



ANA MARIA DE RESENDE MACHADO

**CARBAMATO DE ETILA, ACROLEÍNA E
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS: CARACTERIZAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO EM CACHAÇAS
PROVENIENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR COM
ADUBAÇÃO NITROGENADA E
ACONDICIONADAS EM VIDROS E
“BOMBONAS” DE PEAD**

**LAVRAS-MG
2010**

ANA MARIA DE RESENDE MACHADO

**CARBAMATO DE ETILA, ACROLEÍNA E HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS: CARACTERIZAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO EM CACHAÇAS PROVENIENTES DE CANA-DE-
AÇÚCAR COM ADUBAÇÃO NITROGENADA E ACONDICIONADAS EM
VIDROS E “BOMBONAS” DE PEAD**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientadores

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Dr. Luiz Antônio de Bastos Andrade
Dr. Haroldo Silveira Dórea

**LAVRAS - MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Machado, Ana Maria de Resende.

Carbamato de etila, acroleína e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos : caracterização e quantificação em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e “bombonas” de Pead / Ana Maria de Resende Machado. – Lavras : UFLA, 2010.

269 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Contaminantes. 2. Recipientes de armazenamento. 3. HPLC.
4. GC/MS. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.53

ANA MARIA DE RESENDE MACHADO

**CARBAMATO DE ETILA, ACROLEÍNA E HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS: CARACTERIZAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO EM CACHAÇAS PROVENIENTES DE CANA-DE-
AÇÚCAR COM ADUBAÇÃO NITROGENADA E ACONDICIONADAS EM
VIDROS E “BOMBONAS” DE PEAD**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de agosto de 2010.

Dr. Douglas Wagner Franco USP- São Carlos
Dr. Haroldo Silveira Dórea UFS
Dr. Patterson Patrício de Souza CEFET-MG
Dr. Carlos José Pimenta UFLA
Dra. Adelir Aparecida Saczk UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

**LAVRAS-MG
2010**

A Deus, pois sempre que eu pedi coragem, Ele me deu problemas e me indicou a solução deles, sempre que pedi conhecimento, Ele me mostrou que deveria ouvir os mais experientes, e, depois de tudo isso, ainda me proporcionou chegar até onde cheguei.

Ao meu esposo, Adelmo

Por ter sido meu braço forte e apoio na estrutura familiar;

Às minhas filhas, Juliana e Mariana, por serem o principal motivo da minha busca

por uma pessoa melhor;

À minha mãe, Zulmira, ao meu querido irmão, João, e ao meu pai (in memoriam)

por todo o carinho, incentivo e compreensão que me deram durante toda a minha

vida, ensinando-me a vivê-la com dignidade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, por agradecer-me com saúde, paz e uma família maravilhosa e permitindo-me alcançar mais uma vitória.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pelos anos de convivência, orientação tanto profissional como pessoal e, sobretudo, pela grande amizade.

À professora Dra. Adelir Aparecida Saczk, pelos ensinamentos valiosos compartilhados sobre as análises cromatográficas.

Ao professor Dr. Haroldo Silveira Dórea, pela acolhida e ajuda durante o desenvolvimento dos trabalhos no LCP/UFS.

Ao professor Dr. Luiz Antônio de Bastos Andrade, pelas valiosas discussões a respeito da adubação da cana-de-açúcar.

Aos Professores Dr. Douglas Wagner Franco (USP-São Carlos), Dr. Haroldo Silveira Dórea (UFS), Dr. Patterson Patrício de Souza (CEFET-MG), Dr. Carlos José Pimenta (UFLA) e Dra. Adelir Aparecida Saczk (UFLA), pela participação honrosa na banca avaliadora.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos professores do DQI/UFLA, em especial à Profa. Zuy Maria Magriotis, pela amizade e a todos os funcionários do Departamento de Química.

Ao CEFET-MG, na pessoa do diretor Prof. Flávio Antônio dos Santos, que possibilitou a capacitação dos docentes dessa Instituição. Em especial às amigas Clausymara, Flávia, Junia e Maria Cristina Vidigal, pelo estímulo e apoio, e aos demais colegas do Departamento de Química do CEFET-MG.

Ao meu querido Jean, pela amizade e companheirismo em todos os momentos, principalmente nas diversas “horas extras” de trabalho, que durante algum tempo tornaram-se rotina.

Ao Marcell e Elissandro do LCP/UFS, pela ajuda durante a realização das análises na UFS.

Aos amigos do laboratório LAFQA, colocados por Deus no meu caminho, por contribuírem para a realização deste trabalho: Lidiany, Felipe, Wilder e João.

Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica: Aline, Milene, Lucilene, Marcos, Juliana, Cíntia, Maria Luíza, Rodrigo e Renata, pela amizade e colaboração.

Aos demais colegas, Gustavo, Masson, Leonardo, Paula, Rafaela, Shirley, Cleusa e Hebe, que passaram por lá, mas deixaram o carinho e a saudade.

À Aline e à Carol, pela amizade e acolhida carinhosa na sua casa.

À Roseane e à Marcélia, pela grande amizade conquistada na cidade de Lavras.

Ao produtor de cachaça, Sr. João Mendes “in memoriam”, à sua família e funcionários, que cederam as amostras para a realização deste trabalho.

À Capes pelo suporte financeiro.

E àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho objetivou-se caracterizar e quantificar três contaminantes (carbamato de etila, acroleína e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)) presentes na cachaça artesanal obtida de cana-de-açúcar adubada com ureia e nitrato de amônio. As amostras foram acondicionadas em bombonas de polietileno de alta densidade (PEAD) e vidro, sendo posteriormente submetidas às análises físico-químicas e cromatográficas. As análises físico-químicas foram realizadas conforme metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A acroleína e os HPAs foram caracterizados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), respectivamente. Pelos resultados das análises da acroleína, verificou-se que somente, uma amostra apresentou-se fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira, e que o método utilizado é muito sensível com baixos limites de detecção e quantificação. Na determinação de HPAs, avaliou-se a influência do recipiente de armazenamento da cachaça na contaminação com essas substâncias. Comparando-se as concentrações dos HPAs nos dois tipos de recipientes, foi possível perceber que as cachaças acondicionadas em bombonas apresentaram níveis superiores àquelas armazenadas em vidro, e que os HPAs mais pesados só apareceram nas amostras acondicionadas em bombonas de polietileno. Na quantificação do carbamato de etila (CE), foram desenvolvidos e validados dois métodos analíticos. No primeiro, utilizou-se a microextração em fase sólida (SPME) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), usando o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), e no segundo, empregaram-se a derivação do CE e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência. Nenhuma das amostras apresentou concentração superior a $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$, limite estabelecido pela legislação brasileira.

Palavras-chave: Adubação nitrogenada da cana-de-açúcar. Carbamato de etila. Bombonas de polietileno. HPAs. Acroleína.

ABSTRACT

In the study sought to characterize and quantify three contaminants [ethyl carbamate, acrolein and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)] in the cachaça obtained from sugar cane fertilized with urea and ammonium nitrate. The samples were placed in canisters of high-density polyethylene (HDPE) and glass and were subjected to physico-chemical and chromatographic analysis. The physico-chemical methods were performed as described by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). The acrolein and PAHs were characterized and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), respectively. From the results of the analysis of acrolein, it was found that only one sample was outside the limits set by Brazilian law, and that the method is very sensitive, with low limits of detection and quantification. In the determination of PAHs, the influence of the storage container for the liquid on the contamination with these substances was evaluated. In comparing the PAH concentrations in cachaça stored both types of containers, the cachaça packed in drums had levels higher than those stored in glass, and the heavier PAHs only appeared in samples packed in polyethylene canisters. In the quantification of ethyl carbamate (EC), two analytical methods were developed and validated. The solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) method using selected ion monitoring (SIM) was evaluated first. The method using bypass CE and high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection was also evaluated. None of the samples showed concentrations exceeding the $150.0 \mu\text{g L}^{-1}$ limit established by Brazilian legislation.

Keywords: Nitrogen fertilization of sugarcane. Ethyl carbamate. Polyethylene drums. PAHs. Acrolein.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Etapas do processo de produção de cachaça..... | 30 |
| Figura 2 | Contribuição do nitrogênio na formação de biomoléculas..... | 32 |
| Figura 3 | Formação de álcoois superiores a partir de aminoácidos..... | 41 |
| Figura 4 | Formação de 1,1-dietoxi etano..... | 46 |
| Figura 5 | Via metabólica de formação do acetaldeído..... | 51 |
| Figura 6 | Fórmula estrutural da acroleína | 55 |
| Figura 7 | Via metabólica de formação da acroleína..... | 56 |
| Figura 8 | Mecanismo de eliminação metabólica do benzo(a)pireno..... | 67 |
| Figura 9 | Fórmula estrutural do carbamato de etila..... | 75 |
| Figura 10 | Estruturas conformacionais para o carbamato de etila..... | 76 |
| Figura 11 | Precursos do CE envolvidos no ciclo da ureia..... | 80 |
| Figura 12 | Dispositivo básico de SPME..... | 93 |

Capítulo 3

| | | |
|----------|--|-----|
| Figura 1 | Reação de derivação da acroleína com 2,4-DNPH..... | 158 |
| Figura 2 | Formação da acroleína na etapa de destilação..... | 171 |

Capítulo 4

| | | |
|----------|---|-----|
| Figura 1 | Equação da reação de derivação do CE..... | 199 |
| Figura 2 | Fragmentações propostas para o CE..... | 222 |

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo 2

| | | |
|-----------|--|-----|
| Gráfico 1 | Histograma dos teores de acidez volátil nas amostras de cachaça..... | 136 |
| Gráfico 2 | Histograma dos teores de ésteres nas amostras de cachaça | 138 |
| Gráfico 3 | Histograma dos teores de álcoois superiores nas amostras em cachaça..... | 139 |
| Gráfico 4 | Histograma dos teores de cobre nas amostras de cachaça..... | 141 |
| Gráfico 5 | Histograma dos teores de aldeídos nas amostras de cachaça... | 143 |
| Gráfico 6 | Histograma dos teores de furfural nas amostras de cachaça.... | 145 |

Capítulo 3

| | | |
|-----------|--|-----|
| Gráfico 1 | Intervalo de faixa linear de trabalho para acroleína..... | 163 |
| Gráfico 2 | Curva analítica das soluções de 2,4-DNFHo de acroleína..... | 164 |
| Gráfico 3 | Cromatograma do padrão da 2,4-DNPH de acroleína na concentração de 4,5 mg/100 mL de álcool anidro..... | 165 |
| Gráfico 4 | Cromatograma de uma amostra de cachaça..... | 166 |
| Gráfico 5 | Histograma dos teores de acroleína nas amostras de cachaça.. | 169 |

Capítulo 4

| | | |
|-----------|--|-----|
| Gráfico 1 | Gradiente de eluição das programações nº1 e 2 | 185 |
| Gráfico 2 | Gradiente de eluição das programações nº3 e 4 | 186 |
| Gráfico 3 | Intervalo de faixa linear de trabalho para o CE..... | 202 |
| Gráfico 4 | Curva analítica obtida a partir das soluções de CNXE..... | 203 |
| Gráfico 5 | Cromatograma típico de uma amostra de cachaça..... | 206 |
| Gráfico 6 | Efeito de diferentes fibras na extração do CE..... | 209 |
| Gráfico 7 | Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial 2^4 para CE | 211 |
| Gráfico 8 | Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 no ponto central para CE..... | 212 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Gráfico 9 | Estudo cinético para extração do CE e do CM..... | 213 |
| Gráfico 10 | Curva analítica obtida a partir das soluções de CE na matriz.. | 216 |
| Gráfico 11 | Cromatograma de íons dos padrões CE e CM..... | 220 |
| Gráfico 12 | Cromatograma de íons totais no modo SIM (a), de uma amostra de cachaça e a m/z 62 (b)..... | 221 |
| Gráfico 13 | Espectro de massas do CE..... | 222 |
| Capítulo 5 | | |
| Gráfico 1 | Sobreposição dos cromatogramas referentes ao pico do naftaleno (a) e do benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno(b) da curva de HPAs preparada em acetona e acetato de etila..... | 244 |
| Gráfico 2 | Cromatogramas com sobreposição dos picos dos padrões em acetato de etila, na matriz e em ma matriz isenta de padrões. | 244 |
| Gráfico 3 | Cromatograma da curva na matriz contendo os 16 HPAs..... | 246 |
| Gráfico 4 | Histograma da concentração de HPAs em amostras de cachaças acondicionadas em vidros e em bombonas de PEAD..... | 253 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Padrões de Identidade e Qualidade para cachaça e aguardente de cana..... | 28 |
| Tabela 2 | Estruturas químicas, propriedades e classificação dos HPAs..... | 64 |

Capítulo 2

| | | |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | Tipo e quantidade de adubo e recipientes de armazenamento das amostras..... | 127 |
| Tabela 2 | Composição físico-química das cachaças provenientes de cana, com adubação nitrogenada acondicionada em vidros | 134 |
| Tabela 3 | Composição físico-química das cachaças provenientes de cana, com adubação nitrogenada acondicionada em frascos de plástico (bombonas)..... | 135 |

Capítulo 3

| | | |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | Condições cromatográficas para a análise de acroleína..... | 160 |
| Tabela 2 | Concentrações (mg/100 mL de álcool anidro) de acroleína em amostras de cachaças..... | 167 |

Capítulo 4

| | | |
|----------|---|-----|
| Tabela 1 | Condições cromatográficas para a análise do CE..... | 187 |
| Tabela 2 | Variáveis e níveis dos fatores investigados no planejamento fatorial completo 2^4 | 195 |
| Tabela 3 | Variáveis e níveis dos fatores investigados no planejamento fatorial completo 2^3 | 196 |
| Tabela 4 | Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de CE em amostras de cachaças... | 207 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Tabela 5 | Resultados da otimização do método de extração por SPME..... | 214 |
| Tabela 6 | Parâmetros obtidos na validação do método..... | 217 |
| Tabela 7 | Concentrações de CE em cachaças procedentes de cana adubada..... | 224 |
| Tabela 8 | Comparação das médias das concentrações de CE obtidas por duas técnicas..... | 226 |
| Capítulo 5 | | |
| Tabela 1 | Parâmetros de aquisição de dados no detector de massas... | 242 |
| Tabela 2 | Curvas analíticas e coeficientes de determinação (r^2) usados na quantificação dos HPAs..... | 247 |
| Tabela 3 | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) de HPAs em amostras de cachaça acondicionadas em vidros..... | 249 |
| Tabela 4 | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) de HPAs em amostras de cachaça acondicionadas em bombonas..... | 250 |
| Tabela 5 | Concentração média de HPAs em amostras de cachaça acondicionadas em vidros e bombonas, $\mu\text{g L}^{-1}$ | 251 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------|--|
| ACGIH | American Conference of Governmental Industrial Higiienists |
| AOAC | Association of Official Agricultural Chemists |
| APEX | Agência de Promoção de Exportações. |
| BATF | Bureau of Alcohol Tabaco and Fire Arms |
| CE | Carbamato de etila |
| CM | Carbamato de metila |
| CNXE | Carbamato de N-xantil etila |
| CW | Carbowax |
| CW/DVB | Carbowax/divinilbenzeno |
| DAD | Diode array detector |
| DAP | Dias após o plantio |
| DEP | Diethyl pirocarbonate |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| FDA | Food And Drug Administration. |
| FID | Detectorde ionização por chama |
| FLD | Detector de fluorescência |
| GC | Cromatografia gasosa |
| GC-MS | Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas |
| HPAs | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| IARC | International Agency for Research on Câncer |
| JECFA | Joint Expert Commitee on Food Additives |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| NIOSH | National Institute for Occupational Safety and Healht |
| OIV | Office International de La Vigne ET Vue |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PA | Poliacrilato |
| PDMS | Polidimetil siloxan |
| PDMS/DVB | Polidimetil siloxan/divinilbenzeno |
| PEAD | Polietileno de alta densidade |
| PET | Politereftalato de etileno |
| PIQs | Padrões de Identidade e Qualidade |
| PP | Polipropileno |
| PVC | Cloreto de polivinila |
| SIM | Monitoramento seletivo de íons |
| SPE | Extração em fase sólida |
| SPME | Microextração em fase sólida |
| USEPA | United States Enveronmental Protection Agency |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|----|
| | CAPÍTULO 1: Introdução Geral | 22 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 25 |
| 2.1 | Importância econômica da cachaça/aguardente de cana no Brasil | 25 |
| 2.2 | Regulamentações da cachaça/aguardente de cana | 27 |
| 2.3 | Etapas do processo de produção da cachaça de alambique | 29 |
| 2.3.1 | Adubação nitrogenada da cana-de-açúcar | 31 |
| 2.3.2 | Acondicionamento da cachaça | 36 |
| 2.4 | Compostos voláteis na cachaça | 38 |
| 2.5 | Compostos secundários desejáveis | 40 |
| 2.5.1 | Álcoois superiores | 40 |
| 2.5.2 | Ésteres | 42 |
| 2.5.3 | Ácidos carboxílicos | 44 |
| 2.5.4 | Acetais | 45 |
| 2.6 | Compostos secundários indesejáveis | 46 |
| 2.6.1 | Cobre | 46 |
| 2.6.2 | Arsênio e chumbo | 47 |
| 2.6.3 | Metanol | 48 |
| 2.6.4 | Butanol-1 e butanol-2 | 49 |
| 2.6.5 | Acetoína | 50 |
| 2.6.6 | Acetaldeído | 51 |
| 2.6.7 | Furfural | 52 |
| 2.6.8 | Compostos de enxofre | 53 |
| 2.6.9 | Acroleína | 54 |
| 2.6.9.1 | Formação e propriedades | 54 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 2.6.9.2 | Toxicidade..... | 56 |
| 2.6.9.3 | Acroleína em alimentos e bebidas..... | 57 |
| 2.6.9.4 | Métodos de análise para acroleína..... | 58 |
| 2.6.10 | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)..... | 60 |
| 2.6.10.1 | Formação..... | 61 |
| 2.6.10.2 | Legislação..... | 61 |
| 2.6.10.3 | Toxicidade..... | 62 |
| 2.6.10.4 | Propriedades físico-químicas..... | 65 |
| 2.6.10.5 | HPAs em alimentos e bebidas..... | 68 |
| 2.6.10.6 | Métodos de análises para HPAs..... | 72 |
| 2.6.10.6.1 | Métodos de extração..... | 73 |
| 2.6.11 | Carbamato de etila..... | 75 |
| 2.6.11.1 | Propriedades físico-químicas e aplicações..... | 75 |
| 2.6.11.2 | Mecanismos de formação do carbamato de etila em alimentos e bebidas..... | 77 |
| 2.6.11.3 | Legislação..... | 85 |
| 2.6.11.4 | Aspectos toxicológicos..... | 86 |
| 2.6.11.5 | Ocorrência em bebidas..... | 88 |
| 2.6.11.6 | Métodos de análises para carbamato de etila..... | 89 |
| 2.6.11.6.1 | Extração e pré-concentração..... | 90 |
| 2.6.11.6.2 | Extração em fase sólida (SPE)..... | 91 |
| 2.6.11.6.3 | Microextração em fase sólida (SPME)..... | 92 |
| 2.6.11.6.4 | Derivação..... | 95 |
| 2.6.11.6.5 | Cromatografia em fase Gasosa..... | 96 |
| 2.6.11.6.6 | Cromatgrafia Líquida de Alta Eficiência..... | 99 |
| 2.6.11.6.7 | Planejamento fatorial..... | 100 |
| | REFERÊNCIAS..... | 101 |

| | | |
|---------------|--|------------|
| | CAPÍTULO 2: Análises físico-químicas das cachaças obtidas de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e “bombonas” de PEAD..... | 121 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 124 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 126 |
| 2.1 | Obtenção das amostras..... | 126 |
| 2.2 | Reagentes e solventes..... | 128 |
| 2.3 | Equipamentos e materiais..... | 128 |
| 2.4 | Análise estatística..... | 128 |
| 2.5 | Análise físico-química..... | 128 |
| 2.5.1 | Exame sensorial..... | 129 |
| 2.5.2 | Teor alcoólico..... | 129 |
| 2.5.3 | Extrato seco..... | 129 |
| 2.5.4 | Acidez volátil..... | 129 |
| 2.5.5 | Álcoois superiores | 130 |
| 2.5.6 | Aldeídos..... | 130 |
| 2.5.7 | Furfural..... | 130 |
| 2.5.8 | Ésteres..... | 131 |
| 2.5.9 | Metanol..... | 131 |
| 2.5.10 | Cobre..... | 131 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 132 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 147 |
| | REFERÊNCIAS..... | 148 |
| | CAPÍTULO 3: Caracterização e quantificação de acroleína por HPLC em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e “bombonas” de PEAD..... | 151 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 154 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 156 |
| 2.1 | Reagentes e Solventes | 156 |
| 2.2 | Equipamentos e materiais | 156 |
| 2.3 | Amostras | 156 |
| 2.4 | Preparação do padrão | 157 |
| 2.4.1 | Purificação da 2,4-dinitrofenilhidrazina | 157 |
| 2.4.2 | Síntese do 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína | 157 |
| 2.4.3 | Preparo da solução estoque de 2,4-DNPHo de acroleína | 159 |
| 2.4.4 | Derivação das amostras | 159 |
| 2.5 | Condições cromatográficas | 159 |
| 2.6 | Análise quantitativa da acroleína | 160 |
| 2.7 | Análise estatística | 162 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 163 |
| 4 | CONCLUSÃO | 172 |
| | REFERÊNCIAS | 173 |
| | CAPÍTULO 4: Caracterização e quantificação de carbamato de etila por HPLC e GC/MS em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionada em vidros e “bombonas” de PEAD | 176 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 179 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 181 |
| 2.1 | Amostras | 181 |
| 2.2 | Reagentes e Solventes | 181 |
| 2.3 | Equipamentos e materiais | 182 |
| 2.4 | Análise de carbamato de etila por cromatografia líquida de alta eficiência | 183 |
| 2.4.1 | Purificação do xantidrol | 183 |
| 2.4.2 | Síntese do xantiluretano | 183 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 2.4.3 | Soluções..... | 184 |
| 2.4.3.1 | Solução de fase móvel: acetato de sódio 20 mmol L ⁻¹ | 184 |
| 2.4.3.2 | Solução estoque de carbamato de N-xantil etila..... | 184 |
| 2.4.4 | Derivação das amostras..... | 184 |
| 2.4.5 | Otimização das condições cromatográficas..... | 185 |
| 2.4.5.1 | Testes de programação de separação..... | 185 |
| 2.4.5.2 | Teste de solubilidade do carbamato de N-xantil etila..... | 186 |
| 2.4.5.3 | Testes de fase móvel..... | 186 |
| 2.4.6 | Análise quantitativa do carbamato de N-xantil etila..... | 187 |
| 2.4.6.1 | Caracterização do carbamato de N-xantil etila..... | 187 |
| 2.4.6.2 | Parâmetros de validação..... | 188 |
| 2.5 | Análise de carbamato de etila por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e microextração em fase sólida..... | 190 |
| 2.5.1 | Solução padrão..... | 191 |
| 2.5.2 | Solução tampão de fosfato/hidróxido de sódio..... | 191 |
| 2.5.3 | Condicionamento de fibras..... | 192 |
| 2.5.4 | Pré-seleção das fibras..... | 192 |
| 2.5.5 | Otimização das condições cromatográficas..... | 192 |
| 2.5.6 | Estudo cinético..... | 196 |
| 2.5.7 | Quantificação do carbamato de etila..... | 196 |
| 2.5.8 | Parâmetros de validação..... | 197 |
| 2.6 | Análise estatística..... | 198 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 199 |
| 3.1 | Análise por cromatografia líquida de alta eficiência..... | 199 |
| 3.1.1 | Caracterização do carbamato de N-xantil etila..... | 199 |
| 3.1.2 | Otimização das condições de análises..... | 200 |
| 3.1.3 | Parâmetros de validação..... | 202 |

| | | |
|-------|---|------------|
| 3.1.4 | Análise cromatográfica das amostras de cachaça..... | 205 |
| 3.2 | Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas..... | 208 |
| 3.2.1 | Seleção da fibra..... | 208 |
| 3.2.2 | Otimização das condições de extração..... | 210 |
| 3.2.3 | Estudo cinético..... | 212 |
| 3.2.4 | Parâmetros de validação..... | 216 |
| 3.2.5 | Análise cromatográfica das amostras de cachaça..... | 220 |
| 3.3 | Adubação nitrogenada da cana-de-açúcar e a formação do carbamato de etila em cachaças artesanais..... | 224 |
| 3.4 | Comparação dos resultados de carbamato de etila obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e microextração em fase em sólida..... | 226 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 227 |
| | REFERÊNCIAS..... | 228 |
| | CAPÍTULO 5: Caracterização e quantificação de HPAS por GC/MS em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e “bombonas” de PEAD..... | 233 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 236 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 238 |
| 2.1 | Amostras..... | 238 |
| 2.2 | Reagentes e Solventes..... | 238 |
| 2.3 | Equipamentos e materiais..... | 239 |
| 2.4 | Preparo da solução padrão..... | 239 |
| 2.5 | Teste de solubilidade na preparação da curva..... | 240 |
| 2.6 | Extração das amostras..... | 240 |

| | | |
|-----|------------------------------------|-----|
| 2.7 | Análise quantitativa dos HPAs..... | 241 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 242 |
| 3.1 | Extração das mostras..... | 242 |
| 3.2 | Solubilidade dos padrões..... | 243 |
| 3.3 | Separação cromatográfica..... | 245 |
| 3.4 | Quantificação dos HPAs..... | 246 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 254 |
| | REFERÊNCIAS | 255 |
| | ANEXOS..... | 257 |

CAPÍTULO 1: Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A cachaça, bebida genuinamente brasileira, é muito apreciada por seu sabor e aroma característicos, que são decorrentes dos processos de fermentação, destilação e envelhecimento. No Brasil existem dois processos de produção de cachaça, que se distinguem na quantidade produzida e no processo de destilação utilizado. A cachaça industrial é produzida em grande escala e em colunas de fracionamento de aço inox, tendo como principal produtor o estado de São Paulo. A cachaça artesanal é produzida em pequena escala e em alambique de cobre, destacando-se com Minas Gerais na tradição desse setor. Tanto uma quanto a outra são apreciadas no país e no exterior, porém ambas apresentam características peculiares. Um grande problema que as destilarias artesanais enfrentam é a falta de padronização da bebida e até mesmo a obediência à legislação vigente quanto a alguns parâmetros. Apesar da importância econômica e social da cachaça brasileira, ainda há muito a fazer nessa área.

As exigências dos mercados, interno e externo, fazem com que a preocupação com a qualidade da bebida e, conseqüentemente, melhorias na sua qualidade sejam implementadas, não apenas do ponto de vista comercial, mas considerando principalmente os efeitos toxicológicos, já que um produto que contém compostos indesejáveis podem causar danos à saúde do consumidor.

A produção de cachaça de alambique em Minas Gerais, mesmo registrando um alto grau de clandestinidade, desempenha importante papel na estruturação da economia agroindustrial do Estado. Em Minas Gerais, são mais de 8.466 produtores, sendo a maioria informal, já que apenas 452 deles possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A produção mineira é da ordem de 180 milhões de litros por ano, enquanto o

consumo interno é estimado em 200 milhões de litros anuais. Devido ao grande índice de informalidade, estima-se que a quantidade produzida pelo Estado seja muito maior do que os dados apresentados.

Os produtores clandestinos trabalham de forma precária, utilizam materiais inadequados à produção de cachaça de qualidade, como recipientes de plástico, alambiques de aço inox e tanques de cimento amianto. Tal conduta tem proporcionado a produção de uma bebida de baixa qualidade, sem padronização, favorecendo a contaminação e não atendendo às exigências da legislação nacional. Tais práticas, aliadas à complexidade da matriz “cachaça”, favorecem o aparecimento de contaminantes, como cobre, carbamato de etila, acroleína, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), entre outros, que são frequentemente encontrados na bebida e merecem grande atenção em razão das propriedades tóxicas apresentadas. É consenso entre os pesquisadores, produtores e apreciadores da cachaça de que não basta apenas que a bebida atenda aos requisitos legais estabelecidos para sua produção, é preciso esclarecer bem todas as etapas de produção, bem como os fatores que influenciam na sua qualidade. Assim, as etapas de produção passaram a ser alvo de investigações científicas e que se intensificaram.

Dessa forma, no presente estudo objetivou-se contribuir para o desenvolvimento da cadeia produtiva da cachaça em Minas Gerais, dada a sua importância socioeconômica e a carência de pesquisas que abordem os aspectos referentes à adubação da cana, bem como a utilização de embalagens plásticas e as implicações dessa prática sobre a composição química da bebida. Este trabalho foi desenvolvido em quatro etapas distintas. Inicialmente, no capítulo 1, foi realizada uma revisão bibliográfica abrangendo todos os temas tratados, buscando relacionar os fatores envolvidos na formação do carbamato de etila na bebida, técnicas analíticas para quantificação dos possíveis contaminantes e as implicações da adubação da cana e do acondicionamento da bebida sobre a

composição química da cachaça. No capítulo 2, foram realizadas as análises físico-químicas das amostras de cachaças provenientes de cana adubada com ureia e nitrato de amônio e acondicionada em recipientes de vidros e de polietileno tipo bombonas de polietileno de alta densidade (PEAD). No capítulo 3, foram analisados e quantificados níveis de acroleína nas amostras de cachaças estudadas, e no capítulo 4, objetivou-se desenvolver novos métodos para o carbamato de etila. No capítulo 5, foram quantificados os HPAs presentes na bebida, possivelmente oriundos de contaminação pelo recipiente utilizado no acondicionamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica da cachaça/aguardente de cana no Brasil

As primeiras aguardentes de cana/cachaças brasileiras foram obtidas do caldo fermentado da cana esquecido pelos escravos nos engenhos de um dia para outro, os quais passaram a observar que tal caldo, quando deixado de um dia para outro, apresentava sabor agradável e ardente e, quando ingerido, proporcionava-lhes maior ânimo e coragem para o trabalho do dia a dia, fazendo com que esquecessem as torturas da escravidão. Nasce então a cachaça, não sabendo ao certo quando foram improvisados os primeiros alambiques (TRINDADE, 2006).

A palavra cachaça praticamente não foi usada em nenhum outro país, existindo somente no Brasil. Seja qual for o seu modo de origem, o importante é que ela nasceu no país e aos poucos transformou-se em símbolo da brasilidade. Hoje, várias marcas de alta qualidade figuram no comércio nacional e internacional, estando presentes nos melhores restaurantes e adegas residenciais no Brasil e no mundo. Segundo a Agência de Promoção de Exportações e Investimentos (APEX) a bebida ganhou nome próprio no exterior “Cachaça do Brasil” e a ela são voltados vários planos e projetos do governo para a sua expansão em âmbito nacional e internacional (APEX, 2008).

No Brasil, existem mais de 30 mil produtores de cachaça, os quais produzem mais de 5 mil marcas, gerando 400 mil empregos diretos e indiretos. O estado de São Paulo é o maior produtor (44%), seguido por Pernambuco e Ceará, com 12% cada um e Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, com 8%, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Paraíba dividem o restante da produção nacional (CANÇADO-JÚNIOR; PAIVA; ESTANISLAU, 2009).

Há dois tipos de produção da bebida: a industrial, que é destilada em colunas de aço inox, característica de empresas de médio e grande porte, com produção em larga escala, e a artesanal, destilada em alambique de cobre, e produzida em pequena escala. Nesse processo, há o fracionamento de partes, separando a cabeça, o corpo e a cauda. Dentro de cada tipo, é construído um conceito de qualidade próprio, atrelado à sua estrutura produtiva e organizacional. A grande vantagem da cachaça artesanal sobre a industrial é o aroma e o buquê característicos, enquanto a vantagem da industrial sobre a artesanal é a padronização do produto. Segundo o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), a cachaça artesanal representa apenas 10% das vendas de cachaça no mercado externo, concentrada principalmente na produção mineira (SEBRAE, 2008).

Minas Gerais é o estado com o maior número de cidades produtoras da bebida artesanal e o mais especializado na área. Representa 50% da produção de cachaça artesanal, com 8.500 alambiques e uma produção que pode alcançar 200 milhões de litros/ano, com destaque para as regiões Norte, Jequitinhonha e Rio Doce, as quais detêm cerca de 63% da produção mineira; porém, acredita-se que apenas 0,3% do que é produzido no Estado seja exportado (CANÇADO-JÚNIOR; PAIVA; ESTANISLAU, 2009; OLIVEIRA; MAGALHÃES; BERGERAT, 2009). Mesmo registrando um alto grau de clandestinidade, desempenha importante papel na estruturação da economia agroindustrial do Estado. O aumento do consumo da bebida e conseqüentemente da sua produção levaram a uma demanda técnica e científica das etapas de produção, com estudos e pesquisas nas áreas de desenvolvimento genético de mudas de cana, corte e manejo, fermentação, destilação e envelhecimento.

2.2 Regulamentações da cachaça/aguardente de cana

O Decreto Federal 4.851 de 2003, baseado na portaria 371 do Decreto original nº 2314, de 04/09/1997, dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e a fiscalização de bebidas. De acordo com este decreto e complementado pela Instrução Normativa de nº 13 de 30/06/2005, **Aguardente de cana** é a bebida com graduação alcoólica entre 38% e 54% v/v a 20°C obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares em até 6,0 g L⁻¹, expressos em sacarose. **Cachaça** é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica entre 38% e 48% v/v a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares em até 6,0 g L⁻¹, expressos em sacarose. Visando a proteger a marca brasileira no cenário internacional, o artigo 92 dessa Lei define que cachaça é um produto genuinamente brasileiro. (BRASIL, 2003, 2005).

De acordo com a Instrução Normativa de nº 13 de 2005, os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para a aguardente de cana-de-açúcar e para a cachaça, estabelecidos pela legislação brasileira no decreto 4.851 em 2003, foram mantidos e acrescentados limites para outros contaminantes, como carbamato de etila (CE), propenal-2 (acroleína), butanol-2, butanol-1, chumbo e arsênio, conforme Tabela 1 (BRASIL, 2005).

Neste trabalho, a bebida será tratada como cachaça, pois o teor alcoólico das amostras não ultrapassou 48 %v/v de etanol, conforme legislação, e por ser uma palavra utilizada exclusivamente no Brasil para nomear a bebida destilada obtida do caldo da cana-de-açúcar. Salvo ao se referir a artigo que trata a bebida

como aguardente, ela será referida como tal, mantendo a integridade do trabalho descrito pelo autor.

