UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

MARCELO RABELLO ROSSI

Monoetil carbonato em bebidas alcoólicas carbonatadas

Versão corrigida da dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

25/09/2012

MARCELO RABELLO ROSSI

Monoetil carbonato em bebidas alcoólicas carbonatadas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo
2012

À minha mãe, Neusa, que sempre fez o possível para que eu tivesse a formação que, pelos percalços da vida, ela não pôde ter.

Ao meu falecido avô, Nelson, que sempre valorizou o conhecimento e a quem devo muito do que sou.

À minha amiga Eloisa, pelas inúmeras conversas pelos corredores do instituto nos momentos felizes e infelizes.

À minha amiga Julia, pelos inúmeros :8, :) e _o_ que muitas vezes fizeram a diferença.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Claudimir Lucio do Lago pela orientação, pelo bom humor, pelos cafés no Bloco 19 e pela compreensão nos momentos difíceis.

Aos outros professores do Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica, Lucio Angnes e Ivano Gutz, sempre disponíveis para dar bons conselhos e tirar dúvidas.

A todos os amigos que fizeram parte disso tudo e não souberam.

Às vozes e aos estilos de música que me acompanharam durante o desenvolvimento da pesquisa e durante o preparo deste documento.

Ao acaso, que muitas vezes pareceu ter o seu papel nos degraus da escada da vida e não se fez ausente nesse momento.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido durante os anos de pesquisa.

RESUMO

Rossi, M. R. **Monoetil carbonato em bebidas alcoólicas carbonatadas**. 2012. 75p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os monoalquil carbonatos podem ser vistos como produtos da hidrólise parcial de carbonatos orgânicos. Apesar de serem estudados desde a década de 1920, a literatura apresenta poucas evidências de sua formação em meio aquoso. Recentes estudos apontaram a eletroforese capilar (CE) com detecção condutométrica sem contato (C^4D) como uma técnica versátil para a detecção e quantificação dessas espécies, a partir da qual foi possível evidenciar a formação de monoalquil carbonatos pela reação direta entre o bicarbonato e o álcool correspondente. A presença de monoetil carbonato (MEC) em amostras de cerveja foi demonstrada pela primeira vez no presente trabalho, bem como sua formação em *drinks* preparados a partir de uma bebida alcoólica destilada e um refrigerante. Um equipamento de CE com dois detectores do tipo C^4D foi utilizado para a identificação e a quantificação dessa espécie, principais objetivos do presente trabalho. Uma propriedade intrínseca à detecção condutométrica – o fato de a resposta do detector estar, sob certas condições, exclusivamente relacionada às mobilidades dos compostos presentes – permitiu aquantificação do MEC apesar da impossibilidade de fazê-lo por meio de calibração externa, dada a sua instabilidade em meio aquoso. O método de quantificação, que utiliza como padrões de calibração do detector cinco soluções de espécies estáveis com mobilidades eletroforéticas próximas à do MEC, foi aplicado na determinação de tricloroacetato em solução aquosa e os resultados

obtidos condizem com a concentração da espécie determinada por titulação. As concentrações de MEC encontradas em uma amostra de cerveja do tipo *lager* e em um *drink* de rum com refrigerante de cola foram 1,2 $mmol.L^{-1}$ e 4,1 $mmol.L^{-1}$, respectivamente. Esses valores concordam com as quantidades esperadas de MEC nessas bebidas com base em suas concentrações de álcool e bicarbonato. Apesar dos estudos prévios sugerirem a formação lenta de MEC após a mistura do bicarbonato com o etanol, o preparo dos três *drinks* estudados mostrou rápida formação de MEC logo após a mistura dos ingredientes. Estudos envolvendo a cinética de formação da espécie em diferentes valores de pH foram realizados, evidenciando maiores velocidades de formação em condições ácidas (pH 4) quando comparadas com condições básicas (pH 8). Pôde-se concluir que, apesar de as condições ácidas favorecerem o desprendimento de CO_2 do sistema, deslocando o equilíbrio no sentido da decomposição do MEC, a formação da espécie também ocorre em sistemas ácidos. Além disso, o tempo necessário para a sua formação nesses sistemas condiz com a escala de tempo necessária para o preparo e o consumo dos *drinks*. Apesar de o presente trabalho ser o primeiro relato da existência de MEC em alimentos, bebidas como a cerveja são consumidas há milênios, sugerindo a baixa probabilidade de a espécie estudada ser nociva. Pouco se sabe, no entanto, a respeito do seu papel no sabor das bebidas estudadas e na absorção do álcool pelo organismo.

Palavras-chave: Monoetil carbonato, Monoalquil carbonato, Bebidas alcoólicas, Cerveja, Eletroforese capilar, Detecção condutométrica.

ABSTRACT

Rossi, M. R. **Monoethyl carbonate in carbonated alcoholic beverages.** 2012. 75p. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The monoalkyl carbonates can be treated as products of the partial hydrolysis of organic carbonates. Despite they are studied since late 1920's, the literature shows little evidence about their formation in aqueous media. Recent studies point the capillary electrophoresis (CE) with capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D) as a versatile technique for the identification and determination of these species, showing their formation from the direct reaction between bicarbonate and the corresponding alcohol. The presence of monoethyl carbonate (MEC) in beer is demonstrated for the first time, as well as the formation of this species in drinks prepared with a distilled beverage and a carbonated soft drink. A CE equipment with two C^4D detectors was used to identify and quantify this species in cited beverages, the main objectives of the present work. An intrinsic property of the conductometric detection made possible the determination of MEC in spite of the impossibility to quantitate it by external calibration due to its stability issues in aqueous media. The quantitation method, which uses five solutions of stable species with similar electrophoretic mobilities to the analyte, was applied in the determination of trichloroacetate in aqueous solution and the results were in agreement with the concentration obtained by titration. The concentrations of MEC in samples of lager beer and rum and cola drink were, respectively, 1.2 $mmol.L^{-1}$ and 4.1 $mmol.L^{-1}$, which agree with the levels of ethanol and bicarbonate available in these products.

Although the previous studies suggests the formation of a small amount of MEC right after the mixing of bicarbonate with ethanol – that grows over time – the three studied cases showed a fast formation of MEC after the mixing of the ingredients of the drinks. Studies about the formation kinetics in two different pH values were made showing higher formation rates for acidic media when compared with alkaline media. One can conclude that although the acidic conditions favor the loss of CO_2, shifting the equilibrium toward the decomposition of MEC, the species formation also occurs in acidic media. Besides, the required time for its formation in these systems matches the time scale needed for the preparation and the consumption of the drink. Although the present study is the first report of MEC existence in food, beverages like beer have been consumed for a long time, suggesting the low probability of its harmful potential. There are, however, little knowledge about its role in flavoring and alcohol absorption in the body.

Keywords: Monoethyl carbonate, Monoalkyl carbonate, Alcoholic beverage, Beer, Capillary electrophoresis, Conductivity detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de um instrumento para eletroforese capilar no (a) momento de injeção da amostra e no (b) decorrer da análise. 30

Figura 2. Simulação de separação eletroforética de amostra contendo os cátions 1-potássio e 2-sódio, EOF e ânions 3-MES, 4-butirato, 5-propionato, 6-glioxilato e 7-acetato. A curva em vermelho representa a mesma separação em condição de aumento de 5 % no tempo de migração do marcador de EOF. Os softwares utilizados são descritos a diante em seção específica. 32

Figura 3. Esquema simplificado sem escala do posicionamento dos dois eletrodos no capilar em um detector condutométrico sem contato. A visão frontal do sistema (a) permite reconhecer a geometria cilíndrica do eletrodo em torno do capilar, enquanto que a visão de corte (b) permite uma noção do distanciamento entre os dois eletrodos (0,5 mm). Os pinos que se projetam para fora do eletrodo representam seus terminais elétricos. 33

Figura 4. Composição de eletroferogramas de solução 100 $mmol.L^{-1}$ de DEC. O tempo decorrido a partir do preparo da solução é 0, 14 min, 25 min, 36 min, 58 min e 80 min, da curva inferior à superior, respectivamente. Os tempos de migração são referentes ao primeiro detector. 42

Figura 5. Eletroferogramas de solução de DEC – 80 min a partir do momento da preparação (curva em preto) e de solução de DEC – 80 min a partir do momento de preparação – após *spiking* com solução saturada de bicarbonato de sódio em etanol anidro (curva em azul). Os tempos de migração são referentes ao primeiro detector. 44

Figura 6. Eletroferogramas obtidos para amostras de uma mesma cerveja nas situações: (a) *in natura*, (b) após *spiking* com solução concentrada de MEC e (c) após tratamento com resina catiônica Amberlite IR 120. A região marcada corresponde à janela esperada para a saída do MEC. 47

Figura 7. Eletroferogramas de três amostras do mesmo vinho espumante: (a) *in natura*, (b) mistura com solução concentrada de MEC (1:1; v/v) e (c) amostra após tratamento com resina catiônica. A pequena elevação em 7,3 min que aumenta com a mistura e diminui após o tratamento com resina catiônica pode estar relacionada à presença de MEC.....49

Figura 8. Eletroferogramas de (a) *whisky*, (b) *club soda* e (c) mistura 1:1 (v/v) das duas bebidas. 50

Figura 9. Eletroferogramas de (a) *gin*, (b) água tônica e (c) mistura 1:1 (v/v) das duas bebidas. 51

Figura 10. Eletroferogramas de (a) rum, (b) refrigerante de cola e (c) mistura 1:1 (v/v) das duas bebidas. O butirato não está presente nas bebidas e foi adicionado como padrão interno. 51

Figura 11. Cálculo teórico para a sensibilidade do detector ($d\kappa/dC_A$) em função do módulo da mobilidade eletroforética para um pequeno intervalo de mobilidades. Os cálculos foram realizados levando-se em conta o sistema utilizado: eletrólito Li/CHES 20 mM, pH 9,5, com as mobilidades do co-íon e do contra-íon corrigidas para a força iônica do sistema pelo software Peakmaster. 54

Figura 12. Fator de resposta (referentes ao butirato) das espécies MES, butirato, propionato, glioxilato e acetato, respectivamente. A curva ajustada por regressão linear apresentou coeficiente R^2 = 0,997.....55

Figura 13. Eletroferograma obtido para solução 1 mM de ácido tricloroacético. O TCA é a espécie aniônica mais rápida (t_m = 6,97 min). Os picos em t_m = 2,82 min e t_m = 6,66 min correspondem, respectivamente, ao sódio e ao butirato, adicionado como padrão interno. 56

Figura 14. Curva de calibração do detector para interpolação da mobilidade do TCA. A curva ajustada por regressão linear apresenta coeficiente de correlação R^2 = 0,999. O fator de resposta, obtido dessa forma, permite o cálculo da concentração da espécie na amostra. 57

Figura 15. Eletroferograma C^4D de amostra de cerveja *lager*. O MES (t_m = 6,8 min), adicionado para fins quantitativos, não comigra com as outras espécies presentes, apresentando resolução de pico. 59

Figura 16. Perfis de formação de MEC a partir de etanol e bicarbonato em sistemas com diferentes valores de pH. 63

Figura 17. Equilíbrios envolvendo CO_2 em meio alcoólico/aquoso em função do pH do sistema. 64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CE – Capillary Electrophoresis (Eletroforese Capilar)

C^4D – Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection (Detecção Condutométrica Sem Contato)

MAC – Monoalquil Carbonato

OC – Carbonato Orgânico

DMC – Dimetil Carbonato

TMC– Trimetileno Carbonato

DEC – Dietil Carbonato

MEC – Monoetil Carbonato

^{1}H-NMR – Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H)

^{13}C-NMR – Carbon Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C)

EOF – Eletroosmotic Flow (Fluxo Eletrosmótico)

CHES – 2-(n-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (Ácido 2-(n-ciclohexilamino) etano sulfônico)

MES – 2-(n-morpholino)ethanesulfonic acid (Ácido 2-(n-morfolino) etano sulfônico)

LAIA – Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (IQ-USP)

TCA – Ânion tricloroacetato

1. INTRODUÇÃO 18

1.1. MONOALQUIL CARBONATOS 18

1.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS CARBONATADAS 25

1.2.1. Cerveja 25

1.2.2. Whisky, gin, rum e refrigerantes 27

1.2.3. Drinks 29

1.3. ELETROFORESE CAPILAR 29

1.3.1. O fluxo eletrosmótico e separações conduzidas no contra-fluxo 30

1.3.2. Detecção condutométrica sem contato (C^4D) 33

2. OBJETIVOS 35

3. MATERIAIS E MÉTODOS 36

3.1. MATERIAIS 36

3.2. INSTRUMENTAÇÃO E SOFTWARE 38

3.3. MÉTODOS 40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

4.1. IDENTIFICAÇÃO DE MEC 41

4.1.1. Estratégia de identificação – Hidrólise do DEC 41

4.1.2. Identificação do MEC em amostras de cerveja 44

4.1.3. Identificação de MEC em vinhos espumantes 48

4.1.4. Identificação de MEC em drinks 49

4.2. DETERMINAÇÃO DE MEC 52

4.2.1. Fundamentos 52

4.2.2. Avaliação do método 55

4.2.3. Determinação de MEC em amostras de cerveja 58

4.2.4. Determinação de MEC em drinks 61

4.3. EFEITO DO PH SOBRE A FORMAÇÃO DE MEC 61

5. CONCLUSÕES 65

6. PERSPECTIVAS 67

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

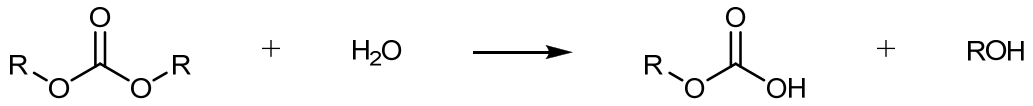
ANEXO. CURRICULUM VITAE 76

1.Introdução

A primeira seção da introdução traz informações relevantes sobre os carbonatos orgânicos e os monoalquil carbonatos e uma abordagem histórica de alguns dos estudos mais importantes a respeito desses compostos. Já a segunda seção traz breves informações sobre o consumo e a composição das bebidas estudadas. Como todos os experimentos realizados durante o presente trabalho foram realizados por Eletroforese Capilar, torna-se importante um panorama sobre a técnica, dado na terceira seção. A Detecção Condutométrica sem Contato e algumas de suas peculiaridades é discutida na quarta seção, devido à sua grande importância na realização do estudo desenvolvido.

