Análise dos compostos voláteis da cachaça por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

FERNANDA DOS SANTOS NOGUEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
DEZEMBRO DE 2006.

Análise dos compostos voláteis da cachaça por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

FERNANDA DOS SANTOS NOGUEIRA

Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Luis César Passoni

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

DEZEMBRO DE 2006.

Análise dos compostos voláteis da cachaça por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

FERNANDA DOS SANTOS NOGUEIRA

Monografia apresentada em 06 de dezembro de 2006, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciatura em Química pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela comissão examinadora, formada pelos professores:

Aprovada em: 06 de dezembro de 2006.

Comissão Examinadora:

_____

Prof. Dr. Luis César Passoni – LCQUI – CCT – UENF
(Orientador)

_____

Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos – LCQUI – CCT – UENF

_____

Profª. Drª. Karla Silva Ferreira – LTA – CCTA – UENF

Aos meus pais, Fernando e Inez, pela compreensão,

a minha avó Zenira pelo companheirismo,

aos meus irmãos Leandro e Leonardo, pelo apoio

e ao meu namorado Bruno pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me concedeu a graça de chegar até aqui, me acompanhando e dando coragem para superar os obstáculos que a vida nos reserva, sendo fonte de luz a me guiar, fortaleza a me proteger e abrigo a me guardar.

Aos meus pais que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, iluminando os caminhos com afeto e dedicação para que trilhasse sem medo e cheio de esperança.

A minha avó, que compartilhou os meus ideais, incentivando-me a prosseguir na jornada, mantendo-se sempre ao meu lado, independente das dificuldades.

Aos meus irmãos, que estiveram de mãos dadas comigo, sempre presentes com gestos de incentivo.

Ao meu namorado pela paciência e compreensão, pois seus carinhos foram as principais armas para obter essa conquista.

A minha grande amiga Alice que me auxiliou nas análises.

As minhas amigas pela alegria do tempo, dificuldades compartilhadas e a certeza de que as alegrias fizeram parte da nossa caminhada, sendo elas Andréia, Angélica, Érica, Isabela, Juliana, Kátia, Leisiani, Rogéria, Vivian e a todas as outras que não citei.

Ao meu Orientador Luís Passoni que deveria ser simplesmente professor, porém foi um amigo que me fez compreender e me incentivou a seguir.

A professora Karla, por se disponibilizar de participar da banca.

Ao professor Carlos pelo total apoio para conclusão desse trabalho, pelas soluções encontradas em minhas dificuldades, pela sua paciência, pelo seu companheirismo, e pelo prazer de tê-lo em minha banca de monografia de final de curso.

A todos os professores do LCQUI que foram personagens imprescindíveis na minha vida acadêmica.

“Se você pensa que cachaça é água? Cachaça não é água não, Cachaça vem do Alambique, e água vem do Ribeirão...”

(Mirabeau Pinheiro).

SUMÁRIO

Lista de abreviatura.....viii

Abstract.....ix

Resumo.....x

1 - Introdução **11**

2 - Objetivos **20**

3 - Metodologia do Projeto **21**
3.1- Preparação das soluções Estoques.....21
3.2 - Preparação do padrão interno.....21
3.3 - Preparação das soluções Padrões.....21
3.4 - Preparação das Amostras para análise por CGEM.....22
3.5 - Ánalises Instrumentais.....22

4 - Resultados e discussões **23**
4.1- Quantificação dos Compostos *27*
4.2- Ánalise das Amostras *32*

5 - Conclusão **35**

6 - Referências Bibliográficas **36**

Anexo 1..... **38**

Lista de Abreviatura

FFAP – Free Fat Acid Phase

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

CGAR – Cromatografia a gás de alta resolução.

DIC – Detector de ionização em chamas.

CG-EM – Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas.

Abstract

In this work it was developed the cromatograph method for the analysis of cachaça compounds, responsibles for the spirit flavour. The quantitative determination of ethil acetate, isobutanol, acetaldehide and isoamilic alcohol were acomplished. Out of three different cachaças produced in the northern Rio de Janeiro state region samples analysed, only one was in accordance with legislation.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo principal, ajustar as condições cromatográficas para a identificação de compostos na cachaça, compostos estes que contribuem para o aroma da bebida. Após o ajuste da metodologia foi possível quantificar os seguintes compostos Acetato de Etila, Isobutanol, Acetaldeído e Álcool Isoamílico. Foram analisadas três amostras de cachaças da região norte-fluminense, das quais apenas uma apresentou teores destes compostos dentro dos limites especificados pela legislação.

1 - Introdução

Os primeiros relatos sobre fermentações de produtos de origem vegetal para a obtenção de bebidas vêm dos egípcios antigos. Também entre os gregos se encontram registros do processo de obtenção da *ácqua ardens* (a água que pega fogo, água ardente, al kuhu). Atribui-se aos árabes o desenvolvimento dos equipamentos para a destilação, semelhantes aos que conhecemos hoje. Na Idade Média, a água ardente foi para as mãos dos alquimistas, que atribuíram a ela propriedades místico-medicinais. Transformou-se, assim, em água da vida (*Aqua Vitae*), que passou a ser receitada como elixir da longevidade [1]. De acordo com um importante fabricante de uísque escocês, a bebida destilada era usada como um medicamento ou um tônico, sendo considerada como água da vida ou "*Aqua Vitae*", que em Gaélico, a língua tradicional da Escócia se pronunciava *Ooshki - Bah*, de onde surge a palavra - *whisky*. Usou-se o uisque como um tratamento para muitos problemas de saúde [2].

Entre as mais diferentes versões sobre a história da cachaça, um ponto em comum é que acredita-se que ela nasceu com o descobrimento do Brasil. Os portugueses trouxeram ao Brasil a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), uma planta pertencente à família das gramíneas originária da Ásia, registros históricos apontam seu cultivo desde tempos muitos remotos. Aparentemente, num engenho da Capitania de São Vicente, entre 1532 e 1548, foi descoberto o vinho de cana-de-açúcar (garapa azeda), originário dos tachos de rapadura que ficavam ao relento, em cochos de madeira, para alimentar os animais. Os senhores de engenho passaram a servir o tal caldo, denominado cagaça, aos escravos. Daí, rapidamente passou-se à destilação da cagaça, nascendo então a cachaça. A cachaça era inicialmente reservada aos escravos, que nos engenhos do Nordeste brasileiro era bebida na primeira refeição do dia, a fim de que pudessem suportar melhor o trabalho árduo dos canaviais [1].

Com o passar dos tempos, os senhores de engenho descobriram que essa bebida era capaz de eliminar a sensação de fome, além de provocar uma animação, que resultava em maior produtividade. Reservada aos escravos, a cachaça, com o aprimoramento da produção, atraiu muitos consumidores e passou a ter importância econômica para o Brasil Colônia, tornando-se uma ameaça aos

interesses portugueses, pois a bagaceira produzida em Portugal passou a ser consumida em menor escala, enquanto a cachaça saiu das senzalas e foi introduzida não só na mesa do Senhor do engenho, mas também nas casas portuguesas [3].

Em 1635, na Bahia, diante dessa realidade, houve a proibição da venda da cachaça e em 1639, ocorreu a primeira tentativa de impedir a sua fabricação. Em 1808, a bebida ganhou notoriedade nacional e mundial quando a corte portuguesa passou a considerá-la como um dos principais produtos da economia brasileira. Em 1819 já se podia dizer que a cachaça era a bebida do país [4].

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Em 2003, a área ocupada com plantações de cana-de-açúcar foi de 5,3 milhões de hectares, destes 3,3 milhões na região Sudeste. Neste período, foram plantados 161.850 hectares no Estado do Rio de Janeiro, tendo a região Norte Fluminense 91% de toda a área plantada do Estado, aproximadamente, 147.285 hectares [5].

Tal como o vinho na Itália, o uísque na Escócia, a cerveja na Alemanha, o Brasil vem se destacando na produção de aguardente, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida do país, perdendo apenas para a cerveja [4]. O estado de São Paulo é o maior produtor de aguardente industrial responsável por 585 milhões de litros de cachaça, 45% do total nacional que são 1,3 bilhões de litros de cachaça, segundo os dados do Emporium São Paulo de 2006 [6].

Menos de 0,6% de aguardente de cana é exportada, pois quase toda a produção é destinada ao mercado interno. As exigências do mercado externo tornaram crescentes as preocupações com a qualidade da aguardente de cana, que no Brasil é destilada e comercializada quase que imediatamente após a produção. Assim, distancia-se muito dos destilados produzidos e comercializados em outros países (como rum, uisque e conhaque), cujo envelhecimento constitui etapa indispensável da produção [7].

De acordo com Cardoso, a cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose [8].

Existem limites estabelecidos para diversos parâmetros, como graduação alcoólica, acidez volátil, ésteres, alcóois superiores, aldeídos, furfural, metanol e cobre, esses são os parâmetros mais comuns envolvidos na legislação vigente. A qualidade físico-química da aguardente de cana no Brasil é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [9], que atravéz da instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005, definiu que a cachaça deve ter os seguintes padrões de identidade e qualidade: o teor alcoólico deve ser de 38 a 54% em volume à 20ºC e o coeficiente de congêneres (aldeídos, ácidos, ésteres, furfural e alcoóis superiores) não pode ser inferior a 200 mg/100 mL de álcool anidro e não pode ser superior a 650 mg/100 mL de álcool anidro, sendo os teores máximos de cada congênere: Acidez volátil em ácido acético 150 mg/100 mL de álcool anidro. Ésteres em acetato de etila 200 mg/100 mL de álcool anidro. Aldeídos em aldeído acético 30 mg/100 mL de álcool anidro. Furfural e hidroximetilfurfural uma soma de 5 mg/100 mL de álcool anidro. Alcoóis superiores como álcool isobutilico, n-propílico e álcool isoamílico devem ter uma soma de, no máximo, 360 mg/100 mL de álcool anidro. Outros compostos são considerados como contaminantes orgânicos, e devem, de preferência, estar ausentes, mas são admitidos até um limite máximo de: Metanol 20 mg/100 mL de álcool anidro, Acroleína 5 mg/100mL de álcool anidro, Carbamato de Etila 150 μg/L, Álcool Sec-butílico (2-butanol) 10mg/100ml de álcool anidro, Álcool Butílico (1-butanol) 3 mg/100 mL de álcool anidro. Sendo definidos ainda parâmetros para contaminantes Inorgânicos como: chumbo 200 μg/L, arsênio 100 μg/L de álcool anidro e o conteúdo de cobre não pode ultrapassar a 5 mg por litro do produto [10].

