 0,50-12,5 | 0,9975 | 17.352,40 | 2.968,30 | 7,392330x10² | 0,13 | 0,50 |
| ácido *trans*-cinâmico | 0,50-15,0 | 0,9997 | 59.797,00 | -4.856,80 | 3,481058x10³ | 0,17 | 0,58 |
| naringerina | 0,50-15,0 | 0,9996 | 154.666,00 | -20.808,10 | 1,009563x104 | 0,20 | 0,65 |
| kaempferol | 1,00-15,0 | 0,9993 | 51.577,00 | -18.502,20 | 5,379517x10³ | 0,31 | 1,04 |
| isoliquiritigenina | 1,00-15,0 | 0,9995 | 64.904,40 | -11.820,70 | 3,115433x10³ | 0,14 | 1,00 |
| biochanina | 5,00-15,0 | 0,9981 | 61.608,90 | 44.253,30 | 6,797300x10³ | 0,33 | 5,00 |
| kaempferide | 0,50-15,0 | 0,9993 | 63.011,80 | -9.730,20 | 2,174306x10³ | 0,10 | 0,50 |
| **Cumarinas** |  |  |  |  |  |  |  |
| 7-hidroxicumarina | 0,25-7,50 | 0,9997 | 4,64531x107 | 487.841,00 | 1,228875x106 | 0,08 | 0,26 |
| escopoletina | 0,25-7,50 | 0,9998 | 2,05271x107 | 290.048,00 | 4,473830x105 | 0,07 | 0,25 |
| 4-metilumbeliferona | 0,25-7,50 | 0,9996 | 4,77422x107 | -279.598,00 | 1,869024x106 | 0,12 | 0,39 |
| cumarina | 5,00-15,0 | 0,9979 | 30.970,60 | 12.006,00 | 6,038237x10² | 0,06 | 5,00 |

\*Regressão linear: y = ax + b; SD = desvio padrão da curva analítica

Analisando a Tabela 1 podemos observar que além dos coeficientes de regressão a e b, também foram obtidos o coeficiente de determinação (R2) para as curvas analíticas construídas, para os quais recomenda-se que seja maior ou igual à 0,99.9 Portanto, pode-se dizer que todos os compostos analisados possuem um R2 maior ou igual a 0,99 (variando de 0,9901 a 0,9998), demonstrando um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão e, com isso, atestando a boa linearidade dos dados.

Além disso, foram obtidos os desvios-padrão da curva analítica de cada um dos compostos analisados, os quais foram utilizados para os cálculos dos limites de detecção e quantificação. Ambos os limites foram calculados utilizando o método baseado em parâmetros da curva analítica.9 Analisando os limites de detecção, observou-se os mesmos variaram de 0,05 a 0,55 mg L-1, e os limites de quantificação variaram de 0,25 a 5,00 mg L-1, evidenciando a boa sensibilidade do método. Em outro trabalho de determinação de compostos fenólicos e cumarinas, em cachaças envelhecidas, foi observada uma variação do LD de 0,01 a 1,15 mg L-1 e do LQ de 0,05 a 3,28 mg L-1 (utilizando ácido acético 2% e acetonitrila, como fase móvel no sistema cromatográfico), demonstrando que os valores obtidos em nosso trabalho estão próximos daqueles encontrados na literatura, para o uso de diferentes solventes no HPLC.3

**4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

 Através dos resultados obtidos, foi possível observar a boa separação cromatográfica dos compostos fenólicos e cumarinas por meio do uso de um solvente verde na composição da fase móvel como fase orgânica.

Pode-se inferir que os dados apresentaram uma boa linearidade e o método apresentou baixos limites de detecção e quantificação, atestando a boa sensibilidade do método. A validação ainda será concluída e assim, o método será aplicado em amostras reais de cachaças envelhecidas em barris de diferentes madeiras.

**Agradecimentos**

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

**5. REFERÊNCIAS**

1 ANJOS, J. P.; *et al*. Evolution of the concentration of phenolic compounds in cachaça during aging in an oak (*Quercus* sp.) barrel. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 7, p. 1307–1314, 2011.

2 ZACARONI, L. M.; *et al.* Avaliação multivariada da composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira. **Científica**, v. 42, n. 2, p. 101–107, 2014.

3 ZACARONI, L. M.; *et al.* Determination of phenolic compounds and coumarins in sugar cane spirit aged in different species of wood. **Anal. Lett.**, v. 44, p. 2061–2073, 2011.

4 HAQ, N.; *et al.* Applying green analytical chemistry for rapid analysis of drugs: Adding health to pharmaceutical industry. **Arab. J. Chem.**, v. 10, p. S777–S785, 2017.

5 TACHE, F.; *et al.* Greening pharmaceutical applications of liquid chromatography through using propylene carbonate–ethanol mixtures instead of acetonitrile as organic modifier in the mobile phases. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 75, p. 230–238, 2013.

6 MICĂLE, F.; *et al.* Ethyl Lactate as a Greener Alternative to Acetonitrile in RPLC: A Realistic Appraisal. **J. Chromatogr. Sci**., v. 53, n. 10, p. 1701–1707, 2015.

7 ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (coord.) **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4ed. 1ed digital, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008, p. 411-445.

8 SILVA, M. C.; *et al.* A Simple Method for Evaluating the Bioactive Phenolic Compounds’ Presence in Brazilian Craft Beers. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4716, 2021.

9 RIBANI, M.; *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.