1.1. Monoalquil carbonatos

Os ácidos alquil carbônicos ou, em sua forma ionizada, monoalquil carbonatos (MACs) podem ser vistos como produtos da hidrólise parcial de carbonatos orgânicos (OCs), reação cuja representação geral é dada pela equação a seguir (Reação 1):

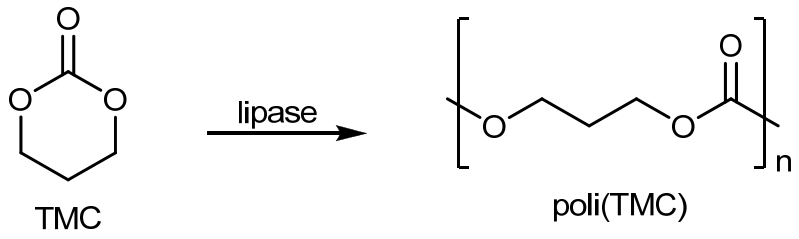


Reação 1. Representação geral da reação de hidrólise de um carbonato orgânico, formando um ácido alquil carbônico e um álcool.

À temperatura ambiente, os OCs se apresentam em geral na forma de líquidos incolores ou óleos, sendo que o mais simples deles, o dimetil carbonato (DMC), apresenta ponto de ebulição de 90ºC e densidade levemente maior do que a da água. São compostos extremamente inflamáveis e apresentam baixo ponto de fulgor [1].

Essas substâncias possuem grande versatilidade em termos de aplicações. Na indústria de polímeros podem sem utilizados como monômeros para a obtenção de policarbonatos – materiais conhecidos por suas inúmeras aplicações na área industrial e medicinal [2-4] – em lugar do fosgênio, substância conhecidamente tóxica.

De acordo com os resultados obtidos por Bisht *et al*. [5], o trimetileno carbonato (TMC), na presença de lipase obtida do fungo *Candida antartica*, a 70 ºC, fornece poli(TMC) com rendimento quantitativo, reação que pode ser representada pela equação a seguir (Reação 2):



Reação 2. Formação do poli(TMC) a partir do TMC, utilizando-se lipase como catalisador natural.

O alto conteúdo de oxigênio e a baixa emissão de gases poluentes como o CO e os NO_x tornam os OCs bons aditivos de combustíveis. Segundo Pacheco e Marshall [6], o DMC apresenta três vezes mais conteúdo de oxigênio do que o metil tert-butil éter – conhecido aditivo da gasolina – sendo ao mesmo tempo biodegradável e de menor toxicidade.

Além disso, o esqueleto estrutural dos OCs é o CO_2, de modo que sua síntese evita a liberação de compostos orgânicos voláteis na atmosfera.

Na área de síntese orgânica, o DMC se mostra como uma alternativa "verde" aos agentes metilantes e metoxicarbonilantes, como os haletos de metila, o dimetil sulfato e o fosgênio [7]. Apesar de sua aplicação em síntese como reagente precursor e sua importância como suporte para a formação de ligações do tipo carbono-carbono, sua maior utilização envolve a proteção de grupos funcionais como álcoois e aminas enquanto reações ocorrem em outros sítios da molécula [1].

Os primeiros estudos envolvendo aspectos cinéticos e termodinâmicos de OCs e MACs datam de 1917 (Skrabal) e 1927 (Faurholt) [8, 9]. Apesar da impossibilidade de acesso a esses trabalhos, estudos subsequentes indicam que, a partir dos estudos da velocidade da reação de saponificação do dietil carbonato (DEC), Skrabal [8] concluiu que a decomposição do monoetil carbonato com a formação de etanol e CO_2 (segunda etapa de hidrólise) ocorre instantaneamente, de modo a não ser mensurável.

De acordo com Faurholt [9], as condições ácidas utilizadas por Skrabal eram responsáveis por promover essa decomposição de maneira quase instantânea. Seus estudos mostraram que a decomposição do etil carbonato de potássio ocorre com velocidade mensurável se realizada em meio alcalino.

A metodologia utilizada por Faurholt para determinar a velocidade da reação é descrita em publicação de Heston *et al.* [10], que descreve o trabalho cujo objetivo foi repetir os experimentos realizados por Faurholt em 1927. São preparadas soluções alcoólicas de hidróxido de sódio, posteriormente submetidas ao borbulhamento com CO_2. Os ânions hidróxido e alcóxido, então, competem pelo CO_2 presente, segundo reações representadas pelas equações a seguir (Reação 3):

$$2\ OH^- + CO_2 \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_2O$$

$$RO^- + CO_2 \rightleftharpoons RCO_3^-$$

Reação 3. Representação simplificada das reações de formação de carbonato (superior) e MAC (inferior).

O sistema é, então, tratado com solução de cloreto de bário, que precipita imediatamente os ânions carbonato, mas não reage diretamente com os MACs, que se decompõem em carbonato e álcool. O precipitado obtido é rapidamente lavado e tratado com solução padrão de ácido. O ácido em excesso é titulado para se obter a concentração de carbonato indiretamente. No dia seguinte, os ânions carbonato formados a partir da decomposição do MAC se encontram precipitados na forma de carbonato de bário. Repete-se o procedimento anterior para a obtenção da concentração. A razão entre as concentrações é dependente, exclusivamente, da taxa de formação relativa entre os ânions.

Segundo Heston, a reação reversa – formação de MACs a partir de carbonato e álcool não se verificou, diferentemente do que alega Faurholt em seu estudo. É importante ressaltar que os experimentos foram todos realizados a 0 ºC e tendo como espécie majoritariamente estudada o monometil carbonato. Em uma série de

publicações posteriores, Faurholt investigou propriedades físico-químicas de diversos outros MACs de estrutura mais complexa.

Em 1934, Miller e Case [11] publicaram resultados que corroboram com a hipótese inicial de Faurholt, de que a hidrólise alcalina do DEC se dá a partir de duas reações, sendo a primeira – hidrólise do DEC com obtenção do monoetil carbonato (MEC) – de segunda ordem – e a segunda – hidrólise do MEC com obtenção de bicarbonato – de primeira ordem. Os experimentos foram realizados a 25 ºC e 35 ºC. Até meados dos anos 1970 não se discutia a identificação de MACs em meio aquoso por evidências estruturais, dado que os estudos apresentados anteriormente eram baseados em titulometrias.

Um dos primeiros resultados, talvez o primeiro, de identificação estrutural de MACs foi obtido por Gattow e Behrendt em 1972 [12]. O tratamento de uma suspensão de monometil carbonato de sódio com solução de cloreto de hidrogênio – ambos em éter metílico a – 50ºC – resultou na formação do ácido metil carbônico, composto cuja formação não havia sido relatada até então. O espectro de infravermelho de uma solução do ácido metil carbônico obtido em éter etílico a - 70 ºC apresenta, de acordo com os autores, bandas que podem ser atribuídas inequivocamente ao composto.

Essas temperaturas e condições extremas são reflexos da baixa estabilidade dessa classe de compostos. Gattow e Behrendt declaram, nessa mesma publicação, que o ácido metil carbônico é um composto sólido incolor com temperatura de fusão de - 36ºC que se decompõe em metanol e CO_2 a temperaturas superiores.

Em 1975, durante um estudo para melhor entendimento de reações de carboxilação catalisadas por enzimas, Sauers *et al.* propõem o estudo das reações de formação e hidrólise de MACs [13]. Durante esse estudo o grupo obteve novos

resultados para a velocidade de hidrólise de MACs em meio aquoso e alcalino. No entanto, poucas considerações são feitas a respeito da formação dessas espécies no sistema utilizado. Apesar de terem sido realizadas algumas medidas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^{1}H-NMR) e de ter sido identificado o pico correspondente ao MAC, o artigo não apresenta os espectros, mas apenas os resultados das constantes obtidas.

Já em 2000, Richardson *et al.* [14] verificam a formação de MEC durante estudo da ativação do peróxido de hidrogênio por bicarbonato para reações de oxidação de sulfetos em sistemas água/álcool. Os estudos foram realizados por ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C-NMR) e os espectros são apresentados. A constante de equilíbrio para a reação de formação de MEC a partir de bicarbonato e etanol é calculada, bem como a constante cinética da reação. Os autores também evidenciam que no sistema água/tert-butanol a formação do MAC correspondente não é verificada.

Dibenedetto *et al.* relatam, em 2006, o que dizem ser a primeira evidência de formação de ácido metil carbônico à temperatura ambiente [15]. A caracterização foi realizada por ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR em sistemas bifásicos envolvendo monometil carbonato de sódio (preparado a partir de metóxido de sódio e CO_2), diclorometano deuterado e água em pequenas quantidades. Nesse trabalho os autores discutem a possibilidade de se utilizar ácido metil carbônico para a síntese de DMC, reação de importância industrial, mas que tal fato não seria possível de ser realizado a partir da reação direta entre metanol e CO_2 a pressões inferiores a 100 MPa, ao contrário do que sugerem outros autores.

Recentemente, Vidal *et al.* demonstraram que a formação de MACs ocorre naturalmente a partir da reação entre bicarbonato e o álcool correspondente, mesmo

em grandes concentrações de água [16]. Os resultados, obtidos por eletroforese capilar (CE) com detecção condutométrica sem contato (C^4D) permitiram, além da identificação dos compostos (feitas por analogia ao sistema DEC – MEC e sugerida por outros resultados), também a obtenção de parâmetros físico-químicos das espécies, tais como mobilidade iônica, coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico. O arranjo de dois detectores do equipamento utilizado permitiu a obtenção de informações necessárias para o cálculo das constantes cinéticas e de equilíbrio para diversas espécies de MACs.

Após a reação de formação do MAC atingir seu equilíbrio, conduz-se uma separação eletroforética utilizando eletrólito de corrida similar à amostra, exceto pela ausência do álcool, o que promove a hidrólise da espécie. A reação de hidrólise ocorre em tempo adequado para se medir a variação da concentração do MAC entre o primeiro e o segundo detector, permitindo o cálculo da constante de hidrólise, segundo a Equação 1:

$$\frac{d[RCO_3^-]}{dt} = -k_h[RCO_3^-][H_2O] \quad \Leftrightarrow \quad k_h = \frac{\ln\left([RCO_3^-]_1/[RCO_3^-]_2\right)}{[H_2O](t_2 - t_1)} \qquad (1)$$

Os termos k_h, $[RCO_3^-]$, $[H_2O]$, t_1 e t_2 são, respectivamente, a constante de hidrólise da reação, a concentração de MAC, a concentração de água, o tempo de corrida necessário para o MAC atingir o primeiro detector e o tempo necessário para atingir o segundo.

Em posse da constante de hidrólise, é possível calcular a concentração do MAC no momento da injeção, fazendo $t_1 = 0$ e t_2 sendo o tempo de passagem da espécie pelo primeiro detector. Como os experimentos são realizados após a reação

atingir seu equilíbrio, a concentração de MAC no momento da injeção corresponde à concentração no equilíbrio.

A partir do valor obtido e das concentrações conhecidas de bicarbonato e do álcool correspondente, a constante de equilíbrio da reação de formação do MAC (K_{eq}) pode ser calculada. A constante cinética de formação do MAC (k_f) pode ser obtida diretamente a partir das duas constantes anteriores.

Os valores de k_h, k_f e K_{eq} obtidos para o MEC, espécie de estudo do presente trabalho, foram $(1,99 \pm 0,46)\ 10^{-5}\ L.mol^{-1}.s^{-1}$, $(4,27 \pm 1,17)\ 10^{-5}\ L.mol^{-1}.s^{-1}$ e $(2,11 \pm 0,09)$, respectivamente.

Outro fato interessante evidenciado pelos autores consiste na comparação entre os raios hidrodinâmicos dos MACs e dos carboxilatos correspondentes em série homóloga. Apesar da similaridade aparente entre as estruturas, os MACs apresentam raio pouco inferior aos carboxilatos com o mesmo número de átomos.

1.2. Bebidas alcoólicas carbonatadas

1.2.1. Cerveja

Sabe-se que a cerveja é uma bebida preparada a partir da fermentação alcoólica do amido. Envolve, em sua produção, a extração do trigo (ou outro substrato rico em carboidratos) com água, a fervura desse extrato, usualmente com a adição de lúpulo, e, por fim, seu resfriamento e sua fermentação usando levedura [17].

A preparação da cerveja data do tempo da construção das antigas cidades da Mesopotâmia (6000 a.C.) e, para os povos antigos, estava diretamente relacionada

à preparação do pão, que envolve os mesmos ingredientes principais: trigo, água e fermento – apresentando assim, de modo amplo, certa equivalência nutricional [18].

No ano de 2002 a cerveja ocupava a segunda posição entre as bebidas mais consumidas no mundo, atrás apenas do chá [19]. De acordo com relatórios do *Kirin Institute of Food and Lifestyle*, o consumo mundial de cerveja totalizou 177 bilhões de litros em 2009, enquanto que a produção mundial de 2010 atingiu 185 bilhões de litros. O Brasil figura em terceiro lugar no ranking mundial de consumo e produção de cervejas [20, 21].

Tais fatos, aliados à crescente competitividade do mercado e às exigências cada vez mais rigorosas dos órgãos reguladores de alimentos, justificam as inúmeras pesquisas voltadas aos processos de produção e aos fatores relacionados ao sabor e à qualidade de cervejas ao redor do globo.

Entre os compostos normalmente presentes em cervejas estão os carboidratos, álcoois, aminoácidos, compostos fenólicos, vitaminas, ácidos carboxílicos e compostos sulfurados [18], além dos íons inorgânicos.

Pollock descreve que as cervejas costumam apresentar entre 3,3 a 4,4 % de carboidratos. A quantidade de álcool pode variar de 0,05 % - cerveja considerada sem álcool – a 12,5 %, como no caso da inglesa *Thomas Hardy Ale*, considerada uma das mais “fortes” do mundo. O material proteico figura entre 0,2 e 0,6 mg/100 mL [22].

A cromatografia líquida de alta eficiência, bem como a cromatografia a gás, está entre as técnicas mais utilizadas para a análise de ácidos carboxílicos em cervejas, empregando ou não derivatização dos compostos de interesse [23, 24]. A CE tem sido empregada nos últimos anos, apresentando como principais

vantagens a maior eficiência de separação e o baixo consumo de solventes [25, 26].

Klampf *et al.* verificaram, por eletroforese capilar com detecção UV indireta e detecção condutométrica, a presença de ácidos orgânicos e conteúdo proteico, respectivamente, em diversos tipos de cervejas [27]. Em uma cerveja do tipo *lager* foram encontrados os ânions citrato, piruvato, acetato, lactato e piroglutamato em concentrações da ordem de 0,1 g/L. Já outros ânions, como oxalato, maleato e succinato foram encontrados em concentrações entre 0,01 g/L e 0,07 g/L. Os diversos aminoácidos presentes foram detectados na forma de cátions em concentrações de mesma ordem de grandeza.