A produção de cachaça no Brasil destina-se quase totalmente ao mercado interno, com a qual o consumo é um hábito amplamente difundido especialmente entre a população de baixo poder aquisitivo, visto ser uma bebida de preço relativamente baixo, conseqüentemente, a parcela de produção destinada ao mercado externo é pouco significativa. Acredita-se que melhor controle da qualidade da cachaça resultaria em uma melhor acolhida do produto não só pelos atuais consumidores, mas como também por parte dos não consumidores, além de propiciar condições para aumentar o volume de exportação [11].

Atualmente, o mercado mundial de melhor poder aquisitivo, está ávido por produtos denominados “naturais”. O produto artesanal tem mais apelo comercial,

permitindo ao micro, pequeno e médio produtor, a chance na competição com o chamado “produto industrial”, sendo imprescindível para isso a qualidade de seu produto. O aumento do consumo de cachaça de qualidade e a possibilidade de exportação estão cada vez mais exigindo que o processo de fabricação de cachaça resulte em produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais. Para a designação de cachaça de boa qualidade é necessário o conhecimento de sua composição tanto inorgânica (metais e outros), quanto orgânica (componentes secundários). A qualidade da cachaça requer conhecimentos científicos e tecnológicos apurados, além de competência, sensibilidade e dedicação na fabricação [4].

A fabricação da cachaça artesanal, além de contribuir com a diversificação da produção, principalmente para pequenos produtores que se baseiam na agricultura familiar, pode ser integrada com outras atividades, como a bovinocultura de leite ou corte e produção de adubo orgânico. Com isso o bagaço, a ponta da cana e o vinhoto são usados na alimentação do gado no período seco do ano, quando as pastagens são deficientes. O período coincide com o da safra de cana, permitindo que o gado possa contar com os subprodutos da fabricação da cachaça [12].

São vários os fatores que interferem na qualidade das bebidas alcoólicas destiladas, tais como a matéria-prima, fermentação, o método de condução dos processos de fermentação, destilação, envelhecimento etc. No entanto, as leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor das bebidas alcoólicas, pois é durante a fermentação que são formados a maioria dos compostos que atribuem aroma e sabor. No processo de fabricação de cachaça artesanal os produtores utilizam leveduras “selvagens”, ou seja, que já se encontram na superfície dos colmos da cana-de-açúcar. Esse tipo de fermento é chamado de “natural”. As cepas de leveduras presentes variam de região para região, sendo afetadas, principalmente, pelas variedades de cana utilizadas, as condições climáticas da região e as peculiaridades operacionais de cada produtor [12].

Quando se faz a cachaça, usa-se das leveduras para converter o açúcar em álcool. Este processo, chamado de fermentação, caracteriza-se por ser conduzido por uma microbiota mista de leveduras, com predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Ocorrendo contaminação com outros microorganismos podem surgir outros tipos de fermentação, por exemplo: fermentação acética

(*Acetobacter*), láctica *(Lactobacillus e Streptococcus)*, butírica (*Clostridium*), dextrânio (*Leuconostoc mesenteroides*) e levânio (*Bacillus, Acrobacter e Streptococcus*). Estas fermentações são diferentes da que produz o álcool e são indesejáveis na produção da cachaça. A principal função do fermento, também chamado "pé de cuba", é desdobrar os açúcares do caldo de cana em álcool etílico e gás carbônico. O fermento "natural" contém uma flora microbiana mista que, além do álcool, produz quantidades mínimas de outros compostos que favorecem as características de aroma e sabor da cachaça. Os mesmos compostos aparecem como principais componentes nas diversas bebidas alcoólicas, independentemente da matéria prima utilizada, o que evidencia a importância das leveduras na formação do sabor das bebidas alcoólicas [13]. A natureza e a quantidade dos compostos formados na fermentação são grandemente afetadas pelas condições de fermentação, tais como a temperatura e nutrientes do meio de fermentação. Além disso, a técnica de destilação tem um grande efeito no aroma das bebidas, especialmente na sua composição quantitativa [14].

Os produtos da destilação da cachaça são divididos em três frações de acordo com a seqüência que são produzidos: "cabeça", "coração" e "cauda". Os destilados de "cabeça" e de "cauda" são os principais responsáveis pela ressaca e dor de cabeça, devendo ser, portanto, eliminados. Os produtos de "coração" é a melhor fração do destilado. Cabeça é a primeira fração, de cerca de 5 a 10% do volume total do destilado muito rico em etanol e que contém a maior parte do metanol, aldeídos e outras substâncias de alta volatilidade. Coração é a segunda fração. Corresponde a cerca de 80% do volume total do destilado, é a cachaça. Cauda ou Água fraca é a terceira fração corresponde à cerca de 10 a 15% finais do destilado total. Constituída de pouco álcool, muita água e substâncias de alto ponto de ebulição, como a presença de alguns ácidos [1].

Durante a destilação, a temperatura do vinho dentro da panela informa sobre o seu teor alcoólico, medido através do manômetro. A temperatura aumenta no transcurso da destilação, dada a redução do teor alcoólico do líquido contido na panela, até o limite de 100°C. Sendo diretamente relacionada ao teor alcoólico do mosto, a temperatura indicada no termômetro ligado à panela pode ser utilizada como referencial para definir o término da destilação [15].

Com o progresso da tecnologia de fermentação alcoólica e da taxonomia de leveduras, foi possível verificar também que a linhagem predominante é a que

possui características mais propícias para adaptação às diferentes condições de processo, tais como teor de açúcar do mosto e teor de etanol no vinho, acidez do vinho, operação de purificação do caldo, temperatura do mosto, etc. Quando se alteram condições de processamento, certamente dão-se condições para estabelecimento de um novo equilíbrio entre linhagens de leveduras, com o surgimento de outra linhagem dominante. A simples inoculação de uma linhagem selecionada, ou de uma linhagem dominante isolada de uma determinada destilaria, não é capaz de garantir a sua permanência e/ou melhorar a eficiência de outras destilarias. A alteração e a adequação de procedimentos tecnológicos de processo são passos importantes para alterar a microbiota e as leveduras com condições de dominância no processo. A seleção de uma microbiota mais eficiente e de maior rendimento, sem perder de vista a qualidade da bebida, deve ser buscada com adoção de processo adequado e que opere em condições as mais estáveis possíveis [13].

O processo de envelhecimento envolve reações complexas que ocorrem naturalmente no produto, bem como as influenciadas pelo material do tonel que transfere compostos para a aguardente, promovendo mudanças químicas, físicas e sensoriais no produto [7].

Nóbrega 2003, em seus estudos analisou os compostos voláteis da cachaça, de uma única marca, adquirida no Comercio de João Pessoa, Paraíba, concluiu que dentre os 18 ésteres identificados, acredita-se que o acetato de 3-metilbutila, o hexanoato de etila, o octanoato de etila, o decanoato de etila e o dodecanoato de etila, assim como, propanoato de etila, butanoato de etila, pentanoato de etila, acetato de hexila e heptanoato de etila, são compostos responsáveis pelas características gerais do aroma final da cachaça. É certo que o acetato de etila é o principal éster, esses ésteres analisados aparecem na cachaça em nível de traço. De acordo com o autor, além destes ésteres, outras substâncias identificadas, como o 3-metil-1-butanol (álcool isoamilico) e o 1,1-dietoxietano, tendo em vista seus altos teores, e o 4,5-diidro-2-metil-3(2H)-tiofenona, devido a presença de enxofre em sua estrutura, também são importante para o aroma final da bebida [16].

Em um trabalho publicado por Nascimento 2000 *et.al,* foram feitas análises dos aldeídos e da acetona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando-se o método da padronização externa e a detecção a 365nm[24-26]

sob a forma de 2,4-dinitrofenilidrazonas. Os ácidos carboxílicos, os álcoois superiores e os ésteres foram quantificados por cromatografia a gás de alta resolução (CGAR) utilizando-se detector por ionização em chama (DIC) e empregando-se o método do padrão interno[36]. O ácido nonanóico foi o padrão interno utilizado na quantificação dos ácidos carboxilícos e o hexanol foi o padrão interno usado na quantificação dos álcoois e ésteres. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear, plotando-se a relação área dos picos dos padrões/área do padrão interno *versus* concentração. Os coeficientes de correlação foram sempre bem próximos da unidade. Os padrões sempre foram preparados em meio hidroalcoólico (etanol 40% v/v), procurando-se reproduzir as condições da matriz analisada. Os compostos carbonílicos como formaldeído, 5-hidroximetilfurfural, acetaldeído, acroleína, propionaldeído, furfural, n-butiraldeído, benzaldeído, isovaleraldeído, n-valeraldeído e acetona também foram analisados através das 2,4-dinitrofenilidrazonas, utilizando um cromatógrafo a líquido, tendo metanol-água como fase móvel e uma coluna C-18. Os ácidos carboxílicos (acético, propiônico, isobutírico, n-butírico, isovalérico, n-valérico, isocapróico, n-capróico, n-heptanóico, n-caprílico, n-cáprico e láurico), álcoois (metanol, propanol, isobutanol, butanol, 2-butanol, álcool isoamílico), ésteres (acetato de etila, acetato de amila, acetato de butila, heptanoato de etila, caprilato de etila, caprato de etila, e benzoato de etila), foram analisados por cromatógrafia a gás de alta resolução (CGAR) empregando-se uma coluna HP-FFAP (Polyethylene Glycol - TPA modified) [17].