Tabela 1 Padrões de Identidade e Qualidade para cachaça e aguardente de cana

| Componente | Unidade | Limites |
|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Teor de etanol em aguardente | % em v/v de etanol a 20 °C | 38 - 54 |
| Teor de etanol em cachaça | % em v/v de etanol a 20 °C | 38 - 43 |
| Sacarose em açúcar cristal, | g/L | 6,0 - 30 |
| Acidez volátil em ac. acético | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 150 |
| Ésteres, em acetato de etila | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 200 |
| Aldeídos, em aldeído acético | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 30 |
| Soma de furfural e HMF | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 5 |
| Álcoois superiores* | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 360 |
| Congêneres** | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 200-650 |
| Álcool metílico | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 20 |
| Cobre | mg L ⁻¹ | 5 |
| Chumbo | µg L ⁻¹ | 200 |
| Arsênio | µg L ⁻¹ | 100 |
| Extrato seco | g L ⁻¹ | 6*** |
| Carbamato de etila | µg L ⁻¹ | 150 |
| Acroleína | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 5 |
| Butanol-2 | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 10 |
| Butanol-1 | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 3 |

*Álcoois superiores = (isobutílico + isoamílico + propílico), HMF = hidroximetilfurfural, **Congêneres = (Acidez volátil + Ésteres + Aldeídos + Furfural + Álcoois Superiores), ***Aguardente de cana e cachaça “adoçada” = máximo 30,0 g/L
Fonte: BRASIL, 2005

2.3 Etapas do processo de produção da cachaça de alambique

A produção de cachaça é uma atividade desenvolvida em todo o Brasil e, pelo seu valor histórico, parece ter incorporado os segredos e a tradição de Minas Gerais. Até o início dos anos 80, conceitos, crendices e técnicas populares envolviam essa atividade de tal forma que cada alambique parecia produzir uma cachaça especial e diferente de todas as outras. Hoje, sua produção vem passando por uma profunda modificação, tentando obter uma homogeneidade nas características do produto, visando à qualidade química e sensorial da bebida (RECHE; FRANCO, 2009).

O perfil atual da cachaça no Brasil exige um controle rigoroso de todas as etapas do processo produtivo, no sentido de padronizar a bebida, para atender ao crescente mercado externo e principalmente ao mercado interno. Essas etapas são basicamente a moagem da cana, filtração do caldo e preparo do mosto, fermentação, destilação, descanso, envelhecimento, engarrafamento e comercialização, conforme Figura 1. A fermentação é uma etapa crítica do processo, porém a utilização de leveduras selecionadas tem facilitado a sua condução. Nessa etapa, os micro-organismos, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, transformam o açúcar e outros componentes presentes no caldo em etanol, CO₂ e componentes secundários, que são responsáveis pela qualidade e anormalidades do produto final. Uma vez finalizada a fermentação, o mosto fermentado, também conhecido como vinho, é submetido à destilação para separação, seleção e concentração dos componentes voláteis (DIAS, 2006).

Artesanalmente a destilação ocorre em um equipamento conhecido como alambique. Em função do grau de volatilidade, o destilado é separado em três frações: "cabeça", (primeira fração), contendo metanol, acetaldeído e elevado grau alcoólico; "coração", (teor alcoólico variável de 45 a 48% em volume), a 20°C, é a fração nobre da destilação, isto é, a cachaça (80% do

destilado total) e "cauda", corresponde de 10% a 15% do destilado total contendo ácidos voláteis, parte dos álcoois superiores, entre outros. O resíduo remanescente na caldeira é a vinhaça, que hoje está sendo empregada na alimentação de animais e na fertilização do solo (EVANGELISTA, 2006).

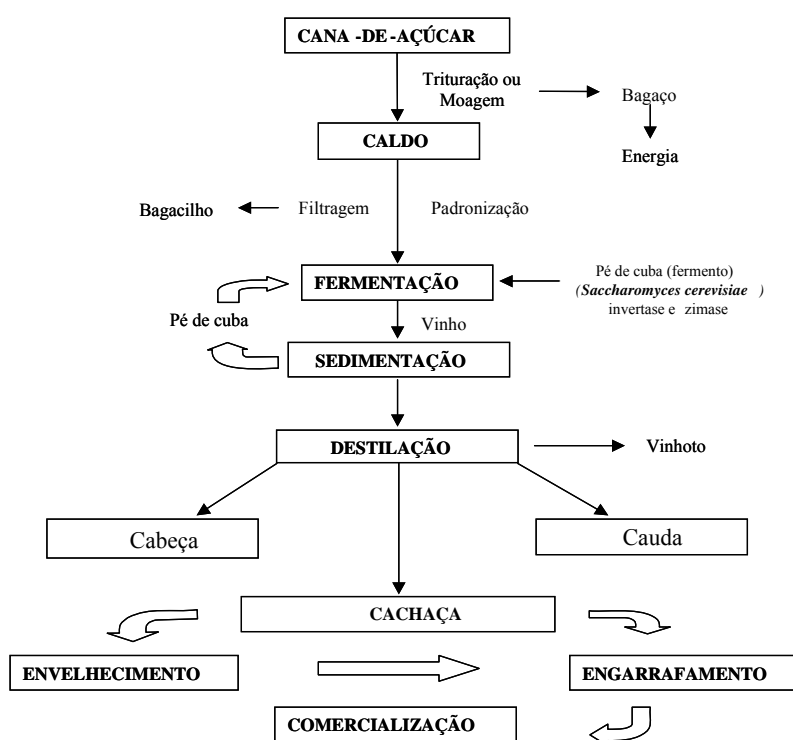


Figura 1 Etapas do processo de produção de cachaça
Fonte: Adaptada de Cardoso (2006)

Após a destilação, a bebida não deverá ser ingerida; é preciso que ela passe por um período de descanso, de três meses, para que haja equilíbrio entre os componentes e eles possam contribuir efetivamente para o buquê da cachaça. De outra forma, a bebida poderá ser acondicionada em recipientes de madeira, etapa de envelhecimento, por, no mínimo, 1 ano e, assim, receber a

denominação de cachaça envelhecida. O envelhecimento em madeiras diferentes proporciona à bebida sabor e aroma diferenciados (AQUINO et al., 2006).

É oportuno neste momento discutir sobre adubação nitrogenada da cana, uma vez que as amostras analisadas nesta pesquisa foram provenientes de cana adubada com ureia e nitrato de amônio.

2.3.1 Adubação nitrogenada da cana-de-açúcar

O nitrogênio é um elemento químico fundamental na formação de biomoléculas, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos e demais grupos. Ele ocorre em três formas principais no solo: nitrogênio gasoso, integrante da matéria orgânica do solo e não disponível para a planta; nitrogênio amoniacal, fixado pelos materiais argilosos, que é disponível lentamente para as plantas e íons de amônio; e nitrato ou compostos solúveis, assimilado pelas plantas, conforme Figura 2. Na natureza, a incorporação do nitrogênio ao ecossistema é feita, principalmente, pelas bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas, que catalisada pela enzima nitrogenase, converte o N_2 em íons amônio (NH_4^+), que serão utilizados pelos seres vivos para a formação de seus compostos nitrogenados (VITTI et al., 2007).

O nitrogênio representa apenas 1% da matéria seca total da cana-de-açúcar e está envolvido diretamente na síntese de aminoácidos essenciais, de clorofila e na produção de carboidratos. Dos nutrientes essenciais, o nitrogênio é um dos mais absorvidos pela cana-de-açúcar, perdendo apenas para o potássio (COLETI et al., 2006). Diversas proteínas são formadas pelas diferentes combinações de aminoácidos, das quais 18% são representadas pelo nitrogênio (CONTIN, 2007).

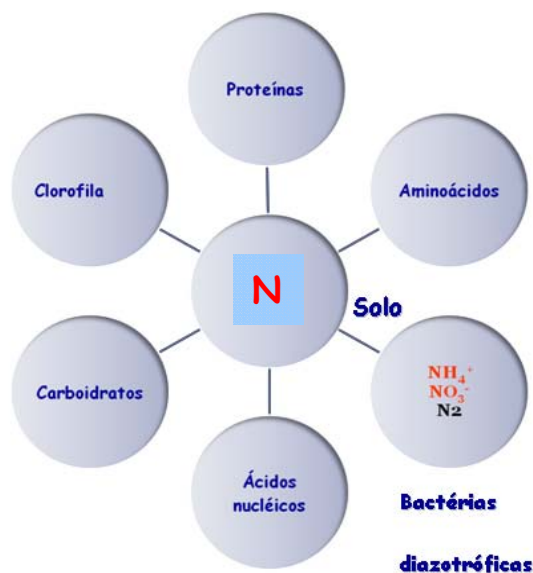


Figura 2 Contribuição do nitrogênio na formação de biomoléculas

O nitrato assimilado nas raízes ou na parte aérea da planta é reduzido a nitrito (NO_2^-) e, posteriormente, transformado em amônia, que é assimilada nos aminoácidos glutamato e glutamina nos plastídeos da raiz ou nos cloroplastos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

O nitrogênio, uma vez absorvido, aumenta a atividade meristemática na parte aérea, resultando em maior perfilhamento, promove um incremento do índice de área foliar, elevando a eficiência do uso da radiação solar e aumentando, portanto, o acúmulo de matéria seca da cana (OLIVEIRA et al., 2007).

No solo, o nitrogênio disponível às plantas é suprido pela mineralização da matéria orgânica, fixação biológica e adição de fertilizantes nitrogenados. A água de irrigação e da chuva contém quantidade variável de nitrogênio mineral, que pode ser absorvido pelas raízes e folhas. Na atmosfera, outra fonte de nitrogênio é a amônia, que pode ser absorvida pelas folhas. Deve-se também

considerar como fonte de nitrogênio, no ciclo de cana-planta, o nutriente contido no tolete de plantio, e para soqueiras, a reserva em rizomas ou colmos subterrâneos (parte basal do colmo que permanece enterrado no solo após o corte da cana) e raízes (TRIVELIN et al., 2002)

A quantidade de nitrogênio acumulado (em kg) por tonelada de colmo produzido indica a eficiência da cultura em transformar o nitrogênio absorvido em produtividade e será tanto maior quanto menor for essa relação (VITTI et al., 2007).

Coleti et al (2006) mostraram que a cana-de-açúcar exporta aproximadamente 0,7 a 1,1 kg de nitrogênio por tonelada de colmo produzido. Considerando-se toda a planta (parte aérea + subterrânea), esses valores variam de 2,1 a 2,4 kg de nitrogênio por tonelada de colmo produzido. Esses dados indicam que uma produção de 100 t ha⁻¹ de colmo de cana extrai em torno de 200 a 300 kg ha⁻¹ de nitrogênio, dos quais 90 a 100 kg ha⁻¹ são exportados com os colmos removidos do campo (TRIVELIN et al., 2002). É oportuno neste momento definir os termos relacionados à adubação, como extração, quantidade de nutrientes que a planta exige para seu desenvolvimento completo e a exportação, quantidade de nutriente que está contido no colmo que não volta mais para o solo

Oliveira (2008), trabalhando com variedades de cana cultivadas em ambiente irrigado no Nordeste brasileiro, observou que a absorção média de nitrogênio foi de 180 kg ha⁻¹ e a exportação, que quantifica os nutrientes contidos nos colmos, correspondeu a 52% do total absorvido de nitrogênio

Contin (2007) observou que a cana adubada com ureia apresenta um período de intensa acumulação de nitrogênio (“fase de armazenamento de nitrogênio”), em resposta ao N-fertilizante aplicado, que ocorreu até aproximadamente até 150 dias após o plantio (DAP). Após esse período, a

cultura apresentou uma fase de intensa redistribuição de nitrogênio indicada pela diminuição no teor de proteínas dos colmos.

A redistribuição de nitrogênio vem atender às necessidades da planta em determinado período. Trivelin, Victoria e Rodrigues (1995) mostraram a translocação do nitrogênio da parte aérea ao sistema radicular no período de 204 a 237 dias após o início do ciclo e concluíram que essa translocação gera condições para as plantas emitirem novas raízes, proporcionando, assim, exploração de maior volume de solo, aumentando o potencial de absorção e acúmulo de nitrogênio do solo.

Embora se conheça a importância do nitrogênio para o crescimento vegetal, muito pouco foi feito sobre a distribuição de suas diferentes formas, na cana, e sobre como esses compostos comportam-se em relação à população de bactérias diazotróficas naturalmente presentes na cultura. Isso pode ser comprovado pelas pesquisas de Gomes et al. (2005), que avaliaram a relação entre a distribuição de nitrogênio em cana e a colonização por bactérias diazotróficas *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. Pelos resultados verificou-se que as maiores concentrações de nitrogênio do grupo amino ocorrem nas raízes, colmo basal e folhas da variedade SP79-2312 e no colmo apical do genótipo Chunnee. Os maiores valores na concentração de nitrato foram observados no colmo basal e intermediário das variedades SP79-2312 e SP70-1143.

A absorção e o metabolismo do nitrogênio são muito influenciados pela disponibilidade de fósforo. Em plantas com suprimento inadequado de fósforo, há redução na absorção do nitrato da solução do solo; a translocação de nitrato das raízes para a parte aérea diminui, aumentando o acúmulo de aminoácidos em folhas e raízes. Tem sido verificada baixa resposta da cana planta à adubação nitrogenada; porém, as respostas nas rebrotas de cana à adubação nitrogenada são mais frequentes. Como recomendação geral, sugere-se aplicar 1,0 kg de N

por tonelada de matéria natural acumulada na parte aérea, e considerando que o colmo representa, em média, 80% da matéria natural da parte aérea, a produtividade de 100 toneladas de colmos corresponderia a 125 toneladas de matéria natural. Nesse caso, a recomendação de adubação seria de 125 kg há⁻¹ de nitrogênio, devendo o adubo nitrogenado ser aplicado, em dose única, juntamente com o potássio (OLIVEIRA et al., 2007).

No Brasil, a ureia, o sulfato de amônio e o nitrato de amônio são os adubos nitrogenados mais utilizados na cultura da cana. Como características comuns, apresentam alta solubilidade em água e são prontamente disponíveis para as plantas. O nitrato de amônio contém simultaneamente duas formas de nitrogênio; a nítrica (NO₃⁻) e a amoniacal (NH₄⁺), totalizando 32% de nitrogênio. Entretanto, este fertilizante tem regulamentações e restrições crescentes quanto à fabricação, estocagem e transporte, em razão de poder ser utilizado como explosivo, o que pode eventualmente afetar sua utilização na agricultura. A ureia é caracterizada como um dos fertilizantes sólidos granulados de maior concentração de nitrogênio (45%) na forma amídica. Como vantagem da utilização da ureia, pode-se citar o baixo custo de transporte, a alta solubilidade, a baixa corrosividade e a facilidade de mistura com outras fontes, responde por 60% dos fertilizantes nitrogenados empregados na agricultura brasileira. Como desvantagem, possui elevada higroscopicidade e maior susceptibilidade à volatilização. A degradação e a dissolução dos grânulos aplicados ao solo ocorrem na presença de umidade. Há registros de que ocorrem até 50% de perdas do nitrogênio oriundo da ureia quando aplicada sem incorporação ao solo. A volatilização da ureia em amônia e dióxido de carbono ocorre principalmente quando se aplica esse fertilizante na superfície sobre a palhada da cana. (PRADO; PANCELLI, 2008).

Andrade (2006) sugere aplicar na cana-soca adubo nitrogenado, equivalente a 80 kg de N ha⁻¹ colocado ao lado da linha da cana. No caso da

presença de palha na área, a adubação pode ser feita sobre a palhada, exceto no caso da ureia, devido à volatilização e perda. A cana-soca apresenta uma boa resposta a essa adubação, e que não se verifica com a cana-planta.

É importante, neste momento, descrever a respeito dos recipientes utilizados no armazenamento da bebida, uma vez que as amostras foram acondicionadas em recipientes de plástico e de vidro.

2.3.2 Acondicionamento da cachaça

No mercado existem atualmente mais de trinta tipos de plásticos, e diferentes tipos de aditivos são incorporados durante o processo de fabricação de embalagens. Particularmente na fabricação de embalagens de polietileno (PE), incluem os aditivos antioxidantes, estabilizantes, agentes anti-estáticos, e corantes. Compostos reativos, como monômeros e oligômeros de baixa massa molecular também estão presentes nos materiais de embalagens plásticas, geralmente em níveis baixos tidos como residuais, como estireno, cloreto de vinila, caprolactama. Além dos aditivos e monômeros residuais presentes nos materiais de embalagem, podem estar presente nas embalagens, outros compostos químicos resultantes de degradação de polímeros e aditivos formados durante o processo de transformação, solventes residuais provenientes de tintas de impressão. Alguns produtos de decomposição de polímeros incluem benzeno e alquilbenzeno, cetonas e aldeídos (FREIRE et al., 2008).

Diante da possibilidade de encontrar essas substâncias dispersas na matriz polimérica, que entrará em contato direto com os alimentos, podendo ser transferidas aos produtos acondicionados, torna-se bastante evidente que embalagens plásticas não são inertes (GARCIA et al., 2006; SILVA, S. et al., 2006).

Durante o acondicionamento de alimentos e bebidas, esses compostos migram para a matriz acondicionada, promovendo a sua contaminação. O termo migração geralmente é descrito como um processo de difusão, que pode ser influenciado pelas interações entre componentes do alimento e o material de embalagem. Essas interações afetam não somente as propriedades sensoriais dos alimentos acondicionados, como também alteram as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material de embalagem. Interferem na migração de contaminantes de embalagem, na difusão da substância na matriz polimérica, na solvatação na interface polímero-alimento, na dispersão na matriz alimentícia, no tempo e na temperatura de contato. A gordura contida no alimento pode ser transferida à matriz dos polímeros polietileno (PE) e polipropileno (PP), facilitando a mobilidade dos componentes dispersos na matriz polimérica, aumentando a migração de agentes químicos ao alimento contido na embalagem (ARVANITOYANNIS; BOSNEA, 2004).

Pela análise por GC/MS de voláteis em “grânulos” de garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD) destinadas ao primeiro uso, verificou-se a presença de limoneno, dietilhexilftalato, ésteres isopropil dos ácidos mirístico e palmítico e 8-nonenal. A análise de água acondicionada em recipiente de PEAD de cor azul e de pedaços de grânulos de embalagens virgens levou à identificação de aldeídos, cetonas e ésteres, que migraram da embalagem e contaminaram a água (SANDERS et al., 2005).

Minas Gerais é um estado de tradição na produção de cachaça artesanal, como citado anteriormente, e conta com mais de oito mil produtores, entre os quais 90% produzem a bebida na clandestinidade. Em decorrência dessa situação, as etapas de produção ficam comprometidas e afetam a qualidade da bebida. Muitas vezes são utilizados recipientes não indicados pela legislação para o armazenamento da bebida, tanto pelo produtor como pelo distribuidor. Existem poucos estudos a respeito da utilização de recipientes de plásticos em

bebidas alcoólicas. Forlin (2005) estudou o envelhecimento da aguardente de cana composta com extrato de madeira acondicionada em recipientes de vidro e polietileno tereftalato (PET). Neste estudo, verificou-se que os diferentes recipientes não influenciaram os parâmetros físico-químicos e tampuco a qualidade sensorial da bebida; por outro lado não foram analisados os possíveis contaminantes procedentes da embalagem.

Com relação á bebida alcoólica, é comum entre os pequenos produtores o uso de bombonas de polietileno de alta densidade (PEAD) no acondicionamento de cachaça. Os recipientes contendo esse polímero (PEAD) são indicados para o armazenamento e transporte de produtos alimentícios, farmacêuticos e químicos, pois são impermeáveis, inertes e atóxicos. O PEAD sem pigmentos é usado em frascos de laticínios, água mineral e sucos de frutas. Pigmentado, é usado, em frascos para detergentes de roupa, branqueadores, óleo de motor, etc. Mesmo sendo utilizado para acondicionar sucos, não há indicação de uso desse recipiente para bebidas alcoólicas e nem trabalhos de pesquisas a respeito dos possíveis contaminantes procedentes do recipiente que foram incorporados na bebida (IMA, 2005).

2.4 Compostos voláteis e não voláteis na cachaça

A cachaça é uma matriz complexa proveniente de diversas transformações químicas e bioquímicas. Devido a essa complexidade, ainda não foi possível identificar todos os compostos presentes, assim como associá-los a fenômenos específicos. Nesse universo diversificado, é importante que pelo menos os principais componentes, considerados desejáveis e indesejáveis, sejam caracterizados. A cachaça é constituída principalmente por água e etanol de proporções variáveis, segundo a sua graduação e centenas de outros compostos voláteis “álcool” ou “não álcool”, proporcionalmente minoritários, denominados

componentes secundários, porém de grande importância na qualidade sensorial. Esses compostos são formados por rotas bioquímicas ou químicas durante e após a fermentação alcoólica. Pertencem a diversas classes de compostos orgânicos, como aldeídos, ácidos carboxílicos, cetonas, álcoois, ésteres, terpenos, lactonas, furanos, compostos nitrogenados, fenólicos, sulfurados entre outros (NÓBREGA, 2003).

Os compostos secundários são formados, principalmente, na etapa de fermentação, mas também durante a destilação e no armazenamento. Geralmente sua concentração compreende uma faixa da ordem de mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ e inferiores a 1% em massa (NASCIMENTO; CARDOSO; FRANCO, 2009). Mesmo à baixa concentração, os compostos secundários apresentam-se em teores variados, tanto nas cachaças de alambique como nas industriais. Tais variações podem ser devidas a fatores edafoclimáticos, tais como solo, clima e altitude ou diferenças na metodologia empregada na elaboração da bebida como matéria-prima, micro-organismos utilizados, condições da fermentação, maneira de destilar e no envelhecimento, como o tempo, tipo de madeira e volume do recipiente (SIEBALD; CANUTO; SILVA, 2009).

Do ponto de vista sensorial, as substâncias podem ser classificadas como desejáveis e não desejáveis, pois realçam o cheiro e o sabor da bebida ou depreciam o paladar e do ponto de vista da saúde do consumidor, são designadas como tóxicas e atóxicas. Nem sempre as substâncias desejáveis são atóxicas, mas podem ser ingeridas mesmo assim, desde que as concentrações não ultrapassem os limites permitidos (SIEBALD; CANUTO; SILVA, 2009). Seja qual for a sua classificação, é necessário realizar um controle rigoroso quanto ao seu teor na bebida. As substâncias não desejáveis são designadas de contaminantes e, de acordo com a sua natureza química, recebem a classificação de orgânicas e inorgânicas. A legislação brasileira estabelece como contaminantes orgânicos em bebidas o metanol, carbamato de etila, butanol-2,

butanol-1 e acroleína, e como inorgânicos, o cobre, chumbo e arsênio. São considerados compostos desejáveis aqueles que se apresentam em concentrações estabelecidas pela legislação e que contribuem do ponto de vista da aceitação degustativa (BRASIL, 2005).

2.5 Compostos secundários desejáveis

Os compostos secundários da cachaça são aquelas substâncias formadas em pequena quantidade, durante a fermentação, mas de grande importância na qualidade sensorial da bebida.

2.5.1 Álcoois superiores

Os álcoois superiores constituem, quantitativamente, o maior grupo de substâncias voláteis nas bebidas destiladas. Formado por mais de dois átomos de carbono, são provenientes da reação de degradação de aminoácidos durante o processo de fermentação ou das vias de degradação do próprio açúcar. Os aminoácidos isoleucina, leucina e valina inicialmente sofrem transaminação catalisada pela enzima transaminase, levando a obtenção de oxo-ácido, o qual posteriormente se descarboxila através da enzima descarboxilase, promovendo a formação do aldeído, que pode parar nesse estágio, ou ser reduzido a álcool, conforme Figura 3. Os principais álcoois superiores encontrados nas bebidas alcoólicas são: os álcoois isoamílico (3-metil-1-butanol), propílico (1-propanol), isobutílico (2-metil-1-propanol), álcool amílico (2-metil-1-butanol) e butílico (1-butanol), hexanol e 2-feniletanol, mas o isoamílico é o principal álcool superior formado durante a fermentação e, dependendo da bebida, pode perfazer 40-70% da fração de álcoois superiores (PENTEADO; MASINI, 2009; VILELA et al., 2007).

Os álcoois superiores, com três a cinco átomos de carbono, apresentam odores característicos, conhecido como “buquê”, tradicionalmente associados com bebidas destiladas. Acima disso, eles tornam-se oleosos e alguns lembram aromas de flores. Segundo Cardoso (2006), os álcoois superiores podem ser formados quando a cana, já cortada, permanece estocada por um período superior a 24 horas, para depois ser moída. Do ponto de vista quantitativo, a formação dos álcoois superiores depende da cepa empregada, assim como da ocorrência de micro-organismos contaminantes. A formação desses compostos é maior quando a fermentação é conduzida de maneira lenta, devido à fraca atividade do fermento, à temperatura elevada e ao pH ácido. A cana estocada antes da moagem podem também contribuir na formação de álcoois superiores.

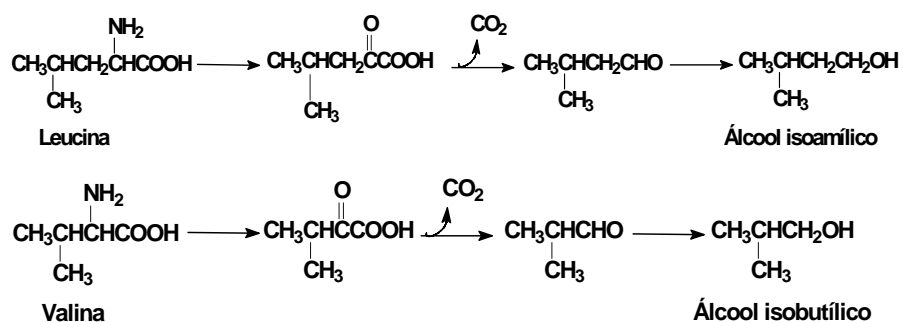


Figura 3 Formação de álcoois superiores a partir de aminoácidos

A Instrução Normativa de n. 13 de junho de 2005, incluiu na lista dos Padrões de Identidade e Qualidade de Aguardente de Cana e de Cachaça duas substâncias que fazem parte dos álcoois superiores, butanol-1 e butanol-2, mas que devem ser quantificadas separadamente e ainda estabeleceu limites permitidos para elas (BRASIL, 2005).

2.5.2 Ésteres

Os ésteres são, quantitativamente e qualitativamente, um dos maiores grupos de compostos da fração volátil das bebidas alcoólicas. A principal origem dos ésteres alifáticos está no metabolismo secundário intracelular das leveduras durante a fermentação alcoólica. Ocorrem duas reações nas células das leveduras, a ativação dos ácidos monocarboxílicos e a descarboxilação dos ácidos 2-oxo. Adicionalmente a essas reações, outro mecanismo provável de formação de ésteres é a partir dos intermediários da síntese dos ácidos monocarboxílicos de cadeia longa. A concentração final dos ésteres é dependente da concentração dos álcoois e da acil-CoA produzidos pela levedura. Uma vez que a acil-CoA e o etanol apresentam-se em maiores concentrações na fermentação, o acetato de etila é o éster presente em maior quantidade em relação aos demais ésteres. Normalmente o acetato de etila representa aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça, que em baixas concentrações, proporciona um aroma agradável de frutas, porém, em grandes quantidades, confere à bebida um sabor enjoativo e indesejado (PARAZZI et al., 2008).

A formação dos ésteres pós-fermentação alcoólica, via reação química direta entre ácidos e álcoois, também ocorre, tanto na destilação quanto no envelhecimento, porém, em escala bem menor que a via enzimática. O aroma dos ésteres é mais acentuado quando o álcool que os compõem possui baixo peso molecular. Além disso, cada éster tem aroma peculiar. Os acetatos de etila e de butila apresentam aroma frutado, o acetato de isoamila e butirato de amila tem aroma de banana, ao passo que os acetatos de álcoois maiores têm aroma cítrico, porém, menos pungente que os ésteres de álcoois menores. Os ésteres

propanoato de etila, butanoato de etila, pentanoato de etila, heptanoato de etila e acetato de hexila são minoritários em cachaça e potencialmente importantes ao aroma da bebida, pois apresentam valores de limiar de odor baixos em água (NÓBREGA, 2003).

No processo de envelhecimento, os ésteres aromáticos são gerados pela interconversão dos compostos fenólicos, tais como siringato de etila e vanilato de etila e os ésteres extraídos da madeira, como o homovanilato de metila e o siringato de metila (VICHI et al., 2007).

O lactato de etila, segundo éster mais abundante na cachaça, é formado pela bactéria *Lactobacillus* spp, que é responsável pela fermentação láctica, favorecida pelo controle deficiente da fermentação alcoólica. A origem dessa bactéria no mosto está associada à própria matéria-prima (cana-de-açúcar, levedura e água) e ao local de produção da bebida. Assim, a presença de lactato de etila constitui um indicador da qualidade de fermentação e por apresentar-se em concentração significativa, sua contribuição à fração de ésteres totais não deve ser negligenciada. (NASCIMENTO; CARDOSO; FRANCO, 2009).

Tanto a quantidade quanto a proporção dos diferentes ésteres influencia a percepção de aromas nas bebidas. Fatores como o tipo e quantidade de fermento, temperatura, aeração e agitação na fermentação e qualidade do caldo influenciam fortemente na formação dos ésteres. A aeração ou agitação fornece uma maior concentração de oxigênio para as leveduras e, assim, uma maior produção intracelular de piruvato, que por descarboxilação oxidativa, fornece alta taxa de acil-CoA, que é alcoolizada formando ésteres. Aparentemente a maioria dos ésteres é produzida nos últimos estágios de fermentação, ao contrário dos álcoois, que são produzidos abundantemente no início (BERRY, 1995).

Nóbrega (2003), analisando os compostos voláteis de aguardente de cana, identificou os seguintes ésteres em bebidas alcoólicas: acetato de etila,

propanoato de etila, butanoato de etila, acetato de 3-metilbutila, pentanoato de etila, hexanoato de etila, acetato de hexila, heptanoato de etila, octanoato de etila, nonanoato de etila, decanoato de etila, octanoato de 3-metilbutila, undecanoato de etila, dodecanoato de etila, decanoato de 3-metilbutila, tetradecanoato de etila, dodecanoato de 3-metilbutila, pentadecanoato de etila, hexadecanoato de etila. Dos 18 ésteres identificados, os quatro majoritários foram: decanoato de etila, octanoato de etila, acetato de 3-metilbutila e dodecanoato de etila.

2.5.3 Ácidos carboxílicos

Os ácidos carboxílicos são compostos normais da fermentação, produzidos por leveduras ou bactérias provenientes de contaminação. O ácido predominante em bebidas fermento-destiladas é o ácido acético, que chega a compor 70% de todos os ácidos presentes na bebida. Ele é formado pela oxidação do acetaldeído, mesmo quando a fermentação é totalmente controlada. Além do ácido acético e láctico, que são subprodutos normais da fermentação alcoólica, estão presentes os ácidos fórmico, butírico, propiônico e outros em quantidades pequenas. São também importantes os ácidos pirúvico, cítrico, succínico e oxaloacético, pois, em conjunto com o ácido acético contribuem sensorialmente para a cachaça, de modo direto ou indiretamente, como no caso destes, por originarem ésteres. Em trabalho de avaliação qualitativa e quantitativa de ácidos voláteis em 57 amostras de cachaça provenientes de diferentes regiões do Brasil, Nascimento et al. (1998) constataram que os ácidos presentes em maiores quantidades foram o acético (90% do total de 14 ácidos identificados), octanoico, decanoico e dodecanoico.

Uma acidez elevada na cachaça é sensorialmente desagradável e está associada a práticas de estocagem da cana e contaminações do mosto com

bactéria acética, mas a presença de ácidos em pequena quantidade é de grande importância para a qualidade da bebida, uma vez que, durante sua produção, os ácidos reagem com os álcoois presentes, aumentando a formação de ésteres (CARDOSO, 2006).

Além desses compostos considerados desejáveis, é possível que existam outros que ainda não foram identificados, por estarem numa matriz complexa e em quantidade traço, mas que por interação com os demais compostos, possam também contribuir para a qualidade sensorial da bebida.

2.5.4 Acetais

Em rum e possivelmente em cachaça, a maioria dos acetais é formada durante a destilação pela reação de uma molécula de aldeído e uma molécula de álcool, formando um hemiacetal. O hemiacetal formado é instável e, uma vez combinado com outra molécula de álcool, forma um acetal estável. A reação de formação de acetais é reversível. Em cachaça, já foram identificados em níveis relativamente elevados o 1,1-dietoxi-etano e 1-etoxi-2-pentoxi-etano. A formação desses compostos pode ser compreendida pela reação de adição entre acetaldeído e os álcoois etílico e pentílico, formando um hemiacetal, seguida pela condensação desse por outra molécula de álcool (Figura 4). O 1,1-dietoxi-etano tem odor refrescante e frutado; portanto, deve contribuir para o aroma final da cachaça, seja pela redução do odor pungente do acetaldeído, majoritário na cachaça, seja pelo reforço com seu aroma frutado (NÓBREGA, 2003).

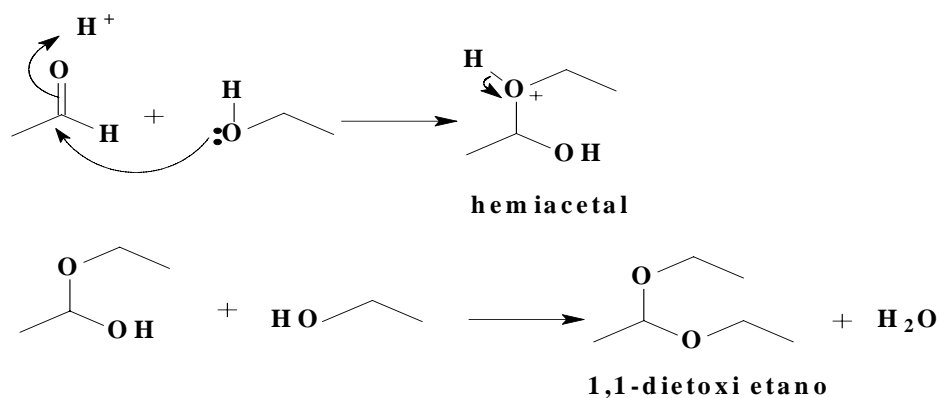


Figura 4 Formação de 1,1-dietoxi etano

2.6 Compostos secundários indesejáveis

As principais substâncias indesejáveis da cachaça, aqui consideradas, sejam estabelecidas ou não pela legislação, são aquelas que oferecem perigo para a saúde humana ou depreciam sensorialmente a bebida.

2.6.1 Cobre

O cobre, material amplamente empregado na indústria de confecção de destiladores, conduz à contaminação do destilado por íons cúpricos. A presença de cobre nas cachaças artesanais deve-se principalmente ao azinhavre [$\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$], carbonato básico de cobre que, uma vez formado, adere na parede interna do alambique e é dissolvido pelos vapores levemente ácidos da bebida durante o processo de destilação. A legislação brasileira limita o teor de cobre em bebidas destiladas em $5,0 \text{ mg L}^{-1}$; entretanto, para exportação, o limite é de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL, 2005).

Dos metais presentes, somente o cobre é desejável, desde que esteja abaixo de limite estabelecido pela legislação. Sua toxicidade está na grande

afinidade com os grupos SH de enzimas e proteínas. Estudos apontam que a sua presença na cachaça melhora as propriedades sensoriais, pois esse metal catalisa a oxidação do gás sulfídrico e dos tióis a sulfeto e dissulfeto, que são compostos de baixa solubilidade, permanecendo na fração cauda, ocorrendo, assim, a redução da concentração deles na bebida. Ainda na destilação, o cobre interfere no equilíbrio líquido-vapor, promovendo um aumento da concentração de acetato de etila no destilado e uma diminuição da concentração do acetaldeído. O cobre reage também com os ácidos carboxílicos, formando os organocúpricos e contribuindo para uma acidez mais equilibrada na bebida. (CARDOSO, 2006).

Para minimizar a contaminação da bebida por cobre, basta fazer uma limpeza apropriada do alambique com água e limão. No entanto, os produtores não acatam essa medida e preferem utilizar filtros de resina de troca iônica ou de carvão ativado, após a destilação. Esse procedimento remove o cobre e outras substâncias importantes no aroma e sabor da bebida (LIMA et al., 2009).

2.6.2 Arsênio e chumbo

A contaminação da cachaça por esses metais ocorre durante o processo de produção pelo contacto com materiais das embalagens utilizadas, revestimentos cerâmicos, tintas e soldas de ligas metálicas nos equipamentos.