Os íons inorgânicos certamente fazem parte da composição das cervejas. Cloreto, sulfato e fosfato estão presentes, sendo o fosfato o mais abundante entre os três [25, 27]. A concentração de bicarbonato está diretamente relacionada à concentração de carbonatos totais em cervejas que, segundo Kuban e Karlberg é de 2,6 g/L [28]. Sódio, potássio, cálcio e magnésio são os cátions inorgânicos mais abundantes [29].

Após os resultados obtidos por Vidal *et al.* no estudo envolvendo MACs [16], houve a busca por sistemas reais envolvendo bicarbonato na presença de álcoois. A presença de quantidades apreciáveis de bicarbonato em meio parcialmente alcoólico torna a cerveja um sistema potencialmente favorável à formação de MEC.

1.2.2. *Whisky*, *gin*, rum e refrigerantes

O *whisky* – produzido primariamente na Escócia, Irlanda, Canadá e Estados Unidos – é uma bebida feita a partir do amido de cereais. Seu processo de produção envolve a quebra hidrolítica do amido em açúcares menores (di- e

monossacarídeos), seguida por fermentação, destilação e maturação em barris de carvalho [30].

Durante o processo de trituração e hidrólise, os açúcares e aminoácidos presentes na composição dos cereais são solubilizados. O etanol é produzido durante a fermentação e posteriormente destilado para aumentar a pureza. Durante a maturação são formados ésteres, fenóis e ácidos carboxílicos responsáveis, em grande parte, pelo sabor e aroma da bebida. Durante o envase, a mistura alcoólica é diluída, com água, a 40 - 43 % (v/v) de etanol [31].

Já o *gin* consiste em uma bebida alcoólica destilada, cujo sabor vem primariamente de uma mistura de ervas, sendo o zimbro a principal delas. O *gin* de maior importância comercial é o *London Dry Gin*, que atualmente é produzido em diversas outras regiões [30]. O teor alcoólico mínimo do *gin* varia entre 37,5 % e 40 %, segundo as definições norte-americanas e europeias.

O rum, por sua vez, é um destilado obtido exclusivamente a partir da fermentação de subprodutos da cana-de-açúcar [30] e, após o envase, deve apresentar a mesma concentração de etanol do *gin*.

Refrigerantes são bebidas, usualmente carbonatadas, amplamente consumidas em todo o mundo. Sua composição, exceto pelo gás carbônico adicionado, se assemelha à naturalmente encontrada em suco de frutas, de modo a conter aproximadamente 10 - 11 % de açúcares (o emprego de adoçantes artificiais tem crescido) e algo entre 0,3 - 0,5 % de ácidos adicionados – sendo o cítrico, o málico e o fosfórico os três mais comuns, embora outros como tartárico e lático possam ser empregados. O nível de carbonatação pode variar entre 2,0 (volumes de CO_2 em solução para cada volume do produto) a 5,0, para as bebidas mais carbonatadas. [32, 33].

1.2.3. *Drinks*

Sistemas envolvendo uma bebida alcoólica destilada e uma bebida carbonatada são amplamente consumidos na forma de *drinks* e recebem os mais variados nomes [34]. Entre as misturas conhecidas estão aquelas compostas pelas bebidas descritas na seção anterior: o *whisky* com *club soda*, o *gin* com água tônica e o rum com refrigerante de cola.

1.3. Eletroforese Capilar

A eletroforese, técnica de separação desenvolvida nos anos 30 pelo químico sueco Arne Tiselius para o estudo de proteínas do soro sanguíneo, é um método baseado na diferença de migração de espécies carregadas em um eletrólito através do qual tenha sido aplicado um campo elétrico de corrente contínua [35].

A realização de eletroforese em tubo capilar foi descrita inicialmente nos anos 60 por Hjérten, com o emprego de um tubo de quartzo de 300 μm e voltagens entre 2,5 e 3 kV [36] e posteriormente por Jorgenson e Lukacs, empregando capilares menores que 100 μm e campos elétricos elevados [37], de maneira similar à eletroforese capilar de zona realizada atualmente.

Resumidamente, sua instrumentação conta com um recipiente de amostra, um recipiente de descarte, uma fonte de alta tensão, um capilar, um ou mais sistemas de detecção e um sistema de manipulação de dados. O esquema da Figura 1 mostra a relação entre os componentes e suas disposições.

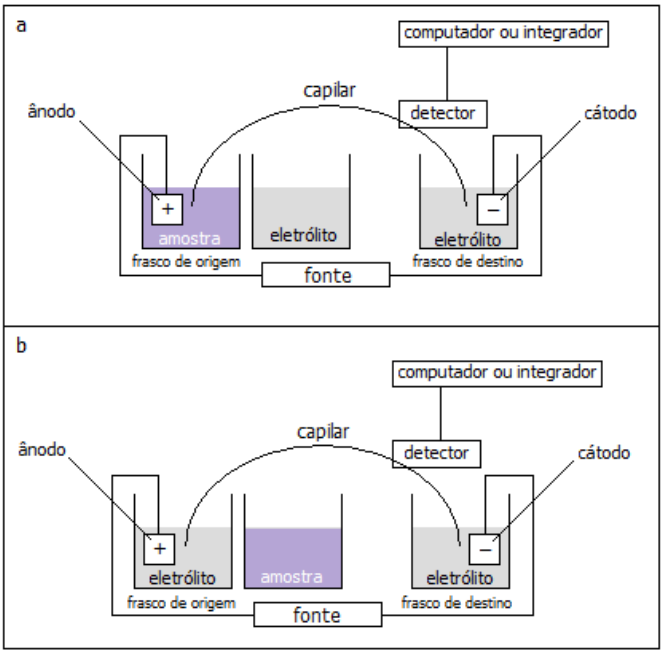


Figura 1. Esquema simplificado de um instrumento para eletroforese capilar no (a) momento de injeção da amostra e no (b) decorrer da análise.

1.3.1. O fluxo eletrosmótico e separações conduzidas no contra-fluxo

O fluxo eletrosmótico (EOF) é um fenômeno conhecido em eletroforese capilar, que consiste no arraste de espécies neutras (e até mesmo negativamente carregadas) em direção ao cátodo (pólo negativo). A superfície interna do capilar, composto de sílica, apresenta grupos silanóis (SiOH) que se encontram na forma dissociada (SiO^-) em valores de pH acima de 3 [38]. O caráter negativo dessa superfície faz com que, próximo à parede do capilar, haja maior concentração de cátions em relação a ânions. Dada a tendência desses cátions de migrarem, em conjunto, ao cátodo, o que se estabelece é um fluxo dessa camada mais próxima a superfície em direção ao cátodo (cátions, espécies neutras e ânions). As camadas mais interiores, embora não apresentem caráter tão positivo, se deslocam na mesma direção por transferência de momento. Em sistemas onde há EOF, o tempo

de migração da espécie até o detector se relaciona com a soma vetorial entre a velocidade efetiva da espécie e a velocidade do EOF.

O EOF pode ser diminuído ou eliminado a partir da modificação da superfície interna do capilar ou da diminuição do pH do eletrólito – ou mesmo ter o seu sentido invertido a partir da utilização de tensoativos, cuja região positiva se adsorve à parede do capilar e a região apolar interage com outras moléculas do tensoativo, formando uma nova camada, dessa vez com a região positiva da molécula em contato com a solução.

A existência do EOF, em algumas situações, permite que cátions e ânions sejam analisados em uma mesma corrida eletroforética, dado que todas as espécies serão levadas em direção ao mesmo detector. Em sistemas não modificados, primeiramente são detectados os cátions e posteriormente os ânions (levando em conta o arranjo representado na Figura 1).

A separação de ânions conduzida no contra-fluxo eletrosmótico permite uma maior janela de separação para pares adjacentes com baixa resolução, visto que é uma estratégia que permite maior tempo de residência dessas espécies dentro do capilar. Esse tipo de separação, dada a ausência de um inversor de EOF, é também uma forma de garantir que o seu composto de interesse não interaja com o tensoativo de maneira indesejada. Como desvantagens podem ser citados o aumento do tempo de análise, maior variação da mobilidade da espécie a pequenas variações da velocidade do EOF para os ânions detectados ao final da corrida e alargamento dos picos.

A simulação a seguir (Figura 2) mostra o efeito da variação de 5 % do tempo de migração do EOF no tempo de migração das diversas espécies no capilar.

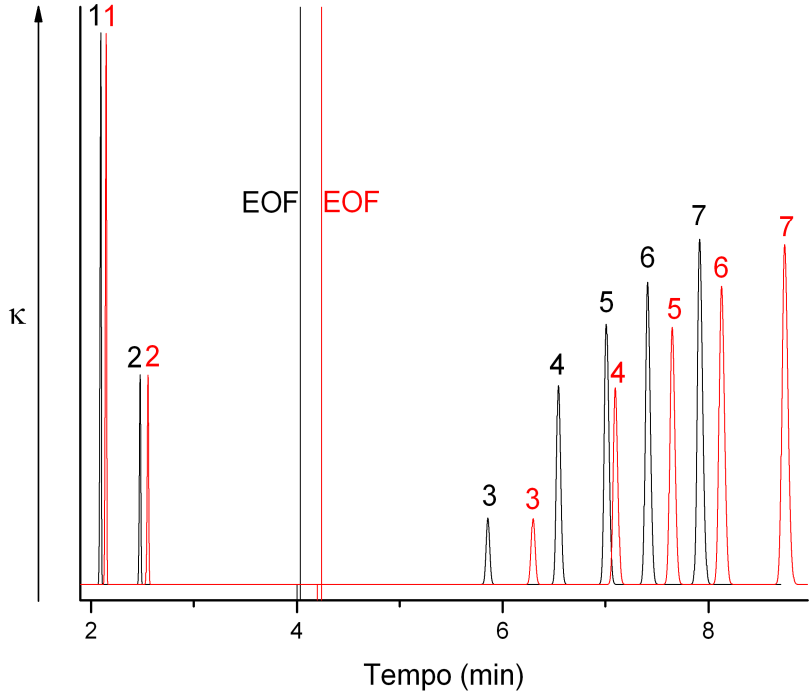


Figura 2. Simulação de separação eletroforética de amostra contendo os cátions 1-potássio e 2-sódio, EOF e ânions 3-MES, 4-butirato, 5-propionato, 6-glioxilato e 7-acetato. A curva em vermelho representa a mesma separação em condição de aumento de 5 % no tempo de migração do marcador de EOF. Os softwares utilizados são descritos na seção 3.2.

Com a variação do tempo de migração do marcador do EOF (4,0 min para 4,2 min), os cátions sódio e potássio, cujo tempo de permanência no capilar é menor, apresentam pouca variação. Já entre os ânions que, na situação de contra-fluxo, permanecem por mais tempo no capilar, aqueles que levam mais tempo para atingir o detector são mais influenciados pela variação da mobilidade do EOF (ex. o tempo de migração do MES variou 7,1 % enquanto que o tempo de migração do acetato variou 9,7 %).

Variações dessa ordem de grandeza na mobilidade do EOF são comuns durante a análise de matrizes complexas ricas em proteínas ou outras macromoléculas. Esse material atua de maneira semelhante aos compostos

utilizados para eliminar o EOF, diminuindo o caráter negativo da superfície de sílica e, por consequência, diminuindo a mobilidade do EOF.

1.3.2. Detecção condutométrica sem contato (C^4D)

A C^4D, ou detecção oscilométrica teve suas primeiras aplicações em separações utilizando-se campos elétricos nos anos 80 com os trabalhos de Gaš *et al.* [39, 40] e Vacik *et al.* [41] e não houve grandes desenvolvimentos na área até o final dos anos 90, quando sua aplicação foi proposta de maneira independente por Zemann *et al.* [42] e Fracassi da Silva e do Lago [43] para utilização em conjunto com eletroforese capilar de zona.

A C^4D aplicada à CE consiste na emissão de um sinal alternado de alta frequência em um dos dois eletrodos posicionados no capilar. O sinal, que pode apresentar sua amplitude atenuada ou amplificada pela solução interior ao capilar, é medido no segundo eletrodo. O arranjo dos eletrodos em um detector do tipo C^4D está ilustrado na Figura 3.

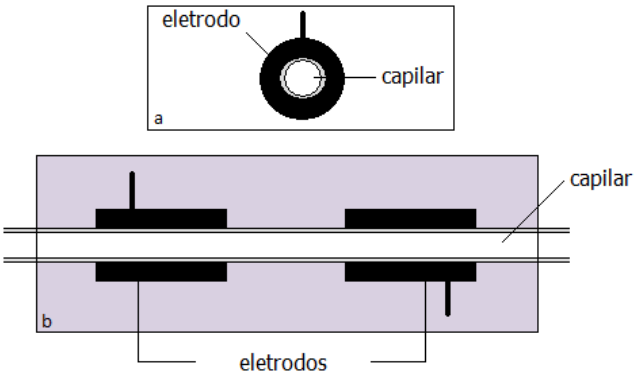


Figura 3. Esquema simplificado sem escala do posicionamento dos dois eletrodos no capilar em um detector condutométrico sem contato. A visão frontal do sistema (a) permite reconhecer a geometria cilíndrica do eletrodo em torno do capilar, enquanto que a visão de corte (b) permite uma noção do distanciamento entre os dois eletrodos (0,5 mm). Os pinos que se projetam para fora do eletrodo representam seus terminais elétricos.

A corrente resultante que passa pela célula é detectada pelo segundo eletrodo, ampliada, retificada e medida. Dado que a corrente é uma função da admitância e que o capilar está preenchido por uma solução eletrolítica, a admitância medida é uma função da condutância na região entre os eletrodos [43]. A alta frequência aplicada reduz a impedância do capilar, permitindo que as variações de condutividade possam ser observadas mesmo com os detectores posicionados externamente ao capilar, sem contato com a solução.

Esse arranjo apresenta como vantagem a prevenção da contaminação e do desgaste dos eletrodos, a eliminação da interferência dos altos potenciais utilizados na separação e a facilidade de posicionamento do capilar.

A C^4D se mostrou eficaz na detecção de diversos íons não complexos em matrizes como água de chuva [44], plasma sanguíneo [45], álcool combustível [46] e mesmo para espécies normalmente não analisadas por CE, como ácidos graxos [47], mono e dissacarídeos [48], álcoois alifáticos [49], entre outros. Técnicas como Cromatografia Eletrocinética Micelar [48] e Eletroforese Capilar em Meio Não-Aquoso [50] também podem ser realizadas utilizando-se detecção C^4D.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal demonstrar a presença de monoetil carbonato em amostras reais de bebidas alcoólicas carbonatadas – estudo esse que, pelo nosso conhecimento, ainda não foi realizado e apresenta um aspecto novo da química desses alimentos. Outros objetivos incluem a obtenção da ordem de grandeza da concentração do monoetil carbonato nessas bebidas, bem como o estudo da influência do pH desses sistemas na formação e na hidrólise dessa espécie.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. No preparo de soluções estoque e de trabalho, foi utilizada água deionizada 18 MΩ.cm (Barnstead/Thermolyne, EUA).