No mesmo trabalho foi estudado a influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. Usando alambiques de cobre e aço inox, observou-se diferenças nos teores médios de ésteres e álcoois superiores, mais evidentes para acetato de etila e álcool isoamílico. Os teores destes compostos são maiores nas amostras destiladas em aço inox. Também observou-se diferenças nos compostos ditos majoritários: caprilato de etila, n-propanol e isobutanol. Os teores médios para os diversos ácidos não variaram significativamente para ambas as amostras. De acordo com este estudo, as cachaças destiladas em alambique de cobre apresentam teores médios de aldeídos totais (19,72 mg/L) e metanol (1,82 mg/L) superiores aos dos destilados em alambique de aço inox, cujos teores foram 9,83 mg/L de aldeídos totais e 1,16 mg/L de metanol. O inverso é observado quanto aos teores de álcoois superiores e ésteres. Quanto aos teores de ácidos e de acetona as diferenças não foram

significativas. As cachaças destiladas em alambiques de cobre são preferidas pelos apreciadores da bebida em função do seu aroma e sabor. Mas a presença de cobre na cachaça, em elevadas concentrações, é indesejável, pois é prejudicial à saúde humana, sendo, portanto, fundamental sua quantificação. A legislação brasileira permite uma concentração não superior a 5 mg/L (cinco miligramas por litro) [17].

O detector em ionização em chamas (DIC) é geralmente aplicável em cromatografia a gás. O efluente da coluna é misturado com hidrogênio e ar e então entra em ignição. A maioria dos compostos orgânicos, quando pirolisados na temperatura da chama de hidrogênio/ar, produz íons e elétrons que podem conduzir eletricidade através da chama. Um potencial de algumas centenas de volts e aplicado através da ponta do queimador e de um eletrodo coletor localizado acima da chama. O detector de ionização em chama é muito utilizado para analise de amostras orgânicas, incluindo as contaminadas por água e óxidos de enxofre e de nitrogênio [18].

Vários fabricantes oferecem equipamentos de cromatografia a gás que podem apresentar uma interface direta com vários tipos de espectrômetros de massa de varredura rápida. A vazão em colunas capilares é geralmente baixa o suficiente para que a saída da coluna possa ser ligada diretamente a câmara de ionização do espectrômetro de massa. Entretanto para colunas empacotadas e colunas capilares de megadiametro, um separador a jato deve ser usado para remover a maior parte do gás de arraste do analito. Neste dipositivo, o fluxo dos gases de saída passam através de um pequeno esguicho de um separador a jato feito de vidro, o que aumenta o momento das moléculas mais pesadas do analito, de modo que 50% ou mais delas deslocam-se em um caminho mais ou menos reto ate o separador. Os átomos de Hélio, ao contrario, são defletidos pelo vácuo e bombeados para fora do sistema. Os instrumentos de cromatografia a gás/espectrometria de massa têm sido usados na identificação de centenas de componentes presentes em sistemas naturais e biológicos, permitindo a caracterização de compostos que dão odor e sabor aos alimentos [18].

Considera-se como desejáveis as seguintes características para uma boa aguardente: transparente, límpida, incolor ou amarela clara; aroma agradável que não arde o nariz, nem os olhos; produz aroma agradável quando esfregada nas mãos; após agitação, formam-se bolhas que permanecem por 12 a 15 segundos; forma película aderente, oleosa, proveniente dos componentes secundários,

quando escorre pelas paredes do recipiente; deixando em repouso, formam-se lágrimas brilhantes ao escorrer pelas paredes; quando degustada, queima agradavelmente a boca, produzindo uma sensação de prazer; Envelhecida em barril de madeira, percebe-se seu aroma agradável; não provoca náuseas, vômitos, dor de cabeça ou resseca [8].

2 - Objetivos

- Desenvolver metodologia analítica por cromatografia a gás para identificar os principais componentes estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, de cachaças fabricadas na região Norte-Fluminense.

- Quantificar os compostos identificados, em três amostras de cachaças comparando os teores detectados com os valores estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

3 - Metodologia

3.1- Preparação das soluções Estoques

Preparou-se soluções estoque com concentração de 10g/L dos compostos: Ácido Acético, Acetato de Etila, Isobutanol, Álcool Isoamílico e n-propílico e 1g/L dos compostos: Acetaldeído, furfural, metanol, 2-butanol e 1-butanol.

Pesou-se cada composto e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL completando o volume com etanol-água (40/60 v.v). Estocou-se em frascos âmbar, vedados e mantidos sob refrigeração, para evitar a evaporação.

3.2- Preparação do padrão interno

Pesou-se 1g de metiletilcetona, e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, completou-se o volume até 1 litro com solução etanol-agua (40/60 v/v).

3.3- Preparação das soluções padrões

Foram preparadas cinco soluções padrão pela mistura das soluções estoque, para obter cinco pontos na curva de calibração. Os volumes usados para preparação das soluções padrão, estão apresentado na tabela 3 da página 25.

3.4- Preparação das Amostras para análise por CG-EM.

Preparou-se soluções-padrão a partir das soluções estoques, adicionou-se 5 mL do padrão interno em 100 mL da mistura de padrões. Transferiu-se essa solução para um funil de extração, fez-se 3 extrações com porções de 5 ml de diclorometano. Após a extração secou-se a fase orgânica, com sulfato de sódio calcinado e injetou-se 1μL no cromatografo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

3.5 Preparação das Amostras para análise por CG-DIC

Preparou-se oito soluções de 10 mL de etanol-agua (40/60 v/v), com 3 gotas de cada composto, tais como acetaldeido, acetato de etila, acido acético, furfural, metanol, propanol, butanol e álcool isoamílico, injetou-se 1 μL de cada solução para se obter o tempo de retenção de cada composto. Após esta etapa injetou-se 1 μL de solução contendo todos os compostos, para confirmar a separação.

3.6 - Análises Instrumentais.

Foram realizadas análises por cromatografia com detector de ionização em chamas da marca Shimadzu modelo GC 17A, equipado com coluna Carbowax da marca L & M modelo CB (0,25 mm de diâmetro interno e 35 metros de comprimento), utilizando hidrogênio como gás de arraste nas seguintes condições: Injetor 250ºC, detector 250ºC, temperatura inicial da coluna 35ºC numa rampa de 7°/min até 90°C, uma segunda rampa de 15°/min até a temperatura final de 200ºC, numa pressão constante de 81 kpa que corresponde a uma vazão de 2 mL/min .

Também foram realizadas análises no CG-EM da marca Shimadzu e do modelo GC 17A, acoplado a coluna DB-05 J & W Scientific (0,25 mm de diâmetro, 0,25 μm de filme e 30 metros comprimento), tendo o Helio como gás de arraste. Nas seguintes condições: Temperatura do Injetor 250ºC, detector 280ºC, temperatura inicial da coluna 40ºC e final 100ºC, taxa de aquecimento de 5º/min, pressão inicial 87,5 Kpa e final 109 Kpa numa rampa da pressão de 1,8 Kpa / min.

4- Resultados e Discussões

Iniciou-se a investigação pela análise por cromatografia a gás acoplado a detector de ionização em chama (DIC), utilizando-se uma coluna Carbowax e obteve-se a separação de todos os compostos para os quais haviam padrões disponíveis, exceto o ácido acético e o furfural, esses dois compostos tiveram o mesmo tempo de retenção na análise. Para uma melhor separação seria necessário a aquisição de uma coluna FFAP, indisponível até o momento.

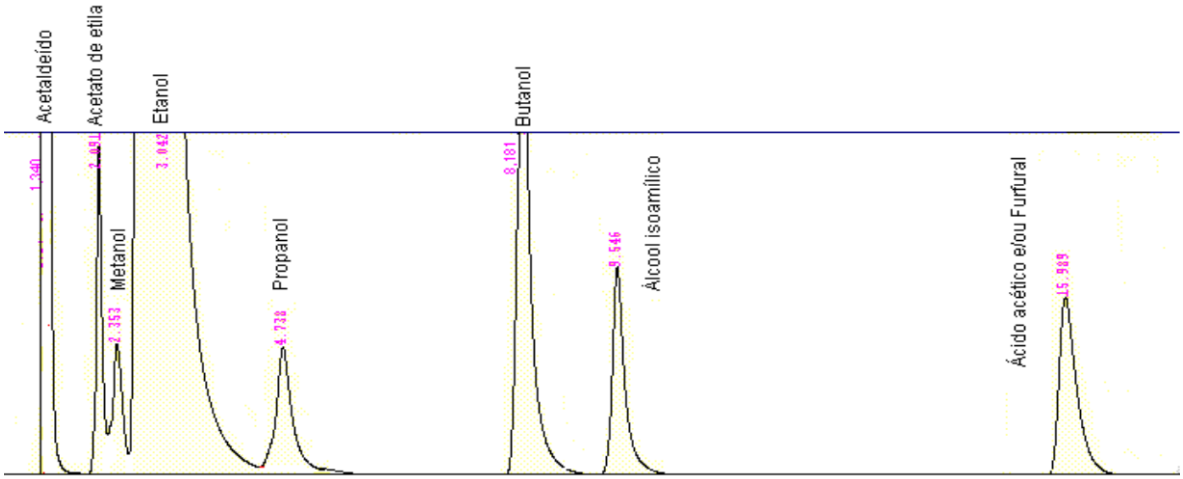


Figura 1 – Cromatograma obtido no CG-DIC para amostra padrão.

Depois dessa etapa não foi possível continuar a análise, pois não foram mais observados sinais no detector. Devido a este problema, deu-se início às análises de cachaças através do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. Para tornar possível a injeção das amostras no CG-EM foi necessário proceder a extração líquido-líquido dos compostos com diclorometano, pois a coluna utilizada era uma coluna apolar, na qual não se pode injetar água, além disso, por estar presente em grande quantidade, a água pode queimar o detector. A extração serve também para concentrar os compostos que tem mais afinidade com a fase orgânica.

Dentre os componentes da cachaça para os quais existem limites definidos em lei dispúnhamos de padrões apenas para os compostos listados na tabela 1, com seus respectivos níveis máximos de tolerância definidos em mg / 100 mL de álcool anidro.

Tabela 1 – Níveis máximos admitidos pelo MAPA de cada composto em mg / 100 mL de álcool anidro

Compostos da Cachaça	mg / 100 mL de álcool anidro
Acetaldeído	30
Acetato de Etila	200
Acido Acético	150
Furfural	2,5
Álcool Isoamílico	120
Isobutanol	120
Metanol	20
Álcool n-propílico	120
2-butanol	10
1-butanol	3

Para estes compostos foram preparadas soluções estoque utilizando as massas definidas na tabela 2.