O arsênio é carcinogênico e doses orais de 3,0 a 30,0 mg kg⁻¹ de massa corpórea podem causar irritação estomacal e intestinal, dor, náusea, vômito, diarreia, diminuição na produção de células brancas e vermelhas, causando fadiga, alteração de batimentos cardíacos e funções nervosas. Os efeitos carcinogênicos da intoxicação por arsênio estão associados à exposição crônica por vários anos. Com base em evidências toxicológicas, em 1993, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu, para a água, a concentração máxima de arsênio de 10,0 µg L⁻¹, valor acatado no Brasil (FUNASA, 2001).

As vias de contaminação do chumbo podem ser por inalação ou por ingestão. Somente os complexos orgânicos do metal podem ser absorvidos via cutânea. Uma vez absorvido, o chumbo é distribuído para o sangue, no qual tem meia-vida de 37 dias; para os tecidos moles, a meia-vida é de 40 dias, e nos ossos, a meia-vida é de 27 anos, constituindo esse o maior depósito corporal do metal, armazenando de 90% a 95% do chumbo presente no corpo (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A intoxicação por chumbo afeta o sistema digestivo, o sistema nervoso central e o sistema hepático, pois esse metal acumula-se no fígado e nos rins (SIEBALD; CANUTO; SILVA, 2009).

2.6.3 Metanol

Entre todos os álcoois presentes na cachaça, o metanol é particularmente indesejável, mesmo em baixas concentrações. A sua presença em bebidas causa agressividade olfativa, além de ser prejudicial à saúde. A oxidação do metanol no organismo humano ocorre da mesma forma que a do etanol; porém, em uma velocidade de oxidação bem menor; portanto, o metanol pode levar vários dias para ser excretado e demorar até 36 horas para manifestar os sintomas de cefaleia, vertigem, vômitos, dor intensa no abdômen, visão embaçada, etc. Para Cardoso (2006), a oxidação do metanol origina o ácido fórmico, o dióxido de carbono e a água. Tanto o ácido fórmico quanto o dióxido de carbono apresentam características ácidas e, assim promovem a acidose no sangue e, como consequência distúrbios no sistema respiratório, levando até o coma. Os problemas visuais são os sintomas comuns da intoxicação; 15 mL de metanol provoca cegueira e de 10,0 a 100,0 mL pode ser fatal (CARDOSO, 2006).

A formação de metanol ocorre, principalmente, na etapa de fermentação por hidrólise enzimática ou ácida do grupo metoxila presente nas substâncias

pécticas. A degradação das substâncias pécticas produz metanol e ácido galacturônico que, por sua vez, degrada em açúcares de cadeias menores. Os bagacilhos são ricos em substâncias pécticas, polímeros de ácido galacturônico, com grau variável de metoxilação (CARDOSO, 2006).

2.6.4 Butanol-1 butanol-2

Sabe-se que o butanol-1 é formado na fermentação devido à contaminação pela bactéria “*Clostridium acetobutylicum*” e que sua toxicidade é relativamente alta, quando comparada ao etanol. A Instrução Normativa de junho de 2005 incluiu na lista dos PIQs de aguardente de cana e de cachaça essas duas substâncias que fazem parte dos álcoois superiores: butanol-1 butanol-2, mas que devem ser quantificadas separadamente e estabeleceu ainda limites permitidos para eles (BRASIL, 2005).

Pesquisando esses contaminantes, Penteadó e Masini (2009) analisaram 33 amostras de aguardentes artesanais e industriais produzidas em quatro estados do Brasil e observaram uma grande variação na concentração dos álcoois superiores dessas bebidas e com conseqüente heterogeneidade das características sensoriais. Neste estudo foram identificados e quantificados, entre outros, butanol-1 e butanol-2, presentes nas amostras e em concentrações superiores ao estabelecido por lei, que são 3,0 e 10,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, respectivamente. Parazzi et al. (2008) avaliaram os efeitos da madeira sobre a composição química da aguardente envelhecida em barris de carvalho, encontrando para o butanol-1 a concentração média de 1,05 mg 100,0 mL⁻¹.

2.6.5 Acetoína

Quanto à classe de cetonas, a legislação brasileira não estabelece limite à sua presença nas cachaças, mas sabe-se que as cetonas são importantes para o sabor das bebidas, sendo originadas por fermentação secundária ou por contaminação durante o processo de produção. A acetoína (3-hidroxi-2-butanona), principal cetona encontrada em bebidas alcoólicas, apresenta odor agradável, atuando como potencializador de aromas em manteiga, vinagre e café. É uma substância comumente produzida em processos fermentativos tanto por leveduras como por bactérias durante a fermentação malolática. A rota da acetoína passa pelo diacetil (2,3-butanodiona) e pelo 2,3-butanodiol, que são importantes componentes de aromas de diversos produtos lácteos, tais como queijo e manteiga. A reação inicia-se com a condensação do piruvato com uma molécula de acetaldeído, combinada com o pirofosfato de tiamina, formando ácido α -acetoláctico que, posteriormente, sofre descarboxilação oxidativa, formando a acetoína. (FLEET, 2003).

O 2,3-butanodiol, juntamente com a acetoína, são desejáveis na bebida e encontrados com frequência em vinho. Geralmente, não afetam a qualidade sensorial das bebidas alcoólicas, mas em elevadas concentrações, pode modificar o “bouquet” e o corpo do vinho, devido ao seu gosto levemente amargo e sua viscosidade. As dicetonas vicinais, principalmente 2,3-butanodiona (diacetil) e 2,3-pentanodiona, podem estar presentes em bebidas como cervejas, vinhos, uísque, rum e cachaça; quando em excesso, podem causar sabor desagradável. O limiar de percepção do odor para 2,3-butanodiona é da ordem de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em bebidas alcoólicas (ROMANO et al., 1998).

2.6.6 Acetaldeído

Da classe dos aldeídos estão presentes na cachaça diversos compostos, sendo a maioria indesejável do ponto de vista tóxico. A composição de aldeídos na bebida depende da adequação e da eficiência da separação da fração cabeça durante o processo de destilação. Os principais aldeídos encontrados em bebidas destiladas são: metanal (aldeído fórmico), etanal (acetaldéido), butanal (aldeído butírico), 3-metil propanal (aldeído isobutírico), pentanal, hexanal, furfural, hidroximetilfural e acroleína. O acetaldeído é proveniente da oxidação do etanol e ocorre principalmente nas primeiras horas da fermentação, diminuindo posteriormente, sob condições de anaerobiose. A principal via metabólica do acetaldeído ocorre pelo processo fermentativo das leveduras, quando o ácido pirúvico é descarboxilado pela ação da enzima piruvato descarboxilase. Pode ainda ser produzido, em pequenas quantidades, através da oxidação não-enzimática do etanol, pela presença de oxigênio (Figura 5). A formação dos demais aldeídos da série homóloga segue a mesma via metabólica do acetaldeído (CARDOSO, 2006).

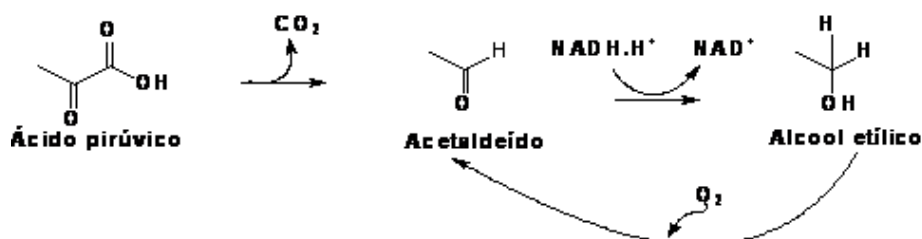


Figura 5 Via metabólica da formação do acetaldeído

O acetaldeído é o principal aldeído presente na cachaça, podendo representar até 90% da concentração dos aldeídos totais. É um composto de alta reatividade, exercendo, portanto, uma influência significativa na maturação da

cachaça, pois à medida que transcorre o tempo necessário para o descanso da bebida, a sua concentração diminui. Normalmente, ele se forma no início da fermentação (NYKANEN; NYKANEN, 1991).

O limite de percepção olfativa do acetaldeído é de 100,0 mg L⁻¹, no vinho, podendo tornar-se irritante ao aparelho respiratório quando em concentração superior a 134,0 mg L⁻¹. O acetaldeído tem se mostrado um potente teratogênico em ratos, sendo considerado também como agente mutagênico e carcinogênico (OSBORNE et al., 2000).

Na indústria de bebidas, é importante conhecer as concentrações de acetaldeído, pois ele tem um papel central na manifestação de intoxicação alcoólica. A legislação brasileira estabelece, para aldeídos totais em cachaça, o limite de 30,0 mg de acetaldeído por 100 mL de álcool anidro. Em vinhos, altas concentrações de acetaldeído resultam em um aroma herbáceo indesejável e a baixa concentração, em aroma de maçã (AZEVEDO et al., 2007).

2.6.7 Furfural

Ainda da classe dos aldeídos, mas do tipo furânico, o furfural e o hidroximetilfurfural são encontrados com frequência em cachaça. A literatura relata que o contato prolongado com o furfural pode causar dermatite, irritação da mucosa e trato respiratório, além de afetar o sistema nervoso central (AZEVEDO et al., 2007).

Na Instrução Normativa de n.13, de junho de 2005, para a fixação dos padrões de identidade e qualidade de aguardente de cana e de cachaça, o parâmetro furfural foi desdobrado para furfural e hidroximetilfurfural, sendo mantido o teor máximo de 5,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005).

O furfural e o hidroximetilfurfural são formados durante a destilação a partir de pentoses e hexoses, surgindo predominantemente como produto da cauda, dependendo do tipo de aquecimento (FARIA et al., 2003).

A reação de formação desses aldeídos é favorecida em meio ácido e pelo aquecimento, envolvendo a desidratação dos açúcares. Na cachaça, os fatores que contribuem para aumentar a concentração do furfural e hidroximetilfurfural estão relacionados com a presença de matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques, açúcar residual, bagacilhos no mosto e quando a colheita for precedida da queima do palhiço (MASSON et al, 2007).

Nas bebidas envelhecidas, o furfural tem sua origem principalmente da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), podendo ter sua origem, pelo menos em parte, no envelhecimento através dos recipientes de madeira utilizados no armazenamento da bebida (MASSON et al., 2007).

Em se tratando de recipientes novos, a parte interna da madeira é queimada e em seguida, molhada, para evitar futuras rachaduras. Esse tratamento resulta na redução parcial da celulose e na formação de hidroximetilfurfural (AZEVEDO et al., 2007).

Segundo Maia (2002), os aldeídos têm aroma pungente e, em geral, desagradável. Sua presença é rapidamente detectada na degustação devido ao “incômodo” provocado nas fossas nasais. Os aldeídos são também responsáveis por outros efeitos fisiológicos indesejáveis, como dor de cabeça e “ressaca”.

2.6.8 Compostos de enxofre

Também presentes em cachaças, os compostos sulfurados apresentam odores desagradáveis e com limite de percepção muito baixo, apresentando efeito negativo sobre o aroma das bebidas. Os compostos sulfurados encontrados na bebida foram o sulfeto de hidrogênio e o dimetil sulfeto, produzidos durante a

degradação da metionina e cisteína, ou ainda, da S-metil-metionina e D-dimetil-sulfóxido e o 4,5-de hidro-2-metil-3[2H]-tiofenona formado pela condensação aldólica envolvendo acetaldeído e piruvaldeído e subsequente reação com H₂S, produzido por intermediário da hidrólise térmica ou degradação de Strecker do aminoácido sulfurado cisteína. Compostos sulfurados são considerados relevantes ao aroma de qualquer bebida, pois a maioria deles possui valor limiar de odor muito baixo (NÓBREGA, 2003).

Em cachaça artesanal, é comum encontrar baixas concentrações de compostos de enxofre, pois o cobre, oriundo do alambique, catalisa as reações de degradação dos compostos sulfurados; porém, com a contaminação da bebida pelo cobre, os produtores estão substituindo parte de seus alambiques por aço inoxidável. Essa medida tem promovido o aumento do teor dos compostos de enxofre na bebida. O material do destilador influencia a composição química da cachaça, pois a bebida destilada em coluna de aço inox produz um teor elevado de sulfeto de dimetila (DMS) comparado com a bebida destilada em alambique de cobre (CARDOSO et al., 2003a).

2.6.9 Acroleína

Neste tópico será discutido mais detalhadamente sobre a acroleína, tendo em vista que a sua caracterização e quantificação fazem parte desta pesquisa.

2.6.9.1 Formação e propriedades

A acroleína é uma substância encontrada em alimentos, bebidas e no meio ambiente, principalmente nas cidades e zonas industriais onde é considerada como um poluente para as vias respiratórias. É um aldeído α,β -

insaturado altamente eletrofilico, apresentando-se sob a forma de um líquido transparente ou amarelo, com um odor penetrante e irritante. Apresenta temperatura de ebulição de 52,5°C, temperatura de fusão -87,7°C, e pressão de vapor de 200 mmHg a 17,5°C. É bastante solúvel em água, muito inflamável e polimeriza com facilidade, tratando-se, portanto, de uma substância bastante reativa, o que a torna muito instável. Sua grande reatividade pode ser relacionada à polarização da dupla ligação pelo grupo aldeídico, (Figura 6). Uma vez absorvida, a acroleína reage diretamente com ácidos, amins primárias e secundárias encontrados em proteínas e ácidos nucleicos. Em proteínas, preferencialmente ataca os grupos SH livres de resíduos de cisteína e os grupos amino de resíduos de lisina e histidina (GHILARDUCCI; TJEERDEMA, 1995).

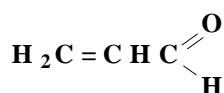


Figura 6 Fórmula estrutural da acroleína

Em bebidas destiladas novas, como conhaque, uísque ou rum, a acroleína é responsável pelo aroma penetrante e apimentado. É formada, na etapa da fermentação ou durante a destilação, pela presença de glicerol no mosto e catalisada por ácidos a quente, quando em contato com superfícies metálicas do alambique. Tanto na fermentação, quanto na destilação ocorre desidratação do glicerol. (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991).

Em outros estudos, verifica-se que a formação de acroleína em bebidas alcoólicas ocorre principalmente durante o processo de fermentação, pela desidratação do glicerol, associada a bactérias termofermentativas, como ocorre em vinhos (AZEVEDO et al., 2007; CARDOSO, 2006).

A rota metabólica proposta para a formação da acroleína na etapa de fermentação é similar à da destilação e envolve a desidratação do glicerol com

perda de duas moléculas de água. Na primeira etapa ocorre a eliminação da hidroxila central e posterior desidratação; na segunda etapa, ocorre simplesmente uma segunda eliminação da molécula de água. A reação simplificada da conversão do glicerol em 3-hidroxi-propanal e, posteriormente, em acroleína, ocorre em meio ácido na presença de calor, como demonstrado na Figura 7.

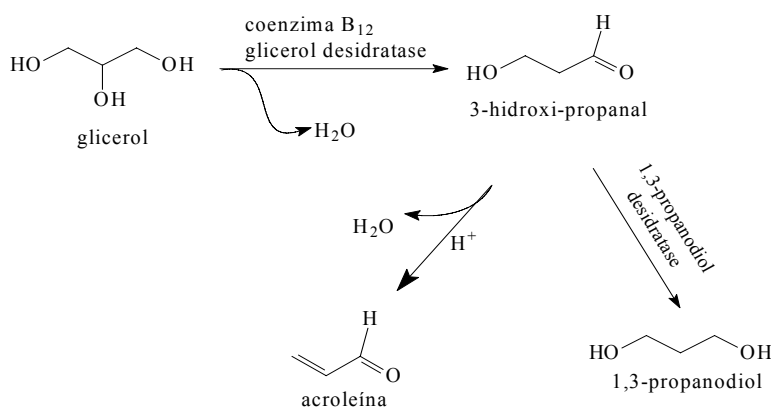


Figura 7 Via metabólica de formação da acroleína

Fonte: Adaptada de Sauvageol et al. (2000)

A produção de acroleína por bactérias está relacionada aos aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina, formando intermediários que são fotodegradados em acroleína e sulfeto de dimetila (SAUVAGEOL et al. 2000).

2.6.9.2 Toxicidade

A acroleína é tóxica por todas as vias de exposição; porém, o mecanismo pelo qual produz sintomas tóxicos não é conhecido, embora se saiba que o composto é altamente reativo, causando reações cruzadas com sítios do

DNA e inibindo a atividade de algumas enzimas (incluindo o citocromo P450 e a glutationa-S-transferase) *in vitro* por reação com os grupos de enxofre em locais ativos. A acroleína promove a supressão de defesas antibacterianas no pulmão, libera radical de oxigênio e reage com proteínas. O ataque irritativo é imediato, mas pode surgir edema pulmonar retardado e insuficiência respiratória que persistem por mais de 18 meses após exposição. Exposições ao vapor de acroleína em concentrações superiores a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ podem levar à edema pulmonar e morte. A inalação pode também causar uma reação asmática em indivíduos sensíveis. Os vapores de acroleína são irritantes aos olhos, nariz e garganta, o limite de percepção olfativa da acroleína no ambiente é de $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ e concentrações dez vezes maiores são consideradas perigosas à vida e à saúde (AZEVEDO et al., 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e particularmente a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) tm demonstrado nos últimos anos grande interesse na identificação dos congêneres e outros compostos presentes em bebidas alcoólicas que apresentam características carcinogênicas, mutagênicas ou tóxicas (NASCIMENTO et al., 1997).

A Instrução Normativa de 2005 incluiu a acroleína, na lista de padrões de Identidade e Qualidade da Cachaça e da Aguardente de Cana, cujo limite permitido é de $5,0 \text{ mg/100 mL}$ de álcool anidro (BRASIL, 2005).

2.6.9.3 Acroleína em alimentos e bebidas

A acroleína pode ser encontrada no ar, na água e em solos próximos de locais usados como depósitos de resíduos perigosos, se não devidamente armazenados. Apesar de ser encontrada na água de superfície e no solo, segundo a Environmental Protection Agency (EPA), a acroleína é rapidamente evaporada ou inativada por ligações a materiais no solo, sendo, assim, improvável que

prevaleça muito tempo no ambiente, ou seja, persistência ambiental não é esperada (EPA, 2003).

A presença de acroleína em alimentos e em bebidas é indesejável por ser extremamente tóxica por todas as vias de administração, além de apresentar características mutagênicas, podendo provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos. Em várias pesquisas têm sido relatada a presença de acroleína em alimentos e bebidas. Hirayama et al. (1991) encontraram acroleína em cinco amostras de óleos comestíveis com concentrações que variavam de 11,9 a 38,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (média de 28,5 $\mu\text{g g}^{-1}$), aquecidos a 80°C durante 20 horas.

Nessa mesma época, Feron et al. (1991) analisando acroleína em vinho e outras bebidas alcoólicas, encontraram uma concentração máxima de 3,8 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Várias pesquisas têm sido realizadas nessa área, porém, até o momento as concentrações de acroleína na bebida apresentam-se abaixo do permitido pela legislação brasileira (AZEVEDO et al., 2007; CARDOSO et al., 2003b; LEDAUPHIN et al., 2006a; MASSON, 2009; ZACARONI, 2009).

Na busca por esclarecimentos a respeito das alterações que se processam na composição da bebida em função da natureza do material dos alambiques, Nascimento et al. (1998) quantificaram os principais aldeídos presentes em bebidas produzidas em diferentes alambiques, porém não foi detectada a presença de acroleína nas amostras avaliadas.

2.6.9.4 Métodos de análise para acroleína

A cromatografia é a técnica mais utilizada na identificação e quantificação de acroleína em alimentos e bebidas. Os aldeídos de baixa massa molar, saturados ou insaturados, como a acroleína, apresentam elevada reatividade, o que dificulta a sua análise direta; portanto, os métodos indiretos,

por derivação, são os mais apropriados. A derivação aumenta a resposta do detector e a seletividade (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Na derivação de compostos carbonílicos, são empregados diversos agentes, como 2,4-dinitro-3,5,6-trideuterofenilhidrazina, semicarbazina, 5,5-dimetil-1,3-ciclo-hexanodiona, 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), hidroxilamina, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-hidroxilamina (PFBHA) e 5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfohidrazida (DNSH) (PEREIRA; CARRILHO; TAVARES, 2002; HO; YU, 2004).

A 2,4-DNPH é uma das melhores alternativas para a determinação de aldeídos e cetonas, tanto em amostras líquidas como gasosas. A reação com os compostos carbonílicos é altamente específica e ocorre em temperatura ambiente, favorecendo um preparo de amostra mais rápido e minimizando os efeitos de matriz (AZEVEDO et al., 2007).

As hidrazonas, uma vez formadas, são analisadas por cromatografia gasosa (GC) e por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC-fase reversa; entre estas duas técnicas, a HPLC tem se mostrado mais atraente. A GC tem limitações no que diz respeito à baixa volatilidade e instabilidade térmica dos derivados. A HPLC é a técnica mais utilizada na determinação de compostos carbonílicos, principalmente em matrizes como alimentos, bebidas ou amostras ambientais. Os derivados hidrazônicos são estáveis e facilmente separados e identificados (LEDAUPHIN et al., 2006b; SILVA, M. et al., 2006).

Em cachaça, os primeiros estudos sobre acroleína utilizaram HPLC em fase reversa após derivação com 2,4-DNPH. Segundo os autores, a metodologia é simples e rápida. Esse procedimento possibilitou a separação de dezoito diferentes aldeídos, dos quais dez foram identificados em 75 amostras (NASCIMENTO et al., 1997, 1998).

A quantificação de compostos carbonílicos insaturados foi realizada por HPLC com detector de UV, após derivação com um agente alternativo, o N-

metil-4-hidrazino-7-nitrobenzenofurano (MNBDH). Esse agente de derivação promoveu a formação de derivados hidrazônicos que mostraram estabilidade por alguns dias (SCHULTE-LADBECK et al., 2001).

Cardoso et al.(2003b) quantificaram acroleína em amostras de cachaças e rum utilizando HPLC e o 2,4-DNPH como reagente de derivação. Esse procedimento pode ser utilizado para determinações simultâneas de cetonas e aldeídos em bebidas alcoólicas.

Uma aplicação interessante da derivação de aldeídos e cetonas saturados ou insaturados foi demonstrada por Herrington et al. (2005) usando DNSH. Neste estudo, foi examinado o mecanismo de reação para a acroleína e os principais parâmetros que influenciaram a reação. A hidrazona da acroleína formada mostrou-se estável por alguns dias, e a quantificação foi realizada por HPLC.

Ledauphin et al.(2006a) desenvolveram um método para identificar e quantificar acroleína em bebidas alcoólicas, utilizando cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo, com derivação prévia da acroleína por MBTH. As bebidas alcoólicas contêm uma grande quantidade de compostos voláteis, mas poucos compostos nitrogenados, facilitando a detecção e reduzindo possíveis problemas de coeluição. Esse método possibilitou o estudo cinético do desaparecimento da acroleína na bebida. A concentração de acroleína diminuiu rapidamente durante as primeiras horas e alterou lentamente após alguns dias.

2.6.10 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos tóxicos e que já foram encontrados em bebidas alcoólicas, embora não façam parte da lista dos padrões de identidade e qualidade da cachaça e aguardente de cana, exigidos pelo MAPA.

2.6.10.1 Formação

Os HPAs são compostos orgânicos que possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados, de cinco ou seis átomos de carbono, podendo ou não ter grupos substituintes ligados. A anelação pode ocorrer de forma linear ou angular. Formados durante a combustão incompleta de material orgânico, seja por pirólise, (compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis), seja por pirossíntese, (moléculas menores e radicais recombina-se para produzir moléculas maiores e mais estáveis), os HPAs podem sofrer reações pirossintéticas, originando estruturas mais complexas, com anéis altamente condensados (PEREIRA-NETTO et al., 2000).

O mecanismo para a formação dos HPAs está baseado na combustão e pode seguir diferentes rotas. A temperatura mais baixa favorece a formação de hidrocarbonetos de dois a cinco anéis, como naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno, na temperatura igual ou superior a 500°C favorece a formação de criseno, benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno. Outros HPAs, como indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)pirileno também são produzidos em temperaturas superiores a 600°C (MCGRATH; CHAN; HAYALIGOL, 2003).

2.6.10.2 Legislação

Agências que controlam a qualidade das águas no Brasil e no mundo listam os principais HPAs a serem monitorados, como o criseno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) lista esses sete HPAs que devem ser monitorados em águas superficiais de classe 1, com limite de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$

(CONAMA, 2005). Em águas destinadas ao consumo, o limite para benzo(a)pireno é de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, não havendo legislação para os demais alimentos; porém, o Brasil segue os limites estabelecidos por outros países (BRASIL, 2006).

A legislação escocesa estabelece limites de HPAs em alimentos de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno; de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fluoranteno, pireno e criseno (BETTIN; FRANCO, 2005). Na Alemanha, Suíça e Polônia, adotou-se um limite de $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo(a)pireno em alimentos defumados (SIMKO, 2002).

2.6.10.3 Toxicidade

A Agência de Proteção Ambiental Americana (United States Environmental Protection Agency – USEPA) monitora 129 poluentes ambientais, dos quais 16 são HPAs e considerados poluentes prioritários. Já o Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional (National Institute for Occupational Safety & Health – NIOSH) controla 17 hidrocarbonetos, incluindo o benzo(e)pireno na lista da USEPA. A Conferência Governamental Americana de Higienistas Industriais (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* ACGIH) classificou as substâncias quanto à carcinogenicidade em: A1- carcinogênico humano confirmado; A2 - carcinogênico humano suspeito; A3 - carcinogênico animal confirmado; A4 – não classificado como carcinogênico humano e A5- não suspeito como carcinogênico humano (ACGIH, 2007). Uma classificação similar já tinha sido feita anteriormente pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), em 1= carcinogênico para humanos; 2A = provável carcinogênico para humanos, com limitada evidência em humanos e suficiente em animais; 2B = possível carcinogênico em humanos e limitada evidência em humanos e

insuficiente em animais; 3 = não é classificada como carcinogênico em humanos (IARC, 1983)

















Os 16 HPAs monitorados pela USEPA estão apresentados na Tabela 2, com suas estruturas e efeitos. Esses compostos promovem risco à saúde, pois são pró-carcinogênicos, ou seja, precisam passar por um processo metabólico preliminar para formar o carcinógeno ativo e tornarem-se capazes de reagirem com o DNA e outras moléculas, sendo listados pela União Europeia como poluentes prioritários (OLIVELLA et al., 2006).

O comitê conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) e o *World Health Organization* (WHO) avaliaram o grupo dos HPAs e concluíram que 13 desses compostos são claramente carcinogênicos e genotóxicos: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, benzo(a)pireno, indeno (1,2,3 cd-pireno), dibenzo(ah)antraceno, dibenzo(ae)pireno, dibenzo(ah)pireno, 5-metilcriseno, dibenzo(ai)pireno e dibenzo(al)pireno, dos quais, o benzo(a)pireno é o mais conhecido e tem sido muito estudado nos últimos anos (WHO, 2005).

Os efeitos carcinogênicos e mutagênicos crescem com o aumento do número de anéis aromáticos condensados. Os HPAs de baixa massa molecular (dois, três ou quatro anéis aromáticos) apresentam uma significativa toxicidade. No entanto, alguns dos hidrocarbonetos de elevada massa molecular (com cinco ou seis anéis) além de serem tóxicos, são altamente mutagênicos (DOONG; CHANG; SUN, 2000).

Os HPAs, uma vez inseridos no corpo humano, por inalação, ingestão ou através da pele, distribuem-se pelo organismo através de qualquer rota e são encontrados em praticamente todos os órgãos internos, principalmente naqueles ricos em lipídeos, ocorrendo a metabolização e depois a excreção pela urina.

Tabela 2 Estruturas químicas, propriedades e classificação dos HPAs

| Nome | FE | Classificação | | T(°C) | | S* |
|------------------------|---|---------------|-------|-------|-----|-------|
| | | IARC | USEPA | Tf | Te | |
| naftaleno |  | 2B | P | 80 | 218 | 30 |
| acenaftileno |  | NC | P | 92 | 265 | 3,93 |
| acenafteno |  | NC | P | 92 | 279 | 3,47 |
| fluoreno |  | 3 | P | 116 | 293 | 1,98 |
| antraceno |  | 3 | P | 216 | 340 | 0,07 |
| fenantreno |  | 3 | P | 101 | 340 | 1,29 |
| Pireno |  | 3 | P | 149 | 360 | 0,14 |
| fluoranteno |  | 3 | P | 111 | - | 0,26 |
| Benzo(a)antraceno |  | 2B | P | 158 | 400 | 0,014 |
| Criseno |  | 2B | P | 265 | - | 0,002 |
| Benzo(a)pireno |  | 1 | P | 179 | 496 | 0,004 |
| Benzo(b)fluoranteno |  | 2B | P | 167 | - | 0,001 |
| Benzo(k)fluoranteno |  | 2B | P | 217 | 480 | 0,001 |
| Benzo(g,h,i)pirileno |  | 3 | P | 222 | - | 0,003 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno |  | 2B | P | 163 | - | 0,062 |
| Dibenzo(a,h)antraceno |  | 2A | P | 262 | - | 0,005 |

FE – fórmula estrutural. NC= não consta. *S – solubilidade (mg L⁻¹).

Te – Temperatura de ebulição Tf – temperatura de fusão

Fonte: Adaptada de IARC (2006)

O metabolismo dos HPAs é complexo. Em geral, são convertidos em epóxidos, os quais posteriormente são convertidos em fenóis, dióis e trióis, que podem ser conjugados com ácido sulfúrico ou glucorônico ou com glutatona. Embora a maior parte do metabolismo resulte em detoxificação, alguns HPAs são ativados formando espécies DNA-ligantes, principalmente o diol epóxido, e posteriormente, compostos poli-hidroxilados, que são mais solúveis em água, o que facilita a eliminação pela via urinária. Um dos intermediários formados pode reagir com a guanina do DNA, formando um aduto e forçando a célula a erros na replicação do DNA, iniciando um processo mutagênico (PEREIRA-NETTO et al., 2000).

Os HPAs podem produzir tumores tanto no local de contato quanto em local distante dele, e o potencial carcinogênico do composto pode variar de acordo com a rota de exposição. As estimativas de risco associado aos HPAs e suas misturas são feitas com base em estimativas de exposição e em resultados de estudos epidemiológicos (WHO, 1998).

2.6.10.4 Propriedades físico-químicas

As propriedades físico-químicas são importantes para entender o comportamento ambiental, biológico e principalmente para estabelecer métodos para sua análise. Essas substâncias são pouco solúvel em água, possuindo elevadas temperaturas de ebulição e fusão, na faixa de 218°C a 542°C, e o intervalo da temperatura de fusão de 80°C a 279°C. São solúveis em solventes orgânicos e demonstram grande afinidade lipofílica (expressa pelo coeficiente de partição octanol/água, Kow) que aumenta com o aumento do número de anéis aromáticos. Por outro lado, a volatilidade desses compostos diminui com o aumento da massa molar e, conseqüentemente, os HPAs de massas molares mais baixas, como o naftaleno, acenafteno e fluoreno, são semi-voláteis e apresentam

maiores pressão de vapor que os mais pesados, tais como o dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-c,d)pireno. O mesmo é observado com respeito aos valores da constante de Henry, que diminui com o aumento da sua massa molar (PEREIRA-NETTO et al., 2000).

Essas propriedades possibilitam encontrar os HPAs na atmosfera, tanto na fase gasosa quanto naquela adsorvida em materiais particulados. Também o caráter lipofílico dos HPAs permite a sua absorção pela pele, por ingestão ou inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo.

Na Figura 8 ilustra-se a biotransformação do benzo(a)pireno, que após entrar no organismo humano, sofre oxidação enzimática pela monoxigenase (MO) e se transforma em vários epóxidos, os quais são hidrolisados aos dihidrodióis epóxidos correspondentes, pela ação da epóxido hidrolase (EH). Os dióis formados, ao sofrerem novamente a ação de enzimas, transformam-se em epóxidos carcinogênicos. A ligação entre o diol epóxido, resultante da ativação metabólica dessas substâncias e o DNA, é favorecida quando o diol epóxido vicinal é formado (região de "baía"), principalmente nas moléculas não lineares, como o benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno e o fenantreno. Provavelmente o ataque eletrofílico do DNA aos epóxidos ocorra através de um mecanismo do tipo SN1 e se processe através de estados de transição nos quais os hidrocarbonetos exibem significativo caráter de carbocátion. Assim, a reatividade com o DNA e, conseqüentemente, a capacidade carcinogênica desses compostos estaria diretamente relacionada com a facilidade de formação desses carbocátions. Embora seja possível a obtenção de quatro formas enantioméricas para cada diol epóxido formado, somente os isômeros correspondentes às estruturas (a) e (c) estão envolvidos nas reações com o DNA em sistemas celulares, sendo que a estereoquímica R,S,S,R correspondente ao isômero da estrutura (a), é responsável pela maior parte da ação carcinogênica (PELTONEN; DIPLLE, 1995).

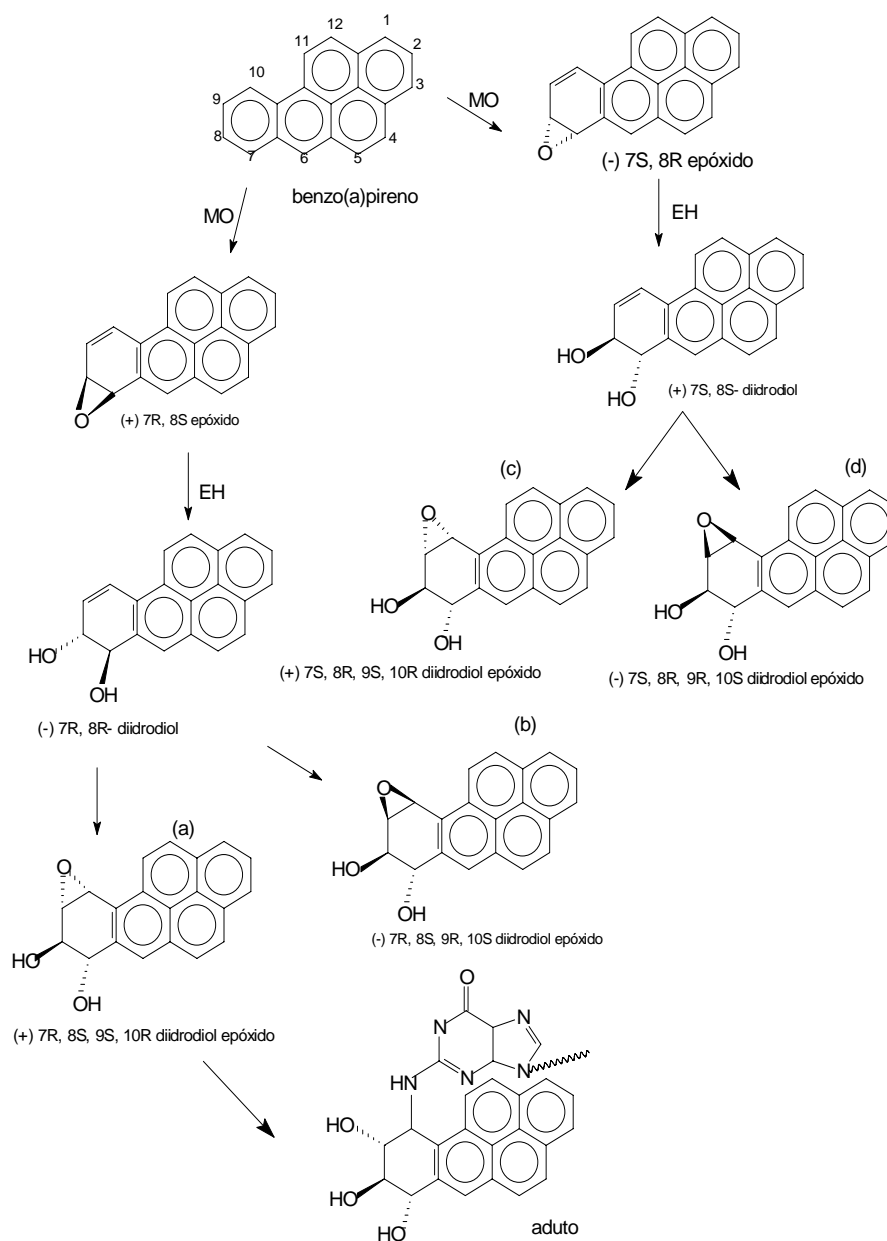


Figura 8 Mecanismo de eliminação metabólica do benzo(a)pireno

Fonte: Adaptado de Peltonen e Diple (1995)

2.6.10.5 HPAs em alimentos e bebidas

Há muitos estudos sobre a ocorrência de HPAs em diversos tipos de alimentos, incluindo óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, vegetais, produtos defumados, chás, café, cereais, água, alimentos de origem marinha, alimentos grelhados, entre outros. A formação desses compostos deve-se principalmente ao processamento, como defumação, torrefação e secagem direta com madeira, à poluição do ar e da água, além de sua presença em solos terrestres e marinhos (CAMARGO; TOLEDO, 2002a, 2002b; GARCIA-FALCÓN; CANCHO-GRANDE; SIMAL-GÁNDARA, 2005).