A lista de reagentes utilizados (em ordem alfabética) e suas procedências encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Reagentes utilizados e procedência

Ácido 2-(n-ciclohexilamino) etano sulfônico “CHES”	Sigma-Aldrich (EUA)
Ácido 2-(n-morfolino)etano sulfônico “MES”	Sigma-Aldrich (EUA)
Ácido acético (sal de sódio)	Merck (Alemanha)
Ácido benzeno sulfônico (sal de sódio)	Eastman (EUA)
Ácido butírico (sal de sódio)	Sigma-Aldrich (EUA)
Ácido clorídrico	Merck (Alemanha)
Ácido glioxílico	Sigma-Aldrich (EUA)

Ácido lático (sal de lítio)	Sigma-Aldrich (EUA)
Ácido oxálico	Sigma-Aldrich (EUA)
Ácido propiônico (sal de sódio)	Sigma-Aldrich (EUA)
Ácido salicílico	Riedel-de Haen (Suíça)
Ácido tricloroacético	Sigma-Aldrich (EUA)
Amberlite IR-120	Merck (Alemanha)
Bicarbonato de sódio	Merck (Alemanha)
Dietil carbonato	Sigma-Aldrich (EUA)
Etanol absoluto	Merck (Alemanha)
Hidróxido de lítio mono-hidratado	Sigma-Aldrich (EUA)

Testes prévios mostraram condições ótimas de separação utilizando-se Li/CHES 20 mmol.L^{-1} com pH entre 9,0 e 9,5, assim como maior sensibilidade para o analito quando comparado com eletrólito CO_3^{2-}/HCO_3^- previamente empregado para análises de MEC [16]. Dessa forma, o eletrólito de corrida utilizado durante os estudos, exceto quando especificado, foi Li/CHES preparado a partir de uma solução 20 mmol.L^{-1} de CHES. A massa de CHES necessária para o preparo foi transferida para um balão volumétrico, ao qual se adicionou água deionizada até atingir 80% do seu volume. Ajustou-se o pH a 9,5 com hidróxido de lítio e o volume do balão volumétrico foi completado. A solução de Li/CHES foi armazenada em refrigerador, sendo substituída semanalmente.

Solução concentrada de MEC foi obtida pela adição de 1 g de bicarbonato de sódio a 10 mL de etanol absoluto. Duas horas após o preparo, a solução foi filtrada com filtro de papel para remoção do excesso de bicarbonato de sódio sólido. Foi realizado um preparo dessa solução para cada dia de experimento.

A resina catiônica Amberlite IR 120 foi condicionada por lavagem com ácido clorídrico 1 mol.L^{-1}. O material foi recuperado por filtração e lavado diversas vezes com água deionizada até atingir pH próximo de 7.

O preparo das soluções utilizadas no estudo da formação de MEC em diferentes condições de pH envolveu três etapas e partiu de soluções (20 mmol.L^{-1} de bicarbonato de sódio + 2 mmol.L^{-1} de butirato de sódio – empregado como padrão interno) e 100 mmol.L^{-1} de ácido oxálico, como descrito a seguir:

1. pH ~ 8

Solução 1: 500 µL água deionizada + 500 µL etanol puro

Solução 2: 500 µL Solução 2 + 500 µL butirato/bicarbonato de sódio

2. pH ~ 4

Solução 1: 280 µL ácido oxálico + 720 µL água deionizada

Solução 2: 500 µL Solução 1 + 500 µL etanol puro

Solução 3: 500 µL Solução 2 + 500 µL butirato/bicarbonato de sódio

As soluções 0,1 mol.L^{-1} de ácidos carboxílicos e MES foram preparadas diretamente a partir dos reagentes e armazenadas em refrigerador, sendo substituídas semanalmente.

3.2. Instrumentação e software

O equipamento de eletroforese capilar utilizado durante os estudos presentes foi desenvolvido pelo Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA,

IQ–USP) e conta com uma fonte bipolar de alta voltagem, controle termostático e dois detectores condutométricos sem contato (C^4D), posicionados a aproximadamente 10 cm de cada uma das extremidades do capilar. Os detalhes a respeito do desenvolvimento do sistema de eletroforese capilar fora descrito previamente por Saito *et al.* [51], bem como certos detalhes sobre os detectores C^4D [52-54], sendo que os detectores utilizados, especificamente, são descritos em [55].

Durante os estudos foram utilizados capilares de sílica fundida (Agilent, EUA) de 80 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, exceto quando especificado. O condicionamento dos capilares foi realizado em três etapas. Primeiramente, se deu a passagem de solução de hidróxido de sódio 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ por 5 min, seguida por 5 min de água deionizada e, por fim, 10 min com o eletrólito de corrida. Para os experimentos com cervejas e *drinks*, o capilar foi submetido a 2 min de limpeza entre as corridas eletroforéticas com hidróxido de sódio 0,1 $mol.L^{-1}$. Todos os procedimentos de limpeza foram realizados com passagem de solução por diferencial de pressão (- 73 kPa na saída do capilar).

Os experimentos foram realizados com o primeiro e o segundo detectores posicionados a 10 cm e 70 cm do ponto de injeção, respectivamente. Exceto quando especificado, a detecção foi realizada no segundo detector. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente pela aplicação constante de 25 kPa, por 1 s, no recipiente contendo a amostra. O ambiente contendo o capilar foi mantido a 20 ºC durante todo o experimento.

As medidas de pH foram realizadas a partir de um pHmetro modelo 827 pH lab (Metrohm, Suíça) com eletrodo de vidro combinado calibrado diariamente para a faixa de pH a ser utilizada.

O software PeakMaster, desenvolvido por Gaš *et al.*, foi utilizado para a previsão dos perfis eletroforéticos de alguns dos experimentos descritos e como fonte de dados para as simulações. Detalhes a respeito das funções disponíveis e dos algoritmos utilizados para os cálculos podem ser encontrados no site do Grupo de Pesquisa de Processos de Separação Envolvendo Eletromigração [56].

A ferramenta Microcal OriginPro 7.5 foi utilizada para tratamento dos dados brutos, bem como para a obtenção e exportação dos gráficos apresentados.

3.3. Métodos

Nos experimentos envolvendo amostras reais, as mobilidades efetivas das espécies foram ajustadas para uma mesma condição de mobilidade de EOF e potencial, dentro de cada experimento, segundo procedimento descrito em literatura para padronização de eletroferogramas [57]. Tal procedimento tem como objetivo a correção das variações nos tempos de migração das espécies devido à adsorção de conteúdo proteico na parede interna do capilar.

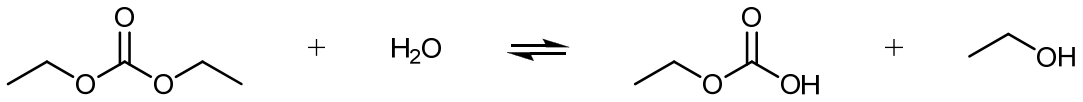
Os eletroferogramas obtidos para os estudos com o vinho espumante e os *drinks* foram tratados por algoritmo de suavização gaussiana com janela de 0,75 s e, posteriormente, com filtro de mediana móvel com janela de 3 pontos [58]. A aplicação dos dois filtros teve como objetivo a redução do ruído bem como a eliminação de sinais esporádicos induzidos no detector devido à fuga de alta tensão da fonte utilizada na separação.

4. Resultados e discussão

4.1. Identificação de MEC

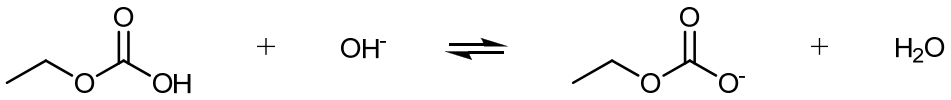
4.1.1. Estratégia de identificação – Hidrólise do DEC

Como descrito anteriormente, os ácidos alquil carbônicos podem ser vistos como produtos da hidrólise parcial de OCs. O ácido etil carbônico é, então, formado na primeira etapa de hidrólise do DEC, reação representada pela equação a seguir:



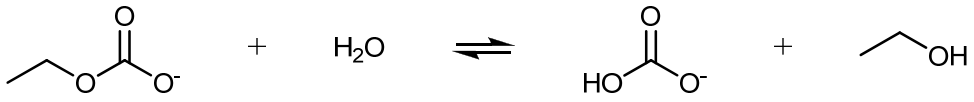
Reação 4. Equilíbrio de hidrólise parcial do DEC com a formação de ácido etil carbônico e etanol.

Em meio básico o ácido etil carbônico encontra-se em sua forma aniônica, o MEC, espécie de interesse do presente trabalho:



Reação 5. Equilíbrio de desprotonação do ácido etil carbônico, com a formação de MEC e água.

O MEC, por sua vez, sofre hidrólise, culminando na formação de bicarbonato e etanol:



Reação 6. Etapa final da hidrólise do DEC. O MEC, produto da primeira etapa, é hidrolisado, com a formação de bicarbonato e etanol.

Com a finalidade de se verificar o processo descrito, preparou-se uma solução de DEC 100 mmol.L^{-1} em hidróxido de lítio 0,1 mmol.L^{-1} para a promoção de sua hidrólise em meio básico. A reação foi monitorada por corridas consecutivas em CE-C^{4}D, no detector mais próximo do ponto de injeção (primeiro detector), desde o momento da preparação da solução até 80 min.

Os eletroferogramas obtidos (Figura 4) foram submetidos a um processo de ajuste de linha de base e suavização utilizando-se algoritmo de média móvel com cinco pontos.

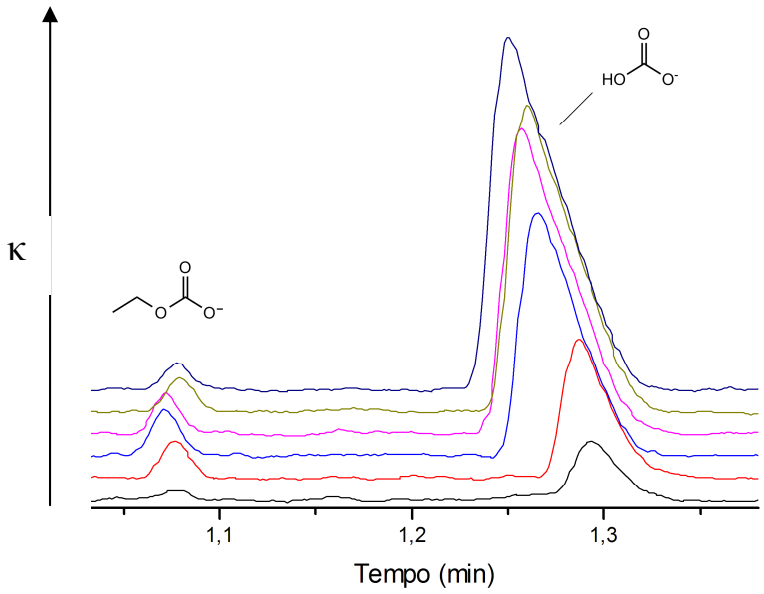


Figura 4. Composição de eletroferogramas de solução 100 mmol.L^{-1} de DEC. O tempo decorrido a partir do preparo da solução é 0, 14 min, 25 min, 36 min, 58 min e 80 min, da curva inferior à superior, respectivamente.Os tempos de migração são referentes ao primeiro detector.

Pode-se verificar um aumento da concentração de MEC durante os primeiros 25 min, produto da primeira etapa da hidrólise do DEC. A partir desse momento ocorre a diminuição da concentração dessa espécie devido à segunda etapa da hidrólise, responsável pela quebra do MEC e a formação de bicarbonato. Como os dois equilíbrios atuam simultaneamente, a existência de ambas as espécies logo na primeira corrida analítica pode ser notada. O resultado sugere, inclusive, que a velocidade da segunda etapa da hidrólise é maior do que a da inicial, motivo pelo qual o aumento da área do pico correspondente ao bicarbonato é proporcionalmente maior do que a diminuição do pico correspondente ao MEC.O sinal relativo ao DEC não pode ser verificado por se tratar de uma espécie neutra e não ter resolução em relação às outras que são arrastadas pelo EOF.

O *spiking* da solução de DEC estudada com solução saturada de bicarbonato de sódio em etanol anidro promove o aumento da relação entre as áreas do primeiro e do segundo pico (Figura 5), sugerindo que há formação natural de monoetil carbonato em ambas – no primeiro caso a partir da hidrólise do DEC e no segundo a partir da reação entre álcool e bicarbonato.

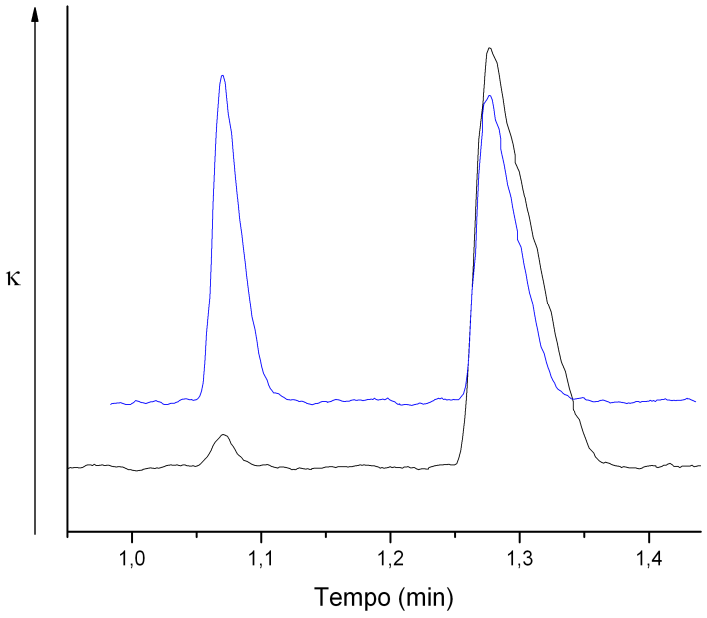


Figura 5. Eletroferogramas de solução de DEC – 80 min a partir do momento da preparação (curva em preto) e de solução de DEC – 80 min a partir do momento de preparação – após *spiking* com solução saturada de bicarbonato de sódio em etanol anidro (curva em azul). Os tempos de migração são referentes ao primeiro detector.

Tais resultados foram obtidos anteriormente para sistema similar, embora utilizando-se reversor de fluxo e maior distância entre o ponto de injeção e o ponto de detecção [59]. O experimento foi reproduzido para fins de confirmação e contribui para a clareza do presente trabalho.

O *spiking* das amostras reais com solução saturada de bicarbonato em etanol, cujas evidências apontam ser concentrada em MEC, foi uma das estratégias utilizadas para a identificação do pico do MEC nos experimentos subsequentes.