Tabela 2 – Quantidade em massa utilizada de cada composto para preparação das soluções estoques

Compostos da Cachaça	Massa em gramas
Acetaldeído	1,1529
Acetato de Etila	10,0780
Acido Acético	10,2414
Furfural	1,1738
Álcool Isoamílico	10,0391
Isobutanol	10,1627
Metanol	1,2260
Álcool n-propílico	10,0276
2-butanol	1,1505
1-butanol	1,1651

Após a preparação das soluções-estoque, procedeu-se à preparação das soluções-padrão utilizando volumes diferentes de cada composto em soluções diferentes, apresentado na tabela 3. O objetivo da preparação das soluções padrão, foi para obter pontos na curva de calibração, de acordo com os níveis estabelecidos pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Tabela 3 – Volumes de soluções estoques usados na preparação das soluções-padrão para obtenção da curva de calibração

Volume=100mL	Solução 1 (mg / L)	Solução 2 (mg / L)	Solução 3 (mg / L)	Solução 4 (mg / L)	Solução 5 (mg / L)
Ácido Acético	10,24 (1mL)*	20,48 (2mL)*	40,96 (4mL)*	61,45 (6mL)*	71,69 (7mL)*
Acetato de Etila	20,16 (2mL)*	40,31 (4mL)*	60,47 (6mL)*	80,62 (8mL)*	90,70 (9mL)*
Acetaldeído	3,46 (3mL)*	6,92 (6mL)*	10,35 (9mL)*	13,83 (12mL)*	17,29 (15mL)*
Furfural	0,59 (0,5mL) *	1,17 (1mL)*	1,76 (1,5mL)*	2,35 (2mL)*	2,93 (2,5mL)*
Isobutanol	10,16 (1mL)*	25,41 (2,5mL)*	35,57 (3,5mL)*	48,78 (4,8mL)*	50,81 (5mL)*
Isoamílico	10,04 (1mL)*	25,09 (2,5mL)*	35,14 (3,5mL)*	48,19 (4,8mL)*	50,20 (5mL)*
n-Propílico	10,03 (1mL)*	25,07 (2,5mL)*	35,1 (3,5mL)*	48,13 (4,8mL)*	50,14 (5mL)*
Metanol	2,45 (2mL)*	4,90 (4mL)*	7,36 (6mL)*	9,81 (8mL)*	12,26 (10mL)*
2-butanol	1,15 (1mL)*	2,30 (2mL)*	3,45 (3mL)*	4,60 (4mL)*	5,75 (5mL)*
1-butanol	0,58 (0,5mL)*	0,93 (0,8mL)*	1,17 (1mL)*	1,40 (1,2mL)*	1,75 (1,5mL)*
Etanol/água	87 mL	72,7 mL	59 mL	44,4 mL	35 mL
2-Butanona**	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL

* ( ) = volume da solução estoque utilizado.

** = padrão interno

Ao injetar as soluções, confirmando através do tempo de retenção dos compostos e através da biblioteca disponível no CG-EM, observou-se a seguinte seqüência de compostos: 2-butanona (padrão interno), 2-butanol, Acetato de etila, Isobutanol, acetaldeído, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol. O Álcool Isoamílico é a soma do 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol. O ácido acético, 1-butanol, n-propanol, o metanol e o furfural, apareceram em nível de traço, devido a esses compostos serem polares, tendo maior afinidade com a fase aquosa da extração, ficando praticamente ausentes na fase orgânica. No anexo 1, encontra-se as análises cromatográficas dos compostos, realizadas no CG-EM e as fragmentações de cada composto observado nas análises.

4.1- Quantificação dos compostos

Para quantificação dos compostos, utilizou-se 2-butanona como padrão interno, todas as áreas dos sinais observados no cromatograma foram divididas pela área do padrão interno. Utilizou-se padrão interno, pois em algumas análises, a quantidade da amostra analisada ou a resposta do instrumento varia ligeiramente por razões difíceis de controlar. Como a concentração do padrão é conhecida, a concentração correta do analito pode ser determinada. O padrão interno é muito usado em cromatografia, pois a pequena quantidade de amostra que é injetada no cromatografo não é reprodutível. A tabela 4 representa as áreas do padrão interno nas soluções

Tabela 4 – Área obtida para a 2-butanona nas soluções-padrão

Soluções	Área
1	845011
2	231387
3	330291
4	293854
5	385897

Realizada as injeções das cinco soluções padrões, os compostos que apresentaram área mensurável foram: 2-butanol, acetato de etila, isobutanol,

acetaldeido e álcool isoamílico. Nas tabelas 5, 6, 7, 8, 9 estão apresentadas as áreas dos sinais observados no cromatograma. Embora o 2-butanol tenha sido extraído pela fase orgânica, não houve reprodutibilidade nas extrações, sendo impossível sua quantificação devido ao fato de, em duas soluções, não ter aparecido sinal referente a este composto no cromatograma. A intensidade do sinal observado foi praticamente a mesma para as soluções-padrão 2 e 4, embora a concentração tenha dobrado de uma para a outra. Com isso o coeficiente de correlatividade da reta apresentou um valor muito abaixo da unidade.

O composto acetaldeido também não apresentou área nas soluções 1 e 3, aparecendo em nível de traços. Desconsiderando as duas soluções 1 e 3, nas demais soluções percebe-se que sua área aumenta proporcionalmente a concentração e observa-se uma correlatividade bem próxima de 1.

Ao fazer as injeções pode-se obter a curva de calibração dos compostos, a curva foi plotada área / concentração, conforme apresentado nas figuras 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 5 - Área do 2-Butanol nos cromatogramas

Padrão	Área/ Área do padrão interno.	Concentração mg/L
1	----------	----------
2	0,3318	23,00
3	----------	----------
4	0,3384	46,00
5	0,6291	57,50

Tabela 6 - Área do Acetato de Etila nos cromatogramas

	Área/ Área do padrão interno	Concentração mg/L
1	1,5691	201,60
2	4,7128	403,10
3	8,3849	604,70
4	15,7759	806,20
5	27,4400	907,00

Tabela 7 - Área do Isobutanol nos cromatogramas

Padrão	Área/ Área do padrão interno	Concentração mg/L
1	0,1397	101,60
2	2,1720	254,10
3	4,2758	355,70
4	4,4162	487,80
5	7,2138	508,10

Tabela 8 - Área do Acetaldeído nos cromatogramas

Padrão	Área/ Área do padrão interno	Concentração mg/L
1	--------	----------
2	0,6014	69,20
3	4,6856	103,50
4	1,1391	138,30
5	1,5502	172,90

Tabela 9 - Área do Álcool Isoamílico, soma do 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol nos cromatogramas

Padrão	Área/ Área do padrão interno	Concentração mg/L
1	0,1609	100,40
2	9,0274	250,90
3	10,3501	351,40
4	11,0566	481,90
5	11,7265	502,00

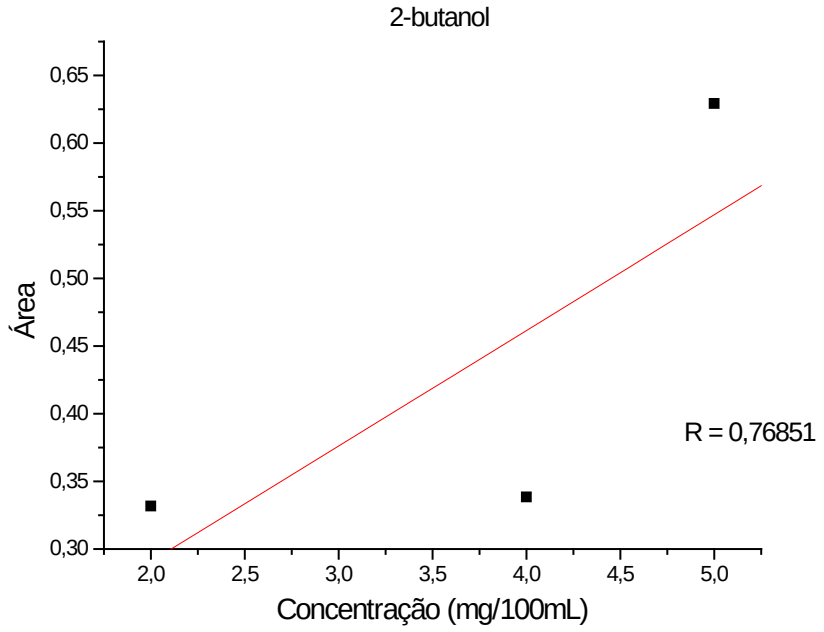


Figura 2 – Curva de Calibração do 2-butanol.

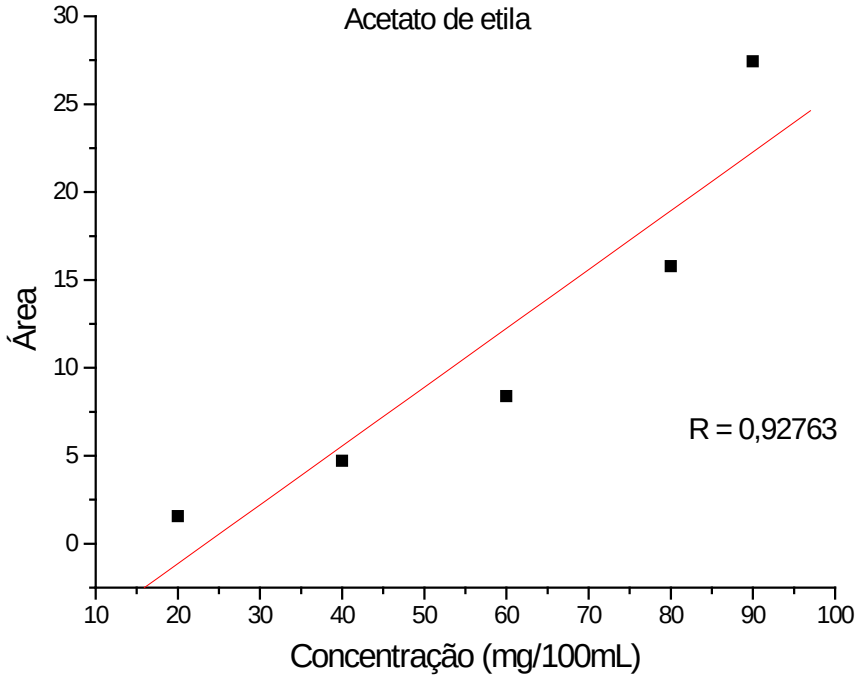


Figura 3 – Curva de Calibração do Acetato de Etila.