As bebidas alcoólicas, destiladas e fermentadas, podem sofrer a contaminação por HPAs durante as etapas de produção, por meio de adição de caramelo (utilizado para a correção da coloração da bebida envelhecida) no produto final ou durante o período de maturação. Nas bebidas preparadas com malte, a cevada germinada é seca por meio dos vapores de turfa queimada. Uísque e outros destilados alcoólicos podem sofrer contaminação quando passados através de filtros de carvão vegetal ou quando estocados por um longo período de tempo em barris de madeira (carbonizados por contato direto com fogo ou por meio de circulação de ar quente. Nos vinhos, a contaminação pode ocorrer durante o armazenamento em barris carbonizados (GARCIA-FALCÓN; SIMAL-GÁNDARA, 2005).

No Brasil, os estudos relacionados à presença de HPAs em cachaça são incipientes, em virtude da não existência de legislação própria; porém, com as exigências do mercado externo e a frequência com que esses compostos são detectados na bebida, eles têm se tornado alvo de grande preocupação, em virtude do potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico destas substâncias (PEREIRA-NETO et al., 2000).

Diversos fatores contribuem para a presença de HPAs em cachaças, como a localização da plantação, queima da cana antes da colheita, emprego de lubrificantes nos equipamentos, utilização de recipientes não adequados para o armazenamento da bebida, tanques revestidos com resinas asfálticas ricas em HPAs, açúcar adicionado à bebida e durante o envelhecimento em tonéis de madeira tratada termicamente (HAWTHORNE; TREMBLEY; MONIOT, 2000; ZAMPERLINI; SILVA-SANTIAGO; VILEGAS, 2000).

Canaviais situados próximo a rodovias podem ser contaminados por esses compostos. Camargo e Toledo (2002a) encontraram maiores níveis de HPAs em frutas e vegetais provenientes de plantações próximas a rodovias, do que aquelas cultivadas em campo aberto.

A queima da palha da cana é uma prática bastante comum nessa cultura, tanto no corte manual como no mecanizado, pois melhora o rendimento do corte, auxilia no preparo do terreno para novos plantios e aumenta a quantidade de açúcar por peso, devido à evaporação da água. Por outro lado, a queima da palha leva à contaminação do ambiente por fuligem, fonte de HPAs que são introduzidos na atmosfera, resultando na contaminação da cana, e conseqüentemente, dos produtos obtidos, dessa cultura (SANTOS; AZEVEDO; AQUINO-NETO, 2002).

Zamperlini, Silva-Santiago e Vilegas (2000) analisaram amostras de fuligem da cana queimada e observaram a presença dos seguintes compostos: naftaleno, acenaftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, 1,2-benzo(e)pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(e)pireno, 1,2-benzo(b) fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e benzo(g,h,i)pirileno. Posteriormente Azevedo, Santos e Aquino-Neto (2002); Godoi et al. (2004); Santos, Azevedo e Aquino-Neto, (2002) confirmaram que realmente a queima da cana é uma fonte importante de emissão de HPAs e pode ser responsável pela presença deles na cana queimada e em seus subprodutos.

BOSSO et al. (2006) mostraram que, durante a colheita manual da cana, os trabalhadores rurais excretaram HPAs através da urina em níveis nove vezes mais alto do que um grupo de controle. Segundo os autores, o estudo comprovou que as condições de trabalho expõem os cortadores de cana ao risco potencial de doenças, principalmente por problemas respiratórios e câncer de pulmão.

As primeiras pesquisas sobre a presença de HPAs em cana (crua e queimada) e seus derivados (açúcar mascavo, cristal, refinado e aguardente) foram realizados por Serra, Pupin e Toledo (1995), que analisaram amostras de cana crua, cana queimada, caldo misto e caldo decantado. Os contaminantes somente foram detectados na cana queimada, com níveis de HPAs totais variando de 0,10 a 1,55 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entre os produtos processados (açúcares e aguardente), o único que não apresentou contaminação foi o açúcar refinado; nos demais produtos os níveis de HPAs totais variaram de 0,76 a 10,15 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Garcia-Falcón e Simal-Gándara (2005) pesquisaram vários tipos de bebidas alcoólicas (vinho, rum, grappa, brandy e uísque), submetidos a diferentes períodos de envelhecimento, avaliando 7 HPAs, e pelos resultados, verificaram que os maiores teores foram encontrados nas bebidas envelhecidas em barris, os quais foram carbonizados por braseiro, um método tradicional para reaproveitamento de recipiente.

Nessa mesma época, Bettin e Franco (2005) quantificaram de 16 HPAs em 28 amostras de aguardentes de cana, observando que as médias variaram de 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para benzo(a)antraceno e de 9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para naftaleno. Pelos resultados, verificou-se maior teor dos contaminantes nas aguardentes em que se utilizaram cana queimada no seu processamento.

Galinaro, Cardoso e Franco (2007), em trabalho similar, monitoraram 16 HPAs em 131 amostras de cachaça de cana queimada e não queimada e confirmaram que a queima da cana contribuiu na formação de HPAs.

Tfouni et al. (2007) analisaram 25 cachaças comercialmente disponíveis no Brasil e verificaram a presença de benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)-pirene e dibenzo(a,h)antraceno. Os níveis de HPAs variaram de não detectado a $1,94 \mu\text{g L}^{-1}$.

Dórea et al. (2008) avaliaram HPAs em cachaças de Minas Gerais e da cidade de Aracaju-Sergipe, encontrando concentrações elevadas de fluoreno, antraceno e benzo(a)pireno.

Caruso e Alaburda (2009) analisando 20 amostras de cachaças de quatro diferentes estados brasileiros, encontraram níveis de contaminação de benzo(a)pireno variando de não detectado ($LD < 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$) a $0,49 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os estudos científicos já divulgados comprovam que a poluição atmosférica originada pela prática da queima da cana-de-açúcar, como parte do processo produtivo de etanol, cachaça e açúcar, repercute em riscos severos à saúde dos trabalhadores e da população em geral, devendo ser abolida imediatamente. Diante do exposto, as autoridades do estado São Paulo, maior produtor de cachaça industrial e etanol do Brasil, aprovaram um regulamento no qual estabeleceram 2020 como a data-limite para a mecanização da colheita de cana em todos os processos e eliminação da prática da queima da cana. Com isso, pretende-se diminuir a contaminação ambiental e em alimentos por HPAs.

Em algumas pesquisas de HPAs em cachaça não foram descritas a respeito da queima da cana antes da produção, mesmo assim, a bebida apresentou contaminação por HPAs. Esse fato aliado à seriedade dos efeitos que estas substâncias causam ao organismo humano, fez com que atenção especial fosse dedicada a todas as etapas do processo de produção da bebida que possa contribuir para uma contaminação. Entre essas, a utilização de recipientes plásticos não adequados para o armazenamento da bebida, uma das práticas mais adotadas pelos produtores, especialmente pela viabilidade econômica.

A portaria de nº 738, de 7 de novembro de 2005, recomenda para o envelhecimento da bebida o uso de tonéis de madeira (de origem exótica ou nativa, desde que autorizados pelos órgãos competentes) de capacidade de 100 a 700 litros e por um período mínimo de um ano. Já o armazenamento da bebida deve ser em dorna de aço inox ou tonéis de madeira que confira características desejáveis ao produto. É proibido o uso de recipientes de plásticos, de ferro, cerâmica, tanques de concreto, aço-carbono para armazenar a bebida. No envelhecimento, é proibido o uso de madeira que possa exercer qualquer ação ou alteração indesejável nas características da cachaça ou que venha ensejar a migração de compostos tóxicos. Nessa mesma portaria, proibiu-se o envelhecimento mediante métodos artificiais, como o tratamento com ozônio e outras substâncias (IMA, 2005).

A seguir, são apresentadas algumas considerações acerca do uso de técnicas cromatográficas na investigação de HPAs em cachaça, a fim de contextualizar as pesquisas que serão delineadas mais adiante.

2.6.10.6 Métodos de análises para HPAs

Os métodos analíticos descritos para a determinação de HPAs baseiam-se na análise cromatográfica em fase gasosa (GC) ou por HPLC. A NIOSH preconiza dois métodos de análise de HPAs em ambientes de trabalho, sendo a principal distinção entre eles as técnicas de análise: A GC com detector de ionização por chama (Method 5515-NIOSH) e HPLC com detectores de Ultravioleta e Fluorescência (Method 5506-NIOSH). Esses métodos são adotados em diversos países, inclusive no Brasil (SILVA, 2009).

A GC utiliza dois detectores, o detector de ionização por chama (*FID*) e o detector por espectrometria de massas (MS), separadamente. A detecção por espectrometria de massas é muito usada, principalmente com monitoramento

seletivo de íons (MS-SIM), por aumentar a sensibilidade. (AZEVEDO; SANTOS; AQUINO-NETO, 2002; SANTOS; AZEVEDO; AQUINO-NETO, 2002; SIMKO, 2002).

Na quantificação de HPAs, utiliza-se com muita frequência a técnica de análise por HPLC, que dispõe dos detectores de ultravioleta com arranjo de fotodiodo (DAD) e de fluorescência. A coluna em fase reversa (C18) polimérica é muito eficiente na separação dos 17 HPAs considerados prioritários pela NIOSH e 16 da USEPA. (DILETTI et al., 2005; PAGLIUCA et al., 2003; PENSADO et al., 2000; SIMKO, 2002).

As duas técnicas são empregadas rotineiramente na análise de HPAs, porém, requer um tratamento prévio da amostra, envolvendo etapas de saponificação (dependendo do tipo de alimento), extração com solventes, concentração do extrato, purificação e determinação cromatográfica. Esse tratamento é realizado em razão da complexidade das matrizes, que traz um grande número de interferentes que, dificultando, assim, a identificação (PENSADO et al., 2000).

Para auxiliar na determinação de HPAs, vários métodos de extração estão sendo desenvolvidos com o intuito de minimizar os problemas inerentes a essa análise.

2.6.10.6.1 Métodos de extração

A escolha do método para a extração depende da natureza da matriz. Em matrizes ricas em proteínas, como a carne, necessariamente passa pela etapa de saponificação, e posterior, extração; já matrizes ricas em lipídeos, no caso de óleos e gorduras, a extração líquido-líquido é indicada. O inconveniente desse procedimento está no tempo longo da análise e no grande consumo de solventes. Tentando superar os problemas presentes nessa técnica, novos métodos de

extração foram introduzidos. A extração em fase sólida consiste na extração sólido-líquido, baseada em mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, que emprega uma pequena coluna aberta de extração (cartucho), a qual contém a fase sólida (fase estacionária), onde é passada a amostra contendo o analito de interesse. Há três modos de operação com a SPE: limpeza da amostra “clean-up, concentração e remoção da matriz. A limpeza consiste em deixar os analitos de interesse “aprisionados” na fase estacionária, eliminando as impurezas indesejáveis pela passagem de solvente. Essa eliminação ocorre pela maior afinidade com o solvente. Quando os analitos de interesse forem menos polares que as impurezas, como é o caso da cachaça, uma fase sólida operando no modo fase reversa é recomendada. No modo concentração da amostra, utilizam-se grandes volumes de solução contendo os analitos em baixa concentração, geralmente $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses serão concentrados na fase sólida, enquanto as impurezas serão descartadas, a posterior eluição dos analitos com um pequeno volume de solvente não polar causará grande concentração dos analitos. O modo remoção da matriz é empregado na remoção de contaminantes de matrizes complexas, geralmente de fluidos biológicos, como sangue, plasma, etc (LANÇAS, 2004). A SPE tem sido muito empregada na extração de HPAs em bebidas (CARUSO; ALABURDA, 2009; GALINARO; CARDOSO; FRANCO, 2007).

Uma técnica relativamente simples do ponto de vista instrumental e muito utilizada é a microextração em fase sólida (SPME), em que a extração ocorre por meio de uma fibra polimérica recoberta por um polímero. Os principais revestimentos da fibra são: dimetilpolisiloxano – PDMS, poliacrilato – PA, carbowax/divinilbenzeno – CW/DVB, dimetilpolisiloxano/divinil benzeno – PDMS/DVB (LANÇAS, 2004)

Outra técnica alternativa é a extração em fluido supercrítico (SFE), em que o CO_2 , em temperatura e pressão acima do ponto crítico, é utilizado como

fase móvel por ser um excelente solvente para compostos orgânicos apolares e polares (ARREBOLA et al., 2006).

Há várias outras técnicas de extração, que são selecionadas de acordo com a natureza da matriz utilizada e do analito de interesse.

2.6.11 Carbamato de etila

O carbamato de etila (CE) é uma substância comum a alimentos e bebidas fermentadas; porém, devido à sua natureza tóxica, e à sua presença constante em bebidas alcoólicas, tornou-se importante a sua caracterização e quantificação nesses produtos. A fórmula estrutural do carbamato de etila está representada na Figura 9.

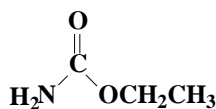


Figura 9 Fórmula estrutural do carbamato de etila

2.6.11.1 Propriedades físico-químicas e aplicações

O CE é um composto orgânico que foi preparado pela primeira vez no século XIX. Também conhecido como uretana ou etiluretana, é um éster etílico do ácido carbâmico cuja temperatura de ebulição está entre 182 e 184°C, temperatura de fusão de 49°C, constante de Henry 0,006 Pa m³/ mol e coeficiente de partição octanol/água expresso em log P = - 0,15, pressão de vapor 0,262 mm Hg a 25°C. Apresenta-se na forma de cristal incolor, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo. É um composto relativamente polar, hidrofílico e bastante solúvel em água (4,80x10⁵ mg L⁻¹), etanol, éter, clorofórmio, acetato de etila, benzeno e glicerol; sublima a 103°C. Essas

propriedades conferem ao CE alta polaridade e baixa volatilidade, além de se decompor à baixa temperatura. (O'NEIL, 2001).

Estudos teóricos de cálculos quânticos para o CE observaram a existência de dois conformeros, na fase gasosa (Figura 10)

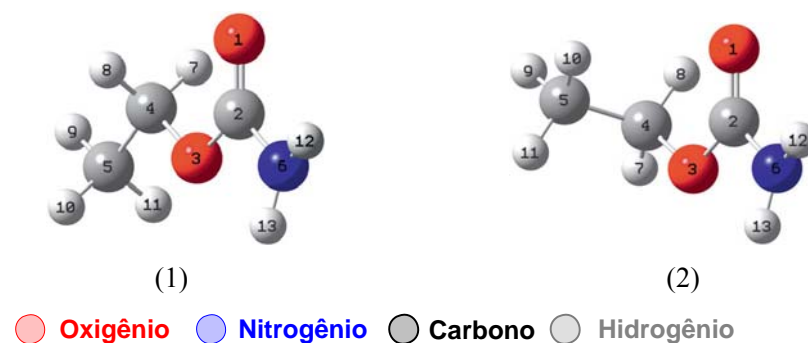


Figura 10 Estruturas conformacionais para o CE

Fonte: GOUBET et al. 2009

Experimentalmente a estrutura (1) é mais estável que a (2), da ordem de $0,5 \text{ KJ mol}^{-1}$, devido à falta de simetria na (2) e pela fraca interação entre os átomos de O_1 e H_8 . Por ser o mais estável, somente o conformero (1) foi detectado pela Cristalografia de Raio-X (GOUBET et al., 2009).

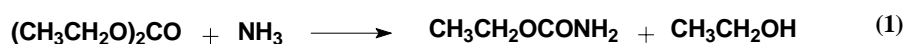
O CE foi utilizado na década de 70 como agente antineoplásico para o tratamento de varicoses, leucemia crônica e mieloma múltiplo. Outra aplicação medicinal do CE é o seu uso como hipnótico e anestésico em seres humanos e animais de laboratório. Atualmente, a utilização de CE na área da medicina vem sendo limitada, em razão dos efeitos pós-operativos adversos observados em animais e suspeita de risco à saúde em seres humanos. Na química, o CE tem sido empregado como intermediário em síntese orgânica, na produção de amino-resinas, como cossolvente na preparação de pesticidas, cosméticos e como

substância intermediária na preparação de um produto utilizado na lavagem e desgaste de tecidos (BELAND et al. 2005; WEBER; SHARYPOV, 2009).

2.6.11.2 Mecanismos de formação do CE em alimentos e bebidas

O CE já foi encontrado em diversos alimentos e bebidas nas quais ocorrem processos fermentativos, como vinhos, cidras, cervejas, cachaça, rum, uísque, vodka, iogurtes, queijos, pães e derivados da soja (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002). Alimentos e bebidas fermentadas e fermento-destiladas são a fonte natural de CE, sendo nessa última detectados níveis relativamente elevados (LACHENMEIER et al., 2005).

Em bebidas alcoólicas, os primeiros relatos sobre a presença de CE iniciaram-se na década de 70, quando o pirocarbonato de dietila (DEP) ou carbonato de dietila foi identificado, como o precursor do CE, ao reagir com amônia em pH neutro ou alcalino, conforme equação 1. Com isso, a utilização do DEP como antimicrobiano em alimentos e principalmente na fabricação de vinhos foi proibida (JAGERDEO et al., 2002).



Em destilados, a formação de CE pode ocorrer antes, durante e depois do processo de destilação, incluindo o armazenamento da bebida (LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008).

Os mecanismos de formação do CE ainda não se encontram claramente estabelecidos; porém, para o vinho, a sua via de formação já está bem consolidada, mas a formação de CE em bebidas alcoólicas, durante a destilação, ainda requer mais estudos. Seja qual for o mecanismo que atua na formação do

CE, ainda existem muitas dúvidas que dificultam propostas de práticas alternativas na produção de cachaça, que evitem ou diminuam os seus níveis.

Na formação do CE, são propostas diversas vias, mas seu caminho será definido de acordo com a natureza da bebida, o processo de produção e os precursores disponíveis na matéria-prima. Geralmente envolve a reação entre o etanol e substâncias nitrogenadas. Muitos compostos, como ureia, fosfato de carbamila, citrulina e aminoácidos N-carbamil são prováveis precursores de CE em bebidas alcoólicas, pois estão presentes no vinho e podem reagir com etanol em pH ácido (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003).

Na fermentação do vinho, a via metabólica proposta passa pelos aminoácidos arginina, ornitina, citrulina e fosfato de carbamila; porém, a ureia e seus derivados são os compostos principais na reação com etanol para formar o CE. A rota mais comum de produção de CE na fermentação é a reação da ureia com etanol, em meio ácido, que é acelerada exponencialmente em temperaturas elevadas, conforme equação 2 (JAGERDEO et al., 2002; WANG et al., 2007).

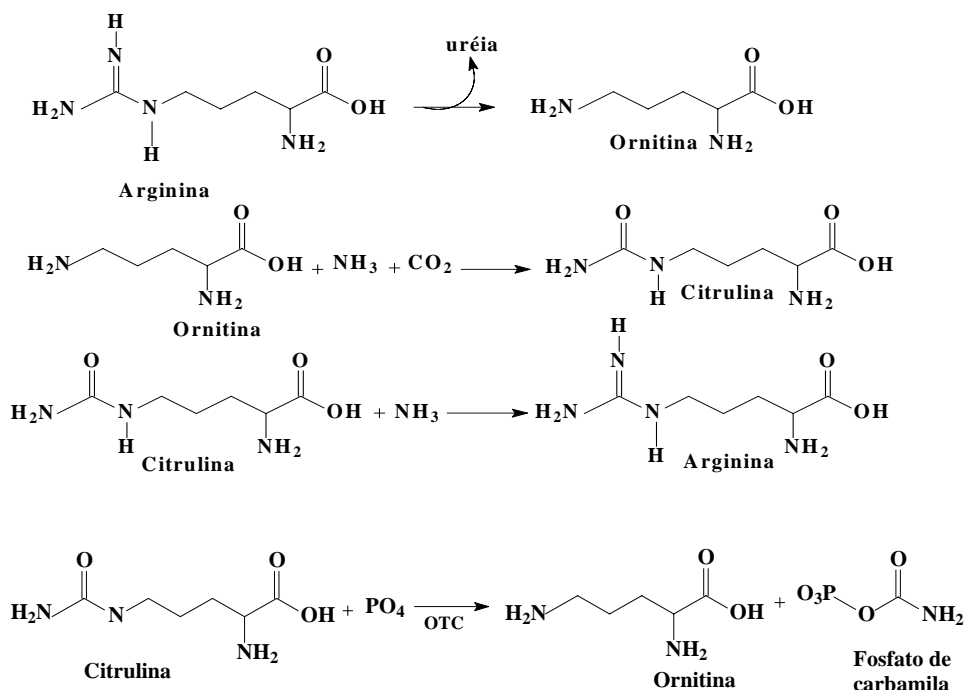


Um parâmetro importante nessa reação foi demonstrado por Aresta, Boscolo e Franco (2001), ao correlacionarem a concentração de ureia e aumento de temperatura, mostrando que a produção de CE a partir de ureia e etanol é moderada à temperatura ambiente. A ureia produzida no vinho vem da degradação de arginina via atividade catabólica da arginase que, por sua vez produz compostos intermediários que também reagem com etanol, levando à formação de CE. Em solução hidroalcoólica entre 60 a 100°C, a ureia se decompõe em cianato e isocianato. Esses, em meio ácido, reagem com etanol, produzindo o CE, conforme mostrado nas equações 3 e 4 (BRUNO et al., 2007).



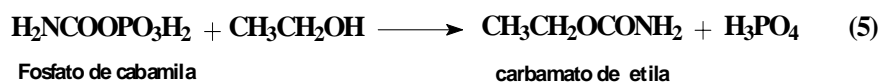
Polastro et al. (2001) e Bruno et al. (2007) descrevem sobre o mecanismo principal de formação do CE, que provavelmente ocorre por meio do metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo, em que há a degradação enzimática da arginina em ureia e outros compostos nitrogenados, como citrulina, ornitina e fosfato de carbamila (Figura 11). A etanólise desses precursores leva à produção de CE, conforme equação 5, na qual o fosfato de carbamila reage com etanol para formar o CE. Da mesma forma, a citrulina reage espontaneamente com o etanol para formar o CE (TONON; LONVAUD-FUNEL, 2002; UTHURRY et al., 2006).

A influência do tempo e da temperatura na concentração de CE, em vinho, foi demonstrada por Hasnip et al. (2004), que monitoraram a variação da concentração de CE, etanol, ureia e de citrulina, observando diminuição na concentração de ureia e de citrulina e aumento na concentração de CE. Uthurry et al. (2004), em trabalho similar, observaram a influência do tempo na concentração de CE em vinhos. Nesse estudo constatou-se que os vinhos mais velhos apresentaram concentrações de CE superiores aos mais novos.



OTC = ornitina transcarbamilase

Figura 11 Precusores do CE envolvidos no ciclo da ureia

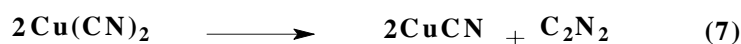


A formação de CE em bebidas destiladas antes da destilação, provavelmente, segue o mesmo caminho apresentado e proposto para vinhos, mas a concentração de CE no produto final não deve ser significativa se o processo de destilação for eficiente e remover quase todo o CE formado na etapa de fermentação (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

Na destilação, o cianeto ou intermediários cianato ou isocianato são os reagentes principais da reação com etanol para formar CE, é formado pela ação

enzimática e clivagem térmica dos glicosídeos cianogênicos (LACHENMEIER, 2005). Aresta; Boscolo e Franco (2001) mencionam que a cana-de-açúcar, matéria-prima para a produção da cachaça brasileira, é classificada como uma cultura cianogênica, mas a sua fonte de cianeto ainda é desconhecida.

Os mecanismos que operam via cianeto ou cianato para a formação de CE ocorrem durante a destilação da bebida. Provavelmente, esses ocorrem na presença de catalisadores. Duas rotas foram propostas: a primeira baseia-se na complexação do cianeto com o cobre (II), proveniente do aparelho destilador, conforme equação (6), e em seguida, a sua oxidação a cianogênio, equação (7). O cianogênio em meio básico sofre uma reação de desproporcionamento a cianato e cianeto, conforme descrito na equação (8). O cianato pode reagir com etanol, em meio ácido, para formar carbamato de etila, como demonstrado na equação (9). A corrosão do equipamento de destilação ou parte dele favorece a liberação de cobre que, por sua vez, aumenta a concentração de CE (BRUNO et al., 2007).

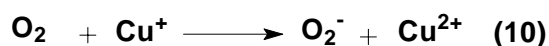


A segunda via propõe um mecanismo fotoquímico para a formação do CE. Nesse caso, ocorre auto-oxidação de compostos instaurados presentes em bebidas alcoólicas, sob luz ultravioleta na presença de oxigênio, formando radicais livres, ou hidroperóxidos orgânicos, os quais catalisam a oxidação do cianeto a cianato. (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

Os fatores que influenciam a formação do carbamato de etila a partir do cianeto são o pH, luz, concentração de etanol, temperatura, natureza dos grupos carbonilas das moléculas orgânicas e a concentração dos íons cobre (II) na bebida. O oxigênio dissolvido na bebida não contribui para a oxidação do cianeto, portanto, a conversão a cianato ocorre na presença de Cu(II) e em meio básico (ARESTA, BOSCOLO E FRANCO, 2001).

Investigando outros fatores que interferem na formação de CE, Boscolo et al. (2002) estudaram a participação do O₂ e CO₂ dissolvidos na bebida e avaliaram o papel do íon Cu (II) como catalisador na reação do cianeto com o etanol e observaram que o aumento da temperatura favorece a reação, encontrando correlação positiva para íon cianeto e a presença de CE.

Como discutido anteriormente, o oxigênio não participa diretamente da oxidação do cianeto a cianato; porém, é provável que ele esteja envolvido na oxidação do Cu⁺ a Cu²⁺, uma reação bastante conhecida por ocorrer em processos industriais, conforme apresentado na equação 10.

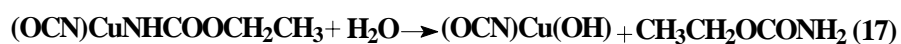
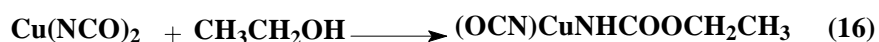


O mecanismo de formação do CE em bebidas alcoólicas via cianeto requer a atuação de catalisador; no caso de cachaças de alambique, o cobre (II) é que vai promover a conversão do cianeto a cianato e este reage com etanol, conforme equações 11-15; porém, a transformação do cianeto em cianato é possível na ausência de catalisador, mas requer pH ácido e ocorre lentamente (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; BRUNO et al. 2007).

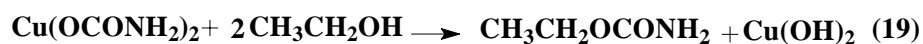
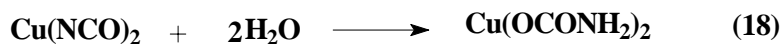




Em solução aquosa, o cianato complexa-se com o cobre (II) e a coordenação com o metal se faz pelo nitrogênio, tornando o átomo de carbono mais positivo e facilitando o ataque nucleofílico do etanol ou da água. Duas rotas são propostas para essa reação: o álcool etílico ataca o complexo cobre-isocianato formando um intermediário de unidade carbâmica, esse, por sua vez, sofre hidrólise para formar o CE, conforme equações 16 e 17.



A outra via envolve primeiro o ataque pela água do isocianato no complexo com o cobre, formando um complexo com unidade carbâmica, que sofre etanólise para formar o CE. A água compete com o etanol no ataque ao complexo com unidade carbâmica e os compostos formados são hidróxido de cobre(II), dióxido de carbono e amônia, conforme equações 18, 19 e 20.



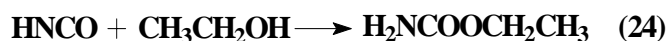
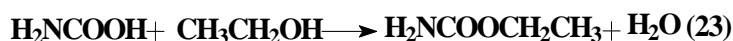
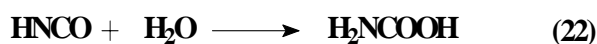
A rota mais provável de ocorrer durante a destilação é aquela que mostra inicialmente a hidrólise do complexo isocianato de cobre(II) e posterior etanólise, com a formação do CE (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

Na etapa de destilação, ocorrem reações em fase gasosa com diferentes mecanismos. Como o CE apresenta uma temperatura de ebulição elevada, (184°C), supõe-se que uma pequena quantidade é vaporizada e recolhida juntamente com a bebida. Entretanto, o CE poderá ser transportado como nuvem de aerossol até o condensador (BRUNO et al., 2007). Além disso, estima-se que quase 80% do CE encontrado nas bebidas destiladas são formados durante a etapa de destilação e/ou 48 horas após a mesma (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; BRUNO et al., 2007). Esses resultados corroboram com aqueles apresentados por Andrade-Sobrinho et al. (2009) na avaliação da estabilidade do CE após 36 meses de repouso e ao abrigo da luz. Os autores observaram uma pequena variação na concentração do CE com o tempo, sugerindo que esse composto é estável após a sua formação.

Na etapa de destilação, os precursores de CE são o HCN ou HOCN, presentes ou formados no meio hidroalcoólico, com baixa temperatura de ebulição, facilitando a sua vaporização e conseqüente reação em fase gasosa e/ou reações heterogêneas gás/sólido. As reações de oxidação de HCN em HOCN na superfície de cobre a 300K estão representadas pela equação 21.



Os intermediários HOCN ou HNCO, adsorvidos ou não, reagem em fase gasosa com o etanol, produzindo intermediários com ácido carbâmico e cianato de etila, que levam à formação de CE no destilado (Equações 22, 23 e 24).



Por fim, uma nova proposta para a formação do ácido carbâmico e do CE foi demonstrada por Dijkstra et al. (2007) envolvendo a reação de CO₂ com aminas. Essa proposta requer mais estudos; no entanto, é uma rota possível para a formação de CE em alimentos e bebidas, nos quais são encontrados CO₂, proveniente da fermentação, e aminas oriundas ou presentes nas matérias-primas.

2.6.11.3 Legislação

Em bebidas alcoólicas, principalmente em vinhos, os níveis de CE, entre 1970 e 1980, eram bastante elevados. Esse fato levou o Canadá a definir uma legislação específica sobre a presença de CE em vinhos e outras bebidas alcoólicas, estabelecendo o limite de 150,0 µg/L, como medida de proteção à saúde humana. Posteriormente, em 1989, nos Estados Unidos, pesquisadores do *Food and Drug Administration* (FDA) e o *Bureau of Alcohol, Tobacco and Fire Arms* (BATF) estabeleceram um acordo com os organismos representantes dos produtores de vinhos e bebidas destiladas, implementando programas voluntários, visando a uma redução gradativa dos níveis do CE. Nessa ocasião, foram estabelecidos limites em µg L⁻¹ para bebidas, como: uísque e conhaque (150,0), vinho de mesa (30,0); vinho fortificado (100,0), vinho licoroso (60,0) e licor (400,0). Esses valores foram estabelecidos de acordo com a frequência e a quantidade consumida (ABREU et al., 2005; UTHURRY et al., 2004).

Preocupados com a incidência constante de CE em alimentos e bebidas, cada país formulou seus próprios regulamentos, controlando a importação e a produção de vinhos e outras bebidas alcoólicas. Nos Estados Unidos, através da FDA, publicaram, em 1997, um manual de ação preventiva que estabeleceu métodos para reduzir a formação de CE. Em 1999, a Organização Mundial da Saúde colocou o CE na lista de toxinas que foram avaliadas quanto aos riscos alimentares por Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA). Em março de 2007, o CE foi reclassificado como pertencente ao grupo 2A (provavelmente cancerígeno para os seres humanos) pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC). Outros cancerígenos do Grupo 2A incluem acrilamida, arsênio, chumbo, mercúrio e gás mostarda (IARC, 2007).

A portaria 59, de 13 de agosto de, 2004 propôs, na forma de consulta pública, o estabelecimento do limite máximo desse contaminante em cachaça de 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2004). No ano de 2005, a legislação brasileira passou a adotar o mesmo padrão do Canadá para controlar os teores de CE em cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar, estabelecendo um prazo de cinco anos para a adequação do setor produtivo (BRASIL, 2005).

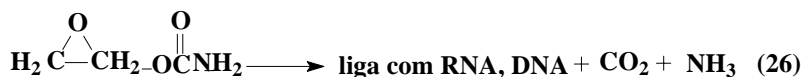
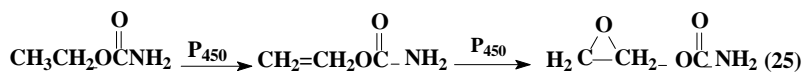
2.6.11.4 Aspectos toxicológicos

Apesar da utilização em larga escala de CE em pacientes nos anos de 1950-1975, não existem dados epidemiológicos disponíveis sobre o potencial de carcinogenicidade em seres humanos. Os primeiros estudos foram realizados em ratos, hamsters e macacos, o que possibilitou a identificação de duas vias metabólicas desse contaminante. A primeira envolve o metabolismo oxidativo, catalisado pelos citocromos P450 2E1, levando à formação do carbamato de vinila (Equações 25/26). Subsequentemente, o composto sofre nova oxidação, formando o respectivo epóxido. Esse é considerado o principal agente

carcinogênico, tendo em vista a formação de derivados resultantes de sua ligação a ácidos nucleicos, proteínas, RNA e DNA, cujos compostos formados têm sido relatados como os responsáveis pela formação de tumores malignos e/ou benignos em órgãos, como pulmões, fígado e glândulas mamárias (BELAND et al., 2005; HOFFLER et al., 2005; PARK et al., 2007).