4.1.2. Identificação do MEC em amostras de cerveja

A presença de etanol e do ânion bicarbonato, provenientes dos processos de fermentação e gaseificação, torna a cerveja um meio naturalmente propício à

formação de MEC. A identificação do MEC em meio às diversas espécies aniônicas presentes na amostra pode ser realizada por CE-C^4D sem a necessidade de tratamento prévio da amostra.

Duas estratégias diferentes foram utilizadas para indicar a presença de MEC na amostra estudada: *spiking* com analito e remoção de bicarbonato. A primeira delas permite a identificação do pico correspondente ao MEC por aumentar a relação entre a área de pico do analito e das outras espécies presentes. A segunda, por sua vez, age no sentido contrário. A remoção de bicarbonato da amostra faz com que o equilíbrio seja deslocado na direção de formação do bicarbonato, reduzindo assim a concentração de MEC na amostra e, consequentemente, a área do pico. Na situação ideal, em que todo o bicarbonato é removido da amostra, o pico correspondente ao MEC deveria desaparecer.

Apesar da impossibilidade de se preparar uma solução padrão do analito, a formação de MEC a partir de soluções alcoólicas de bicarbonato de sódio já foi evidenciada por estudos anteriores e corroborada pelo experimento sobre a formação de MEC a partir da hidrólise de DEC apresentado na seção anterior. Dessa forma, uma solução saturada de bicarbonato de sódio em etanol foi utilizada para a execução do *spiking*. É importante ressaltar o fato de que o preparo dessa solução deve ser realizado com pelo menos 45 minutos de antecedência, para que a concentração de MEC atinja níveis detectáveis após sua adição à amostra [16].

A remoção do bicarbonato de uma amostra pode ser realizada prontamente a partir de sua acidificação, levando à formação de ácido carbônico que, por sua vez, decompõe-se em água e gás carbônico, que se desprende do sistema.

Dado que o estudo foi realizado a partir da técnica de CE, deve-se considerar que um aumento de força iônica da amostra pode levar a consequências

indesejáveis no processo de separação, de modo que a utilização de ácidos fortes (ex. ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico), que geram espécies de alta mobilidade, deve ser desencorajada. Alguns ácidos fracos, como o ácido acético, propiônico ou butírico, ionizam-se em água, formando ânions cujos tempos de migração são relativamente próximos do tempo de migração do analito, podendo ocorrer co-migração ou dificultar a avaliação do eletroferograma, além de também contribuírem significativamente para o aumento da força iônica do meio.

Uma alternativa viável é a utilização de uma resina catiônica. A troca de cátions presentes na matriz por cátions H_3O^+ promoveria a remoção do bicarbonato, sendo posteriormente retirada do sistema sem que houvesse a adição de ânions. Além disso, o efeito sobre a força iônica provocado pela acidificação do meio seria amenizado pela retirada de cátions de menor mobilidade em igual proporção.

O experimento foi conduzido na situação de contra-fluxo que, embora eleve o tempo de análise, procura evitar uma possível interação dos componentes da cerveja com o tensoativo utilizado para a reversão do fluxo eletrosmótico. O aumento da janela de separação também apresenta grande importância nessa análise, dado o número de espécies presentes com mobilidades próximas à do analito.

Os eletroferogramas da Figura 6 evidenciam o efeito das duas estratégias discutidas anteriormente.

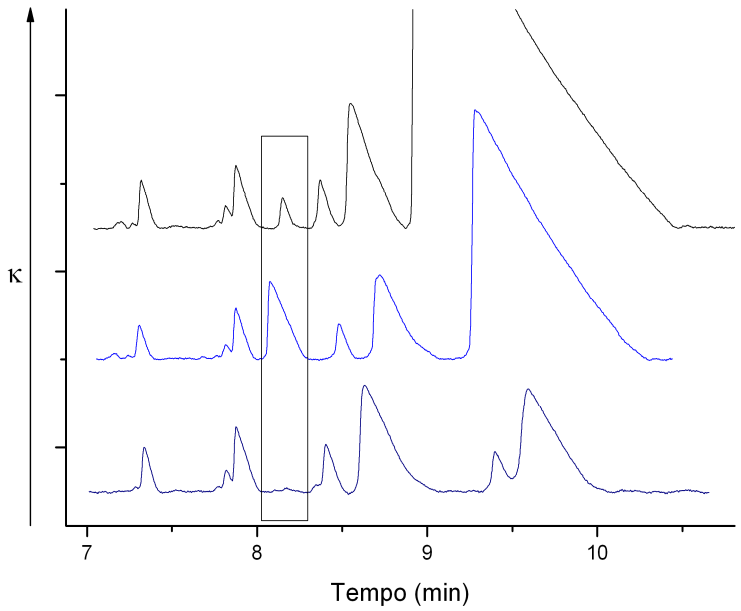


Figura 6. Eletroferogramas obtidos para amostras de uma mesma cerveja nas situações: (a) *in natura*, (b) após *spiking* com solução concentrada de MEC e (c) após tratamento com resina catiônica Amberlite IR 120. A região marcada corresponde à janela esperada para a saída do MEC.

Os resultados, quando analisados à luz dos estudos anteriores e dos aspectos discutidos anteriormente no presente trabalho, tornam evidente a presença de MEC nas amostras de cerveja estudadas.

A região dos eletroferogramas 7a e 7b antes ocupadas pelo pico correspondente ao bicarbonato (pico de maior área) passam a apresentar dois picos de menor área, como mostra o eletroferograma 7c. Esse resultado pode indicar que houve a remoção total do bicarbonato, revelando outras duas espécies comigrantes, ou a remoção parcial, sendo um dos picos remanescentes o sinal do bicarbonato restante. De qualquer forma, o eletroferograma 7c mostra que, independentemente da quantidade de bicarbonato presente na amostra, houve o desaparecimento do sinal do MEC. Esse resultado é importante do ponto de vista quantitativo, dado que mostra a inexistência de possíveis espécies que comigrem com o analito.

4.1.3. Identificação de MEC em vinhos espumantes

Os vinhos espumantes também são fortes candidatos à formação de MEC dado que, assim como as cervejas, também apresentam bicarbonato e etanol em sua composição.

Apesar disso, os resultados de CE-C^4D obtidos para amostras dessas bebidas não foram conclusivos. Foi verificada a presença de uma ou mais espécies com mobilidades próximas à mobilidade do MEC, que apesar do formato do pico apresentar semelhança, o tempo de migração sugere não ser o bicarbonato. Devido ao fenômeno de eletrodispersão – distorção do pico devido à diferença de condutividade entre a região ocupada pela amostra e o eletrólito de corrida – o alargamento dos picos faz com que toda a região do eletroferograma onde se verificaria o pico correspondente ao MEC seja encoberta.

As duas abordagens de identificação discutidas no caso das cervejas foram utilizadas: *spiking* com solução concentrada de MEC e tratamento com resina catiônica. Os resultados (Figura 7) sugerem que a elevação presente na cauda do pico (t_m = 7,3 min) pode estar relacionada com a presença de MEC.

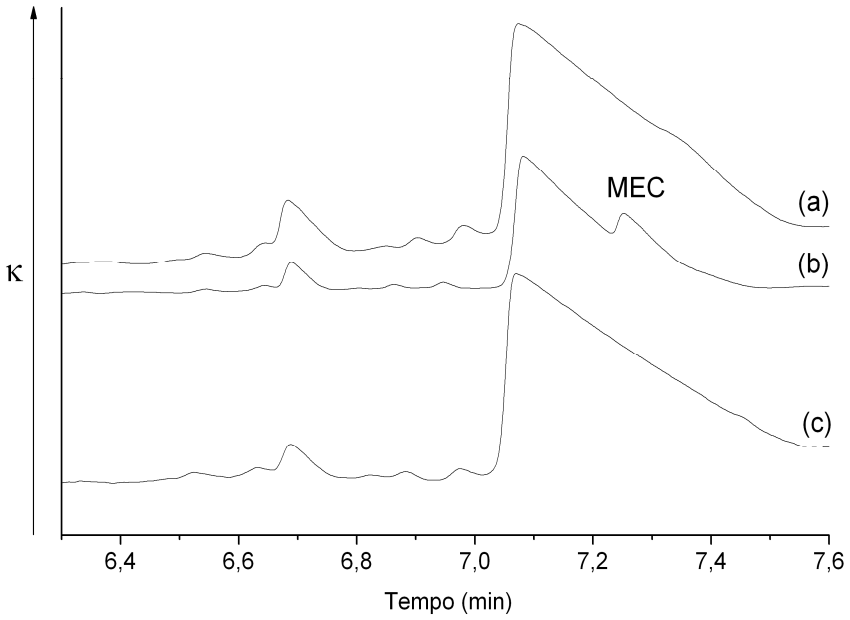


Figura 7. Eletroferogramas de três amostras do mesmo vinho espumante: (a) *in natura*, (b) mistura com solução concentrada de MEC (1:1; v/v) e (c) amostra após tratamento com resina catiônica. A pequena elevação em 7,3 min que aumenta com a mistura e diminui após o tratamento com resina catiônica pode estar relacionada à presença de MEC.

Pode-se argumentar que as condições eletroforéticas utilizadas não foram otimizadas para se obter a separação entre o MEC e seus interferentes de matriz. Deve-se, no entanto, levar em consideração o fato de que o MEC é uma espécie instável, o que restringe o número de abordagens que podem ser utilizadas para conseguir melhores resultados. Sendo assim, apesar das incertezas, os resultados apresentados são as melhores evidências da presença de MEC em vinhos espumantes.

4.1.4. Identificação de MEC em *drinks*

Os estudos sobre formação direta de MEC a partir da mistura entre etanol e bicarbonato sugerem a possibilidade de que essa espécie também se forme em sistemas binários envolvendo uma bebida alcoólica (fonte de etanol) e uma bebida carbonatada ou refrigerante (fonte de bicarbonato).

Sistemas como esses são amplamente consumidos na forma de *drinks* e recebem os mais variados nomes. Entre essas misturas estão o *whisky* com *club soda*, o *gin* com água tônica e o rum com refrigerante de cola.

Essas bebidas alcoólicas destiladas constituem matrizes simples do ponto de vista da CE-C^4D. Pode ser verificado nos eletroferogramas a diante (Figura 8, Figura 9, Figura 10) a pequena quantidade (ou até mesmo a ausência) de ânions cuja mobilidade seja próxima à do MEC, diferentemente da cerveja.

A maior concentração de etanol nesses sistemas – quando comparado com as cervejas – sugere que uma maior quantidade de MEC seria formada, levando-se em conta o deslocamento do equilíbrio da formação de MEC no sentido da formação dos produtos.

Com o objetivo de se verificar a hipótese de formação de MEC nos três sistemas supracitados, misturas binárias na proporção 1:1 (bebida alcoólica : bebida carbonatada; v/v) foram submetidas à análise por CE-C^4D logo após o momento de sua preparação. Os resultados obtidos podem ser visualizados nos eletroferogramas a seguir (Figura 8, Figura 9 e Figura 10):

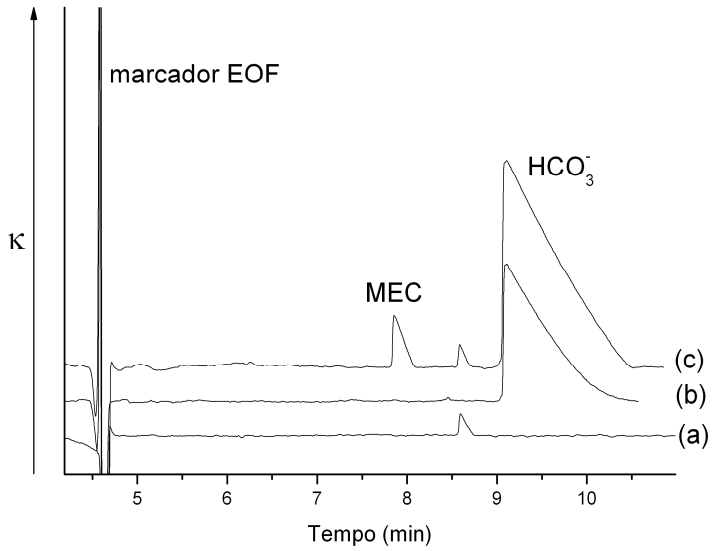


Figura 8. Eletroferogramas de(a) *whisky*, (b) *club soda* e (c) mistura 1:1 (v/v) das duas bebidas.

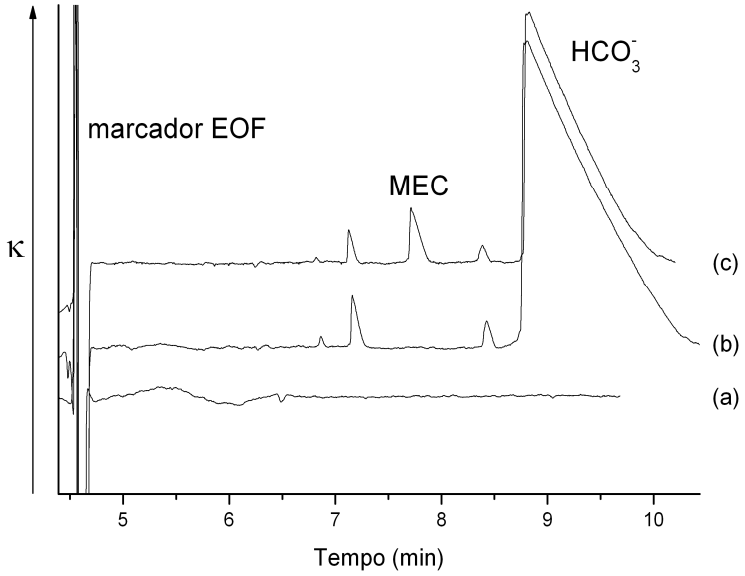


Figura 9. Eletroferogramas de (a) *gin*, (b) água tônica e (c) mistura 1:1 (v/v) das duas bebidas.