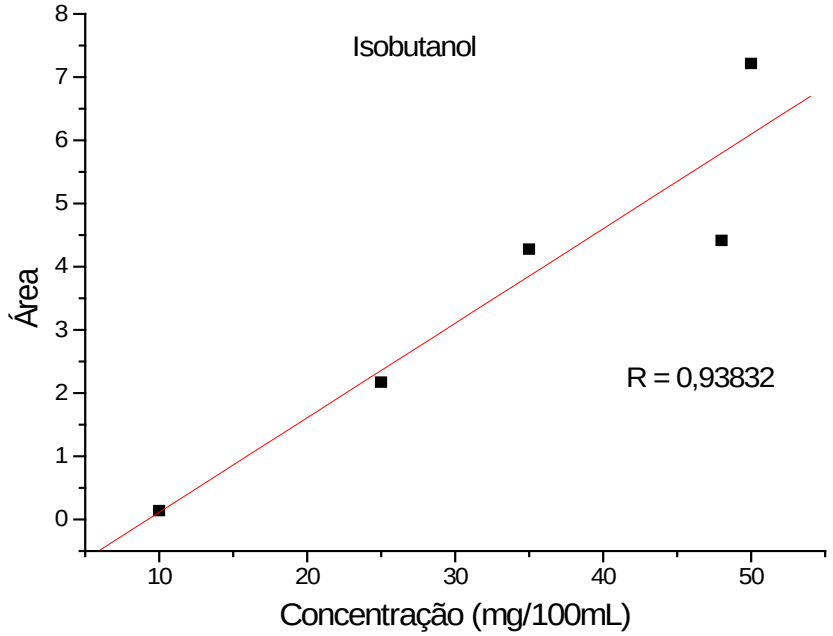


Figura 4 – Curva de Calibração do Isobutanol.

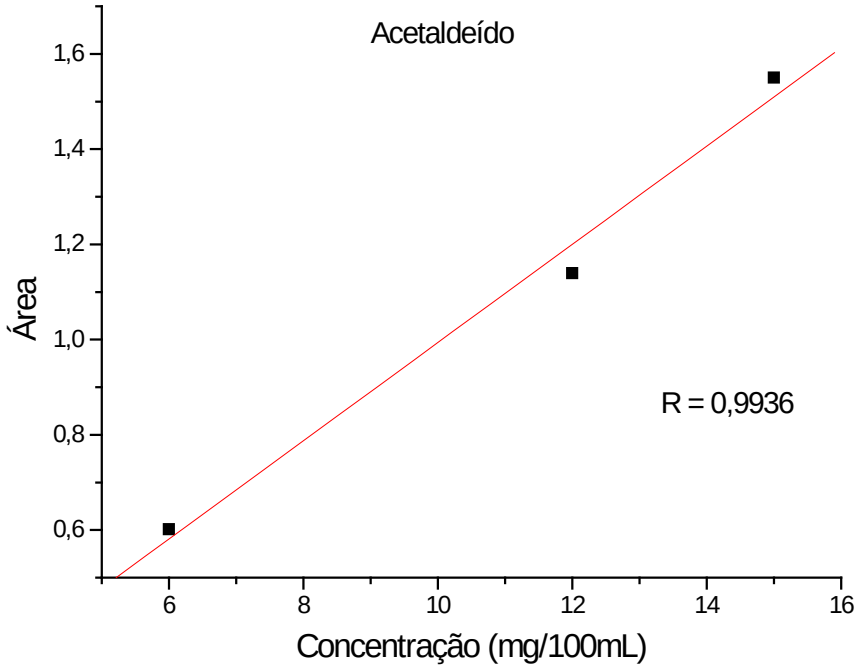


Figura 5 – Curva de Calibração do Acetaldeído.

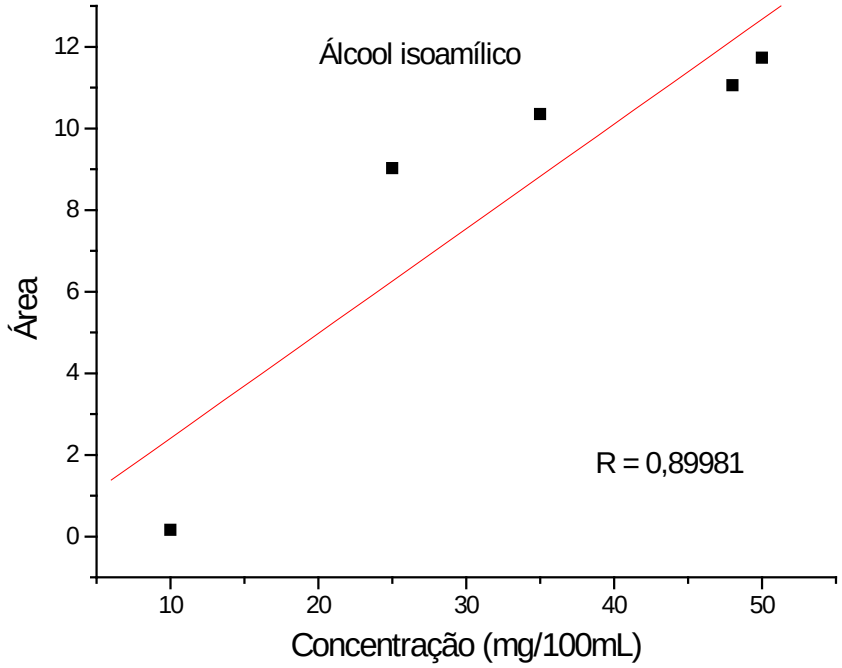


Figura 6 – Curva de Calibração do Álcool Isoamílico.

4.2- Análise das Amostras

Após a quantificação dos compostos, fez-se a injeção de três amostras de cachaça fabricada na região norte-fluminense. Injetou-se 1μL da fase orgânica, obtida após extração com diclorometano, no CG-EM. A tabela 10 apresenta as áreas do padrão interno e dos compostos analisados: acetato de etila, isobutanol, acetaldeído e do álcool isoamílico nas três amostras analisadas. A tabela 11 apresenta a área dos compostos dividas pela área do padrão interno.

.

Tabela 10 – Área dos Compostos analisados

Compostos	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
2-butanona*	407845	384643	341880
Acetato de Etila	640647	1779754	421785
Isobutanol	502806	711118	847025
Acetaldeído	769034	455634	309414
Álcool Isoamílico	8128312	7970707	3825527

* = padrão interno

Tabela 11 – Área dos compostos nas amostras divididos pela área do padrão interno

Compostos	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Acetato de Etila	1,5708	4,6270	1,2337
Isobutanol	1,2328	1,8488	2,4775
Acetaldeído	1,8856	1,1845	0,9050
Álcool Isoamílico	19,9299	20,7223	11,1897

Equação da Reta

***** Acetato de Etila Y = -7,82983 + 0,33459 X R = - 0,92763
* Isobutanol Y = -1,38225 + 0,14958 X R = - 0,93832
* Acetaldeído Y= -0,03791 + 0,10316 X R = - 0,9936
* Álcool Isoamílico Y = 0,15644 + 0,25657 X R = - 0,89981

Por meio da equação da reta pode-se obter as concentrações dos componentes nas três cachaças analisadas em mg /100 mL de cachaça. Fez-se a conversão para mg / L de cachaça conforme apresentado na tabela 12.

A amostra 1 possui 38% de álcool anidro (etanol), a amostra 2 e 3 possuem 42% de álcool anidro. De acordo com a equação C = (C(mg/L)*10)/graduação alcoólica, pode-se multiplicar por 10 todas as concentrações, apresentadas na tabela 12 e dividir pelo grau alcoólico presente nas amostras. Obtendo-se uma nova concentração em mg/100 mL de álcool anidro, apresentada na tabela 13. Realizada essas transformações pode-se compará-las com as concentrações estabelecidas pelo MAPA.

Tabela 12 – Concentração dos compostos

Compostos	Amostra1*	Amostra 2 *	Amostra 3 *
Acetato de Etila	280,96	372,30	270,86
Isobutanol	174,83	216,01	258,04
Acetaldeído	186,46	118,50	91,40
Álcool Isoamílico	782,88	813,76	442,22

* = mg / L de cachaça

Tabela 13 – Concentração das Amostras Analisadas

Compostos	Amostra1*	Amostra 2 *	Amostra 3 *
Acetato de Etila	73,92	88,64	64,50
Isobutanol	46,00	51,43	61,44
Acetaldeído	49,07	28,21	21,76
Álcool Isoamílico	206,02	193,75	105,29

* = mg /100 ml de álcool anidro

A tabela 13 se refere às concentrações em mg / 100 mL de álcool anidro, de cada composto analisado, nas amostras de cachaça da região Norte-Fluminense, de acordo com os parâmetros exigidos pelo MAPA. As três amostras analisadas, contêm concentração dentro das normas para os compostos acetato de etila e isobutanol, sendo o nível máximo permitido de 200mg/100mL de álcool anidro e 120 mg / 100 mL de álcool anidro, respectivamente.

A amostra 1, possuía elevada concentração do composto Acetaldeído, 49,08 mg / 100 mL de álcool anidro, sendo que o nível máximo permitido pelo MAPA é de 30 mg / 100 mL de álcool anidro.

A amostra 1 e 2, possuíam elevada concentração do composto Álcool Isoamílico, 206,03 e 193,76 mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente, sendo que o nível máximo permitido pelo MAPA é de 120 mg / 100mL de álcool anidro.

A amostra 3 possuía concentração dentro das normas em todos os compostos analisados.

5- Conclusão

Conclui-se com esse trabalho que a metodologia realizada para análise no GC-DIC, seria a mais indicada para separação e identificação de maior números de compostos presentes na cachaça. Como não foi possível sua continuidade, pode-se perceber que a metodologia realizada no CG-EM foi satisfatória para a identificação e quantificação de quatro compostos da cachaça sendo eles o Acetato de Etila, Isobutanol, Acetaldeído e Álcool Isoamílico.