Pesquisas com animais comprovaram que o CE, carbamato de vinila e o epóxido correspondente são mutagênicos in vivo e que o carbamato de vinila é mais potente que o CE. Evidências experimentais sugerem semelhanças na via metabólica do CE em roedores e seres humanos (HERNANDEZ; FORKERT, 2007). A dose letal (LD50) em roedores é de 2000 mg kg⁻¹

A segunda via metabólica do CE envolve a catálise pela esterase e formação de etanol, CO₂, e NH₃. Os metabólitos finais, comum às duas vias, são o CO₂ e NH₃, conforme equações 25, 26 e 27 (BELAND et al., 2005; PARK et al., 2007).



Estudos de Miller et al. (2003) sobre a indução de incidências de tumores de pulmão em ratos com injeção de CE mostraram que quase 100% dos ratos apresentaram teste positivo.

As interações entre álcool e CE foram discutidas por Beland et al. (2005), que mostraram a influência de diferentes quantidades de CE e de etanol adicionados à água consumida por fêmeas de camundongo por 12 semanas.

Todas as possíveis combinações das concentrações de CE e etanol foram testadas. Em todas as combinações, houve formação de adenomas nos pulmões dos camundongos, mas a incidência de tumores foi reduzida, quando do tratamento simultâneo com maiores concentrações de etanol. Nesse caso, o efeito foi independente da dose de CE. Além do etanol, o acetaldeído, produto de oxidação de etanol, é um potente inibidor do metabolismo de CE e um substrato para o citocromo P450 2E1 (BELAND et al., 2005).

Tratando de bebidas alcoólicas, o fato de o acetaldeído inibir o metabolismo do CE não contribui para a saúde do consumidor, pois se o acetaldeído é também carcinogênico em animais, possivelmente será em seres humanos (IARC, 1987).

2.6.11.5 Ocorrência em bebidas

Após quase 20 anos, quando ocorreram os primeiros avisos sobre o perigo do CE nas bebidas alcoólicas, o problema persiste especialmente nos produtos derivados das destilarias pequenas. Em aguardente de frutas, as concentrações são mais elevadas do que nas outras bebidas destiladas. Atualmente existem diversos trabalhos nos quais se correlacionam as diferenças nos teores de CE com processo de produção, principalmente na destilação, procedência da bebida, ou seja, diferenças geográficas, armazenamento e outros. Labanca; Glória; Afonso (2008), estudando cachaças e aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais, observaram que 93% não atendiam à legislação e que não havia correlação significativa ao nível de 5% entre os teores de CE, graduação alcoólica, pH e teores de cobre. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Barcelos et al. (2007), os quais encontraram maior teor de CE em aguardentes de cana com menor teor de cobre na bebida, contrariando

o proposto por Aresta; Boscolo; Franco (2001) e Andrade-Sobrinho et al. (2002).

Andrade-Sobrinho et al. (2009), estudando 380 amostras de aguardente de cana e 45 amostras de aguardente de mandioca, também conhecida como tiquira, concluíram que as amostras produzidas em alambique apresentaram menor teor de CE, quando comparada àquelas produzidas por destilação de coluna. Não se observou correlação entre o teor de cobre e CE em aguardente de cana, e nenhuma correlação entre a concentração de CE e cobre e cianeto para a aguardente de mandioca.

A influência do processo de destilação e de armazenamento na formação do CE foi avaliada em 25 amostras de aguardente de cana do estado do Paraíba, por Nóbrega et al. (2009), os quais observaram que 70% das amostras apresentaram teores superiores a $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$, e as concentrações maiores foram das amostras destiladas em colunas não refrigeradas. Esses pesquisadores verificaram a existência de uma estreita relação entre o sistema de destilação e a formação do CE.

2.6.11.6 Métodos de análise para carbamato de etila

Para a determinação de CE em bebidas alcoólicas, são descritos diversos métodos analíticos, sendo a cromatografia a técnica mais utilizada. Outros métodos, como espectroscopia no infravermelho, já foram empregados (LACHENMEIER, 2005; 2007).

Numa perspectiva analítica, a determinação de CE em alimentos e bebidas não é uma técnica simples, pois essa substância encontra-se presente em faixas de concentração variáveis, às vezes muito baixas, em uma matriz complexa. Técnicas cromatográficas, gasosa e líquida de alta eficiência são as mais utilizadas, uma vez que fornecem alta resolução, sensibilidade e

versatilidade. O desafio é desenvolver e validar métodos analíticos que possam determinar baixas concentrações de CE em matrizes hidroalcoólicas. A análise de CE compreende um tratamento de pré-concentração da amostra, que envolve desidratação com sulfato de sódio, derivação, extração, seja com solventes, seja com dispositivos, como a SPE e a SPME; em seguida, o analito passa pelas etapas de separação, detecção e quantificação.

2.6.11.6.1 Extração e pré-concentração

Para a extração e/ou pré-concentração de CE em alimentos e bebidas, são utilizadas várias técnicas, sendo a mais comum a extração líquido-líquido, na qual o CE é extraído de alimentos e bebidas mediante agitação da amostra com solventes orgânicos, como diclorometano, éter de petróleo, hexano, pentano, acetona, acetato de etila ou misturas com o diclorometano, geralmente em pH alcalino e com adição de soluções concentradas de NaCl e KCl. Dependendo da matriz, utilizam-se materiais com alta capacidade de absorção de água (Extrelut, Celite 545) e posterior extração em coluna de alumina ou terra diatomácea (MATSUDO et al., 1993).

O método de referência para quantificação de CE em bebidas alcoólicas, adotado por *Office International de la Vigne et Vue* (OIV) e igualmente pela Comunidade Européia, emprega a extração líquido-líquido e/ou coluna de terra diatomácea com diclorometano como solvente de extração; em seguida, a evaporação, recompondo o analito com acetato de etila, antes da injeção e quantificação por GC/MS. Esse método passou a integrar o compêndio de métodos da *Association Of Official Agricultural Chemists* (AOAC) (HERBERT et al., 2002).

2.6.11.6.2 Extração em fase sólida (SPE)

As técnicas de preparação de amostras têm sido automatizadas, para possibilitar a eliminação de erro humano de manipulação, diminuir o tempo de assistência do analista durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais à saúde e aumentar o número de análises de amostras por tempo (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A técnica de SPE consiste na separação sólido-líquido, que se baseia em mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. Empregam-se cartuchos com sorventes nas formas de discos ou de seringa. A eluição da amostra ocorre por gravidade ou pressão, com o auxílio de uma bomba a vácuo. Um cartucho típico de volume variado é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50,0-500,0 mg de sorvente, com 40-60 µm de tamanho de partícula (LANÇAS, 2004).

Na extração, os analitos contidos numa matriz são retirados, após passarem por um cartucho. Um sorvente orgânico seletivo é utilizado para remover os interferentes e, então, outro solvente é usado para extrair os analitos de interesse.

As etapas envolvidas na SPE são divididas em condicionamento, no qual ocorre a ativação do sorvente, deixando os sítios disponíveis para interagir com os analitos. Após o condicionamento, a solução contendo o analito é colocada no topo do cartucho e aspirada, de forma a penetrar nele com aplicação de pequeno vácuo, segue-se a drenagem de toda a fase líquida. O analito fica retido no sorvente e posteriormente é eluído com um pequeno volume de solvente, sendo coletado em concentração já apropriada para análise. De outro modo, a matriz pode ficar retida no cartucho e não o analito (LANÇAS, 2004).

Os procedimentos de SPE para CE em bebidas têm empregado sorvente polimérico, recomendado para substâncias de média a alta polaridade. Aplicando

a técnica preparativa de SPE na análise de CE em vinhos, Jagerdeo et al.(2002) encontraram como interferência a porcentagem de álcool presente na matriz; porém, a redução desse teor para 4% permitiu tornar a extração eficiente.

A adição de um padrão interno ao extrato tem sido recomendada por muitos autores para controlar as recuperações e acompanhar as possíveis perdas que ocorrem durante as etapas de extração e limpeza da amostra.

Uthurry et al.(2004), empregando a SPE e o carbamato de propila como padrão interno, quantificaram CE em vinho por GC/MS. Trabalhos posteriores foram realizados por Mirzoian e Mabud (2006), nos quais compararam-se as técnicas de extração e avaliou-se a eficiência da SPE na extração do CE em bebidas alcoólicas. A nova proposta incluiu o uso do CE deuterado como surrogate. A análise foi realizada por GC/MS no modo SIM e o método demonstrou boa correlação com o método de referência.

2.6.11.6.3 Microextração em fase sólida (SPME)

Até pouco tempo, a SPME estava associada à cromatografia em fase gasosa, constituindo uma metodologia rápida de caracterização da composição volátil de uma variada gama de produtos. No entanto, o seu uso com HPLC tem se tornado uma excelente alternativa para análise de compostos não voláteis.

O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida com uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero. É uma técnica de separação no equilíbrio e desenvolvida para ocorrer em duas etapas, sendo a primeira fase de extração propriamente dita (adsorção) e, na seguinte, ocorre a transferência do material extraído para um cromatógrafo, com a dessorção térmica dos analitos. Assim, na extração, a seção recoberta com o material sorvente (polímeros ou sólidos adsorventes) é colocada diretamente em contato com a amostra (modo direto) ou no seu espaço confinante

(*headspace*), onde irá ocorrer sorção das espécies de interesse presentes na amostra. A seguir, a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo, onde os analitos são termicamente desorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica, conforme Figura 12 (PAWLISZYN, 1997).

Na SPME, controlam-se diversos parâmetros, como revestimento da fibra, temperatura de extração, tempo de extração, pH, força iônica do meio, velocidade de agitação e tempo de desorção (LANÇAS, 2004).

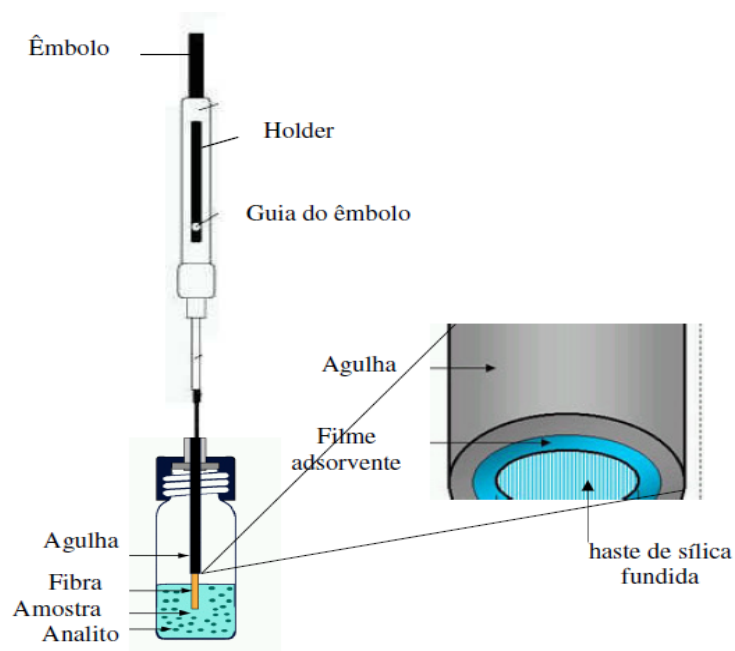


Figura 12 Dispositivo básico de SPME

A escolha da fibra está relacionada com a natureza do analito de interesse. As sugestões de uso para as fibras são úteis como ponto de partida, mas devem ser conferidas experimentalmente. A seleção do recobrimento é baseada na polaridade e volatilidade dos compostos. As principais fibras

disponíveis comercialmente são a polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) Carbowax (CW), Carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), polidimetilsiloxano divinilbenzeno (PDMS /DVB) e outras.

Geralmente o pH da matriz deve ser ajustado para aumentar a recuperação da extração do analito sobre a fibra, tanto no modo direto quanto no modo headspace. O ajuste do pH deve ser feito de acordo com a natureza do analito. A adição de sal, como cloreto de sódio, pode melhorar a eficiência da extração, principalmente para os analitos mais polares. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fibra (PAWLISZYN, 1997).

Na SPME, no modo headspace, a fibra de sílica fundida recoberta com polímeros orgânicos líquidos é introduzida no espaço confinante acima da amostra e entre o septo do vial no frasco de extração. Assim, a fibra não entra em contato com a amostra, os analitos são transportados através da barreira de ar, antes de atingirem o recobrimento da fibra. Esse modo é indicado para analitos de alta a média volatilidade. Já no modo direto, o recobrimento da fibra (a fase sólida) é inserido diretamente na amostra e os analitos são transportados da amostra para a fase extratora. Esse modo é indicado para analitos de baixa a média volatilidade; porém, não é indicado para matrizes aquosas que contêm material particulado. Para matrizes limpas, os dois modos podem ser utilizados (LANÇAS, 2004).

O tempo de extração é o tempo necessário para que o equilíbrio dos analitos entre as fases (recobrimento da fibra e a amostra) seja estabelecido. Por se tratar de um processo de partição, a quantidade máxima a ser extraída será atingida quando o equilíbrio for estabelecido. Para os compostos que possuem coeficientes de partição menor, o tempo necessário para estabelecer o equilíbrio com a fibra é longo. A agitação magnética é muito utilizada nesses processos, por sua simplicidade e ainda por aumentar a taxa de transferência de massa e

diminuir o tempo de extração. O uso de fibras de baixa espessura e de um *liner* adequado pode acelerar o processo de dessorção (LANÇAS, 2004).

Alguns trabalhos nos quais se utilizou SPME para determinação de CE em bebidas podem ser encontrados na literatura. (Whiton e Zoecklein, 2002) quantificaram CE em vinhos por GC/MS utilizando a SPME no modo headspace. A fibra mais indicada nesse procedimento foi a CW/DVB. Posteriormente, o mesmo procedimento de extração foi adotado por Dufour et al. (2003) e por Lachenmeier, Nerlich e Kuballa (2006), os quais encontraram a CW/DVB como melhor fibra para extração de CE em bebidas alcoólicas no modo headspace. Na China, Zhang e Zhang, (2008) analisaram CE em vinho e cerveja por GC/MS, após otimizarem a SPME no modo headspace. As melhores condições implicaram no uso da fibra CW/DVB, com ajuste de pH. Em todas essas pesquisas observou-se o comportamento do CE diante da SPME em bebidas alcoólicas; porém, até o momento, nenhum trabalho foi realizado com a matriz cachaça. Uma desvantagem da técnica de SPME é o fato de a fibra ser frágil, além de poder ser danificada por um acúmulo de materiais não volatilizáveis das amostras. Falhas na agitação podem tornar o processo de extração lento.

2.6.11.6.4 Derivação

A detecção de CE em matrizes complexas torna-se difícil, porque muitas vezes esse se encontra em baixas concentrações. Em se tratando de HPLC, o CE não pode ser detectado, pois não apresenta absorção no ultravioleta (UV) e nem fluorescência, tornando-se necessário um processo de derivação para aumentar a absorbância e permitir sua detecção.

A literatura apresenta o 9-xantidrol (9-hidroxixanteno) como principal reagente de derivação para o CE (ABREU et al., 2005; GIACHETTI;

ASSANDRI; ZANOLO, 1991; HERBERT et al., 2002; MADRERA; VALLES, 2009), embora outros reagentes tenham sido utilizados (WALKER et al., 1974).

O reagente 9-xantidrol é específico para o grupo amida, em que a reação ocorre por substituição nucleofílica, sendo o grupo amida o nucleófilo. Giachetti; Assandri e Zanoló (1991) descrevem pela primeira vez, a derivação do CE em vinhos por 9-xantidrol. No procedimento utilizou-se excesso de reagente em meio ácido, obtendo-se bons rendimentos no produto.

O derivado formado, carbamato de N-xantil etila (CNXE) ou xantiluretano, é um sólido cristalino de estabilidade térmica superior ao CE, que pode ser detectado por fluorescência, após separação por HPLC (MADRERA; VALLES, 2009).

2.6.11.6.5 Cromatografia em fase Gasosa

Historicamente, a cromatografia em fase gasosa foi utilizada na análise de CE em alimentos e bebidas no início dos anos 70. Ough (1976) analisou CE em alimentos por GC/MS, com extração prévia do analito.

A detecção do CE é realizada, geralmente, pela espectrometria de massas (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; GIACHETI; ASSANDRI; ZANOLO, 1991; JAGERDEO et al., 2002).

A GC/MS dispõe de dois modos de operação, o monitoramento seletivo de íons (SIM) ou espectro de massas total em determinada faixa de massas (SCAN). Em razão de o sinal do analito ser distribuído por meio de uma série de diferentes canais de íons, a sensibilidade em cada um desses canais é menor em modo SCAN do que no modo SIM. Neste último, as amplitudes das voltagens são ajustadas para monitorar somente uma massa especificada ou uma seleção de massas. Isso resulta num grande aumento da sensibilidade, quando são selecionados íons específicos, já que um menor tempo é gasto para processar

cada massa. Assim, o aumento da sensibilidade é consequência do ajuste do tempo de processamento (LASATER, 2005).

O método de referência para análise de CE em bebidas alcoólicas emprega na etapa de preparação da amostra celite e coluna de terra diatomácea. Após evaporação do extrato, realiza-se a análise por GC/MS no modo SIM, monitorando os íons m/z 89, 74, 62 e 44. A execução desse método em laboratório de controle de qualidade é difícil, principalmente devido a fenômenos de interferência de matriz. Por esse motivo, diferentes métodos em que se utilizam várias técnicas de extração, especialmente a extração SPE e SPME e de separação cromatográfica, têm sido publicadas nos últimos anos. Lachenmeier et al (2005) adotaram o método de referência para determinar CE em 631 amostras de bebidas de frutas entre 1986 e 2004. A amostra foi submetida à extração em coluna com terra diatomácea, evaporação e análise em GC/MS. A concentração de CE variou de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $18,0 \text{mg L}^{-1}$.

No método anterior, detectaram-se problemas na quantificação referente à razão dos íons, que não pode ser verificada com confiança, provavelmente devido à interferência. Tentando superar esses problemas, no mesmo ano, Lachenmeier, Frank e Kuballa (2005) propuseram um novo método utilizando a GC/MS/MS para quantificar CE presente em aguardentes de frutas. Na quantificação, optou-se pelo carbamato de etila deuterado como padrão interno. A aplicabilidade deste método foi demonstrada pela investigação de 70 amostras, em que a concentração de CE variou de $70,0$ a $7700,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Essa técnica é muito sensível e o custo elevado da instrumentação e a complexidade das técnicas constituem fatores negativos na aceitação de sua execução em análise de rotina.

Otimizando o modo de extração de CE em vinhos, Uthurry et al. (2004) utilizaram a SPE e quantificaram por GC/MS no modo SIM. As concentrações

encontradas foram abaixo de $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$, valor estabelecido pelas autoridades canadenses.

Os padrões internos mais utilizados na quantificação de CE em alimentos e bebidas são os carbamatos de metila, propila, isopropila, butila e o de etila deuterado, ^{13}C ou ^{15}N . O carbamato de propila pode sofrer reação de transesterificação em meio alcoólico, além de coeluir com o CE em colunas polares, comprometendo a quantificação. Portanto, os mais indicados são os CE deuterado, ^{13}C ou ^{15}N porque proporcionam recuperação mais precisa por evitar coeluição (HASNIP et al., 2007).

O problema verificado com os padrões internos, seja por coeluição seja por custos elevados, como os deuterados, conduzem, muitas vezes à padronização externa na quantificação do CE em bebidas alcoólicas.

Vários autores relataram a viabilidade da determinação do CE sem qualquer tratamento prévio em uísques e cachaças. Basicamente, esse método suprime as etapas de pré-tratamento utilizadas nos métodos clássicos. Entretanto, procedimentos de pré-tratamento são necessários em matrizes mais complexas, como vinhos, de modo a separar pigmentos e outros possíveis interferentes da matriz (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; NAGATO et al., 2000).

Hesford e Schneider, (2001) mostraram a possibilidade de utilização desse método na caracterização e quantificação do CE em bebidas alcoólicas por GC/MS no modo SIM, sem tratamento da amostra. Para tanto, as amostras devem apresentar concentrações de CE superiores a $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e serem ajustadas para 40% de álcool, por diluição com água ou por adição de etanol.

O método GC/MS no modo SIM para determinação de CE em bebidas alcoólicas sem tratamento da amostra é bastante sugestivo, apesar de apresentar ressalvas quanto à concentração de CE e presença de pigmentos, no caso do vinho. Diante dos inúmeros trabalhos encontrados na literatura, verificou-se que

atualmente é o método mais usado na determinação de CE em bebidas alcoólicas (RECHE et al., 2007; BARCELOS et al., 2007; RECHE; FRANCO, 2009; NÓBREGA et al., 2009; MASSON, 2009; ZACARONI, 2009).

2.6.11.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os detectores mais comuns da HPLC são o detector espectrofotométrico de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS), detector por Arranjo de Diodos (DAD) e detector por Fluorescência (FLD). Conforme descrito na literatura, a análise de CE por HPLC faz uso do detector de fluorescência, após derivação do CE. Herbert et al. (2002) validaram um método de determinação de CE em cidras por HPLC com detector de fluorescência, a partir da derivação do CE com o 9-xantidrol para formar um composto fluorescente.

Abreu et al. (2005) apresentaram os resultados de um estudo comparativo entre laboratórios na determinação do CE em vinhos por HPLC com detector de fluorescência e GC/MS. Os resultados obtidos pelos laboratórios usando a HPLC foram comparáveis àqueles obtidos por GC/MS.

Um procedimento que envolve a HPLC/MS/MS foi desenvolvido e comparado a outros métodos analíticos para a quantificação do CE em molho de soja coreano, usando como padrão interno o carbamato de propila. Esse método mostrou-se mais sensível que o método por GC/MS (PARK, et al., 2007).

Madrera e Valles (2009) determinaram CE em cidras baseado no método analítico por HPLC, após derivação prévia do CE, encontrando teores normais para o tipo de bebida.

Diante do exposto, uma das propostas para este trabalho é quantificar CE em cachaça por HPLC, com detector de fluorescência e derivação prévia do CE, utilizando o 9-xantidrol. Conforme relatado, o método constitui uma alternativa potencial, em relação ao método de referência, porque apresentou

para as bebidas alcoólicas analisadas níveis similares de detecção e tem uma etapa mais rápida da preparação da amostra. O método analítico é simples e rápido para ser executado na análise de rotina. Também é compatível com demandas legais referentes aos limites máximos. A outra proposta é quantificar o CE em cachaças por GC/MS utilizando a SPME como tratamento prévio da amostra. Até hoje, nenhuma dessas duas técnicas analíticas foram utilizadas na determinação de CE em cachaça; portanto, trata-se de propostas inovadoras.

2.6.11.6.7 Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas, sendo classificado como um método do tipo simultâneo, em que as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Para realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos em diferentes valores desses fatores. A seguir, são realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados.

De um modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^a , em que “a” é o número de fatores e “b” é o número de níveis escolhidos. Os planejamentos fatoriais do tipo 2^a são os mais comuns. Um dos aspectos favoráveis desse tipo de planejamento é a realização de poucos experimentos. Torna-se óbvio que, com um número reduzido de níveis, não é possível explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis; entretanto, observam-se tendências importantes para a realização de investigações posteriores.

Na análise de CE em cachaça por GC/MS e SPME, foi realizado um planejamento fatorial para otimizar a etapa de extração, devido ao número de variáveis presentes nessa etapa.

REFERÊNCIAS

ABREU, S. M. et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 2, p. 498-503, May 2005.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Threshold limit values for chemical substances and biological exposure indices**. Cincinnati: TLVs and BEIs, 2007. 256 p.

ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 25-67.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (Cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1074-1077, nov./dez. 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.

AGÊNCIA DE PROMOÇÃO DE EXPORTAÇÕES E INVESTIMENTOS. **Alimentos, bebidas e agronegócio**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.apexbrasil.com.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

AQUINO, F. W. B. et al. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 145-149, jan./mar. 2006.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, June 2001.

ARVANITOYANNIS, I.; BOSNEA, L. Migration of substances from food packaging materials to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 44, n. 2, p. 63-76, Mar. 2004.

ARREBOLA, F. J. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by completely automated headspace technique coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 41, n. 6, p. 822-829, June 2006.

AZEVEDO, D. A.; SANTOS, C. T. M.; AQUINO-NETO, F. R. Identification and seasonal variation of atmospheric organic pollutants in Campos dos Goytacazes, Brazil. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 36, n. 14, p. 2383-2395, May 2002.

AZEVEDO, L. C. et al. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1968-1975, dez. 2007.

BARCELOS, L. V. F. et al. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: zona da mata, sul de minas e vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p.1009-1011, jul./ago. 2007.

BELAND, F. A. et al. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, n. 1, p.1-19, Jan. 2005.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 32-44.

BETTIN, S. M.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p.234-238, abr./jun. 2005.

BOSCOLO, M. et al. Spectrophotometric determination of caramel content in spirits aged in oak casks. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.85, n.3, p.744-750, May 2002.

BOSSO, R. M. V. et al. Effects of genetic polymorphisms CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 on urinary 1-hydroxypyrene levels in sugarcane workers. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 370, n. 2/3, p. 382-390, Nov. 2006.

BRASIL. Decreto nº 4.851, de 2 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto no 2.314, de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 6-7, 2 nov. 2003. Seção 1. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

BRASIL. Portaria nº 59, de 13 de agosto de 2004. Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p.10, 17 ago. 2004. Seção 1. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 de jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 3, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

BRASIL. Portaria n. 36, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de portabilidade da água destinada ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 jan. 1990. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 10 jul. 2006.

BRUNO, S. N. F. et al. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 4, p. 1345-1352, 2007.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 5, p. 19-26, 2002a.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 49-53, jan./abr. 2002b.

CANÇADO JÚNIOR, F. L.; PAIVA, B. M.; ESTANISLAU, M. L. Evolução do mercado de cachaça nos anos 2000. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 7-13, jan./fev. 2009.

CARDOSO, D. R. et al. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 165-169, mar./abr. 2003a.

CARDOSO, D. R. et al. HPLC–DAD analysis of ketones as their 2,4-dinitrophenylhydrazones in Brazilian sugar-cane spirits and rum. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 16, n. 5, p. 563-573, Oct. 2003b.

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguardente. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 203-232.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Optimization of the benzo(a)pyrene determination procedure in cachaça. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 502-508, 2009.

COLETI, J. T. et al. Remoção de macronutrientes pela cana-planta e cana-soca, em argissolos, variedades RB83-5486 e SP81-3250. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 24, n.5, p. 32-36, 2006.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005**. Disponível em:
<http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_federal/Resolucoes_CONAMA/COLETANEA_DE_%20RESOLUCOES_DO_%20CONAMA_DE_2008.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2010.

CONTIN, T. L. M. **Ureia tratada com o inibidor da urease NBPT na adubação de cana-de-açúcar colhida sem despalha a Fogo**. 2007. 69 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)-Instituto Agronômico, Campinas, 2007.

DIAS, S. M. B. C. O processo de destilação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p.137-202.

DIJKSTRA, Z. J. et al. Formation of carbamic acid in organic solvents and in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S.I.], v. 41, n. 1, p. 109-114, May 2007.

DILETTI, G. et al. Isotope dilution determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive pomace oil by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1062, n. 2, p. 247-254, Jan. 2005.

DOONG, R.; CHANG, S.; SUN, Y. Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen US environmental protection agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 879, n. 2, p. 177-188, May 2000.

DÓREA, H. S. et al. Análise de poluentes orgânicos tóxicos na cachaça. **Revista da Fapese**, Aracaju, v. 4, n. 2, p. 5-18, jul./dez. 2008.

DUFOUR, J. P. et al. Flavour research at the dawn of the twenty-first century, In: CAMPBELL, I.; PRIEST, F. G. **Proceedings of the 10th weurman flavor research symposium**. Paris: Tec & Doc, 2003, p. 584-625.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Toxicological review of acrolein in support of summary information on Integrated Risk Information System (IRIS)**. Washington, 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ncea/iris>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

EVANGELISTA, A. R. Aproveitamento de resíduos da fabricação da cachaça. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 289-307.

FARIA, J. B. et al. Cachaça, pisco e tequila. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. (Ed.). **Fermented beverage production**. 2nd ed. New York.: Klumer Academic; Plenum, 2003. p. 335-363.

FERON, V. et al. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 259, n. 3/4, p. 363-385, Mar./Apr. 1991.

FORLIN, F. J. **Maturação de aguardente de cana composta com extrato de madeira de carvalho em embalagens de Polietileno tereftalato (PET)**. 2005. 182 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1/2, p.11-22, Sept. 2003.

FREIRE, M. T. A. et al. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p.1522-1532, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Portaria nº 1.469/2000, de 29 de dezembro de 2000**. Aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, p. 32, 2001. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org>>. Acesso em: 19 jun. 2010.

GALINARO, C. A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian sugar cane cpirits: discrimination between cachaças produced from nonburned and burned sugar cane crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 8, p. 3141-3147, Apr. 2007.

GARCÍA-FALCÓN, M. S.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 4, p. 643-647, May 2005.

GARCÍA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic drinks and the identification of their potencial sources. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 22, n. 9, p. 791-797, Sept. 2005.

GARCIA, R. S. et al. Revision of analytical strategies to evaluate different migrants from food packaging materials. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 7, p. 354-366, July 2006.

GHILARDUCCI, D. P.; TJEERDEMA, R. S. Fate and effects of acrolein. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 144, p. 95-146, 1995.

GIACHETTI, C.; ASSANDRI, A.; ZANOLO, G. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate as the xanthylamide derivative in Italian aqua vitae (grappa) samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 585, n. 1, p. 111-115, Oct. 1991.

GODOI, A. F. L. et al. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1027, n. 1/2, p. 49-53, Feb. 2004.

GOMES, A. A. et al. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p.1105-1113, nov. 2005.

GOUBET, M. et al. Influence of the geometry of a hydrogen bond on conformational stability: a theoretical and experimental study of ethyl carbamate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 11, p. 1719-1728, 2009.

HASNIP, S. et al. Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 21, n.12, p.1155-1161, Dec. 2004.

HASNIP, S. et al. Survey of ethyl carbamate in fermented foods sold in the United Kingdom in 2004. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 7, p. 2755-2759, Apr. 2007.

HAWTHORNE, S. B.; TREMBLEY, S.; MONIOT, C. B. Static subcritical water extraction with simultaneous solid-phase extraction for determining polycyclic aromatic hydrocarbons on environmental solids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 886, n. 1/2, p. 237-244, July 2000.

HERBERT, P. et al. New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1616-1620, June 2002.

HERNANDEZ, L. G.; FORKERT, P. G. In vivo mutagenicity of vinyl carbamate and ethyl carbamate in lung and small intestine of F₁ (Big Blue® × A/J) transgenic mice. **International Journal of Cancer**, New York, v. 120, n. 7, p. 1426-1433, Apr. 2007.

HERRINGTON, J. et al. Optimizing a dansylhydrazine (DNSH) based method for measuring airborne acrolein and other unsaturated carbonyls. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v. 7, p. 969-976, 2005.

HESFORD, F.; SCHNEIDER, K. Validation of a simple method for the determination of ethyl carbamate in stone fruit brandies by GC-MS. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, Zurich, v. 92, n. 3, p. 250-259, Apr. 2001.

HIRAYAMA, T. et al. High-performance liquid chromatographic determination of 2-alkenals in oxidized lipid as their 7-amino-6-methylquinoline derivatives. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 39, n. 5, p. 1253-1257, 1991.

HO, S. S. H.; YU, J. Z. Determination of airborne carbonyls: comparison of a thermal desorption/GC method with the standard DNPH/HPLC method. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 38, n. 3, p. 862-870, Feb. 2004.

HOFFLER, U. et al. Inhibition of uretana-induced genotoxicity and cell proliferation in CYP2E1-null mice. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 572, n.1/2, p. 58-72, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Polynuclear aromatic compounds**: Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. Lyon, Dec.1983. v. 32. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol32/volume32.pdf>> Acesso em: 12 jun. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Overall evaluation of carcinogenicity**. Lyon, 1987. v. 1/42, p. 1-440. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/suppl7.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: _____. **Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans**. Lyon, 2006. v. 92. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92-6.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate. In: _____. **Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans**. Lyon, 2007. v. 96. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol96-participants.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2010.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRICA. **Portaria nº738, de 07 de novembro de 2005**. Aprova Regulamento de produção de cachaça em processo de alambique e dá outras providências. Disponível em: <ima.mg.gov.br>. Acesso em: 10 jun. 2010.

JAGERDEO, E. et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 21, p. 5797-5802, Oct. 2002.

LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação de carbamato de etila em aguardente de cana por GC/MS. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n. 7, p. 1860-1864, 2008.

LACHENMEIER, D. W. Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 6, p. 1407-1412, July 2005.

LACHENMEIER D. W. et al. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 22, n. 5, p. 397-405, May 2005.

LACHENMEIER, D. W.; FRANK, W.; KUBALLA, T. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the routine analysis of ethyl carbamate in stone-fruit spirits. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v.19, n. 2, p. 108-112, Jan. 2005.

LACHENMEIER, D. W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1108, n. 1, p. 116-120, Mar. 2006.

LACHENMEIER, D.W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. **Food Chemistry**, London, v.101, n. 2, p. 825-832, 2007.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE): métodos de análise cromatográfica**. 4. ed. São Carlos: RIMA, 2004. 96 p.

LASATER, M. A. **Application of GC and MS for target analysis and quantitation. As published in LabPlus international**, 2005. Disponível em: <http://www.labintl-online.com/uploads/tx_ttproducts/datasheet/application-of-gc-and-ms-for-target-analysis-and-quantitation.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2010.

LEDAUPHIN, J. et al. Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in Calvados and cider. **LWT-Food Science and Technology**, [S. I.], v. 39, n. 9, p. 1045-1052, Nov. 2006a.

LEDAUPHIN, J. et al. Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac: carbonyl and sulphur compounds. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.19, n. 1, p. 28-40, Feb. 2006b.

LIMA, A. B. et al. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.

MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. **Food Control**, Guildford, v.20, n. 2, p.139-143, Feb. 2009.

MAIA, A. B. Equipamentos para a produção de cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 63-66, 2002.

MASSON, J. et al. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1805-1810, nov./dez. 2007.

MASSON, J. **Determinação dos teores de carbamato de etila e de acroleína de aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MATSUDO, T. et al. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 3, p. 352-356, Mar. 1993.

MCGRATH, T. F.; CHAN, W. G.; HAYALIGOL, R. Low temperature mechanism for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of cellulose. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S.I.] v. 66, n. 1, p. 51-70, Jan. 2003.

MILLER, Y. E. et al. Induction of a high incidence of lung tumors in C57BL/6 mice with multiple ethyl carbamate injections. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 198, n. 2, p.139-144, Aug. 2003.

MIRZOIAN, A.; MABUD, M. A. Comparison of methods for extraction of ethyl carbamate from alcoholic beverages in gas chromatography/mass spectrometry analysis. **Journal of AOAC international**, Arlington, v. 89, n. 4, p. 1048-1051, July/Aug. 2006.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 167-181, 2004.

NAGATO, L. A. et al. Quantitation of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. **Alimentaria**, Madrid, n. 311, p. 31-36, 2000.

NAGATO, L. A. F.; NOVAES, F. V.; PENTEADO, M. de V. C. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 1, p. 40-47, jan./jun. 2003.

NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Comparação de técnicas de determinação de ésteres em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2323-2327, 2009.

NASCIMENTO, R. F. et al. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 735-739, nov./dez. 1998.

NASCIMENTO, R. F. et al. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 782, n. 1, p. 13-23, Oct. 1997.

NÓBREGA, I. C. C. Análise de compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “Headspace” e comatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n. 2, p. 210-216, maio/ago. 2003.