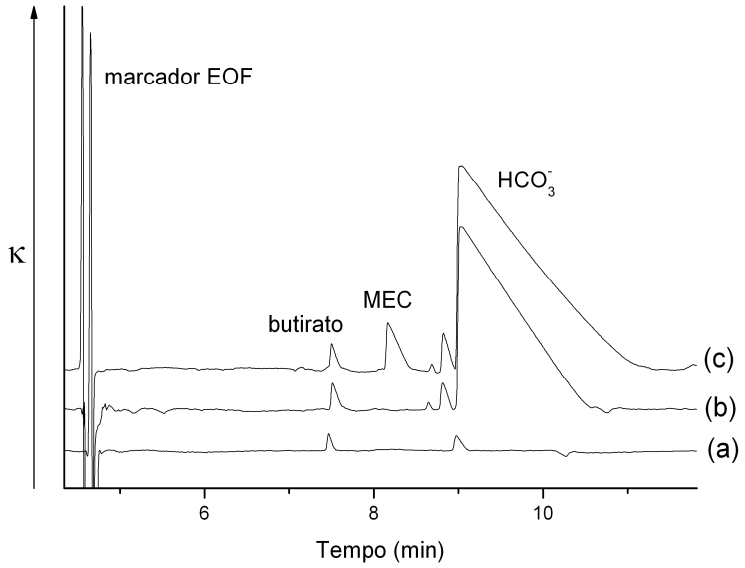


Figura 10. Eletroferogramas de (a) rum, (b) refrigerante de cola e (c) mistura 1:1 (v/v) das duas bebidas. O butirato não está presente nas bebidas e foi adicionado como padrão interno.

Os eletroferogramas mostram o aparecimento de uma nova espécie, que pode ser atribuída ao MEC por *spiking* com solução concentrada do composto.

Verificou-se também que, diferentemente dos resultados obtidos em estudos anteriores, houve a formação de quantidades apreciáveis de MEC logo após o preparo da mistura binária. A possibilidade da existência de um processo catalítico promovido por algum dos componentes presentes nos *drinks* levou à realização de novos experimentos, descritos em detalhes na seção 4.3.

4.2. Determinação de MEC

4.2.1. Fundamentos

Como já discutido, o MEC é uma espécie instável. Sua determinação por calibração direta a partir de uma solução padrão do composto não é uma estratégia viável, devido ao processo de hidrólise, que se daria desde o momento da preparação das soluções até o momento de sua detecção.

Sabe-se, no entanto, que para espécies monovalentes a sensibilidade do detector condutométrico ($d\kappa/dc_A$), pode ser descrita pela Equação 2 [52, 60]:

$$\frac{d\kappa}{dc_A} = \frac{(\mu_A - \mu_S)(\mu_A + \mu_O)}{\mu_A} F \qquad (2)$$

Sendo μ_A, μ_S e μ_O ($cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) as mobilidades do analito, seu co-íon e o seu contra-íon, respectivamente e F a constante de Faraday.

A escolha do eletrólito de corrida utilizado durante o presente trabalho tem como fundamento os conceitos expressos pela equação anterior. A grande diferença entre as mobilidades eletroforéticas do MEC e do CHES (seu co-íon, presente no

eletrólito) é responsável por promover um ganho na sensibilidade quando comparado, por exemplo, com o tampão carbonato.

O valor $d\kappa/dc_A$ está diretamente relacionado com a altura do pico obtido para o analito. A área do pico, no entanto, leva em conta fatores que contribuem para o formato do pico, como a eletrodispersão, a mobilidade e o campo elétrico envolvido na separação (representados pela constante *g* na Equação 3).

O fator de resposta ($k_{a,pi}$) é a razão entre a sensibilidade do analito (*a*) e do padrão interno (*pi*). Dessa forma, o fator de resposta calculado em função das áreas dos picos pode ser calculado pela Equação 3:

$$k_{a,pi} = \frac{g_A \mu_{pi}(\mu_A - \mu_S)(\mu_A + \mu_O)}{g_{pi}\mu_A(\mu_{pi} - \mu_S)(\mu_{pi} + \mu_O)} F \qquad (3)$$

Como mostra a Equação 3, o fator de resposta está inteiramente relacionado com as mobilidades das espécies presentes na análise. Esse fato sugere que quaisquer espécies que apresentam valores de mobilidade e fatores dispersivos (*g*) iguais à mobilidade do MEC apresentam o mesmo fator de resposta e, portanto, podem ser utilizados como padrões de calibração.

A busca por uma espécie cuja mobilidade seja exatamente igual à do MEC não constitui uma tarefa trivial, no entanto. Apesar disso, uma análise gráfica da Equação 2 (e, consequentemente, Equação 3) mostra que, para intervalos pequenos de mobilidade (próximas à mobilidade do MEC), a sensibilidade do detector apresenta caráter linear (R^2 = 0,999) (Figura 11). A unidade de mobilidade Ti (Tiselius) corresponde a $10^{-5}.cm^2.V^{-1}.s^{-1}$.

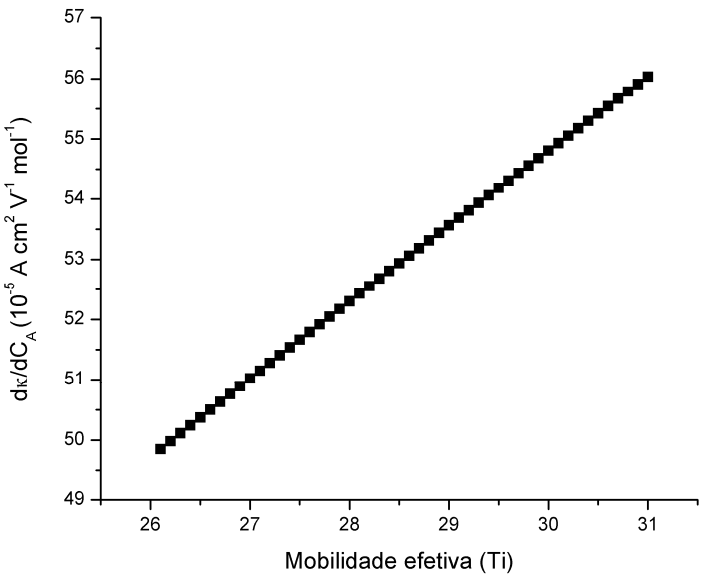


Figura 11. Cálculo teórico para a sensibilidade do detector ($d\kappa/dC_A$) em função do módulo da mobilidade eletroforética para um pequeno intervalo de mobilidades. Os cálculos foram realizados levando-se em conta o sistema utilizado: eletrólito Li/CHES 20 mM, pH 9,5, com as mobilidades do co-íon e do contra-íon corrigidas para a força iônica do sistema pelo software Peakmaster.

Sabe-se que alguns carboxilatos e sulfonatos, espécies estáveis nas condições de estudo, apresentam mobilidades próximas à do MEC. A curva de fatores de resposta em função das mobilidades dessas espécies pode ser utilizada para a obtenção do fator de resposta do MEC por interpolação.

Diversas espécies foram testadas com a finalidade de servirem ao propósito descrito anteriormente. Cinco delas foram selecionadas para a montagem da curva: MES, butirato, propionato, glioxilato e acetato. O butirato foi adotado como padrão interno. A Figura 12 mostra a curva obtida. Os pontos são acompanhados pela representação gráfica das incertezas (n = 5).

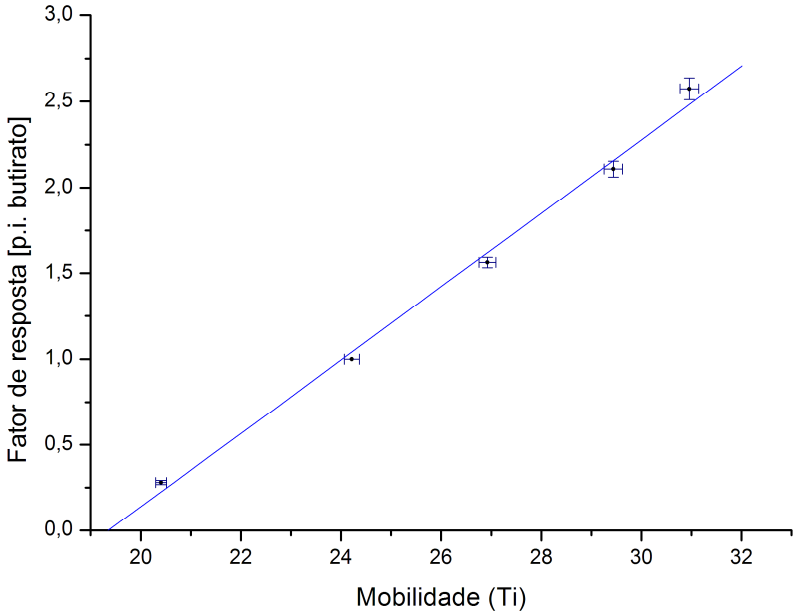


Figura 12. Fator de resposta (referentes ao butirato) das espécies MES, butirato, propionato, glioxilato e acetato, respectivamente. A curva ajustada por regressão linear apresentou coeficiente R^2 = 0,997.

A mobilidade do MEC pode ser prontamente obtida a partir das corridas eletroforéticas. Sua interpolação na curva anterior resulta em um valor de fator de resposta da espécie em função do padrão interno utilizado. Dadas as áreas dos picos das espécies envolvidas (analito e padrão interno) e a concentração do padrão interno, obtém-se a concentração de MEC a partir da definição de fator de resposta (Equação 4).

$$\frac{A_a}{A_{pi}} = k_{a,pi}\frac{C_a}{C_{pi}} \qquad (4)$$

4.2.2. Avaliação do método

O método de quantificação descrito acima foi verificado a partir da determinação do tricloroacetato (TCA) em uma solução padrão. Sua concentração

foi determinada por titulometria de neutralização com hidróxido de sódio (n = 3) e corresponde a (0,1008 ± 0,0001) mol.L^{-1}.

A mobilidade eletroforética do TCA foi determinada experimentalmente a partir da média entre três corridas analíticas. O perfil obtido encontra-se a seguir (Figura 13).

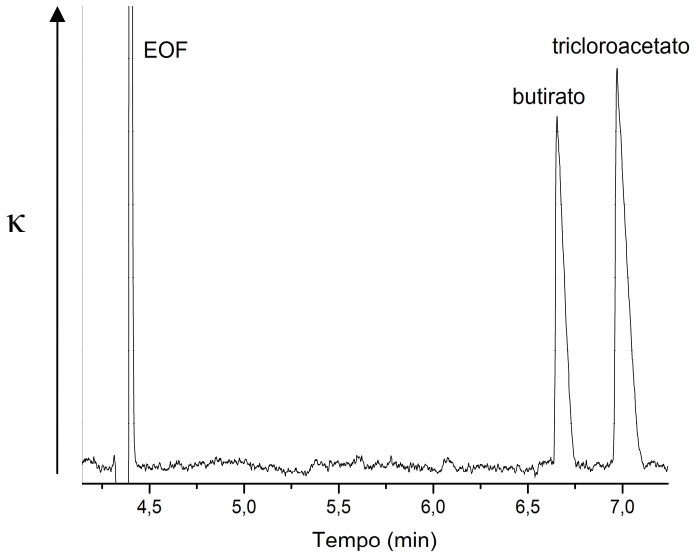


Figura 13. Eletroferograma obtido para solução 1 mM de ácido tricloroacético. O TCA é a espécie aniônica mais rápida (t_m = 6,97 min). Os picos em t_m = 2,82 min e t_m = 6,66 min correspondem, respectivamente, ao sódio e ao butirato, adicionado como padrão interno.

Para a calibração do detector foram realizadas cinco corridas analíticas de soluções padrão das cinco espécies citadas anteriormente. A curva dos fatores de resposta de cada espécie em função das suas mobilidades (Figura 14) foi utilizada para a interpolação da mobilidade do TCA.

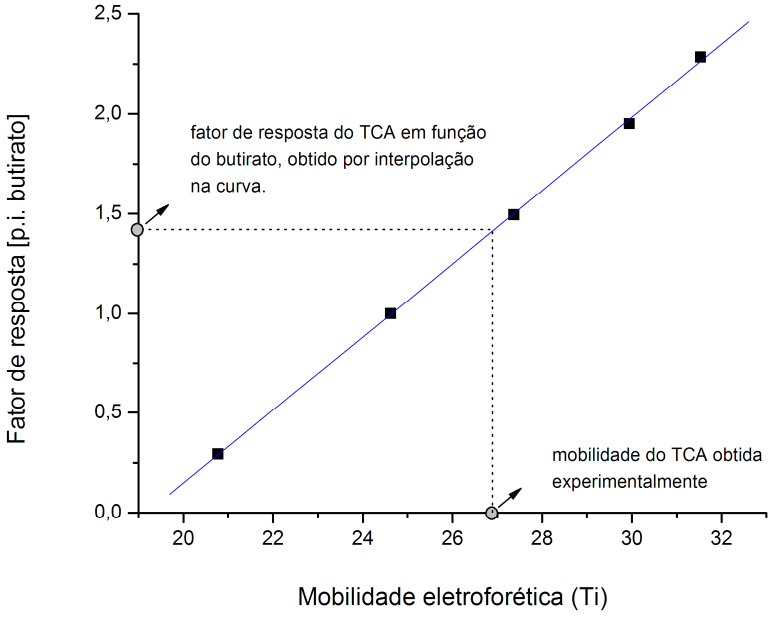


Figura 14. Curva de calibração do detector para interpolação da mobilidade do TCA. A curva ajustada por regressão linear apresenta coeficiente de correlação R^2 = 0,999. O fator de resposta, obtido dessa forma, permite o cálculo da concentração da espécie na amostra.

De acordo com a Equação 4, vale a relação:

$$\frac{A_{TCA}}{A_{but}} = k_{TCA,but}\frac{C_{TCA}}{C_{but}} \qquad (5)$$

A concentração do TCA (Equação 6) pode ser obtida diretamente a partir do rearranjo dos membros da Equação 5:

$$C_{TCA} = \frac{C_{but}A_{TCA}}{A_{but}k_{TCA,but}} \qquad (6)$$

O valor obtido por CE-C^4D com calibração indireta para C_{TCA} foi de (0,102 ± 0,003) mol.L^{-1}, mostrando forte correspondência com o resultado obtido por

titulometria. As médias se mostraram comparáveis de acordo com o teste t de Student com 95 % de confiança.

O método de quantificação descrito foi utilizado para a estimativa das concentrações de MEC em diversas bebidas alcoólicas carbonatadas.

4.2.3. Determinação de MEC em amostras de cerveja

A concentração de MEC em amostras de cerveja varia de acordo com diversos fatores, dentre eles a quantidade de álcool e bicarbonato presentes (que não é constante entre fabricantes ou mesmo entre lotes diferentes do mesmo fabricante). O desprendimento de CO_2 que ocorre continuamente após a abertura da lata também dificulta a obtenção de uma concentração exata da espécie, dado que a cada corrida analítica sua concentração tende a ser menor. Outro fator se deve ao processamento da amostra de cerveja. A grande quantidade de bolhas compromete a obtenção de medidas volumétricas.

Apesar disso, essa concentração pode ser estimada de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Para esse experimento, o detector C^4D foi calibrado a partir de três corridas eletroforéticas de uma solução 1 $mmol.L^{-1}$dos cinco padrões (MES, butirato, propionato, glioxilato e acetato) de acordo com o procedimento já descrito, imediatamente antes da injeção da amostra.