6 - Referências Bibliográficas.

1 - SEBRAE, Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas no Espírito Santo. (2001) *Recomendações de controle ambiental para produção de cachaça.* In Filho, H. B., *et al*. – Vitória : SEBRAE/ES. 46 p.

2 – Robert, B. - *The Loch Lomond Scotch Whisky Distillery.* Disponível em http://www.lochlomonddistillery.com Acesso em 26/10/2006.

3 - CARDOSO, M. das G. (2006) Análises físico-químicas de aguardente. *Produção artesanal de aguardente*. Lavras: UFLA, v.2

4 - AZEVEDO,S. M (2003) *Levantamento da contaminação por cobre nas cachaças de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais*: *Ciência e Agrotecnologia***,** Lavras, v. 27, n.3, p. 618-624

5 – IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2005). Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/calendario_estudos2005.shtm. Acesso em 10/10/2006

6 - BRASIL. Ministério do Desenvol., Indúst. e Com. Exterior. *MDIC vai incentivar as exportações de cachaça*. Brasília. Disponível em: www.mdic.gov.br. Acesso em 25/09/2006.

7 - CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B (2000). *Modificações físico-químicas e sensoriais de aguardentes de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho*. B. CEPPA, Curitiba, v.15, n.2, p.87-100.

8 - CARDOSO, M. das G (2001) *Análises físico-químicas de aguardente: Produção artesanal de aguardente*. Lavras: UFLA, v.1.

9 - MAPA – *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento* (2006). Disponível em http://www.agricultura.gov.br Acesso em 16/10/2006

10 - BRASIL. Decreto nº 2.314, 4 set. 2005. (2005) Dispõe sobre o registro, classificação, padronização, controle, inspeção e fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União***,** Brasília.

11 - LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D.W (2002) *A aguardente e o controle químico de sua qualidade.* Engarrafador Moderno, 4(33)

12 - RIBEIRO, J.C.G.M. (2002) *Fabricação artesanal da cachaça mineira*. Belo Horizonte – MG; Editora Perform, . 162 p.

13 - OLIVEIRA, E.S.,(2001) *Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais.* Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 135p

14 - CRISPIM, J.E. (2000) *Manual da Produção de aguardente de qualidade.* Guaíba – RS; Editora Agropecuária LTDA, 333 p.

15 - MAIA, A. B. R. de A. (2005) *Tecnologia da cachaça de alambique*. Belo Horizonte: SEBRAE/MG; SINDBEBIDAS, p. 22, 24, 25, 39, 40, 41, 73

16 - NÓBREGA, I.C.C.(2003) *Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do "Headspace" e cromatografia gasosa-espectrometria de massas*. Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas – SP, v. 23, n. 2, p. 210-216.

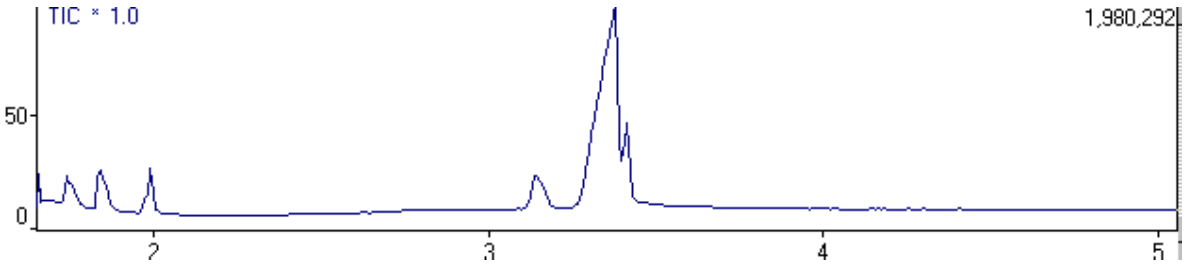
17 - NASCIMENTO, R.F, *et al* (2000) *Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar*. Química Nova*,* v. 21, n. 6, p. 737-739.

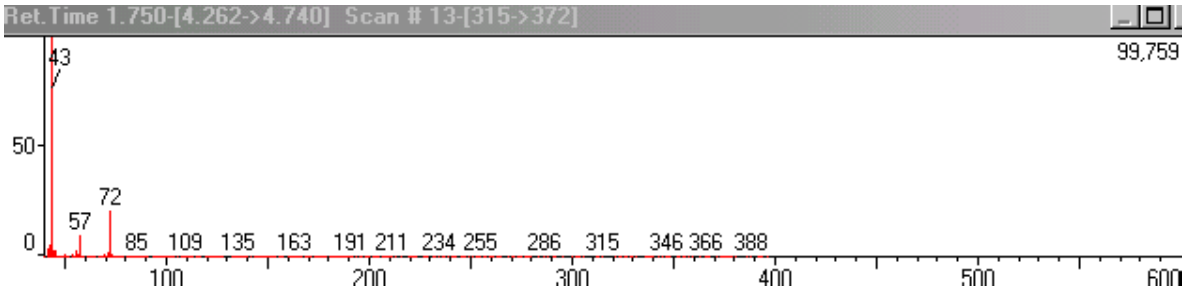
18 - Skoog, D.A., *et al* (2002) *Princípios de Analise Instrumenta*l. Artemed, São Paulo, v.3, n.5, p.625, 6.

ANEXO 1

1 - Ánalises cromatográfica realizadas no CG-EM

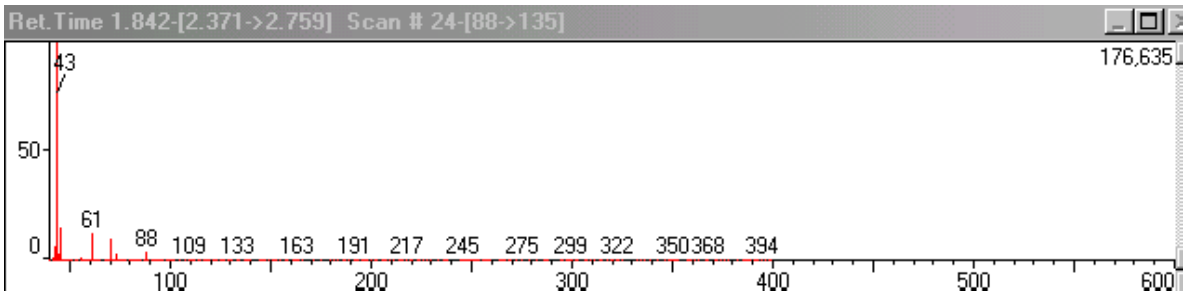
1.1 – Amostra 1





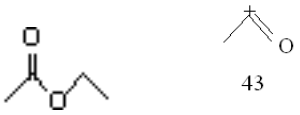
1 - Composto 2-butanona, utilizada como padrão interno (M.M = 72)

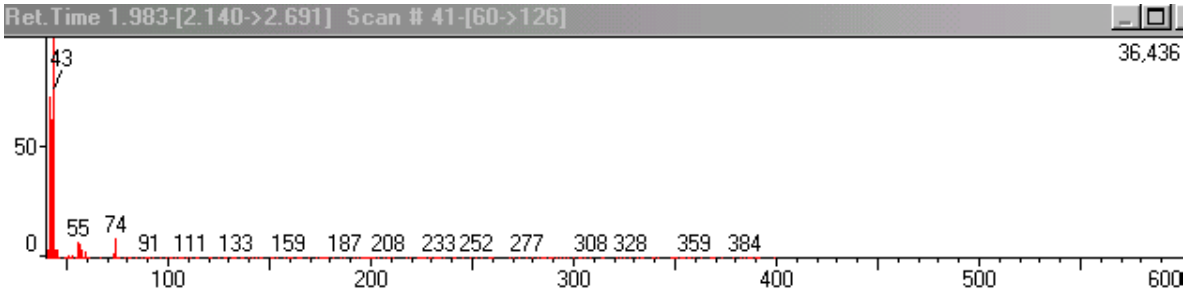
Fragmentações:



2 - Composto Acetato de Etila (M.M = 88)

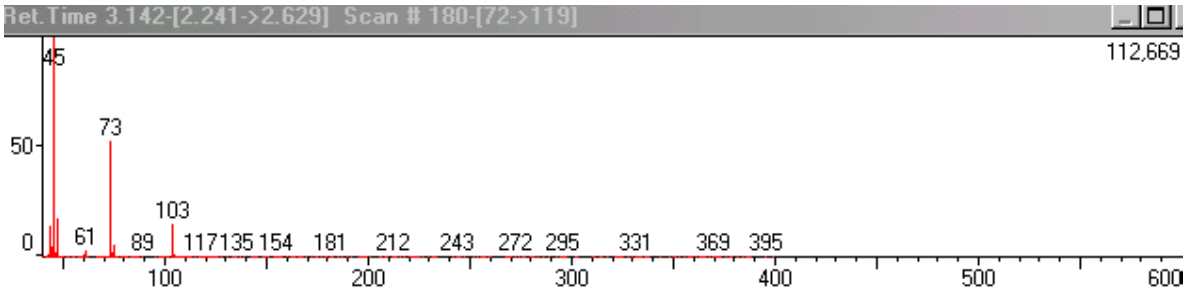
Fragmentações:





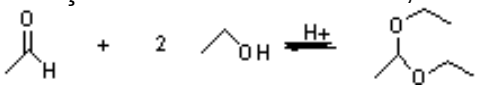
3 - Composto Isobutanol (M.M = 74)

Fragmentações:

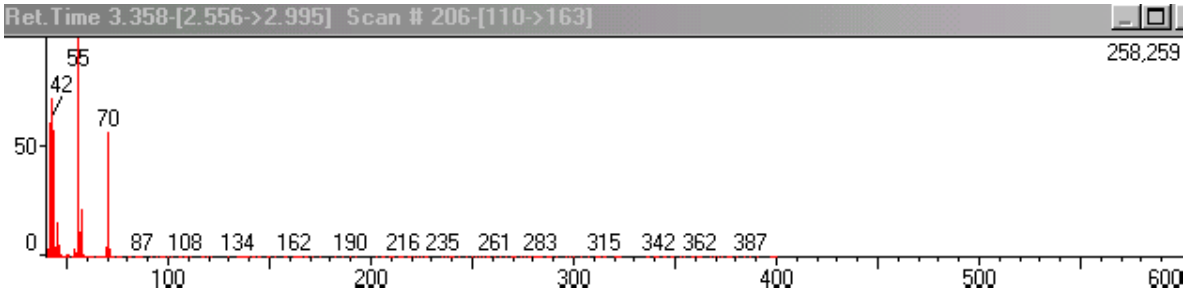


4 - Composto Acetaldeído

Reação do 1,1 dietoxietano (M.M = 118):