NÓBREGA, I. C. C. et al. Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions. **Food Chemistry**, London, v. 117, n. 4, p. 693-697, Dec. 2009.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. **Volatile compounds in food and beverages**. New York: M. Dekker, 1991. p. 547-580.

OLIVEIRA, E. C. A. **Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar em sistema irrigado de produção**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)– Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2008.

OLIVEIRA, M. W. et al. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 239, p. 30-43, jul./ago. 2007.

OLIVEIRA, S. G.; MAGALHÃES, M. A.; BERGERAT, P. C. A luta da cachaça de alambique para se consolidar como fonte de riqueza em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p.14-19, jan./fev. 2009.

OLIVELLA, M. A. et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine waters after mediterranean forest fires. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 355, n. 1/3, p. 156-166, Feb. 2006.

O'NEIL, M. J. **The Merck Index**: Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th ed. New Jersey: Merck, 2001. p. 1759.

OSBORNE, J. P. et al. Acetaldehyde metabolism by wine lacte acid bactéria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, n. 1, p. 51-55, Oct. 2000.

OUGH, C. S. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethyl carbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 2, n. 24, p. 328-331, Mar. 1976.

PAGLIUCA, G. et al. Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 17, p. 5111-5115, Aug. 2003.

PARAZZI, C. et al. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 193-199, jan./mar. 2008.

PARK, S. K. et al. Analysis of ethyl carbamate in Korean soy sauce using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection or tandem mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 8, p. 975-982, Aug. 2007.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: Theory and Practice**. Ontario: Wiley-VCH, 1997. 190 p.

PENSADO, L. et al. Optimization of the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from wood samples by the use of microwave energy. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 869, n. 1/2, p. 505-513, Feb. 2000.

PENTEADO, J. C. P.; MASINI, J. C. Heterogeneidade de álcoois secundários em aguardentes brasileiras de diversas origens e processos de fabricação. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1212-1215, 2009.

PEREIRA, E. A.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Laser-induced fluorescence and UV detection of derivatized aldehydes in air samples using capillary electrophoresis. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 979, n. 1/2, p. 409-416, Dec. 2002.

PEREIRA-NETTO, A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 765-773, dez. 2000.

PELTONEN, K.; DIPLLE, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 52-58, Jan. 1995.

POLASTRO, L. R. et al. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.21, n. 1, p. 179-182, Jan./Apr. 2001.

PRADO, R. M.; PANCELLI, M. A. Resposta de soqueiras de cana-de-açúcar à aplicação de nitrogênio em sistema de colheita sem queima. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 951-959, Oct./Dec. 2008.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C. S. F. Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos encontrados em Fluidos Biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n.1, p. 68-76, jan./fev. 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

RECHE, R. V. et al. Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of Brazilian cachaças. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 16, p. 6603-6608, Aug. 2007.

RECHE, R. V.; FRANCO, D. W. Distinção entre cachaças destiladas em alambiques e em colunas usando quimiometria. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 332-336, 2009.

ROMANO, P. et al. The production of 2,3-butanediol as a differentiating character in wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 649-653, Oct. 1998.

SANDERS, R. A. et al. Identification of 8-nonenal as an important contributor to “plastic” off-odor in polyethylene packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 5, p. 1713-1716, Mar. 2005.

SANTOS, C. Y. M.; AZEVEDO, D. A.; AQUINO NETO, F. R. Selected organic compounds from biomass burning found in the atmospheric particulate matter over sugarcane plantation areas. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 36, n. 18, p. 3009-3019, June 2002.

SAUVAGEOL, N. et al. Glicerol metabolism in *Lactobacillus colinoides* : production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 55, n. 1/3, p. 167-170. Apr. 2000.

SCHULTE-LADBECK, R. et al. Characterization of chemical interferences in the determination of unsaturated aldehydes using aromatic hydrazine reagents and liquid chromatography. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v.3, p. 306-310, 2001.

SERRA, G. E.; PUPIN, A. M.; TOLEDO, M. C. F. Ensaio preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 134-137, 1995.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cachaça artesanal estudos de mercado**. Brasília, 2008. 42 p. Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em: 30 jun. 2010.

SIEBALD, H. G. L.; CANUTO, M. H.; SILVA, J. B. B. Alguns aspectos toxicológicos da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 55-59, jan./fev. 2009.

SILVA, M. V. et al. Determination of 11 low-molecular weight carbonyl compounds in marine algae by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 44, n. 5, p.233-238, May 2006.

SILVA, S. A. et al. Compilation of analytical methods and guidelines for the determination of selected model migrants from plastic packaging. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 10, p. 535-546, Oct. 2006.

SILVA, R. P. **Determinação de HPA em ambiente ocupacional de indústria de cimento que co-processa resíduos**. 2009. 164 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SIMKO, P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 770, n. 1/2, p. 3-18, Apr. 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

TFOUNI, A. V. S. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaca by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 334-338, 2007.

TONON, T.; LONVAUD-FUNEL, A. Arginine metabolism by wine Lactobacilli isolated from wine. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 5, p. 451-461, Oct. 2002.

TRINDADE, A. G. **Cachaça: um amor brasileiro**. São Paulo: Melhoramentos, 2006. 165 p.

TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L.; RODRIGUÊS, J. C. S. Aproveitamento soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e ureia-15N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 1375-1385, 1995.

TRIVELIN, P. C. O. et al. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 637-646, 2002.

UTHURRY, C. A. et al. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 3, p. 329-336, Dec. 2004.

UTHURRY, C. A. et al. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 2, p. 262-270, Jan. 2006.

VICHI, S. et al. Volatile and semi-volatile components of oak wood chips analysed by accelerated solvent extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 4, p. 1260-1269, 2007.

VILELA, F. J. et al. Determinação das composições físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, jul./ago. 2007.

VITTI, A. C. et al. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual da adubação e do sistema radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n. 2, p. 249-256, fev. 2007.

WANG, D. et al. Synthesis of diethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 8, p. 807-812, Aug. 2007.

WALKER, G. et al. Gas chromatographic analysis of urethan (ethyl carbamate) in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 22, n. 6, p. 944-947, Nov. 1974.

WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg, v. 7, n. 3, p. 233-247, Sept. 2009.

WHITON, R. S; ZOECKLEIN, B. W. Determination of ethyl carbamate in wine by solidphase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 1, n. 53, p. 60-63, Mar. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons**. Geneva. 1998. v. 202, 883 p. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc.202.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Summary and onclusions of the sixtyfourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Rome, 2005. 47 p. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2010.

ZACARONI, L. M. **Compostos fenólicos e curmarinas**: certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ZAMPERLINNI, C. M. G.; SILVA-SANTIAGO, M.; VILEGAS, W. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gás chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 889, n. 1/2, p. 281-289, Aug. 2000.

ZHANG, Y.; ZHANG, J. Optimization of heaspace solid-phase microextração for analysis of ethyl carbamato in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 627, n. 2, p. 212-218, Oct. 2008.

CAPÍTULO 2

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS CACHAÇAS OBTIDAS DA CANA- DE-AÇÚCAR COM ADUBAÇÃO NITROGENADA E ACONDICIONADAS EM VIDROS E “BOMBONAS” DE PEAD

RESUMO

A cachaça é o destilado mais consumido no território nacional, ocupando o segundo lugar entre as bebidas alcoólicas, ficando atrás apenas da cerveja. O Brasil produz aproximadamente 1,3 bilhão de litros de cachaça por ano; entretanto, exporta apenas cerca de 1% desse total. Atualmente, são mais de 40 mil produtores e 4 mil marcas. O aumento do consumo dessa bebida e a possibilidade de aumentar a exportação exigem que seu processo de fabricação seja baseado em práticas corretas, visando à obtenção de um produto padronizado e com boa qualidade físico-química e sensorial. Minas Gerais caracteriza-se pela tradição da cachaça artesanal, contando com diversos produtores espalhados por todo o estado. Porém, apesar da tradição e importância dessa bebida, a falta de padronização do processo e a não utilização de adequadas tecnologias de produção têm levado à fabricação de cachaça de baixa qualidade, sem padronização, não atendendo às exigências da legislação nacional. Provavelmente isso ocorre porque o setor conta com os pequenos produtores, que, na realidade são a maioria, trabalhando na clandestinidade e comprometendo, muitas vezes, a qualidade da bebida. Alguns produtores acondicionam a bebida em bombonas de polietileno de alta densidade (PEAD) por elas apresentarem propriedades de resistência à ruptura, perfuração, rasgamento, impacto, além de apresentarem baixo peso e facilidade de transporte. Neste trabalho, objetivou-se verificar possíveis interferências dos recipientes de acondicionamento e da adubação nitrogenada da cana sobre os parâmetros físico-químicos da bebida. As cachaças procedentes de cana adubada com ureia e nitrato de amônio foram acondicionadas em vidros e em bombonas por 6 meses e submetidas às análises físico-químicas. Pelos resultados obtidos, verificou-se que tanto os recipientes como a adubação nitrogenada da cana interferem nos componentes secundários da bebida e, conseqüentemente, na sua qualidade, uma vez que contribuem para seu aroma e sabor. A ureia promoveu um aumento na concentração dos álcoois superiores, enquanto as bombonas proporcionaram aumento nos níveis de ésteres e diminuição nos teores de acidez volátil, porcentagem de álcool e aldeídos.

Palavras-chave: Análises físico-químicas. Recipientes. Qualidade de cachaça.

ABSTRACT

Cachaça is the most commonly consumed distilled beverage in the country, ranking second among the alcoholic beverages, second only to beer. Brazil produces about 1.3 billion liters of cachaça per year, but exports only about 1% of the total. Currently, there are over 40000 producers and 4000 brands. The increase in consumption of the beverage and the possibility of increasing exportation demand that the manufacturing process be based on correct practices that lead to the production of a standardized product of good physicochemical and sensory quality. Minas Gerais is characterized by the traditional domestic cachaça, with several producers scattered throughout the state. However, despite the tradition and importance of this beverage, the lack of standardization of the process and the lack of application of appropriate production technologies have led to the manufacture of low quality cachaça, without standardization, that does not meet the requirements of the national legislation. This fact is probably the result of the dependance of the industry on small producers, who are the majority and work in secrecy, often compromising the quality of the beverage. Some manufacturers store the beverage in containers of high-density polyethylene (HDPE) because of their resistance to piercing, tearing, and impact, low weight, tensile strength and portability. The present study sought to evaluate the possible interference of the containers and nitrogen fertilization of sugarcane on the physico-chemical parameters of the beverage. The cachaças obtained from cane fertilized with urea and ammonium nitrate were stored in glass and plastic drums for six months and their physico-chemical properties were analyzed. The results revealed that both the containers and the fertilization of sugarcane interfere with the secondary components of the drink and, consequently, their quality, since they contribute to the aroma and flavor. Urea, promoted an increase in the concentration of higher alcohols, while the drums provided increased levels of esters and a decrease in levels of volatile acidity, percentage of alcohol and aldehyde.

Keywords: Physico-chemical properties. Containers. Quality of cachaça.

1 INTRODUÇÃO

A produção de cachaça está distribuída por todo o país e a heterogeneidade do processo produtivo é marcante. Os produtores especializados investem em tecnologia e produzem em grande escala a cachaça industrial. Em meio aos especializados, inúmeros pequenos produtores estão distribuídos por todo o território nacional e vivem da renda gerada nessa atividade. Estes produzem a cachaça de maneira artesanal em alambique de cobre, e em pequena escala. Minas Gerais é o principal estado produtor de cachaça artesanal e conta com mais de oito mil produtores; porém, 90% trabalham na clandestinidade (CARDOSO, 2006).

O aumento do consumo e conseqüentemente o aumento na produção exigiram maiores esclarecimentos técnicos e científicos sobre todas as etapas de produção. Os estudos realizados nessa área levaram à desmistificação de algumas etapas que foram acatadas pelos produtores, o que promoveu melhorias na qualidade da bebida. Assim, pode-se dizer que a cachaça artesanal chega ao século XXI com as etapas de produção bem definidas, vislumbrando a possibilidade de crescimento da exportação.

Mesmo com o controle correto das etapas de produção da bebida, resultando no equilíbrio dos compostos secundários, e conseqüentemente na obtenção de uma bebida de excelente qualidade físico-química e sensorial, é de se esperar que as cachaças brasileiras apresentem semelhanças e diferenças entre si, em razão da sua origem, como observadas para outras bebidas (RECHE et al., 2004).

A cachaça é a segunda bebida mais consumida do país, só perdendo para a cerveja, e o terceiro destilado mais bebido do mundo, ficando atrás apenas da vodca e do soju, bebida coreana à base de arroz, batata-doce e trigo, muito consumida na Ásia. Do total comercializado, cerca de 1,0 bilhão de litros são

provenientes das indústrias, que representam 70% da produção: e o restante é atribuído à bebida artesanal produzida em alambiques (SEBRAE, 2008).

O fato de a produção de cachaça estar difundida pelo Brasil e existirem algumas diferenças no processo de produção, demanda-se uma análise de qualidade, principalmente as análises físico-químicas. A composição química da cachaça é bastante complexa e os compostos presentes na bebida são reflexos de uma série de fatores que, somados, conferem à bebida sabor e aroma peculiares. Dentre os fatores, destacam-se os ambientais e as condições de manejo na produção e pós-produção, como o acondicionamento da bebida. Em se tratando das condições de manejo, as adubações e o estado nutricional da planta podem influenciar a composição da cana e, conseqüentemente, a qualidade da bebida. O modo de acondicionamento da bebida é uma etapa ainda preocupante, pois alguns produtores e até mesmo distribuidores acondicionam a bebida em recipientes de plástico, tipo bombona, sem se preocupar com qualquer contaminação que possa ocorrer, seja por reutilização de recipientes não adequados ao uso, seja por extração de compostos indesejáveis provenientes do plástico. Diante do exposto, realizaram-se análises físico-químicas das cachaças produzidas de cana adubada com ureia e nitrato de amônio e acondicionadas em recipientes de vidro e de plástico tipo bombona por 6 meses, para verificar possíveis interferências dos procedimentos sobre os parâmetros físico-químicos da bebida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

A cana-de-açúcar foi plantada em área localizada no município de Perdões, alambique João Mendes “JM”, situado na região sudoeste do estado de Minas Gerais. A cultivar utilizada foi a SP-79-1011 e a época do plantio foi novembro de 2006, após corte de um canavial, de terceira soca. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial (2 x 5). O primeiro fator foi constituído por duas fontes de nitrogênio (ureia – 44% de N e nitrato de amônio – 32% de N) e o outro fator correspondeu a cinco doses de nitrogênio (0, 40, 80, 120 e 160 kg de N/ha), totalizando 10 tratamentos. Todos os tratamentos receberam uma adubação básica de 80 kg de K₂O/ha utilizando-se KCl. Cada dose foi aplicada em seis linhas de cana espaçadas de 1,0 m entre si. A área total adubada foi de 3.973,2 m². Todos os tratamentos receberam uma adubação básica de 80 kg de K₂O por há, utilizando KCl. Não houve controle de pragas e doenças, somente capina manual. A colheita foi realizada de forma manual, sem queima prévia do canavial, em outubro de 2007.

A moagem da cana foi realizada separadamente para cada dose de adubo aplicado, obtendo 200,0 L de caldo, para cada tratamento. Após as fermentações, o mosto foi submetido à destilação, produzindo, portanto, dez amostras de cachaça, correspondendo às dez concentrações dos fertilizantes (Tabela 1).

As dornas de fermentação do alambique JM têm capacidade para 1000 litros, mas normalmente só trabalham com 600 litros de caldo, enquanto o alambique tem capacidade para 1200 litros, mas trabalham com 1000 litros de mosto fermentado. A produção foi realizada no final de safra e o fermento utilizado foi o mesmo da produção da safra de 2007. Para segurar o fermento, esse foi armazenado 10 dias em água, até o início da fermentação.

As amostras foram coletadas imediatamente após a destilação; parte foi acondicionada em recipiente de vidro de 5,0 litros tipo garrafão e encaminhada para o laboratório; a outra parte foi acondicionada em bombonas de plástico (azul) tipo polietileno de alta densidade (PEAD), com capacidade de 50,0 litros, permanecendo no alambique JM. Após seis meses foram realizadas as análises físico-químicas.

Na Tabela 1 apresentam-se o tipo e a quantidade de adubo utilizado na cana, os recipientes de acondicionamento e a denominação das amostras.

Tabela 1 Tipo e quantidade de adubo e recipientes de armazenamento das amostras

| Adubo | | Amostras/Recipientes | |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| Tipo | Quantidade (Kg/ha) | Vidro | Plástico |
| Ureia | 0 | URV1 | URP1 |
| | 40 | URV2 | URP2 |
| | 80 | URV3 | URP3 |
| | 120 | URV4 | URP4 |
| | 160 | URV5 | URP5 |
| Nitrato de amônio | 0 | NAV1 | NAP1 |
| | 40 | NAV2 | NAP2 |
| | 80 | NAV3 | NAP3 |
| | 120 | NAV4 | NAP4 |
| | 160 | NAV5 | NAP5 |

2.2 Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados nas análises físico-químicas foram de alta pureza e da marca Merck.

2.3 Equipamentos e materiais

Foram utilizados os seguintes equipamentos e materiais: Destilador Eletrônico Enochimico Gibertini; DensiMat digital marca Gibertini; Espectrofotômetro Shimadzu UV-160-1PC; Balança analítica marca Marte modelo AM – 220; Deionizador Nanopure Diamond, Barnstead; Micro-seringas de 10, 50 e 100 µL Gilson.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% ($p \leq 0,05$) de probabilidade. Todos os valores apresentados correspondem à média de três determinações analíticas (Ferreira, 2003).

2.5 Análises físico-químicas

As amostras de cachaças foram analisadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente (LAFQA)–UFLA-MG, segundo as metodologias oficiais para aguardente de cana (BRASIL, 1997; BRASIL 2005). Após a redestilação em triplicata, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração. As metodologias empregadas para as análises estão descritas a seguir:

2.5.1 Exame sensorial

O exame sensorial foi realizado mediante a observação da amostra em frasco transparente em um transluminador de luz branca. Os parâmetros observados foram aspecto, coloração, limpidez, presença de corpos estranhos e vazamentos.

2.5.2 Teor alcoólico

Foi determinado por densimetria utilizando o densímetro digital DensiMat Gibertini, sendo o resultado expresso em %v/v.

2.5.3 Extrato seco

O método oficial para esta análise foi o gravimétrico, em que a amostra não redestilada foi evaporada em banho-maria a 100°C por três horas. Após esse período, o resíduo permaneceu em estufa a 100°C por 30 minutos e, posteriormente foi colocado em um dessecador. O resultado foi obtido por diferença de massas e expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra.

2.5.4 Acidez volátil

A acidez foi determinada por meio da extração por arraste de vapor dos ácidos voláteis em Destilador Eletrônico Enochimico. Em seguida, os ácidos foram quantificados por volumetria de neutralização. Os resultados foram expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra ou por 100 mL de álcool anidro.

2.5.5 Álcoois superiores

A quantificação dos álcoois superiores foi realizada por medida espectrofotométrica a 540 nm, após reação colorimétrica. As concentrações foram determinadas por meio da construção de curva analítica de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1. A quantidade total desses compostos foi expressa em miligrama por 100 mL de álcool anidro. As reações envolvidas na quantificação estão descritas no ANEXO A, na Figura 1A.

2.5.6 Aldeídos

Os aldeídos totais foram analisados pelo método titulométrico direto com iodo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, titulando o SO_2 formado por meio das reações envolvidas na análise. Os resultados foram expressos em miligramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro. As reações referentes a essa análise estão descritas no ANEXO A, Figura 2A.

2.5.7 Furfural

O furfural foi quantificado por meio de medidas espectrofotométricas a 520 nm, por comparação das absorbâncias das amostras com valores de absorbâncias de uma curva analítica previamente construída com soluções padrão de etanol/furfural. Para a análise de furfural, o grau alcoólico do destilado foi corrigido para 50 %v/v. Os resultados obtidos foram expressos em miligrama de furfural por 100 mL de álcool anidro. A reação envolvida na análise está descrita no ANEXO A, Figura 3A.

2.5.8 Ésteres

Os ésteres foram determinados por volumetria de neutralização dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas bebidas. Suas quantidades foram expressas em gramas de acetato de etila por 100 mL de amostra. As reações de hidrólise dos ésteres e da titulação estão descritas no ANEXO A, Figura 4A.

2.5.9 Metanol

O metanol foi identificado por reações colorimétricas e quantificado por medidas espectrofotométricas a 575 nm, comparada com a curva analítica do padrão em solução de etanol/metanol. Os resultados foram expressos em mg de metanol por 100 mL de álcool anidro. As reações envolvidas nessa análise estão descritas no ANEXO A, Figura 5A.

2.5.10 Cobre

A quantificação do cobre presente nas cachaças foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro a 546 nm, comparado a valores de absorbância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando-se sulfato de cobre como padrão primário. As reações foram realizadas nas amostras de cachaças sem redestilar. Os resultados obtidos foram expressos em mg L^{-1} e as reações envolvidas nessa análise estão descritas no ANEXO A, Figura 6A.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 2 e 3 mostram as médias dos diversos parâmetros analisados, para 20 amostras de cachaças, cujos resultados foram comparados entre si e com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira vigente. Pode-se observar que das amostras analisadas, 80% apresentaram-se fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico (10%), acidez volátil (70%), cobre (40%), ésteres (5%) e 50% quanto à presença de aldeído.

Baseando em laudos anteriores fornecidos por laboratórios credenciados, verifica-se que, normalmente, as cachaças produzidas no “alambique JM” apresentam-se dentro dos padrões exigidos pela legislação. No caso específico deste trabalho, a bebida foi produzida exclusivamente para esta pesquisa e numa quantidade bem inferior à de costume. Vários fatores podem ter influenciado, como o fermento, que já tinha sido utilizado em fermentações anteriores e apresentava baixa atividade, devido à produção ter ocorrido no final de safra, à quantidade de caldo fermentado e à quantidade de vinho destilado.

As cachaças provenientes da cana adubada com ureia e com nitrato de amônio que foram armazenadas em vidro e em bombonas apresentaram variações em todos os parâmetros, grau alcoólico, acidez, ésteres, aldeídos, cobre e congêneres, com valores acima daqueles preconizados pela legislação. Mesmo não sendo destinada ao consumo, pois foi produzida exclusivamente para esta pesquisa, a qualidade da bebida pode ser comparada a diversas outras, como mostraram os pesquisadores. Pereira et al. (2003), avaliando a qualidade físico-química da aguardente de cana no estado de Minas Gerais, no período de agosto de 2000 a julho de 2001, observaram que 25% das amostras apresentaram-se fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico, 16,67% ao teor de ácidos e cobre e 83,33%, presença de furfural.

As análises de variância pelo teste de Scott-Knott a 5% mostraram diferenças significativas entre as médias. Pelos valores das análises, observa-se que a média encontrada para o teor alcoólico foi maior na amostra URV1, cuja cana não recebeu adubação com ureia, ao passo que a amostra URV5, cuja cana recebeu o maior nível de ureia, apresentou menor teor alcoólico; o inverso ocorreu com as cachaças provenientes de cana adubada com nitrato de amônio. Observou-se uma variação não proporcional do teor alcoólico das amostras o que nos leva a inferir que a adubação, como já esperado, não influenciou esse parâmetro. Essa variação, provavelmente, ocorreu na etapa de destilação na qual não foi mantido o mesmo corte da fração para todas as amostras.

Durante a etapa de envelhecimento da bebida em recipientes de madeira, o teor alcoólico diminuiu devido a trocas que ocorrem nos poros da madeira com o ambiente. Os recipientes de vidros e de polietileno de alta densidade (PEAD) são impermeáveis; portanto, não proporcionam trocas gasosas; assim, as possíveis perdas de álcool provavelmente podem ser devidas às reações de esterificações que são normais na bebida. Comparando as mesmas amostras em recipientes diferentes, observa-se que houve diminuição no teor alcoólico nas amostras acondicionadas em recipientes de plástico. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Correa (2001), que avaliou o acondicionamento de aguardente de cana em garrafas plásticas de polipropileno (PP), politereftalato de etileno (PET) e policloreto de vinila (PVC) e de vidro, durante 17 meses. Pelos resultados, verificaram-se decréscimo do grau alcoólico da aguardente de cana envasada em PP e aumento na acondicionada em PET e PVC.

Tabela 2 Composição físico-química das cachaças provenientes de cana com adubação nitrogenada acondicionada em vidros

| Análises | Amostras | | | | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | URV1 | URV2 | URV3 | URV4 | URV5 | NAV1 | NAV2 | NAV3 | NAV4 | NAV5 |
| Grau alcoólico (% v/v 20°C) | 43,93i ±0,14 | 39,06c ±0,14 | 42,27g ±0,12 | 43,00h ±0,08 | 36,22a ±0,15 | 38,21b ±0,07 | 38,36b ±0,14 | 38,84c ±0,17 | 42,43g ±0,11 | 40,21d ±0,17 |
| *Acidez volátil | 66,24b ±0,15 | 58,57a ±0,08 | 61,24a ±0,07 | 373,84k ±0,58 | 311,63i ±0,89 | 297,80h ±0,84 | 436,6m ±0,24 | 243,80e ±0,45 | 245,32e ±0,55 | 343,25j ±0,31 |
| *Ésteres | 74,99 ±1,12 | 102,32 ±1,35 | 55,65 ±1,28 | 172,90 ±1,26 | 143,26 ±2,13 | 143,01 ±1,039 | 191,34 ±1,36 | 120,36 ±1,33 | 119,51 ±1,43 | 148,94 ±0,45 |
| *Aldeídos | 29,02 ±0,91 | 48,54 ±0,33 | 29,84 ±0,38 | 28,05 ±0,19 | 52,03 ±0,37 | 33,00 ±0,41 | 22,56 ±0,44 | 45,12 ±0,26 | 10,46 ±0,40 | 41,94 ±0,52 |
| *Furfural | 3,26f ±0,03 | 2,59e ±0,08 | 2,39d ±0,01 | 0,08a ±0,001 | 0,15b ±0,01 | 0,05a ±0,001 | 0,05a ±0,001 | 0,05a ±0,01 | 0,32c ±0,05 | 0,09a ±0,002 |
| *Álcoois superiores | 143,35 ±1,80 | 215,76 ±2,91 | 187,12 ±0,77 | 171,45 ±1,01 | 253,86 ±1,41 | 222,92 ±1,69 | 162,94 ±1,38 | 100,14 ±0,63 | 73,17 ±0,41 | 91,67 ±1,22 |
| *Álcool metílico | 0,040 ±0,004 | 0,025 ±0,003 | nd | 0,007 ±0,001 | 0,209 ±0,013 | nd | 0,005 ±0,0007 | 0,0097 ±0,0006 | nd | nd |
| Cobre (mg L ⁻¹) | 2,55c ±0,05 | 3,85e ±0,02 | 2,19b ±0,03 | 8,27i ±0,08 | 6,48f ±0,03 | 2,06a ±0,02 | 7,16h ±0,03 | 6,77g ±0,08 | 2,16b ±0,03 | 3,02d ±0,01 |
| Extrato seco (g L ⁻¹) | 0,076 ±0,008 | 0,087 ±0,008 | 0,050 ±0,002 | 0,303 ±0,024 | 0,256 ±0,014 | 0,215 ±0,014 | 0,187 ±0,017 | 0,220 ±0,012 | 0,157 ±0,012 | 0,201 ±0,014 |
| *Congêneres | 326,56 ±5,19 | 427,77 ±1,40 | 336,24 ±1,10 | 746,33 ±1,79 | 760,92 ±0,52 | 696,78 ±1,72 | 813,74 ±3,70 | 509,48 ±0,91 | 448,78 ±2,40 | 625,88 ±1,32 |

* mg /100 mL etanol anidro. Congêneres = acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores.

Médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo Teste Scott-Knott a 0,05

Tabela 3 Composição físico-química das cachaças provenientes de cana com adubação nitrogenada acondicionada em bombonas

| Análises | Amostras | | | | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | URP1 | URP2 | URP3 | URP4 | URP5 | NAP1 | NAP2 | NAP3 | NAP4 | NAP5 |
| Grau alcoólico (% v/v 20 °C) | 42,27g ±0,12 | 36,59a ±0,70 | 41,92f ±0,05 | 41,91f ±0,02 | 36,12a ±0,64 | 38,20b ±0,067 | 38,33b ±0,10 | 38,57b ±0,53 | 41,34e ±0,06 | 40,29d ±0,21 |
| *Acidez volátil | 66,90b ±1,90 | 59,38a ±3,12 | 61,45a ±3,62 | 295,22h ±2,02 | 284,04g ±5,54 | 272,30f ±2,70 | 380,76l ±2,49 | 212,90c ±1,11 | 234,52d ±0,35 | 313,38i ±1,48 |
| *Ésteres | 91,82 ±0,97 | 108,55 ±3,43 | 71,39 ±1,23 | 195,81 ±2,41 | 162,56 ±2,05 | 161,30 ±1,01 | 211,78 ±0,90 | 142,87 ±0,96 | 139,02 ±1,10 | 194,14 ±1,26 |
| *Aldeídos | 26,01 ±0,31 | 46,56 ±0,93 | 25,97 ±0,25 | 23,15 ±0,25 | 48,90 ±0,90 | 31,32 ±0,25 | 21,00 ±0,28 | 41,46 ±0,26 | 9,65 ±0,27 | 38,53 ±0,28 |
| *Furfural | 3,18f ±0,02 | 2,66e ±0,20 | 2,34d ±0,06 | 0,08a ±0,01 | 0,16b ±0,01 | 0,052a ±0,008 | 0,051a ±0,007 | 0,046a ±0,007 | 0,357c ±0,012 | 0,098a ±0,009 |
| *Álcoois superiores | 143,54 ±2,23 | 216,05 ±3,94 | 187,24 ±0,23 | 171,85 ±2,10 | 254,32 ±1,27 | 223,54 ±0,87 | 163,39 ±1,17 | 101,84 ±1,86 | 72,99 ±0,59 | 91,15 ±0,52 |
| *Álcool metílico | 0,040 ±0,006 | 0,019 ±0,003 | nd | 0,005 ±0,001 | 0,218 ±0,002 | nd | 0,004 ±0,0007 | 0,0098 ±0,0002 | nd | nd |
| Cobre (mg L ⁻¹) | 2,52c ±0,05 | 3,84e ±0,02 | 2,19b ±0,01 | 8,22i ±0,11 | 6,49f ±0,01 | 2,06a ±0,02 | 7,16h ±0,07 | 6,76g ±0,01 | 2,17b ±0,02 | 3,05d ±0,09 |
| Extrato seco (g L ⁻¹) | 0,071 ±0,004 | 0,086 ±0,001 | 0,051 ±0,002 | 0,31 ±0,03 | 0,251 ±0,009 | 0,208 ±0,003 | 0,178 ±0,003 | 0,200 ±0,025 | 0,157 ±0,006 | 0,203 ±0,005 |
| *Congêneres | 331,80 ±4,17 | 433,21 ±4,28 | 348,32 ±3,11 | 686,09 ±3,16 | 749,99 ±8,30 | 688,53 ±2,05 | 776,39 ±2,95 | 499,11 ±1,76 | 456,53 ±1,09 | 637,30 ±2,01 |

* mg /100 mL etanol anidro. Congêneres = acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores.

Médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo Teste Scott-Knott a 0,05

Com relação à acidez volátil, 70% das amostras apresentam valores acima do limite estabelecido pela legislação. A acidez elevada pode ser um indicativo de contaminação do mosto por bactérias acéticas durante o processo de fermentação, ou corte indevido das frações na etapa da destilação. Outro fator que influencia a acidez, no caso de envelhecimento da bebida, é a oxidação a ácido acético dos álcoois e aldeídos, principalmente do etanol e acetaldeído (CARDOSO, 2006).

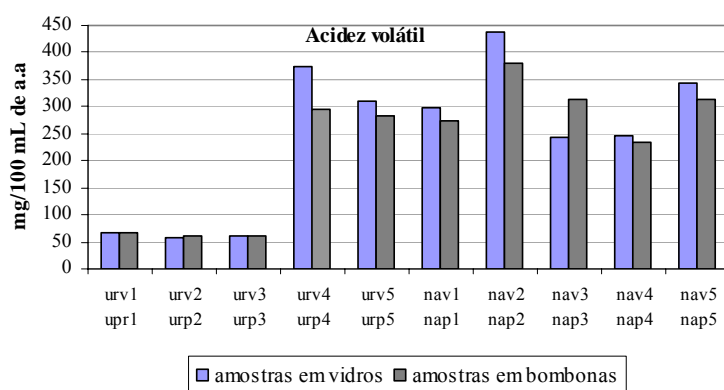


Gráfico 1 Histograma dos teores de acidez volátil nas amostras de cachaca

Neste caso particular, a bebida não foi envelhecida, mas armazenada em recipiente de vidro e de plástico; porém, as características inerentes à bebida favorecem, como no envelhecimento, a oxidação de álcoois a aldeídos e, posteriormente, ácidos carboxílicos, aumentando a acidez. Os resultados apresentados no Gráfico 1 mostraram grande variação na acidez das amostras URV1 e URP1, cuja cana não recebeu adubação nitrogenada, comparadas às amostras NAV1 e NAP1, que também não receberam adubação nitrogenada, e apresentaram acidez elevada. Apesar de a cana ter recebido o mesmo tratamento, a cachaca foi obtida separadamente; portanto, essa diferença pode ser atribuída a

falhas no processo de produção da bebida. Comparando as mesmas amostras acondicionadas nos dois tipos de recipientes, observa-se que não houve diferenças significativas entre as três primeiras amostras, conforme teste Scott-Knott. O período de 6 meses de acondicionamento da cachaça em embalagens de polietileno e em vidro, ora representou incremento de acidez volátil, ora decréscimo.

Brunetto (2008), trabalhando com adubação nitrogenada de videira, observou que o aumento nas doses de nitrogênio promovia um aumento na acidez do vinho, o que não foi observado com a cana.

Forlin (2005), avaliando as alterações decorrentes de acondicionamento, por 12 meses, de aguardente de cana em vidro e em PET, observou que houve alteração do perfil físico-químico da bebida, diminuindo a acidez total e volátil, o teor de aldeídos totais, incrementando a acidez fixa, os teores de ésteres totais e de álcoois superiores nas amostras provenientes da embalagem PET. Nielsen; Damant e Castle (1997), ao analisar a matriz polimérica da garrafa PET, quantificaram compostos das classes dos ésteres, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos. Essas substâncias, presentes no polímero e quando em contato com o alimento, podem migrar para a bebida, explicando, portanto, o aumento nos teores de ésteres e álcoois superiores.

A diminuição no teor alcoólico e na acidez nas amostras acondicionadas em bombonas deve-se provavelmente à reação de esterificação de ésteres, que deve ser favorecida nesse ambiente da matriz polimérica. Os resultados para os ésteres vêm confirmar esse fato, pois as amostras armazenadas em bombonas apresentaram teores mais elevados que as correspondentes em vidro, como mostra o Gráfico 2, o que nos leva a afirmar que a variação de ésteres totais na cachaça durante o período de 6 meses de descanso em embalagens de PEAD e vidro foi influenciada pela natureza das embalagens. O mesmo foi encontrado por Forlin (2005), que observou um aumento na concentração de ésteres quando

comparou as amostras acondicionadas em vidro e em PET, durante 12 meses, em diferentes volumes.