A curva de calibração obtida foi utilizada para a interpolação da mobilidade eletroforética do MEC presente na cerveja, obtida experimentalmente, como descrito a seguir. O MES foi utilizado como padrão interno na construção da curva e, posteriormente, foi adicionado às amostras de cerveja. Apesar da maior diferença de tempo de migração em relação ao MEC quando comparado com outras espécies (ex. butirato e propionato), o MES não comigra com outros compostos presentes na

cerveja, de modo que o seu sinal pode ser facilmente integrado no eletroferograma (Figura 15).

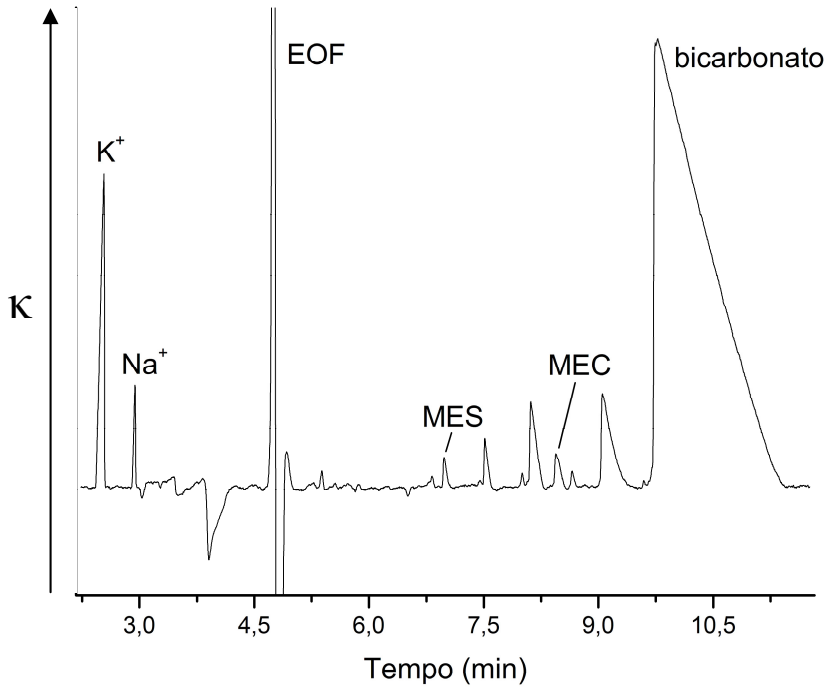


Figura 15. Eletroferograma C^4D de amostra de cerveja *lager*. O MES (t_m = 6,8 min), adicionado para fins quantitativos, não comigra com as outras espécies presentes, apresentando resolução de pico.

Uma amostra de cerveja foi submetida à CE-C^4D logo após a abertura da lata. A mobilidade do MEC proveniente dos eletroferogramas foi interpolada na curva padrão do detector e, com base no fator de resposta obtido, sua concentração foi calculada. A concentração de MEC encontrado em uma amostra de cerveja do tipo *lager* foi de (0,67 ± 0,11) $mmol.L^{-1}$.

Essa concentração é, no entanto, subestimada, devido ao processo de hidrólise que se dá entre o momento da injeção e o de sua passagem pelo detector. Apesar disso, pode-se calcular a concentração de MEC no momento da injeção, de acordo com o procedimento descrito na introdução, utilizando-se a constante de hidrólise obtida anteriormente por Vidal *et al.* [16].

$$k_h = \frac{\ln\left(\frac{[RCO_3{}^-]_1}{[RCO_3{}^-]_2}\right)}{[H_2O](t_2 - t_1)} \quad (7)$$

$$\ln\left(\frac{[RCO_3{}^-]_1}{[RCO_3{}^-]_2}\right) = k_h \cdot [H_2O] \cdot (t_2 - t_1) \quad (8)$$

$$\ln([RCO_3{}^-]_1) - \ln([RCO_3{}^-]_2) = k_h \cdot [H_2O] \cdot (t_2 - t_1) \quad (9)$$

$$\ln([RCO_3{}^-]_1) = k_h \cdot [H_2O] \cdot (t_2 - t_1) + \ln([RCO_3{}^-]_2) \quad (10)$$

$$[RCO_3{}^-]_1 = e^{k_h \cdot [H_2O] \cdot (t_2 - t_1) + \ln([RCO_3{}^-]_2)} \quad (11)$$

Sendo k_h = (1,99± 0,5).10^{-5}L.mol^{-1}.s^{-1}, t_1 o momento da injeção (t = 0), t_2 o momento da detecção (t = 7,3 min) e utilizando-se a razoável aproximação de [H_2O] = 55,5 mol.L^{-1}, obtém-se a concentração inicial de MEC igual à (1,2 ± 0,2) mmol.L^{-1}

Se considerarmos que os 2,5 g.L^{-1} de carbonato total existente na cerveja [28] estejam na forma de ânions bicarbonato, e que a cerveja possui aproximadamente 5 % de etanol (de acordo com o indicado pelo fabricante), pode-se obter uma aproximação da concentração esperada de MEC na cerveja como demonstrado a seguir:

$$K_{eq} = \frac{[CH_3CH_2OCO_2^-][H_2O]}{[CH_3CH_2OH][HCO_3^-]} \quad (12)$$

$$[CH_3CH_2OCO_2^-] = \frac{K_{eq}[CH_3CH_2OH][HCO_3^-]}{[H_2O]} \quad (13)$$

Substituindo-se na Equação 13 os valores declarados anteriormente, após as devidas conversões de unidade, obtém-se uma concentração esperada de MEC de

aproximadamente 1,3 mmol.L^{-1}. Sendo assim, verifica-se uma boa concordância entre o valor esperado e o valor obtido experimentalmente.

Vale ressaltar que a situação real do experimento não permite a obtenção de um valor exato para a concentração de MEC, sendo a contínua perda de CO_2após a abertura da lata um dos principais motivos.

4.2.4. Determinação de MEC em *drinks*

A determinação de MEC em amostras de *drinks* é facilitada em relação à cerveja devido ao menor número de espécies com mobilidades próximas ao MEC presentes na matriz e ao processamento relativamente mais simples das amostras. A alta concentração de etanol, quando comparada com a da cerveja, leva a maiores concentrações de MEC.

Com a finalidade de se obter a concentração de MEC em uma mistura de rum com refrigerante de cola (1:1; v/v), foi realizado um experimento de CE-C^4D logo após a mistura das duas bebidas. A menor complexidade da matriz permitiu o emprego do butirato como padrão interno, espécie cuja mobilidade é mais próxima da mobilidade do MEC quando comparada com o MES.

A amostra apresentou (4,1 ± 0,5) mmol.L^{-1} de MEC após extrapolação da concentração para o ponto de injeção de modo análogo ao realizado na seção anterior para a concentração de MEC em cerveja. Os eletroferogramas obtidos para os outros dois *drinks* (ver seção 4.1.4) sugerem concentração similar de MEC.

4.3. Efeito do pH sobre a formação de MEC

De acordo com resultados prévios a respeito da cinética de formação de MACs [16], são necessários alguns minutos para que a mistura entre etanol e bicarbonato reaja formando concentrações detectáveis de MEC. Apesar disso, os

eletroferogramas discutidos na seção 4.1.4 evidenciam a formação de MEC logo após o preparo do *drink*. Tal fato sugere a existência de um processo catalítico que ocorre nos sistemas estudados, embora não verificado nos sistemas descritos na literatura.

Há relatos na literatura a respeito do efeito catalítico da anidrase carbônica sobre a hidrólise dos MACs [61]. Considerando-se que a anidrase carbônica está presente em todos os seres vivos – animais, vegetais, fungos e bactérias –, a hipótese da existência de um processo enzimático não deve ser prontamente descartada.

Apesar disso, tendo-se em vista que o mesmo efeito catalítico foi verificado nas três misturas binárias, a possibilidade de a catálise se tratar de um processo enzimático é pequena – dado que o conteúdo enzimático possivelmente presente seria diferente para as três bebidas alcoólicas (verificar componentes das bebidas utilizadas na seção 1.2.2).

Os três sistemas compartilham, no entanto, o baixo valor de pH – 4,50, 3,23 e 2,66 para "*whisky* e *club soda*", "*gin* e tônica" e "rum com refrigerante de cola", respectivamente, obtidos por medida direta com o auxílio de um pHmetro.

Com a finalidade de se verificar o efeito do pH sobre a formação de MEC em sistemas envolvendo água, etanol e bicarbonato, duas soluções com diferentes valores de pH foram preparadas e submetidas à CE-C^4D.

O ácido utilizado para o ajuste de pH foi o ácido oxálico, devido ao seu baixo impacto na força iônica da amostra quando comparado com ácidos mais fortes (i.e. ácido clorídrico). Além disso, o produto de sua dissociação é o ânion oxalato, cuja mobilidade eletroforética não compromete a separação dos compostos na região do analito.

Os resultados obtidos (Figura 16) mostram perfis claramente diferentes para a cinética de formação do MEC.

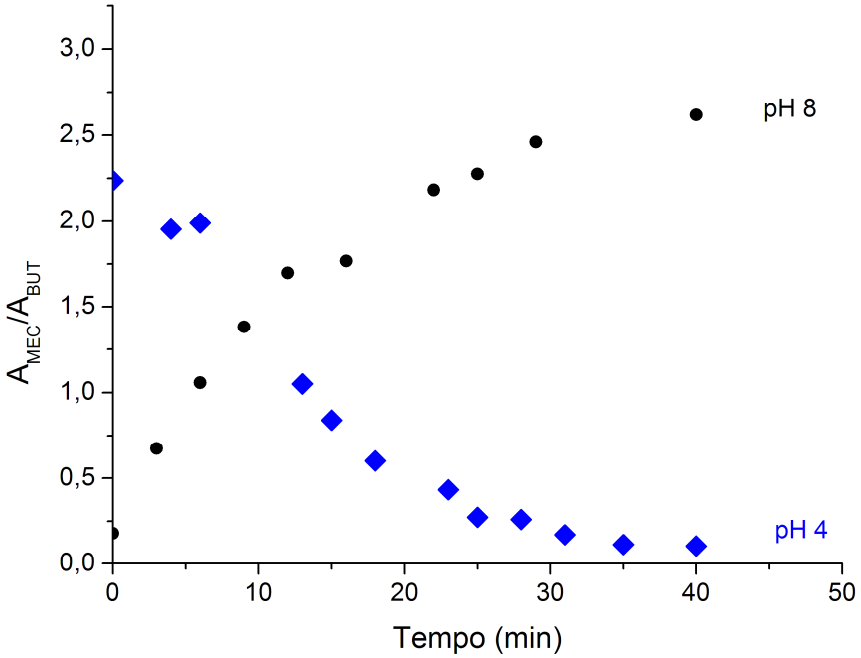


Figura 16. Perfis de formação de MEC a partir de etanol e bicarbonato em sistemas com diferentes valores de pH.

Para o sistema de pH 4 verifica-se uma quantidade substancial de analito logo após o momento da mistura, de maneira similar à verificada na preparação dos *drinks*. Dada a acidez do meio, essa concentração diminui ao longo do tempo, devido à perda de bicarbonato na forma de CO_2. Já em pH 8 observa-se o oposto: logo após a mistura das soluções, a quantidade de MEC existente é baixa e tende a aumentar com a passagem do tempo, até atingir o equilíbrio. Devido ao pH elevado, a perda de bicarbonato é minimizada. Os resultados para esse sistema estão de acordo com os obtidos por Vidal *et al.* [16]para valores mais altos de pH.

A figura abaixo representa os equilíbrios do CO_2 em meio alcoólico/aquoso em função do pH (Figura 17).

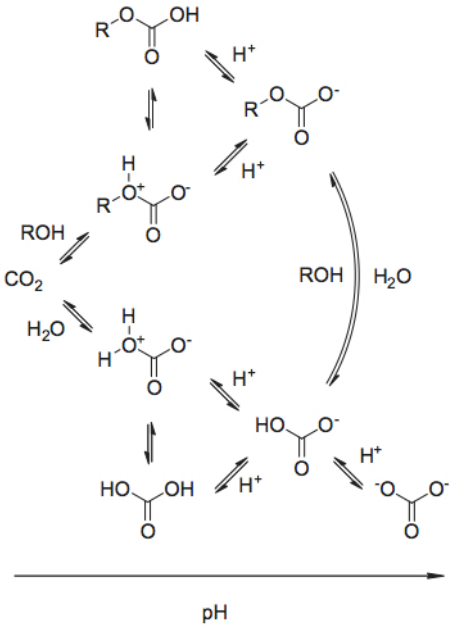


Figura 17. Equilíbrios envolvendo CO_2 em meio alcoólico/aquoso em função do pH do sistema.

Percebe-se que, para valores mais altos de pH, o caminho mais provável envolve a substituição nucleofílica pelo solvente no grupo carbonato (lado direito do esquema). A medida que se reduz o pH do sistema, espera-se que a reação ocorra pela adição do solvente no CO_2, espécie mais abundante (lado esquerdo do esquema). Os resultados obtidos indicam que o segundo caminho é o mais rápido.

5. Conclusões

Verificou-se a presença de MEC em amostras de cerveja *lager* e cerveja escura, independentemente do baixo valor de pH dessas bebidas. Apesar das complicações encontradas, há também evidências da presença de MEC em vinhos espumantes.

Nos casos das bebidas já envasadas na presença de gás carbônico há tempo suficiente para que a reação atinja o equilíbrio até o momento da abertura do recipiente para consumo. Mesmo depois de abertos, com o desprendimento de gás do sistema, ainda se verifica concentrações detectáveis de MEC.

Ao contrário do esperado com base nos resultados da literatura, pôde-se verificar a presença de quantidades detectáveis de MEC logo após a mistura entre uma bebida alcoólica destilada e uma bebida carbonatada. O pH dessas misturas não se mostrou suficientemente baixo para promover a liberação de CO_2 em grande extensão e, consequentemente, a decomposição total do MEC.

Verificou-se, ainda, que o baixo pH favorece a cinética de formação da espécie em uma escala compatível com o tempo levado para se consumir a bebida, havendo então consumo de MEC durante a ingestão de *drinks*.

A estimativa da concentração de MEC nas bebidas estudadas foi possível devido ao grande potencial analítico da técnica de CE-C^4D em permitir a determinação de espécies sem a necessidade de uma curva de calibração, qualidade

que a torna uma ferramenta poderosa não apenas na quantificação do MEC, mas de diversas outras espécies instáveis.

6. Perspectivas

A presença de MEC em alimentos era desconhecida até então. Apesar disso, bebidas como a cerveja são consumidas há milênios, sugerindo a pequena probabilidade de que a espécie seja nociva. Não há, no entanto, informações a respeito do seu papel no sabor da bebida, bem como seu efeito na absorção do álcool pelo organismo. Estudos anteriores concluíram que a presença de CO_2 favorece a absorção do álcool no organismo [62]. Há também relatos na literatura a respeito da diferença nas taxas de absorção do etanol pelo organismo ao se ingerir uma mistura de água com vodka e uma de água gaseificada com vodka [63].