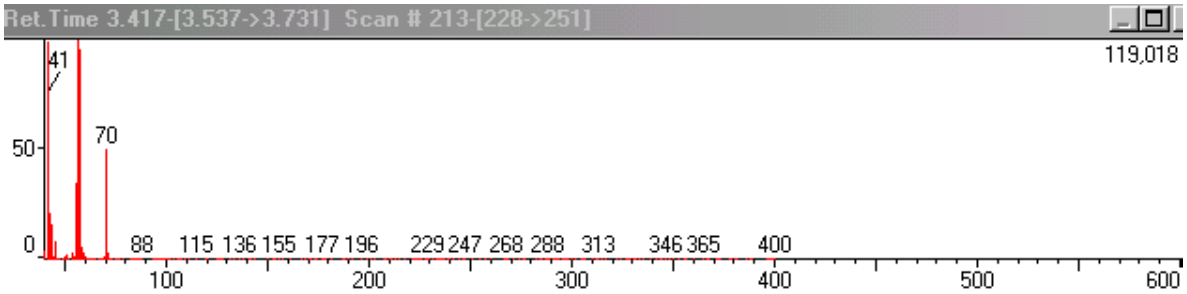


Fragmentações:



5- Composto 3-metil-1-butanol (M.M = 88).

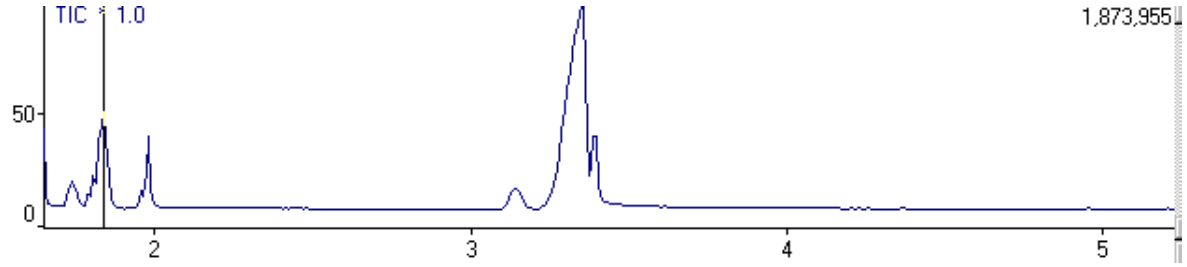
Fragmentações:

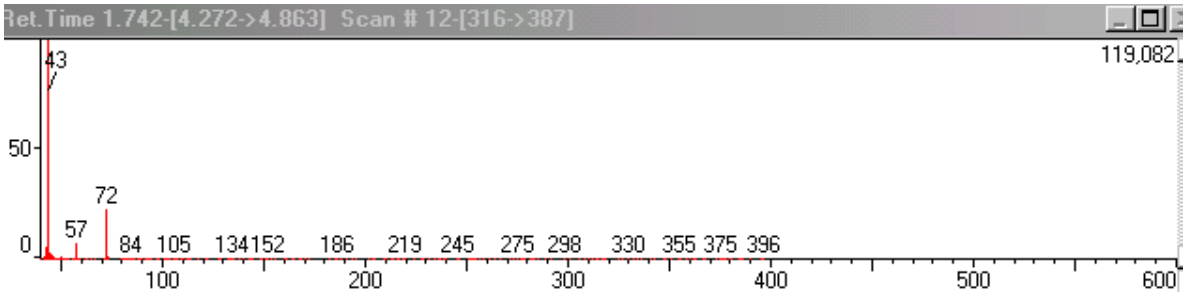


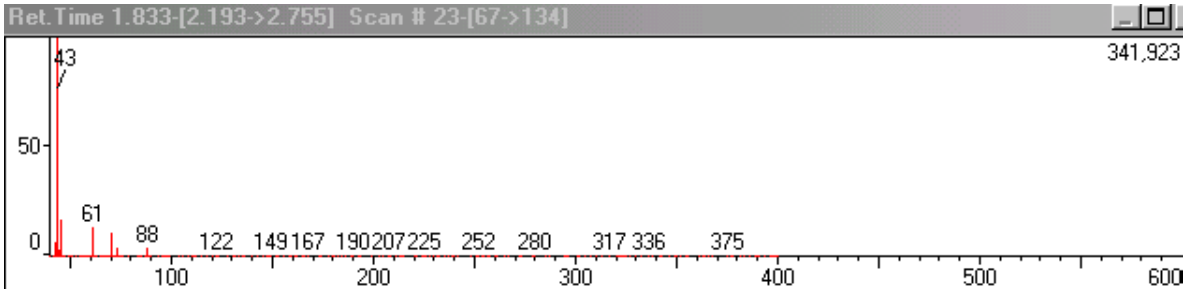
6- Composto 2-metil-1-butanol (M.M = 88).

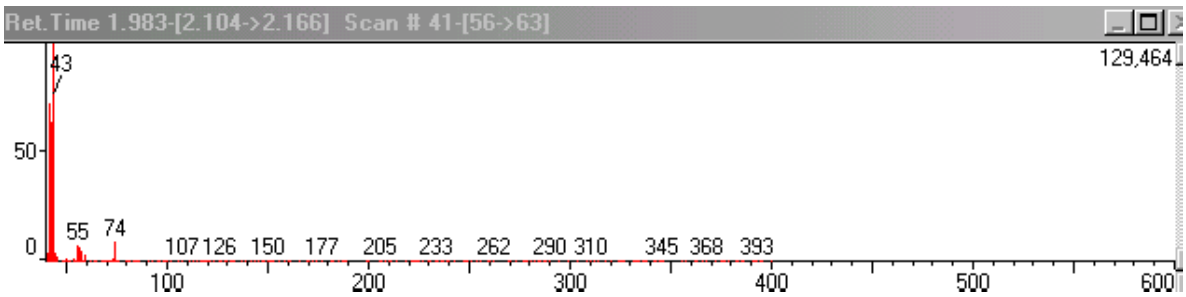
Fragmentações:

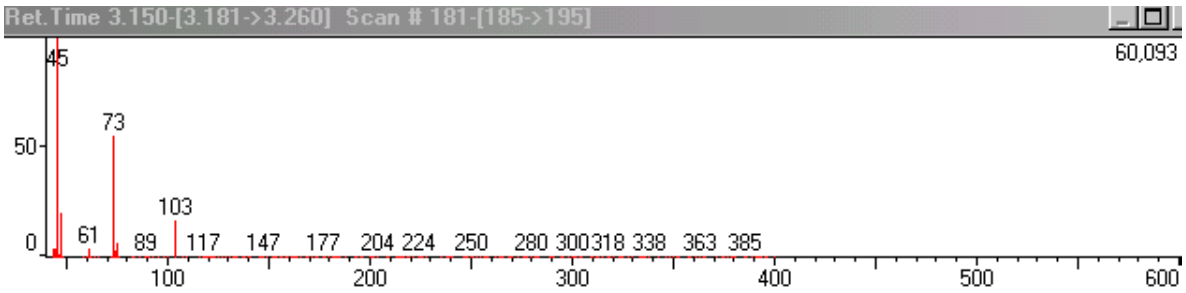
1.2 – Amostra 2

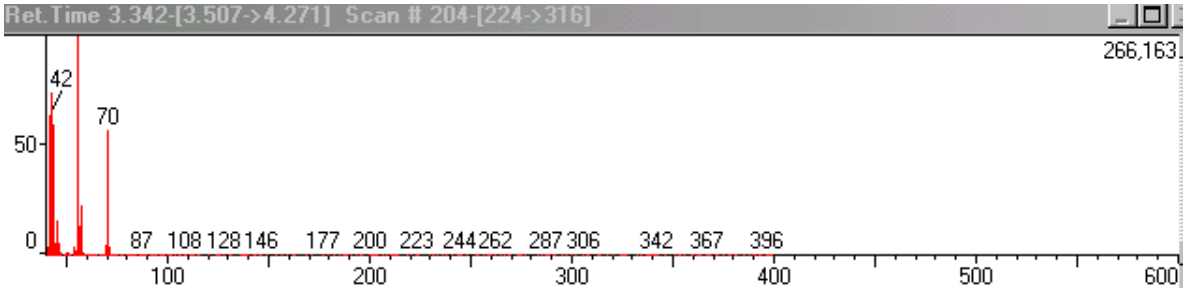


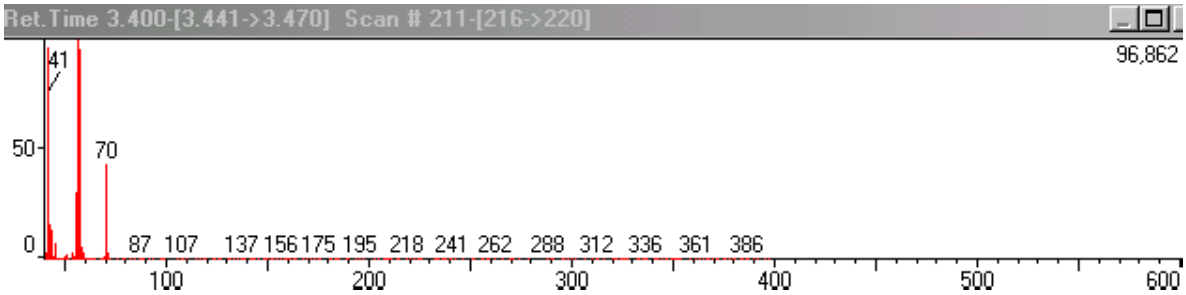




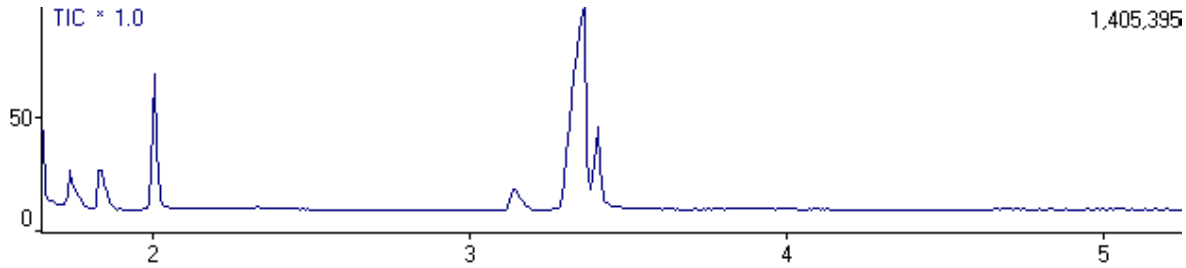

Ret.Time 1.983-[2.104->2.166] Scan # 41-[56->63]
129,464
43
55 74
107 126 150 177 205 233 262 290 310 345 368 393
50
0
100 200 300 400 500 600