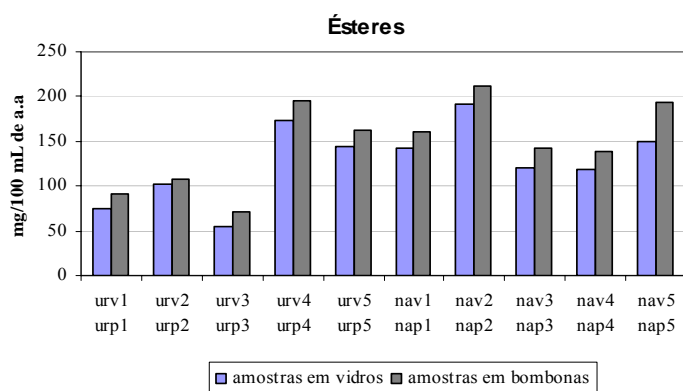


Gráfico 2 Histograma dos teores de ésteres nas amostras de cachaca

Parazzi et al. (2008), avaliando a composição química de aguardentes de cana armazenadas em tonéis de carvalho e em recipientes de vidro, por um período de 36 meses, observaram que houve aumento na concentração de ésteres, em relação às épocas de amostragem e ao tipo de recipientes. Quanto ao tempo de armazenamento, não houve variações significativas para os compostos analisados nas aguardentes armazenadas em vidro, exceto para o acetato de etila. Como na acidez volátil, também observaram diferenças entre as amostras de URVI, URPI e NAVI, NAPI devido a falhas tanto na fermentação como na destilação.

Os valores encontrados para os ésteres foram expressos em acetato de etila e estão dentro do limite de 200,0 mg/100mL álcool anidro, recomendado pela legislação brasileira, exceto para a amostra NAP2 (BRASIL, 2005).

Os álcoois superiores são formados na etapa de fermentação e têm sua origem nos aminoácidos; assim, a adubação nitrogenada da cana pode contribuir

para o aumento dos aminoácidos e estes aumentarem a quantidade de álcoois superiores na bebida. No gráfico apresentado no Gráfico 3, as amostras (1) correspondem às cachaças provenientes de cana não adubada, as demais correspondem às amostras adubadas com doses crescentes.

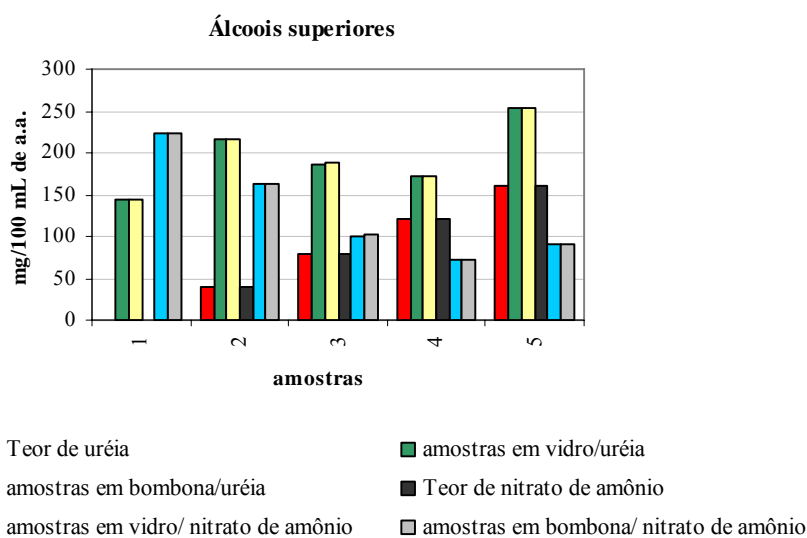


Gráfico 3 Histograma dos teores de álcoois superiores das amostras de cachaças

Observa-se no gráfico 3 que as doses de nitrogênio afetaram a quantidade de álcoois superiores. As amostras de cachaças provenientes de cana adubada com ureia apresentaram aumento nas concentrações em álcoois superiores quando aumentou a quantidade de ureia, resultado contrário foi observado para as amostras oriundas de cana adubada com nitrato de amônio.

Observa-se ainda que o tipo de recipiente não influenciou a formação dos álcoois superiores. Pelos resultados apresentados na Figura 3, verifica-se que o nitrato de amônio não favoreceu a formação de álcoois superiores na bebida, pois as amostras (NAV1 e NAP1, no gráfico, refere-se à amostra 1) cuja cana

não recebeu esse adubo e apresentou concentrações superiores às aquelas procedentes de cana adubada com nitrato de amônio (amostras 2, 3, 4 e 5).

Boeira e Daudt (1995), estudando a interferência da adubação nitrogenada de videiras sobre vinhos procedentes de regiões distintas e fermentados com diferentes leveduras, observaram que o aumento nas doses do adubo promoveu uma diminuição na concentração dos álcoois isobutílicos e isoamílico, e um aumento na concentração do álcool propílico.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3, o teor de cobre na cachaça acondicionada por 6 meses em embalagens de vidro e de plástico não foi influenciado significativamente ($p \leq 0,05$) pela natureza dos recipientes. A presença de cobre em bebidas artesanais tem sido atribuída a problemas intrínsecos da produção, pois é o metal mais utilizado na construção de alambiques. Em elevadas concentrações na cachaça, é altamente indesejável e indica falta de assepsia e higiene, principalmente durante as paradas de alambicagem. As amostras armazenadas em vidro: URV4, URV5, NAV2, NAV3 e as correspondentes em bombonas: URP4, URP5, NAP2 e NAP3 apresentaram concentrações elevadas de cobre, superiores ao permitido pela legislação, que é de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Gráfico 4). Esse é um problema que ainda preocupa os produtores de cachaças artesanais (BRASIL, 2005).

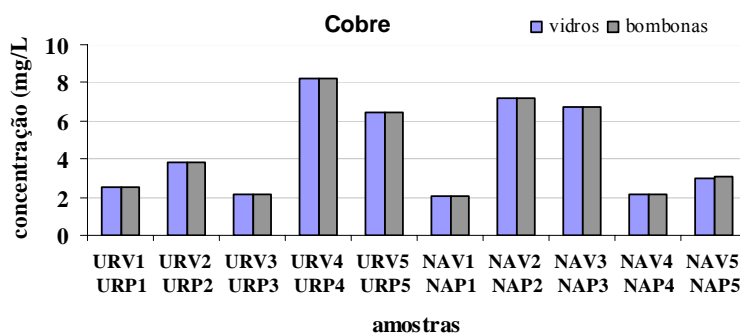


Gráfico 4 Histograma dos teores de cobre nas amostras de cachaças

Observa-se no Gráfico 4 as variações das amostras com relação à concentração de cobre; porém, é notório que o tipo de recipiente não interferiu na quantidade de cobre.

Azevedo et al. (2003) indicaram uma forma empírica para avaliar uma possível contaminação por cobre em cachaça: a utilização de um filtro branco de algodão ou gaze para filtrar a bebida. Caso o filtro fique azul, denotaria a ocorrência de excesso de cobre. Avaliando teores de cobre em 45 cachaças da região de Minas Gerais, eles observaram um nível de cobre acima do permitido pelo MAPA em 6,7% das amostras. Labanca et al. (2006), analisando 71 amostras de cachaça da região de Minas Gerais, encontraram 7% das amostras fora dos padrões da legislação vigente. Se analisadas quanto ao limite do mercado externo ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), apenas 50,7% atenderiam aos padrões internacionais. No estado do Rio Grande do Sul, esses resultados são mais alarmantes. Garbin; Bogusz-Junior e Montano (2005) avaliaram o teor de cobre em 25 amostras de cachaça artesanal, provenientes de quatro microrregiões que integram a região noroeste do Rio Grande do Sul. Foram constatados que 72% das amostras apresentaram anormalidades quanto à limpeza e 38,3% apresentaram níveis de cobre acima do limite permitido pela legislação.

A contaminação pode ser evitada fazendo uma cuidadosa higienização dos alambiques nos períodos de safras e entressafras, utilizando-se água e limão na primeira destilação, de modo a eliminar os resíduos de cobre e ingredientes utilizados na limpeza (CARDOSO, 2006). Uma alternativa bastante utilizada pelos produtores é a utilização de filtros, como o carvão ativado e as resinas de troca iônica. Entretanto, deve-se ter um cuidado especial na utilização desses adsorventes, pois, alguns materiais retiram, além do cobre, substâncias importantes para o sabor e aroma da bebida, comprometendo sua qualidade sensorial (LIMA et al., 2006).

Os teores de metanol obtidos nas aguardentes não ultrapassaram o limite permitido pela legislação, que é de 20,0 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005). Também não apresentaram diferenças quanto aos recipientes utilizados. As concentrações médias de metanol foram de não detectado, a 0,218 mg/100 mL de álcool anidro.

Esses resultados são condizentes com aqueles apresentados por Vilela et al. (2007), que avaliaram os parâmetros exigidos pela legislação em cachaças artesanais da região do sul de Minas Gerais e observaram que o metanol encontrava-se dentro dos limites estabelecidos; porém, para algumas amostras, o cobre estava acima de 5,0 mg L⁻¹.

A presença do metanol é indesejável na cachaça, pelas características de toxicidade, mesmo em baixas concentrações. A origem desse álcool está associada à degradação da pectina, um polissacarídeo sempre presente na cana-de-açúcar, embora com baixos teores de ocorrência.

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, observa-se dez amostras com teor de aldeído acima do aceitável pela legislação. As cachaças armazenadas em bombonas apresentaram concentrações inferiores, como mostra o Gráfico 5. Os aldeídos são medidos pela concentração de acetaldeído, e esse composto é indesejável, por estar associado à ressaca e intoxicação.

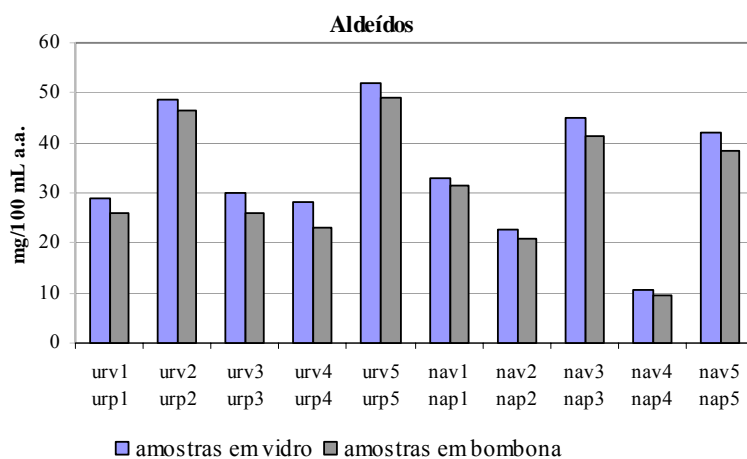


Gráfico 5 Histograma dos teores de aldeídos nas amostras de cachaça

A redução de aldeídos durante o acondicionamento da cachaça pode ocorrer pela sua transformação química, por oxidação, a ácidos, considerando, igualmente, que esses podem ser originados por oxidação de álcoois. Se a diminuição da concentração de aldeídos for atribuída à sua oxidação, as amostras acondicionadas nas bombonas deveriam apresentar concentrações de ácidos superiores àquelas acondicionadas em vidro, o que não ocorreu. Mesmo assim, a oxidação pode ter ocorrido e o ácido formado não estar disponível devido a outras reações, nas quais ele participa, como é o caso da esterificação.

Sendo os aldeídos compostos de baixa massa molar e baixa temperatura de ebulição, estão associados a elevados índices de perdas por volatilização, em condições ambientais, notadamente com o aumento da temperatura e por difusão através da estrutura das embalagens. Nesse caso, a hipótese deve ser desconsiderada, pois os dois recipientes usados no acondicionamento das bebidas são impermeáveis, não permitindo trocas gasosas por difusão.

Nascimento et al. (1997) analisaram o teor de aldeídos em 56 aguardentes e 10 uísques importados e concluíram que as aguardentes

comerciais contêm menores concentrações de aldeídos que as artesanais e que o aldeído presente em maior concentração foi o acetaldeído.

Os aldeídos têm sua origem na ação das leveduras durante estágios preliminares do processo da fermentação, principalmente o acetaldeído, que tende a desaparecer com o tempo, pela oxidação a ácido acético; por outro lado, vários aldeídos podem também ser formados de aminoácidos presentes no caldo de cana. Neste trabalho, a adubação nitrogenada da cana não interferiu na formação de aldeídos, pois as amostras que não receberam adubos (URV1, URP1, NAV1 e NAP1) apresentaram concentrações de aldeídos superiores a algumas amostras (URV4, URP4, NAV2, NAP2, NAV4 e NAP4), cuja cana recebeu adubação e apresentaram concentrações inferiores de aldeídos. Os aldeídos com até oito átomos de carbono têm aromas penetrantes e enjoativos, considerados indesejáveis em bebidas destiladas; porém, os de cadeias maiores, com mais de dez átomos de carbono, apresentam aroma agradável.

Comparando os resultados das análises de furfural apresentados nas Tabelas 2 e 3, observa-se que as amostras procedentes de cana adubada com ureia e acondicionadas em recipientes diferentes não apresentaram diferenças significativas, o mesmo ocorreu com as amostras provenientes de adubação com nitrato de amônio, podendo-se inferir que os recipientes não influenciaram a concentração de furfural. Os resultados das análises de furfural mostraram que as amostras procedentes de adubação com nitrato de amônio apresentaram concentrações bem inferiores àquelas obtidas com ureia, como apresentado no Gráfico 6. O processo de destilação não apenas concentra os constituintes voláteis provenientes da fermentação, mas também produz novos compostos via esterificação, desidratação, etc. Desse modo, acredita-se que o furfural seja proveniente não apenas do processo de fermentação, como também de outras etapas do processo de produção da bebida, como a destilação (MADRERA; GOMIS; ALONSO, 2003).

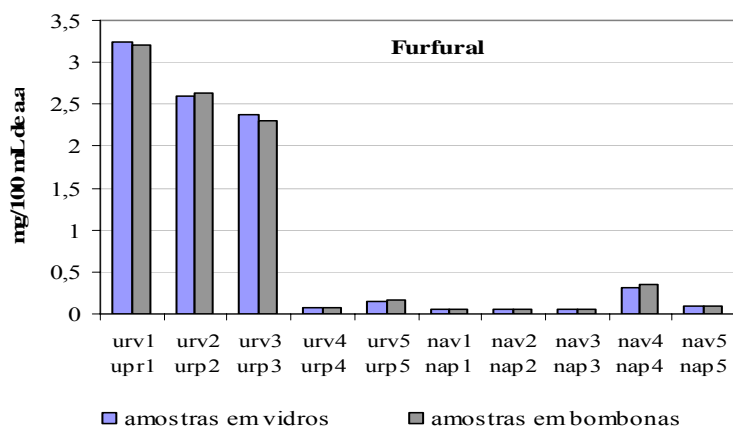


Gráfico 6 Histograma dos teores de furfural bas amostras de cachaça

Pelos dados do Gráfico 6, observa-se que o furfural teve uma grande queda a partir da quarta amostra de cachaça proveniente de adubação com ureia e acondicionada em vidros e bombonas e em todas as amostras provenientes de cana adubada com nitrato de amônio. Todas as amostras encontram-se abaixo do permitido pela legislação brasileira (5,0 mg/100mL álcool anidro).

Miranda; Horii; Alcarde (2006) mostraram que o envelhecimento não influenciou a formação de furfural em cachaças armazenadas em tonéis de madeira, submetidos ao tratamento por irradiação, num período de até 390 dias. Esses autores atribuíram a formação do furfural à etapa de destilação da bebida, apesar de outros autores citarem que esse composto pode ser oriundo das pentoses presentes na madeira do tonel.

Masson et al. (2007) quantificaram o furfural em amostras de cachaças produzidas com cana queimada e não queimada e verificaram que a queima do palhiço da cana-de-açúcar favorece a formação de furfural. Barcelos et al. (2007) analisaram diversos compostos presentes em cachaças produzidas em três diferentes regiões de Minas Gerais e verificaram que todas as amostras

analisadas apresentaram concentrações de furfural dentro do limite permitido pelo MAPA e, como as amostras analisadas foram produzidas utilizando cana não queimada, atribuíram a formação do furfural a falhas durante o processo fermentativo.

Os resultados das amostras armazenadas em vidro mostraram uma similaridade com aquelas correspondentes em bombonas quanto aos álcoois superiores, furfural, metanol e extrato seco; porém, apresentaram variações para as diferentes concentrações de adubo e entre os diferentes adubos, apesar de estarem dentro dos limites da legislação brasileira.

Com relação ao extrato seco, observou-se que não houve interferência do tipo de recipiente de armazenamento.

3 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, concluiu-se que tanto os recipientes como a adubação nitrogenada da cana interferem nos componentes secundários da bebida e, conseqüentemente, na sua qualidade, uma vez que ambos contribuem para seu aroma e sabor. A ureia promoveu um aumento na concentração dos álcoois superiores na cachaça, enquanto as bombonas proporcionaram aumento nos níveis de ésteres e diminuição nos teores de acidez volátil, porcentagem de álcool e aldeídos.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, S. M. et al. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 618-624, maio/jun. 2003.

BARCELOS, L.V. F. et al. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: zona da mata, sul de Minas e vale do jequitinhonha. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p.1009-1011, jul./ago. 2007.

BOEIRA, L. S.; DAUDT, C. E. Efeito da fertilização nitrogenada em videira sobre a formação de alguns compostos voláteis no vinho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 305-309, 1995.

BRASIL. Decreto nº 2.314 de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, 5 set. 1997. Seção 1. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Decretos/Ant2001/Ant1999/Dec231497.htm>>. Acesso em: 03 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 3, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

BRUNETTO, G. **Nitrogênio em videira**: recuperação, acumulação e alterações na produtividade e na composição da uva. 2008. 139 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

CARDOSO, M. G. Análises físico-químicas de aguardente. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 203-232.

CORREA, C. P. A. **Avaliação da influência de embalagens na qualidade da aguardente de cana-de-açúcar**. 2001. 111 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6, Build 61. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.

FORLIN, F. J. **Maturação de aguardente de cana composta com extrato de madeira de carvalho em embalagens de Polietileno tereftalato (PET)**. 2005. 182 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

GARBIN, R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; MONTANO, M. A. Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p.1436-1440, 2005.

LABANCA, R. A. et al. Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no estado de Minas Gerais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1110-1113, set./out. 2006.

LIMA, A. B. et al. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 247-250, mar./abr. 2006.

MADRERA, R. R.; GOMIS, D. B.; ALONSO, J. J. M. Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 19, p. 5709-5714, Feb. 2003.

MASSON, J. et al. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1805-1810, nov./dez. 2007.

MIRANDA, M. B.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Estudo do efeito da irradiação gamma (^{60}Co) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 772-778, out./dez. 2006.

NASCIMENTO, R. F. et al. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 782, n. 1, p. 13-23, Oct. 1997.

NIELSEN, T.; DAMANT, A. P.; CASTLE, L. Validation studies of a quick test for predicting the sorption and washing properties of refillable plastic bottles. **Food Additives & Contaminants: Part A**, London, v. 14, n. 6-7, p. 685-693, 1997.

PARAZZI, C. et al. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 193-199, jan./mar. 2008.

PEREIRA, N. E. et al. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.5, p.1068-1075, set./out. 2003.

RECHE, R. V. et al. Distinção entre rum e cachaça. Um passo na direção da tipificação da cachaça. **Engarrafador moderno**, São Paulo, v. 119, p.26-30, 2004.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cachaça artesanal estudos de mercado**. Brasília, 2008. 42 p. Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em: 30 jun. 2010.

VILELA, F. J. et al. Determinação das concentrações físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, jul./ago. 2007.

CAPÍTULO 3

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ACROLEÍNA POR
HPLC EM CACHAÇAS PROVENIENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR
COM ADUBAÇÃO NITROGENADA E ACONDICIONADAS EM
VIDROS E “BOMBONAS” DE PEAD**

RESUMO

A cachaça é uma bebida brasileira que representa importância econômica para o país. Minas Gerais é um estado pioneiro na produção de cachaça artesanal e a região sul do estado conta com uma significativa quantidade de pequenos produtores dessa bebida, os quais possuem nessa atividade agroindustrial uma forma de geração de renda, divisas e empregos, mas muitos deles são leigos e executam o processo de maneira empírica e rudimentar, baseados no senso comum ou em informações que passam de geração para geração. Tais fatos levaram à necessidade de conhecer a composição química, especialmente os contaminantes da bebida produzida nessa região e no estado como um todo, a fim de confrontar os resultados obtidos com os limites estabelecidos pela Legislação, fornecendo dados para futuras ações de capacitação dos produtores quanto à importância da qualidade do produto, com reflexos diretos no mercado interno e externo. Avaliou-se a presença da acroleína em cachaças provenientes de cana adubada com ureia e nitrato de amônio e acondicionadas em frascos de vidro e de plástico de polietileno de alta densidade (PEAD). O procedimento utilizado envolveu a derivação prévia da amostra, com 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguida de análise do derivado hidrazônico por HPLC com o detector DAD. Os parâmetros de validação utilizados mostraram que o método é preciso na quantificação de acroleína em cachaça. Os valores obtidos para a acroleína variaram de 1,30 a 5,20 mg/100 mL de álcool anidro. As amostras, cuja cana recebeu ureia como adubo, apresentaram níveis de acroleína superiores às aquelas em que a cana foi adubada com nitrato de amônio. Da mesma forma, as amostras de cachaça armazenadas em bombonas apresentaram níveis de acroleína superiores às aquelas acondicionadas em vidros.

Palavras-chave: HPLC. Acroleína. Cachaça.

ABSTRACT

Cachaça is a Brazilian beverage of economic importance for the country. The state of Minas Gerais is a pioneer in the production of cachaça, and the southern region of the state has a significant number of small producers of this beverage. This agroindustrial activity is a form of generation of income, foreign exchange, and jobs, but many of the producers are lay people and execute the process in an empirical and rudimentary manner, utilizing common-sense or information that passes from generation to generation. These facts led to the necessity of determining the chemical composition, especially of contaminants in the beverage produced in this region and in the state as a whole to compare the results obtained with the limits established by the legislation. The results could furnish data for future activities of training producers with regard to the importance of product quality, with direct impact on domestic and foreign markets. The presence of acrolein in cachaça from sugarcane fertilized with urea and ammonium nitrate and packed in glass bottles and plastic high density polyethylene (HDPE) was evaluated. The procedure involved the derivatization of the sample with 2,4-dinitrophenylhydrazine, followed by analysis of the hydrazone derivative by HPLC using a DAD detector. The validation parameters indicated that the method is accurate for the quantification of acrolein in cachaça. The values obtained for acrolein ranged from 1.30 to 5.20 mg/100 mL of anhydrous alcohol. The samples, whose cane received urea as fertilizer, had higher levels of acrolein to those where the crop was fertilized with ammonium nitrate. Likewise the cachaça samples stored in canisters had levels higher than those of acrolein acondicionadas glasses.

Keywords: HPLC. Acrolein. Cachaça.

1 INTRODUÇÃO

A acroleína é uma substância encontrada no meio ambiente, no solo, na água e no ar, principalmente nas áreas industriais das cidades, e em alimentos e bebidas. Os riscos associados à acroleína não são recentes e, provavelmente, a população tem sido exposta a essa substância por algumas gerações. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), a acroleína é classificada dentro do grupo 3, isto é, uma substância não carcinogênica ao homem, podendo ser tóxica ao sistema nervoso de seres humanos e animais em determinadas doses (IARC, 1995).

Pode ser formada na atmosfera, pela oxidação fotoquímica de hidrocarbonetos ou por degradação térmica de amido, açúcares, aminoácidos e proteínas. É um agente tóxico e irritante para as vias respiratórias, produz ardor no nariz, garganta e pode afetar os pulmões. As propriedades de irritação dessa substância são claramente evidenciadas em estudos com animais, nos quais todos os ratos morreram quando expostos a uma concentração de $8,0 \text{ g L}^{-1}$ durante 4 horas (ACGIH, 1971). A acroleína já foi detectada em uma variedade de frutas (maçãs, uvas, framboesas, morangos, amoras) e hortaliças (couve, cenouras, batatas, tomates), em alimentos como carne de porco, pão, queijo e em bebidas como uísque, vinho tinto, cerveja, café e chá.

Em bebidas alcoólicas, é encontrada de maneira bastante difundida, podendo influenciar significativamente a qualidade sensorial pelo seu sabor picante além, do efeito nocivo à saúde (NASCIMENTO et al., 1997).

Devido às preocupações sobre os possíveis efeitos tóxicos à saúde humana relacionados à ingestão de acroleína, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu, por meio da Instrução normativa de nº 13, de junho de 2005, que essa substância não deve estar presente na bebida em uma concentração superior a $5,0 \text{ mg/100mL}$ de álcool

anidro. Além disso, concedeu um prazo de três anos para que os produtores de cachaça possam se adequar à nova medida (BRASIL, 2005).

Diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos e validados, viabilizando a determinação do teor de acroleína em níveis de concentração cada vez menores (AZEVEDO et al., 2007; LEDAUPHIN et al., 2006; MASSON, 2009; ZACARONI, 2009). As pesquisas caminham no sentido de buscar novos métodos de análises, além de informações sobre a otimização de parâmetros de processos de produção para minimizar a formação dessa substância.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e a cromatografia gasosa (GC) com detector de nitrogênio e fósforo (NPD) com derivação prévia da amostra têm sido utilizadas por diversos autores; porém, com a finalidade de se evitar uma longa preparação da amostra e obter métodos rápidos destinados ao maior número de matrizes diferentes, a HPLC com detector de UV foi alternativamente investigada. Diversos procedimentos baseados nessa técnica analítica foram, então, desenvolvidos (AZEVEDO et al., 2007; LEDAUPHIN et al., 2006; MASSON, 2009; NASCIMENTO et al., 1997; ZACARONI, 2009).

A utilização da HPLC na análise de acroleína em bebidas vem contribuindo de maneira significativa para melhor entendimento das propriedades químicas, ocorrência, variação na composição e os fatores influentes durante processamento e estocagem, com implicações marcantes no controle de qualidade de bebidas. Diante do exposto, no presente trabalho objetiva-se a caracterização e quantificação da acroleína em cachaças produzidas com cana adubada com ureia e nitrato de amônio e acondicionadas em recipientes de vidro e plástico de polietileno de alta densidade (PEAD).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e solventes

O padrão de acroleína utilizado para obtenção da hidrazona foi da marca Aldrich com 90% de pureza; 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) marca Vetec, pureza 99%, ácido perclórico, 70% de pureza, Merck; ácido sulfúrico, 97% de pureza, Merck.

No preparo das amostras e dos padrões, utilizaram etanol, 99,5% de pureza e da Merck, na fase móvel, os solventes acetonitrila e metanol de grau cromatográfico HPLC J. T. Baker. A água deionizada foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore).

2.2 Equipamentos e materiais

Os equipamentos e materiais utilizados foram: Balança analítica marca Marte modelo AM – 220; Equipamento BUCHI 535; Deionizador Nanopure Diamond, Barnstead; Cromatógrafo líquido modelo UFLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-6AD, dois detectores, arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A e fluorescência (FLD) modelo RF-10AXL, injetor automático com auto-amostrador modelo SIL-10AF; Microseringas de vidro 10, 50 e 100 µL Gilson; Filtros Millipore descartáveis, com membrana durapore HV de 0,45 µm de poro e 25 mm de diâmetro.

2.3 Amostras

As amostras provenientes da cana adubada com ureia e nitrato de amônio foram acondicionadas por 24 meses em recipientes de vidro tipo

garrações denominadas URV1, URV2, URV3, URV4, URV5, NAV1, NAV2, NAV3, NAV4 e NAV5 e em bombonas de plástico chamadas de URP1, URP2, URP3, URP4, URP5, NAP1, NAP2, NAP3, NAP4 e NAP5, conforme descrito no item 2.1 do capítulo 2. Após esse período, as amostras foram coletadas para as análises cromatográficas.

2.4 Preparação do padrão

No preparo da solução-padrão, a 2,4-DNPH foi purificada previamente para posterior reação de derivação da acroleína.

2.4.1 Purificação da 2,4-dinitrofenilhidrazina

A 2,4-DNPH foi recristalizada por três vezes com metanol. Após a terceira filtração, deixou-se em repouso à temperatura ambiente, até a cristalização completa; em seguida, os cristais foram separados por filtração a vácuo. Terminada a purificação, uma solução do padrão em acetonitrila foi injetada em HPLC-UV para conferir a sua pureza e, em seguida, estocada sob refrigeração em frasco âmbar.

2.4.2 Síntese do 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína

Normalmente, as reações envolvidas na derivação de cetonas e aldeídos ocorrem por adição nucleofílica de um átomo de nitrogênio ao carbono da carbonila para formar produtos estáveis. Entre as reações de adição à carbonila, a mais empregada é a condensação com solução acidificada de 2,4-DNPH (Figura 1).

A reação de derivatização entre acroleína e a 2,4-DNPH produz o derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína (2,4-DNPHo), cujos cristais, depois de purificados, foram utilizados no preparo da solução-estoque, que foi usada como padrão na quantificação da acroleína igualmente derivada em amostras de cachaça. A reação de derivação consiste em adicionar 2,0 mL de ácido sulfúrico a 0,4 g de 2,4-DNPH e, em seguida, gotejar lentamente 2,0 mL de água deionizada, sob agitação até a dissolução completa. Adicionou a essa solução 10,0 mL de etanol. Paralelamente preparou-se uma solução de 0,1 g de acroleína em 15,0 mL de etanol e essa solução é misturada à solução inicial de hidrazina, conforme descrito por Nascimento et al. (1997). A mistura resultante foi colocada em repouso à temperatura ambiente para aguardar a formação completa dos cristais, que foram posteriormente filtrados e recristalizados por duas vezes, em etanol. A pureza foi confirmada pela determinação da temperatura de fusão e análise por HPLC.

A conversão quantitativa dos aldeídos nas bebidas alcoólicas destiladas aos derivados 2,4-DNPHs é assegurada por meio de um excesso de 2,4-dinitrofenilidrazina (LO COCO et al., 1995).

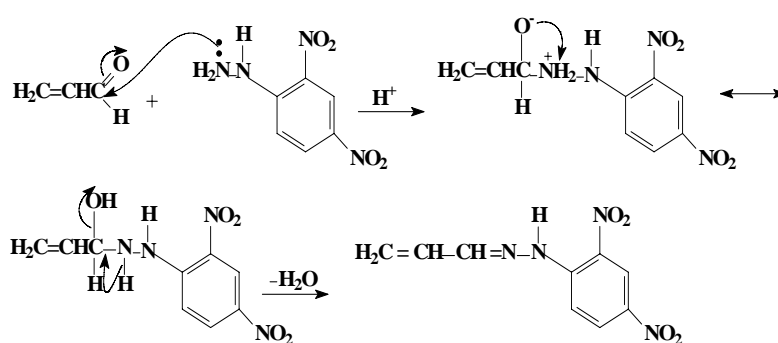


Figura 1 Reação de derivação da acroleína com 2,4-DNPH

2.4.3 Preparo da solução estoque de 2,4-DNPHo de acroleína

A partir do derivado 2,4-DNPHo-acroleína, foi preparada uma solução estoque de 250,0 mg L⁻¹ em acetonitrila. Essa solução foi armazenada sob refrigeração, em frasco âmbar e envolvido em papel-alumínio, para evitar contaminação ou degradação pela luz.

2.4.4 Derivação das amostras

Para a derivação das amostras, adicionaram-se, simultaneamente, 1,0 mL da solução de 2,4-DNPH (0,4% em acetonitrila), 4,0 mL da amostra (sem tratamento prévio) e 50,0 µL de HClO₄ (1,0 mol L⁻¹). A mistura resultante foi agitada e permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 45 min; em seguida, foi filtrada em membranas e injetada 20,0 µL no HPLC.

2.5 Condições cromatográficas

Nas separações cromatográficas empregou-se uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 mm x 4,6 mm, com partículas esféricas de 5 µm) e uma pré-coluna: Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (12,5 x 4,6 mm, 5µm). O gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica foi adaptado da metodologia de Nascimento et al., (1997) e de Zacaroni, (2009). As condições de programação da análise estão apresentadas na Tabela 1. A detecção da acroleína foi realizada em DAD a 365 nm, com injeção de 20,0 µL de padrão e amostra, e fluxo na coluna de 0,9 mL min⁻¹, totalizando 15 minutos de análise.

Tabela 1 Condições cromatográficas para a análise de acroleína

| Tempo (min.) | Fase móvel* | |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| | Solvente A (% v/v) | Solvente B (% v/v) |
| 0,01 | 30 | 70 |
| 3,00 | 15 | 85 |
| 10,00 | 20 | 80 |
| 12,00 | 30 | 70 |
| 15,00 | 30 | 70 |

* Solvente A: água:ácido acético 98:2% (v/v); Solvente B: metanol

2.6 Análise quantitativa da acroleína

Todas as amostras foram preparadas em duplicatas, exceto os padrões, que foram em triplicatas. O composto presente nas amostras foi identificado comparando-se seu tempo de retenção com o tempo de retenção do padrão. O método utilizado na quantificação da acroleína foi o de padronização externa. A partir da solução estoque do 2,4-dinitrofenilhidrazona da acroleína, prepararam-se, por diluição com solução de álcool 50%, as soluções de trabalho nas concentrações que variaram na faixa de 0,5-20,0 mg L⁻¹ (n= 8 pontos). A curva analítica foi obtida por regressão linear, plotando a área do pico versus concentração. Essas análises foram realizadas em triplicata. Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados testes de validação, considerando os parâmetros de linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação e exatidão. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base na razão entre o desvio-padrão da resposta e a inclinação da curva analítica. O valor

resultante da razão foi, então, multiplicado por três, para obtenção do LD, e por dez, para obtenção do LQ.

A linearidade expressa a resposta do analito e a sua concentração, que deve ser diretamente proporcional num intervalo especificado. A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração do analito de interesse foi expressa pela equação da reta (curva analítica) e seu respectivo coeficiente de correlação (r). Considerou-se como evidência de um ajuste ideal dos dados, para linha de regressão, valor de $r > 0,9900$. Muitas vezes, mesmo que um método analítico demonstre ser linear, é necessário conhecer a faixa de concentração na qual a sensibilidade possa ser considerada constante, definindo o intervalo denominado faixa linear de trabalho, que possibilita a determinação da concentração do analito com precisão, exatidão e linearidade, necessários para o ensaio. Para determinar a faixa linear, foi construído um gráfico contendo a resposta relativa (área do pico/concentração do analito) no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. Três linhas horizontais e paralelas ao eixo x foram colocadas, representando o valor médio das respostas relativas a 95,0 e 105% desse valor para a linha inferior e superior, respectivamente. Após a plotagem dos pontos no gráfico, consideraram como faixa linear de trabalho os pontos em que a resposta relativa estava inserida entre os limites inferiores e superiores do gráfico (RIBANI et al., 2004).

Para determinar a precisão inter-day, foram preparadas em duplicatas e em três dias consecutivos, soluções dos padrões nas concentrações 0,5, 8,0 e 20,0 mg L⁻¹. Já na precisão intra-day, prepararam-se em duplicata seis soluções de cada nível. Os resultados foram expressos em termos de coeficiente de variação.

Foram realizados testes de recuperação em três diferentes matrizes. As amostras foram fortificadas com solução padrão de 2,4-dinitrofenilidrazona de acroleína, na concentração de 8,0 mg L⁻¹. As análises foram realizadas em

duplicata e a recuperação foi calculada pela diferença da quantidade medida da substância e a quantidade adicionada na matriz.