Sabe-se que os MACs apresentam raios hidrodinâmicos pouco inferiores aos carboxilatos com mesmo número de carbonos [16]. É conhecido o fato de que algumas células apresentam canais que auxiliam no transporte de alguns carboxilatos entre seu interior e exterior. Apesar das explicações fornecidas pelos autores, o desconhecimento a respeito da formação de MEC nesses sistemas os leva a desconsiderar seu possível papel como transportador do etanol por membranas.

Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho sirvam como estímulo para novas pesquisas na área de alimentos, sendo a influência da presença de MEC no sabor das bebidas alcoólicas carbonatadas uma sugestão cabível. O envolvimento de outras áreas na busca por novos conhecimentos a respeito da formação e estabilidade de MEC em solução aquosa, tais como a área médica, pode levar a um melhor entendimento da absorção do etanol e seu metabolismo.

7. Referências Bibliográficas

1. Parrish JP, Salvatore RN, Jung KW. Perspectives on alkyl carbonates in organic synthesis. Tetrahedron. 2000 Oct 13;56(42):8207-37.

2. Schwartz SS, Goodman SH. Plastic Materials and Processes. Nova York: Van Nostrand Reinhold; 1982.

3. Kawaguchi T, Nakano M, Juni K, Inoue S, Yoshida Y. Examination of Biodegradability of Poly(Ethylene Carbonate) and Poly(Propylene Carbonate) in the Peritoneal-Cavity in Rats. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1983;31(4):1400-3.

4. Yasuda H, Aludin MS, Kitamura N, Tanabe M, Sirahama H. Syntheses and physical properties of novel optically active poly(ester-carbonate)s by copolymerization of substituted trimethylene carbonate with epsilon-caprolactone and their biodegradation behavior. Macromolecules. 1999 Sep 21;32(19):6047-57.

5. Bisht KS, Svirkin YY, Henderson LA, Gross RA, Kaplan DL, Swift G. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of trimethylene carbonate. Macromolecules. 1997 Dec 15;30(25):7735-42.

6. Pacheco MA, Marshall CL. Review of dimethyl carbonate (DMC) manufacture and its characteristics as a fuel additive. Energy & Fuels. 1997 Jan-Feb;11(1):2-29.

7. Tundo P, Selva M. The chemistry of dimethyl carbonate. Accounts of Chemical Research. 2002 Sep;35(9):706-16.

8. Skrabal A. Zur Kinetik der alkalischen Verseifung der Kohlensäureester. Monatshefte für Chemie. 1917;38:305-18.

9. Faurholt C. Studies on mono-alkyl-carbonates. I. On the formation of mono-alkyl-carbonates from sodium bicarbonate in watery solutions of alcohols. The equilibrium between alcohol, mono-alkyl-carbonate, carbonate and carbon-dioxide in watery solution. Zeitschrift Fur Physikalische Chemie--Stochiometrie Und Verwandtschaftslehre. 1927 Mar;126(1/2):72-84.

10. Heston BO, Dermer OC, Woodside OA. The Reaction of Alkoxide Ions with Carbon Dioxide. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science. 1943;23:67-8.

11. Miller NF, Case LO. The kinetics of the alkaline hydrolysis of ethyl carbonate and of potassium ethyl carbonate. J Am Chem Soc. 1935 Jan;57(5):810-4.

12. Gattow G, Behrendt W. Methyl Hydrogen Carbonate. Angewandte Chemie-International Edition. 1972;11(6):534-&.

13. Sauers CK, Jencks WP, Groh S. Alcohol-Bicarbonate-Water System - Structure-Reactivity Studies on Equilibria for Formation of Alkyl Monocarbonates and on Rates of Their Decomposition in Aqueous Alkali. J Am Chem Soc. 1975;97(19):5546-53.

14. Richardson DE, Yao HR, Frank KM, Bennett DA. Equilibria, kinetics, and mechanism in the bicarbonate activation of hydrogen peroxide: Oxidation of sulfides by peroxymonocarbonate. J Am Chem Soc. 2000 Mar 1;122(8):1729-39.

15. Dibenedetto A, Aresta M, Giannoccaro P, Pastore C, Papai I, Schubert G. On the existence of the elusive monomethyl ester of carbonic acid [CH3OC(O)OH] at 300 K: H-1- and C-13 NMR measurements and DFT calculations. European Journal of Inorganic Chemistry. 2006 Mar 6(5):908-13.

16. Vidal DTR, Nogueira T, Saito RM, do Lago CL. Investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. Electrophoresis. 2011 Apr;32(8):850-6.

17. Hough JS, Briggs DE, Stevens R. Malting and brewing science. Londres: Chapman and Hall; 1971.

18. Hornsey IS. A history of beer and brewing: Royal Society Of Chemistry; 2003.

19. Fillaudeau L, Carrere H. Yeast cells, beer composition and mean pore diameter impacts on fouling and retention during cross-flow filtration of beer with ceramic membranes. Journal of Membrane Science. 2002 Feb 15;196(1):39-57.

20. Kirin Institute of Food and Lifestyle. Report Vol. 29 - Global Beer Consumption by Country in 2009. Disponível em: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2010/1222_01.html. Acessado em: 04/05/2012.

21. Kirin Institute of Food and Lifestyle. Report Vol. 30 - Global Beer Production by Country in 2010. Disponível em: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2011/0811_01.html. Acessado em: 04/05/2012.

22. Pollock JRA. Brewing science. Nova York: Academic Press; 1979.

23. Badoud R, Pratz G. Improved High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Some Carboxylic-Acids in Food and Beverages as Their Para-Nitrobenzyl Esters. J Chromatogr. 1986 Jun 6;360(1):119-36.

24. Miwa H, Yamamoto M. Determination of mono-, poly- and hydroxy-carboxylic acid profiles of beverages as their 2-nitrophenylhydrazides by reversed-phase ion-pair chromatography. J Chromatogr A. 1996 Jan 19;721(2):261-8.

25. Soga T, Ross GA. Capillary electrophoretic determination of inorganic and organic anions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid: Effect of electrolyte's complexing ability. J Chromatogr A. 1997 Apr 11;767(1-2):223-30.

26. Klampfl CW. Analysis of organic acids and inorganic anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999 Mar;47(3):987-90.

27. Klampfl CW, Katzmayr MU. Determination of low-molecular-mass anionic compounds in beverage samples using capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect ultraviolet and conductivity detection. J Chromatogr A. 1998 Sep 25;822(1):117-23.

28. Kuban P, Karlberg B. On-line coupling of gas diffusion to capillary electrophoresis. Talanta. 1998 Jan;45(3):477-84.

29. Dionex. Application Note 46 - Ion Chromatography: A Versatile Technique for the Analysis of Beer. Disponível em: http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4760-AN46_IC_beer_03May95_LPN0661-01.pdf. Acessado em: 07/05/12.

30. Varnam AH, Sutherland JM. Beverages: Technology, Chemistry and Microbiology: Springer; 1994.

31. Henderson M. Whiskey. In: Friberg S, Hui YH. Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology. New York: Marcel Dekker Inc; 2005. p. 896 – 907.

32. Steen D. Carbonated Beverages. In: Ashurst PR. Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices. Oxford: Blackwell Pub. Ltd.; 2005. p. 150 - 81.

33. British Soft Drinks Association [homepage on the Internet]. London [cited 2012 07/05]; Available from: http://www.britishsoftdrinks.com/.

34. Hellmich M. The Ultimate Bar Book: The Comprehensive Guide to Over 1,000 Cocktails. San Francisco: Chronicle Books; 2006.

35. Tiselius A. The Moving Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins [tese de doutorado]. Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsaliensis^ Upsala: 1930.

36. Hjertén S. Free zone electrophoresis. Chromatographic Reviews. 1967;9(2):122-219.

37. Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. Anal Chem. 1981;53(8):1298-302.

38. Tavares MFM. Capillary electrophoresis: Basic concepts. Quim Nova. 1996;19(2):173-81.

39. Gas B, Vacik J. High-Frequency Contactless Conductivity Detector for Capillary Isotachophoresis. Chem Listy. 1980;74(6):652-8.

40. Gas B, Demjanenko M, Vacik J. High-Frequency Contactless Conductivity Detection in Isotachophoresis. J Chromatogr. 1980;192(2):253-7.

41. Vacik J, Zuska J, Muselasova I. Improvement of the Performance of a High-Frequency Contactless Conductivity Detector for Isotachophoresis. J Chromatogr. 1985;320(1):233-40.

42. Zemann AJ, Schnell E, Volgger D, Bonn GK. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Anal Chem. 1998 Feb 1;70(3):563-7.

43. da Silva J, do Lago C. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. Anal Chem. [Article]. 1998 OCT 15 1998;70(20):4339-43.

44. Rocha FR, da Silva JAF, Lago CL, Fornaro A, Gutz IGR. Wet deposition and related atmospheric chemistry in the Sao Paulo metropolis, Brazil: Part 1. Major inorganic ions in rainwater as evaluated by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. Atmos Environ. 2003 Jan;37(1):105-15.

45. da Silva JAF, Ricelli NL, Carvalho AZ, do Lago CL. Improved separation of IA and IIA metal cations in matrices with high sodium concentration by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. J Brazil Chem Soc. 2003 Mar-Apr;14(2):265-8.

46. Munoz RAA, Richter EM, de Jesus DP, do Lago CL, Angnes L. Determination of inorganic ions in ethanol fuel by capillary electrophoresis. J Brazil Chem Soc. 2004 Jul-Aug;15(4):523-6.

47. Oliveira MAL, do Lago CL, Tavares MFM, da Silva JAF. Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. Quim Nova. 2003 Nov-Dec;26(6):821-4.

48. Carvalho AZ, da Silva JAF, do Lago CL. Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. Electrophoresis. 2003 Jun;24(12-13):2138-43.

49. da Silva JAF, do Lago CL. Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector. Electrophoresis. 2000 Apr;21(7):1405-8.

50. Muzikar J, van de Goor T, Gas B, Kenndler E. Propylene carbonate as a nonaqueous solvent for capillary electrophoresis: Mobility and ionization constant of aliphatic amines. Anal Chem. 2002 Jan 15;74(2):428-33.

51. Saito RM, Brito-Neto JGA, Lopes FS, Blanes L, da Costa ET, Vidal DTR, et al. Ionic mobility of the solvated proton and acid-base titration in a four-compartment capillary electrophoresis system. Anal Methods-Uk. 2010 Feb;2(2):164-70.

52. Brito-Neto JGA, da Silva JAF, Blanes L, do Lago CL. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. Electroanal. 2005 Jul;17(13):1198-206.

53. Brito-Neto JGA, da Silva JAF, Blanes L, do Lago CL. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. Electroanal. 2005 Jul;17(13):1207-14.

54. da Silva JAF, do Lago CL. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. Anal Chem. 1998 Oct 15;70(20):4339-43.

55. Francisco KJM, do Lago CL. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. Electrophoresis. 2009 Oct;30(19):3458-64.

56. Group of electromigration separation processes [homepage on the Internet]. Prague [cited 2012 07/05]; Available from: http://web.natur.cuni.cz/gas/.

57. Ikuta N, Yamada Y, Yoshiyama T, Hirokawa T. New method for standardization of electropherograms obtained in capillary zone electrophoresis. J Chromatogr A. 2000 Oct 13;894(1-2):11-7.

58. do Lago CL, Juliano VF, Kascheres C. Applying Moving Median Digital-Filter to Mass-Spectrometry and Potentiometric Titration. Anal Chim Acta. 1995 Jun 30;310(2):281-8.

59. Vidal DTR. Investigação por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato sobre a formação e as propriedades de monoalquil carbonatos em meio aquoso [tese de doutorado]. Instituto de Química, Universidade de São Paulo; São Paulo: 2011.

60. Katzmayr MU, Klampfl CW, Buchberger W. Optimization of conductivity detection of low-molecular-mass anions in capillary zone electrophoresis. J Chromatogr A. 1999 Jul 30;850(1-2):355-62.

61. Pocker Y, Davison BL, Deits TL. Decarboxylation of Monosubstituted Derivatives of Carbonic-Acid - Comparative Studies of Water-Catalyzed and Acid-Catalyzed Decarboxylation of Sodium Alkyl Carbonates in H_2O and D_2O. J Am Chem Soc. 1978;100(11):3564-7.

62. Ridout F, Gould S, Nunes C, Hindmarch I. The effects of carbon dioxide in champagne on psychometric performance and blood-alcohol concentration. Alcohol Alcoholism. 2003 Jul-Aug;38(4):381-5.

63. Roberts C, Robinson SP. Alcohol concentration and carbonation of drinks: the effect on blood alcohol levels. J Forensic Leg Med. 2007 Oct;14(7):398-405.

Anexo. Curriculum Vitae

DADOS PESSOAIS

Nome: Marcelo Rabello Rossi

E-mail institucional: rabello@usp.br

Local e data de nascimento: São Paulo, 13 de maio de 1985.

EDUCAÇÃO

Mestrado em Química Analítica (2012)

Instituto de Química - Universidade de São Paulo

Bacharelado e Licenciatura em Química (2009)

Instituto de Química – Universidade de São Paulo

Ensino Médio (2002)

Centro Federal de Educação Tecnológica de São Paulo (CEFET-SP)

OCUPAÇÃO

Analista Bioquímico Júnior (MAGABI Pesquisas Clínicas e Farmacêuticas / Eurofarma), junho/2011 – maio/2012

Bolsista de Mestrado (CNPq), setembro/2009 – maio/2011

Bolsista de Iniciação Científica (CNPq-PIBIC), janeiro/2006 – junho/2007

PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS

do Lago CL, Vidal DTR, Rossi MR, Hotta GM, da Costa ET. On the formation of carbonate adducts of fatty alcohols, sterols, and sugars in biological conditions. Electrophoresis 2012; 33, 2102-10.

Rossi MR, Vidal DTR, do Lago CL. Monoalkyl carbonates in carbonated alcoholic beverages. Food Chem. 2012 Jul 15;133(2):352-7.

Giovedi C, PinoES, Rossi MR, Machado LDB. Electron beam irradiation effects on the mechanical, thermal and surface properties of a fluoroelastomer. Nucl Instrum Meth B. 2007 Dec;265(1):256-9.

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

16th Latin American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology (LACE) – Florianópolis - Brasil.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

16th Latin American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology (LACE) – Florianópolis - Brasil.

Título do trabalho: Identification and determination of monoethyl carbonate in beer samples using capillary electrophoresis with capacitively-coupled contactless conductivity detection.