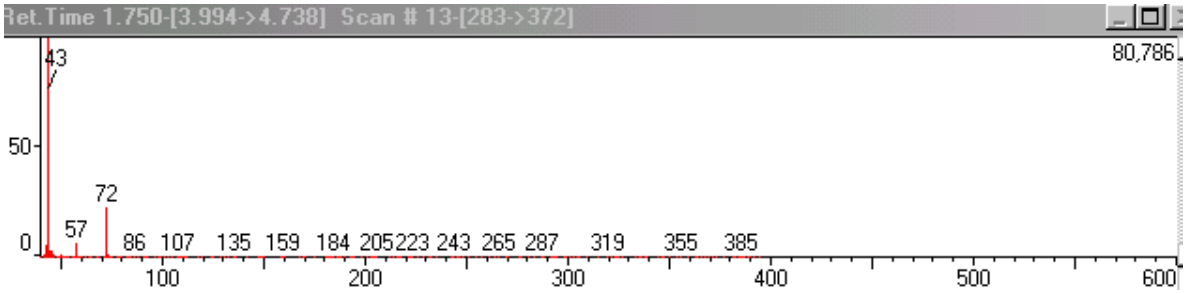

Ret.Time 3.150-[3.181->3.260] Scan # 181-[185->195]
60,093
45
73
103
61 89 117 147 177 204 224 250 280 300 318 338 363 385
50
0
100 200 300 400 500 600

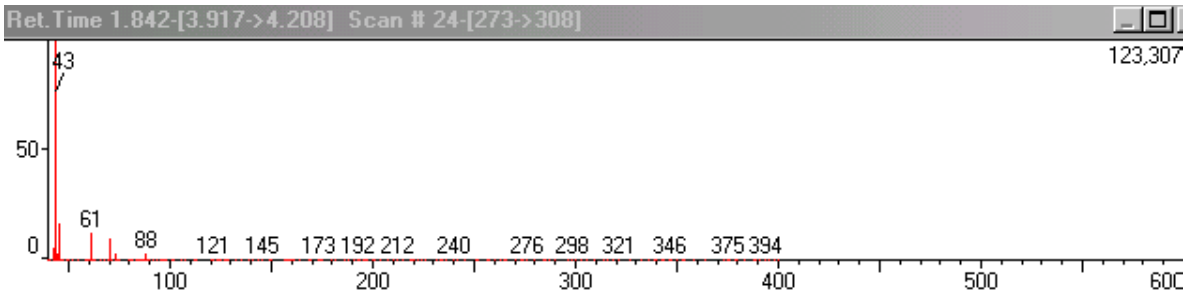

Ret.Time 3.342-[3.507->4.271] Scan # 204-[224->316]
266,163
42
70
87 108 128 146 177 200 223 244 262 287 306 342 367 396
50
0
100 200 300 400 500 600

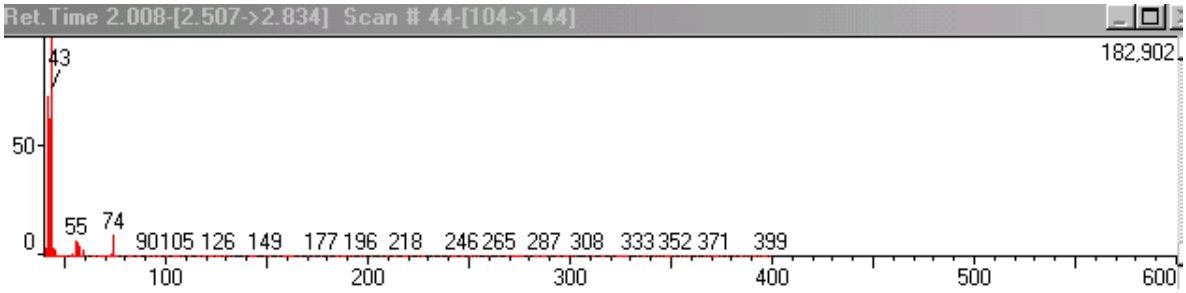

Ret.Time 3.400-[3.441->3.470] Scan # 211-[216->220]
96,862
41
70
87 107 137 156 175 195 218 241 262 288 312 336 361 386
50
0
100 200 300 400 500 600

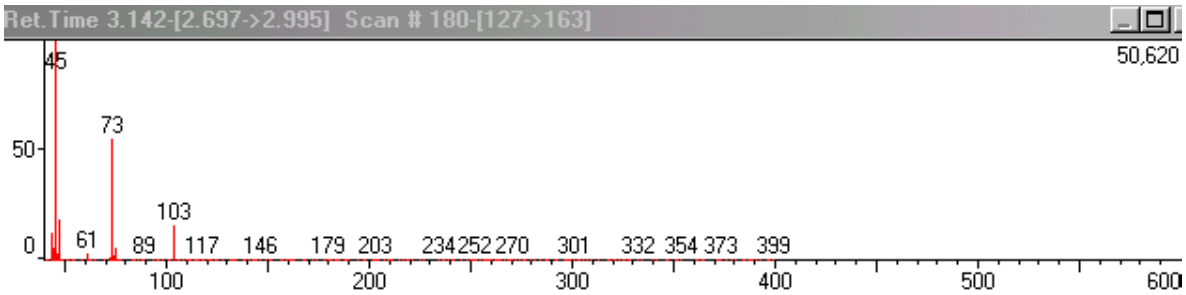
1.3 – Amostra 3

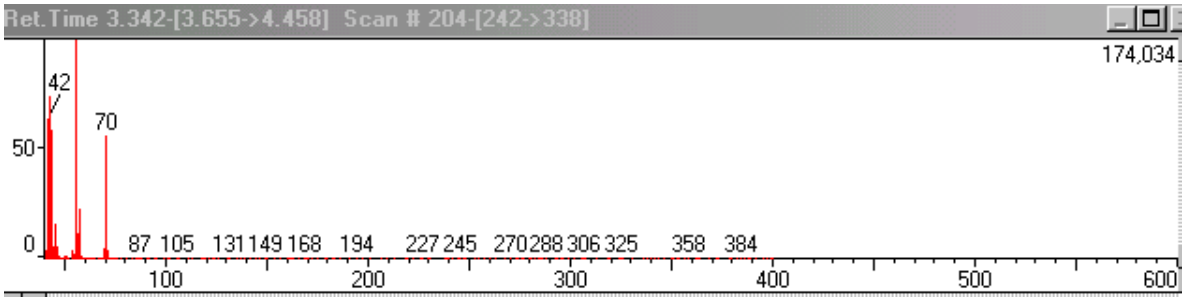

TIC * 1.0
1,405,395
50
0
2
3
4
5

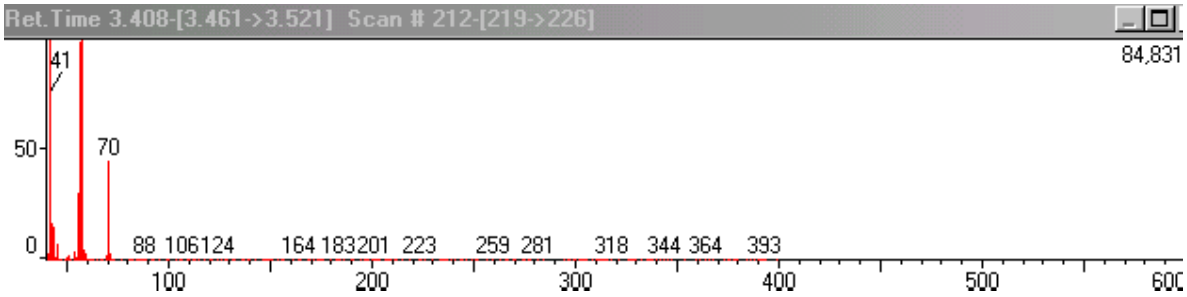

Ret.Time 1.750-[3.994->4.738] Scan # 13-[283->372]
80,786
43
72
57
86 107 135 159 184 205 223 243 265 287 319 355 385
50
0
100 200 300 400 500 600


Ret.Time 1.842-[3.917->4.208] Scan # 24-[273->308]
123,307
43
61
88
121 145 173 192 212 240 276 298 321 346 375 394
50
0
100 200 300 400 500 600


Ret.Time 2.008-[2.507->2.834] Scan # 44-[104->144]
182,902
43
55 74
90 105 126 149 177 196 218 246 265 287 308 333 352 371 399
50
0
100 200 300 400 500 600


Ret.Time 3.142-[2.697->2.995] Scan # 180-[127->163]
50,620
45
73
103
61 89 117 146 179 203 234 252 270 301 332 354 373 399
50
0
100 200 300 400 500 600


Ret.Time 3.342-[3.655->4.458] Scan # 204-[242->338]
174,034
42
70
50
0
87 105 131 149 168 194 227 245 270 288 306 325 358 384
100
200
300
400
500
600


Ret.Time 3.408-[3.461->3.521] Scan # 212-[219->226]
84,831
41
70
50
0
88 106 124 164 183 201 223 259 281 318 344 364 393
100
200
300
400
500