2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Schott-Knott a 95% de confiança, usando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização do derivado hidrazônico da acroleína mostrou para a temperatura de fusão o valor de $(163,8 \pm 3)$ °C, para duas repetições, próximo ao valor tabelado (165°C). A análise cromatográfica do derivado mostrou a presença de picos minoritários de interferentes, mesmo após purificação do padrão (Gráfico 3).

O estudo da faixa linear de trabalho visa a definir o intervalo de concentração no qual é possível quantificar de forma segura o analito. Conforme resultado apresentado no Gráfico 1, o intervalo linear de trabalho obtido neste estudo foi de 0,5 a 20,0 mg L⁻¹, em que todos os pontos estão inseridos entre o limite inferior e superior do gráfico. A curva analítica para determinação da acroleína foi construída dentro dessa faixa linear de trabalho, como mostra o Gráfico 2.

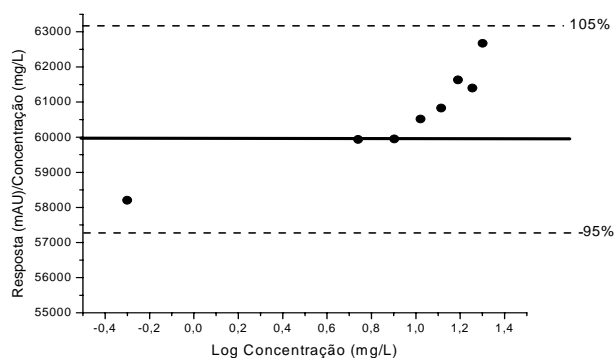


Gráfico 1 Intervalo de faixa linear de trabalho para acroleína

Para acroleína, a equação encontrada foi $y = 62502,9x - 13663,4$, calculada pela regressão linear medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração. O método apresentou sensibilidade, pois o coeficiente angular mostrou valor elevado, indicando que, com pequenas variações na concentração, obtêm-se grandes variações nos sinais medidos, garantindo a diferenciação entre duas concentrações próximas. O coeficiente de correlação encontrado foi 0,99974, indicando forte correlação linear entre as concentrações e as áreas (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando-se dos parâmetros da curva analítica, o desvio-padrão da curva (10210,3) e o coeficiente angular (62502,9), considerando 3 e 10 vezes, respectivamente. Os valores encontrados foram de 0,490 para o LD e 1,634 mg L⁻¹ para o LQ. Esses resultados são superiores aos descritos por Zacaroni (2009) em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, cujos limites de detecção e quantificação foram 0,110 e 0,368 mg L⁻¹, respectivamente.

Ledauphin et al (2006), avaliando acroleína em cidras por GC/NPD, encontrou 6,0 µg L⁻¹ para o limite de quantificação, valor esse bem menor do que aquele encontrado neste estudo.

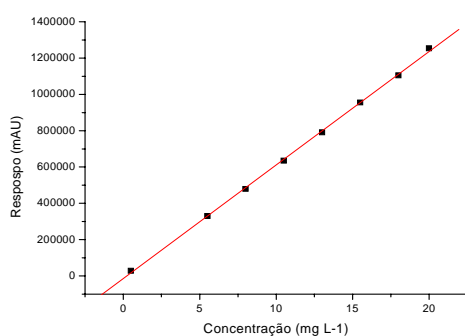


Gráfico 2 Curva analítica das soluções de 2,4-DNFHo de acroleína

Os resultados da precisão *intra day* expressos pelo coeficiente de variação %CV), nas concentrações de 0,5, 8,0 e 20,0 mg L⁻¹, são, respectivamente, 3,30%, 2,83% e 3,37%, para a precisão *inter day* 4,1%(0,5), 4,7%(8,0) e 5,2%(20,0 mg L⁻¹). Esses resultados revelam que o método fornece resultados com precisão aceitável, em diferentes dias de análise. A avaliação da recuperação foi realizada na concentração de 8,0 mg L⁻¹ em três diferentes amostras. O valor de recuperação encontrado foi de 106,4% e o coeficiente de variação de 5,4%, valor superior ao encontrado por Nascimento et al. (1997) que foi de 99%.

Os resultados forneceram um panorama do comportamento do método, indicando que a metodologia utilizada apresenta exatidão confiável, uma vez que a faixa de recuperação entre 80,0 e 110,0% é considerada aceitável em estudos de validação de método (BRITO et al., 2003).

Nos Gráficos 3 e 4 apresentam-se os cromatogramas referentes ao padrão de 2,4-DNPHo da acroleína e de uma amostra de cachaça, respectivamente.

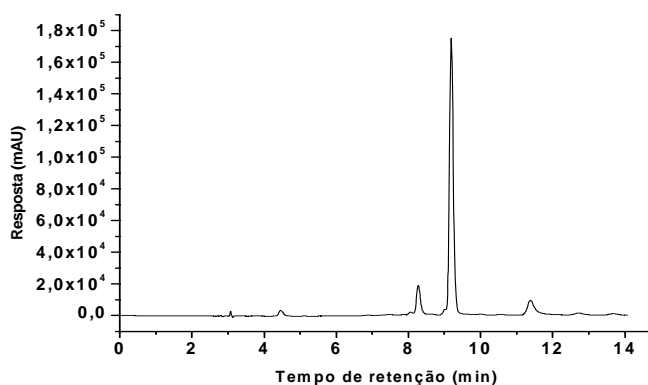


Gráfico 3 Cromatograma do padrão da 2,4-DNPH de acroleína (4,5 mg/100 mL de álcool anidro)

O cromatograma do padrão mostra, além da acroléina, a presença de compostos minoritários, mesmo depois de recristalizado por três vezes. O pico cujo tempo de retenção está entre 4,0 e 5,0 minutos refere-se a 2,4-dinitrofenilidrazina. No Gráfico 4 reflete-se o perfil cromatográfico das cachaças analisadas neste trabalho, caracterizando o baixo teor de acroleína. Perfil semelhante foi relatado nos trabalhos de Nascimento et al. (1997); Zacaroni (2009) e Masson (2009), nos quais observa-se a presença de um pico bastante intenso próximo ao pico da acroleína referente ao acetaldeído, como o pico da acroleína elue bem próximo a outra substância, as alterações nas condições cromatográficas não possibilitaram uma melhor separação; porém, os dois picos não coeluíram, não comprometendo a sua quantificação.

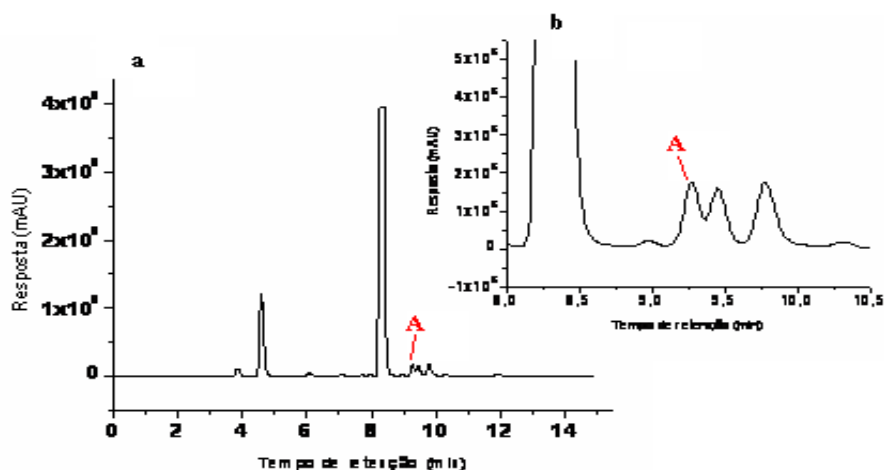


Gráfico 4 Cromatograma de uma amostra de cachaça
Pico identificado: A = acroleína.

Neste trabalho, foi possível observar a importância do forno no equipamento. Zacaroni (2009), analisando acroleína em cachaça em equipamento com forno, conseguiu as melhores condições cromatográficas, com um tempo total de análise de 12 minutos e fluxo de 1,0 mL/min. Porém, não foi

possível reproduzir essas condições utilizando o equipamento de mesma marca, mas sem forno. Assim, o método descrito por Zacaroni, (2009) foi modificado no sentido de conduzir a melhores resultados. O tempo total de análise foi de 15 minutos.

As concentrações de acroleína presentes nas amostras de cachaça estão descritas na Tabela 2. Os resultados mostram valores entre 1,30 a 5,20 mg/100mL de álcool anidro e concentração média de 2,70 mg/100mL de álcool anidro. Entre as amostras analisadas, somente a URP1 apresentou-se acima do limite exigido pela legislação brasileira.

Tabela 2 Concentrações (mg/100 ml álcool anidro) de acroleína em amostras de cachaças

| Amostra | Concentração (mg/100 mL aa*) | %CV | Amostra | Concentração mg/100 mL aa) | %CV |
|----------------|---|------------|----------------|---------------------------------------|------------|
| URV1 | 4,76k | 1,94 | NAV1 | 1,99c | 5,10 |
| URV2 | 3,22f | 3,21 | NAV2 | 2,47d | 1,69 |
| URV3 | 2,87f | 1,31 | NAV3 | 1,30a | 3,91 |
| URV4 | 3,58h | 1,17 | NAV4 | 1,38b | 5,36 |
| URV5 | 1,35a | 1,95 | NAV5 | 3,09g | 2,70 |
| URP1 | 5,20i | 1,49 | NAP1 | 2,24d | 3,18 |
| URP2 | 3,57g | 5,29 | NAP2 | 2,55e | 1,81 |
| URP3 | 3,14g | 3,23 | NAP3 | 1,32a | 3,04 |
| URP4 | 3,89i | 3,08 | NAP4 | 1,42b | 4,09 |
| URP5 | 1,41a | 3,07 | NAP5 | 3,25f | 1,88 |

*aa = álcool anidro.

Letras diferentes na mesma coluna e linha diferem estatisticamente a 5%.

Nascimento et al. (1997), analisando amostras de aguardentes de cana, obtiveram concentrações que variaram de não detectado a 0,780 mg/100mL de álcool anidro; para a cachaça artesanal, a concentração média foi de 0,139

mg/100mL de álcool anidro. Posteriormente, Nascimento et al. (1998), avaliando a influência da destilação de aguardentes de cana em alambiques confeccionados com cobre e aço inox, sobre os componentes secundários, não detectaram a presença de acroleína nas amostras analisadas.

Com base na análise estatística, observa-se que as quatro primeiras amostras oriundas de cana adubada com ureia e armazenadas em vidros apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) com relação àquelas armazenadas em bombonas, cujas concentrações foram superiores para todas as amostras. Para as amostras provenientes de cana adubada com nitrato de amônio, observam-se também diferenças significativas para três amostras, sendo que as maiores concentrações referentes às amostras acondicionadas em recipientes de polietileno. As amostras que não diferiram significativamente apresentaram concentrações menores. A concentração média de acroleína em vidro foi de 2,60 mg/100 mL de álcool anidro, ao passo que em bombona foi de 2,80 mg/100 mL de álcool anidro. Considerando o tipo de adubo, a concentração média para acroleína de amostras procedentes de cana adubada com ureia foi de 3,30 mg/100 mL de álcool anidro e, para amostras procedentes de adubação com nitrato, foi de 2,10 mg/100 mL de álcool anidro.

Em 2006, Braga avaliou a presença de acroleína em aguardentes de cana produzidas com três linhagens de leveduras com temperatura de fermentação controlada (20 e 32°C) e encontrou níveis inferiores a 0,7 mg/100 mL de álcool anidro para o contaminante.

Souza et al. (2009), avaliando os teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas no Rio de Janeiro, encontraram para acroleína a faixa de não detectado a 7,9 mg/100 mL de álcool anidro. Nessa mesma época, Masson (2009) e Zacaroni (2009), analisando várias amostras de cachaça envelhecida da região do sul de Minas, encontraram concentração média para acroleína de 2,07 e 2,09 mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente

Os resultados encontrados neste trabalho são superiores àqueles descritos por Braga (2006) e Nascimento et al. (1997); porém, menores que os apresentados por Masson (2009), Souza et al. (2009) e Zacaroni (2009), sendo concordante somente nas médias encontradas nos dois últimos trabalhos.

A maior concentração de acroleína foi determinada nas amostras URV1 e URP1, que representa a mesma amostra; porém, acondicionadas em recipientes diferentes (Gráfico 5).

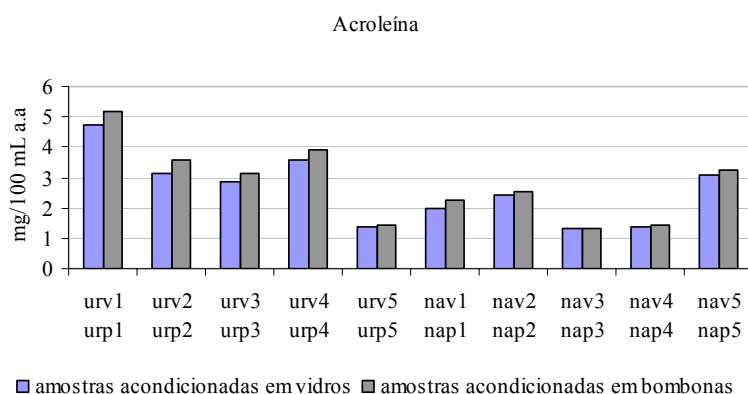


Gráfico 5 Concentração de acroleína em amostras de cachaça

Observa-se uma pequena diferença nas concentrações de acroleína entre os dois recipientes, e concentrações maiores para as amostras acondicionadas em bombonas. Isso se deve à elevada reatividade da acroleína devido à conjugação existente em sua estrutura; assim, em meio transparente, com incidência de luz (vidro), a acroleína reage rapidamente, diminuindo a sua concentração; já em meio escuro, como é o caso das bombonas, essa reação é mais lenta; portanto, a concentração de acroleína nesse meio deve ser maior. Os resultados apontam que a adubação nitrogenada não interferiu na concentração de acroleína, uma vez que as amostras de cachaça cuja cana não recebeu adubo apresentam concentração elevada de acroleína, em relação àquelas cuja cana recebeu dose

maior de adubo. O aumento da quantidade de adubo, tanto ureia como nitrato de amônio não promoveu aumento na concentração de acroleína. Por outro lado, observou-se que as amostras procedentes de cana adubada com nitrato de amônio apresentaram concentração média inferior àquelas adubada com ureia.

Pelos resultados obtidos neste estudo infere-se a possibilidade de o adubo que dispõe do nitrogênio na forma amidica favorecer de alguma maneira a formação do glicerol. Esse uma vez formado pode ser transformado em acroleína, na etapa de fermentação. A acroleína é facilmente separada na etapa de destilação, devido à alta volatilidade, permanecendo na fração cabeça. Uma proposta apresentada por Mota, Silva e Gonçalves (2009), para a formação da acroleína durante a produção de biodiesel, pode ser considerada adequada para a etapa de destilação da cachaça. Os requisitos necessários envolvem temperatura elevada, meio ácido e catalisadores metálicos, condições encontradas nessa etapa. Nesse mecanismo, o glicerol, por desidratação, poderá conduzir a dois produtos majoritários: a acroleína e o acetol. A desidratação da hidroxila central do glicerol e a tautomerização leva à formação do 3-hidroxi-propanal, o qual também pode sofrer desidratação para formar a acroleína. A desidratação da hidroxila terminal seguida de tautomerização cetoenólica leva à obtenção da α -hidroxi-acetona, também conhecida como acetol. A produção de acroleína pela transformação de 3-hidroxi-propanal é comum em cidras e provoca uma alteração indesejada, conhecida por "*piqûre acroleique*", responsável pelo aroma de pimenta e pela sensação picante e irritante nas bebidas (Azevedo et al., 2007). Na Figura 2 apresenta-se a proposta mecanística provável para a formação de acroléina em cachaça na etapa de destilação. Observa-se a competição entre acetol e acroleína, sendo esta última favorecida pelo aumento de temperatura, acidez e utilização de catalisadores. A destilação da cachaça apresenta condições propícias para essa reação, com possibilidade de o cobre atuar como catalisador.

O glicerol presente no mosto fermentado pode ser conduzido até as partes ascendentes do destilador e, assim, em contato com o cobre e temperatura elevada, sofrer desidratação e formar a acroleína. A quantidade de acroleína formada depende da quantidade de glicerol presente no mosto.

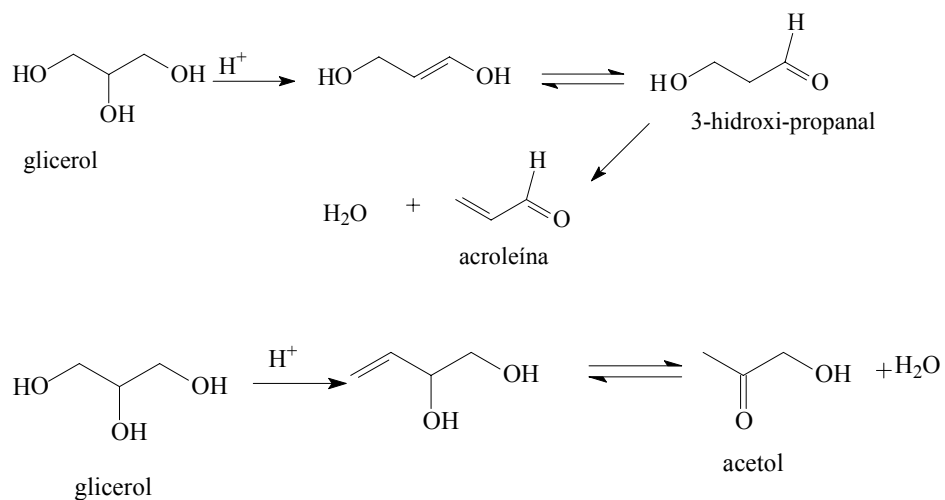


Figura 2 Formação da acroleína na etapa de destilação
 Fonte: Adaptado de Mota, Silva e Gonçalves (2009)

3 CONCLUSÃO

Das vinte amostras analisadas, somente uma está fora do valor estabelecido pela legislação. Os teores de acroleína variaram de 1,30 a 5,20 mg.100 mL⁻¹ de etanol, e as amostras, cuja cana recebeu ureia como adubo, apresentaram níveis de acroleína superiores àquelas cuja cana foi adubada com nitrato de amônio. Da mesma forma, as amostras de cachaça armazenadas em bombonas apresentaram níveis de acroleína superiores àquelas acondicionadas em vidros.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HIGIENISTS. **Threshold limit values for chemical substances and biological exposure indices**. Cincinnati: TLVs and BEIs, 2007. 256 p.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HIGIENISTS. Acrolein. In:_____. **Documentation of the threshold limit values for substances in workroom air**. 3rd ed. Cincinnati, 1971, p. 5.

AZEVEDO, L. C. et al. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, 1968-1975, dez. 2007.

BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. São Paulo, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 3, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6, Build 61. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: **Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans**. Lyon, 2006. v. 92. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92-6.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Acrolein**. Lyon, v. 63, 1995. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol63/mono63.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2010.

LEDAUPHIN, J. et al. Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in Calvados and cider. **LWT-Food Science and Technology**, [S. I.], v. 39, n. 9, p. 1045-1052, Nov. 2006.

LO COCO, F. et al. Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. **Analytical Chemistry Acta**, Amsterdam, v. 306, n. 1, p. 57-64, Apr. 1995.

MASSON, J. **Determinação dos teores de carbamato de etila e de acroleína de aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C.. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

NASCIMENTO, R. F. et al. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.6, p. 735-739, nov./dez. 1998.

NASCIMENTO, R. F. et al. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 782, n. 1, p. 13-23, Oct. 1997.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. **Volatile compounds in food and beverages**. New York: M. Dekker, 1991. p. 547-580.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, set./out. 2004.

SOUZA, L. M. et al. Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na região norte fluminense Rio de Janeiro. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2304-2309, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method development**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 1997. p. 694-697.

ZACARONI, L. M. **Compostos fenólicos e curmarinas**: certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CAPÍTULO 4

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMATO DE
ETILA POR HPLC E GC/MS EM CACHAÇAS PROVENIENTES DE
CANA-DE-AÇÚCAR COM ADUBAÇÃO NITROGENADA E
ACONDICIONADAS EM VIDROS E “BOMBONAS” DE PEAD**

RESUMO

Em busca da melhoria da qualidade da cachaça, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para a Aguardente de Cana e para Cachaça, incluindo diversos contaminantes, como o carbamato de etila (CE). Estudos sobre essa substância, bem como as metodologias para sua determinação, são requeridos, no sentido de avaliar e verificar quais fatores contribuem para a formação desse composto. O CE ocorre naturalmente em bebidas fermento-destiladas e a sua formação envolve a reação entre o etanol e substâncias nitrogenadas, como ureia e aminoácidos, que pode ocorrer antes, durante e depois do processo de fermentação. Seja qual for o caminho que leva à formação deste contaminante, ainda existem dúvidas sobre o mecanismo e a etapa na qual o CE se forma. No intuito de esclarecer sobre a sua formação, trabalhou-se com adubação nitrogenada na cana, na expectativa de o nitrogênio fornecido para a cultura da cana influenciar a composição dos compostos nitrogenados, e esses, por sua vez, proporcionarem um aumento na concentração de CE. Diante do exposto, com o presente trabalho, objetivou-se analisar e quantificar o CE em amostras de cachaça procedentes de cana adubada com ureia e nitrato de amônio. Desenvolveram-se dois métodos analíticos; a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com derivação prévia da amostra e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) após microextração em fase sólida (SPME) acompanhada da avaliação dos principais parâmetros de validação, possibilitando a determinação do CE, com confiabilidade analítica. A otimização da etapa de extração foi realizada por meio do planejamento fatorial completo. Pelos resultados, verificou-se a baixa concentração de CE, dentro do limite exigido pela Legislação Brasileira. As metodologias analíticas desenvolvidas para análise de CE demonstraram-se apropriadas para a determinação desse composto em bebidas destiladas, sendo simples, seletivas e rápidas, apresentando baixos limites de detecção e quantificação.

Palavras-chave: CE. HPLC. GC/MS.

ABSTRACT

In the pursuit of the improved quality of cachaça, the Brazilian Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) has approved the Technical Regulations for Setting Standards of Identity and Quality (PIQs) for distilled sugar cane spirits and cachaça, including various contaminants such as ethyl carbamate (EC). Studies on this substance, as well as the methods for its determination, are required to evaluate and determine which factors contribute to its formation. EC occurs naturally in distilled fermented beverages, and its formation involves the reaction between ethanol and nitrogenous substances such as urea and amino acids, which may occur before, during, and after the fermentation process. Whatever the path that leads to the formation of this contaminant, there are still doubts with regard to the mechanism and the step in which the EC is formed. Seeking clarification on its formation, fertilization of the cane with nitrogen was performed in the expectancy that the nitrogen supplied in the cultivation of sugarcane would influence the composition of the nitrogen compounds and cause an increase in the concentration of EC. Given the above, the present study sought to analyze and quantify the EC in samples of cachaça obtained from sugarcane fertilized with urea and ammonium nitrate. Two analytical methods—high performance liquid chromatography (HPLC) with prior derivatization of the sample and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) after solid phase microextraction (SPME) – were developed, followed by the assessment of the main validation parameters. The EC was determined with analytical reliability. The optimization of the extraction step was performed using a full factorial design. The concentration of EC determined was low, within the limits required by Brazilian legislation. The analytical methods developed for EC analysis proved to be useful for the determination of this compound in distilled beverages, being simple, selective and rapid, with low limits of detection and quantification.

Keywords: EC. HPLC. GC/MS.

1 INTRODUÇÃO

A cachaça é uma mistura complexa de diversos compostos, entre esses alguns são classificados como contaminantes. O CE é um contaminante natural em alimentos fermentados, normalmente encontrado em concentrações elevadas em bebidas fermento-destiladas. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), preocupado com a qualidade da bebida e com a saúde do consumidor, incluiu na lista dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) alguns contaminantes, entre eles o CE.

O caminho de formação do CE ainda não está totalmente estabelecido; porém, para o vinho, os mecanismos na etapa de fermentação, já estão consolidados e a formação do CE em cachaça, na etapa de fermentação parece seguir o mesmo caminho do vinho. Já a formação de CE durante a destilação ainda requer mais estudos. Seja qual for o mecanismo que atua na formação desse contaminante, ainda existem muitas dúvidas sobre a etapa na qual ele se forma, dificultando propostas de práticas alternativas na produção de cachaça, que evitem ou diminuam os seus níveis.

Na formação do CE, são propostas diversas vias, mas seu caminho será definido de acordo com a natureza da bebida, com o processo de produção e com os precursores disponíveis na matéria-prima. Geralmente envolve a reação entre o etanol e substâncias nitrogenadas. Na etapa de fermentação, a via metabólica proposta passa pelos aminoácidos arginina, ornitina, citrulina e fosfato de carbamila, e uréia, que são os compostos principais na reação com etanol para formar o CE. A rota mais comum de produção de CE na fermentação é a reação da ureia com etanol, em meio ácido.

Na etapa de destilação, reagem com o etanol para formar o CE o cianeto ou seus intermediários cianato ou isocianato, na presença do cobre como catalisador da reação. Por outro lado, as últimas pesquisas têm apontado maior

quantidade de CE nas cachaças industriais, as quais não têm a participação do cobre na sua produção, pois a destilação é realizada em colunas confeccionadas em aço. Portanto, tornam-se necessários estudos no sentido de buscar maiores esclarecimentos sobre a formação desse contaminante.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a influência da adubação nitrogenada da cana na formação de CE e padronizar metodologias para caracterizar e quantificar esse contaminante em cachaças, além de verificar as possíveis interferências nas concentrações de CE em cachaças acondicionadas em diferentes recipientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram desenvolvidos dois métodos de análise para CE; portanto, alguns itens são comuns aos dois métodos, enquanto outros referem-se especificamente a um deles.

2.1 Amostras

Amostras provenientes da cana adubada com ureia e nitrato de amônio foram acondicionadas por 24 meses em recipientes de vidro tipo garrações denominadas URV1, URV2, URV3, URV4, URV5, NAV1, NAV2, NAV3, NAV4 e NAV5 e em bombonas de plástico chamadas URP1, URP2, URP3, URP4, URP5, NAP1, NAP2, NAP3, NAP4 e NAP5, conforme descrito no item 2.1 do capítulo 2. Após esse período, as amostras foram coletadas para as análises cromatográficas.

2.2 Reagentes e solventes

O padrão de carbamato de etila utilizado nas análises foi da marca Acros Organics, com 97% de pureza, Xantidrol (9-hidroxixanteno) 99% Acros Organics, carbamato de metila, 99% Acros Organics, Ácido clorídrico Merck, Acetato de sódio 99% - 100,5 %, Vetec, hidrogenofosfato de sódio 99%, Carlo Elba, hidróxido de sódio, 99% (Merck), cloreto de sódio, 99% Merck.

Os solventes utilizados na fase móvel da cromatografia líquida foram de grau cromatográfico, acetonitrila e metanol, J Baker. Esses solventes orgânicos foram filtrados em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), com especificações de 45 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os solventes utilizados no preparo de amostra e

solução padrão foram todos de alta pureza. Propanol (Merck), acetato de etila (Merck), etanol (Merck). Toda a água utilizada foi ultrapura, obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore).

2.3 Equipamentos e materiais

Os equipamentos utilizados foram: Balança analítica marca Marte modelo AM – 220 com resolução de 0,1mg; Deionizador Milli-Q Millipore, Bedford , MA, USA; Equipamento de ponto de fusão MQAPF-302 Microquímica equipamentos; pHmetro DIGIMED, mod DM21; Cromatógrafo a líquido modelo UFLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-6AD, dois detectores, arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A e fluorescência (FLD) modelo RF-10AXL; Cromatógrafo a gás Varian CP 3800 acoplado a espectrômetro de massas Varian 4000 MS íon Trap, autoinjeter – CP 8400. Aparelho de Infravermelho Digilab Excalibur Serie, Laser light do not Stare into beam, 600 microwatts at 632,8nmCW.

Os materiais utilizados foram: Microseringas de vidro 10, 50 e 100 μ L Gilson; Filtros Millipore descartáveis, com membrana durapore HV de 0,45 μ m de poro e 25 mm de diâmetro; Holder manual, Supelco (Bellefonte, USA); Fibras para SPME (Supelco): Poliacrilato (PA, 85 μ m); Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB, 65 μ m); Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75 μ m); Frascos para SPME com tampa de rosca e septo de teflon/silicone de 9,0 mL; Micro seringa (100- 1000 μ L), Labmate, HTL.

2.4 Análise de carbamato de etila por cromatografia líquida de alta eficiência

As separações cromatográficas por HPLC foram realizadas empregando-se uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA-C18 (150 mm x 4,6 mm, com partículas esféricas de 5 µm) e uma pré-coluna: Agilent - Zorbax Eclipse AAA (12,5 x 4,6 mm, 5µm).

2.4.1 Purificação do 9-xantidrol

Recristalizou-se por três vezes, em hexano, o 9-xantidrol. Após a terceira filtração, deixou-se em repouso à temperatura ambiente, até a cristalização completa, quando os cristais foram separados por filtração a vácuo e seco à temperatura ambiente (ALPMANN; MORLOCK, 2006).

2.4.2 Síntese do xantiluretano

A solução de 9-xantidrol foi preparada por dissolução de 0,1782g para 4,0 mL de propanol em recipiente âmbar. Paralelamente, 0,08g de CE foram dissolvidos para 20,0 mL em solução alcoólica 40%. As duas soluções foram, então, misturadas, adicionando-se lentamente 2,0 mL da solução de ácido clorídrico (920 µL de ácido clorídrico dissolvidos em 1080 µL de água). Agitou-se, deixando-se em repouso por 30 minutos, sendo os cristais, após recristalização, em hexano, utilizados no preparo da solução-estoque (ALPMANN; MORLOCK, 2006).

2.4.3 Soluções

Todas as soluções utilizadas nas análises foram acondicionadas em frascos fechados, identificadas e armazenadas sob refrigeração.

2.4.3.1 Solução de fase móvel: acetato de sódio 20 mmol L⁻¹

Diluíram 0,68 g de acetato de sódio em 250,0 mL de água milliQ. Essa solução foi preparada diariamente e filtrada em Manifold, com membrana de 0,45 µm, antes de sua utilização.

2.4.3.2 Solução estoque de carbamato de N-xantil etila (CNXE)

A partir do CNXE, foi preparada solução estoque de 10,0 mg L⁻¹ em acetato de etila. Essa solução foi armazenada sob refrigeração, em frasco âmbar e envolvido em papel-alumínio, para evitar degradação pela luz. A solução-estoque foi utilizada na preparação das soluções de trabalho, que foram obtidas por diluição em álcool 50%. Na construção da curva analítica, foram utilizados oito pontos na faixa de 15,0 – 160,0 µg L⁻¹.

2.4.4 Derivação das amostras

Para a derivação das amostras, adicionaram-se, em frasco âmbar 4,0 mL de cachaça, seguido por 0,8 mL de xantidrol (0,02 mol L⁻¹) e 0,4 mL de HCl (1,5 mol L⁻¹). Agitou-se e deixou-se por 30 minutos em repouso à temperatura ambiente. Filtrou-se em membranas de polietileno 0,45 µm (Milipore) diretamente no vial, injetando 20,0 µL no cromatógrafo. A conversão

quantitativa do CE em seu derivado CNXE é assegurada por meio de excesso de 9-xantidrol (HERBERT et al., 2002).

2.4.5 Otimização das condições cromatográficas

A análise de CE foi baseada no método desenvolvido por Herbert et al. (2002), com algumas alterações para obter melhor resolução dos picos no cromatograma. Nesse sentido, foram realizados testes de programação da fase móvel.

2.4.5.1 Testes de programação de separação

Durante o desenvolvimento da metodologia analítica para determinação do CE, foram testados diferentes gradientes com solução padrão, e posteriormente, com amostras de cachaça para selecionar aquele que permitisse uma melhor resolução dos picos e menor tempo de análise. A seguir, estão apresentados, nos Gráficos 1 e 2, os quatro procedimentos testados, tendo como base os métodos descritos por Madrera e Valles (2009) e Park et al. (2007). As fases móveis utilizadas foram água e metanol. Os cromatogramas correspondentes a cada programação encontram-se no ANEXO C, nos Gráficos 1C, 2C, 3C e 4C.

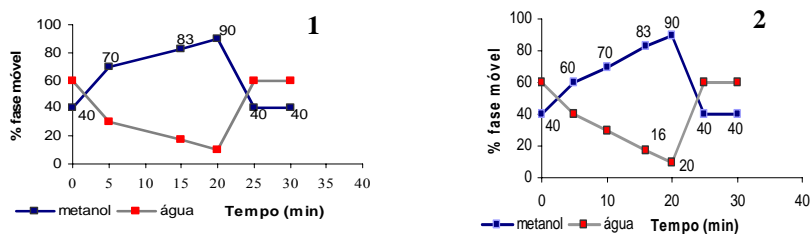


Gráfico 1 Gradiente de eluição das programações nº 1 e 2

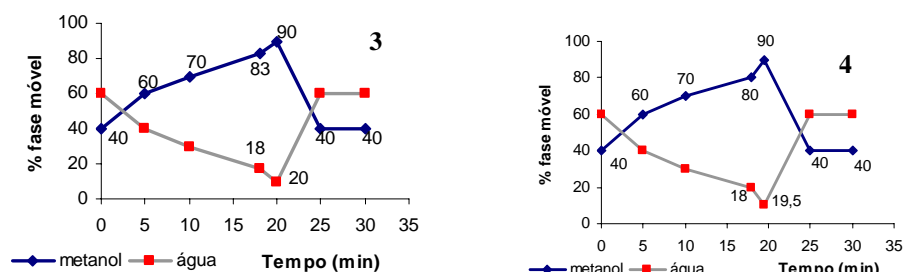


Gráfico 2 Gradiente de eluição das programações n°3 e 4

2.4.5.2 Teste de solubilidade do carbamato de N-xantil etila

Na solubilização do CNXE para preparação da solução estoque, foram utilizados dois solventes, solução alcoólica 50% e acetato de etila.

2.4.5.3 Testes de fase móvel

No gradiente da programação n°4, foram testadas mais duas fases móveis; a água e acetonitrila, cujo cromatograma encontra-se no ANEXO C, Gráfico 5C e solução tampão de acetato de sódio e acetonitrila, cujo cromatograma encontra-se no ANEXO C, Gráfico 6C. A condição de análise descrita na Tabela 1 foi utilizada na quantificação do CE. A detecção do CNXE foi realizada em detector de fluorescência a 233 nm de excitação e 600 nm de emissão, com injeção de 20,0 μL de solução padrão e da amostra, com fluxo na coluna de 0,75 mL min^{-1} , totalizando 30 minutos de análise.

Tabela 1 Condições cromatográficas para a análise do CE

| Tempo (min.) | Fase móvel* | |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| | Solvente A (% v/v) | Solvente B (% v/v) |
| 0,01 | 60 | 40 |
| 5,00 | 40 | 60 |
| 10,00 | 30 | 70 |
| 18,00 | 20 | 80 |
| 19,50 | 10 | 90 |
| 25,00 | 60 | 40 |
| 30,00 | 60 | 40 |

*Fase móvel: Solvente A: solução de acetato de sódio (20 mmol L⁻¹) pH 7,0
Solvente B: acetonitrila

2.4.6 Análise quantitativa do carbamato de N-xantil etila

A quantificação do CE, por meio de seu derivado, foi realizada por padronização externa, pela curva analítica do padrão.

2.4.6.1 Caracterização do carbamato de N-xantil etila

Após purificação do carbamato de N-xantil etila, os cristais foram submetidos às análises por infravermelho, cromatografia gasosa acoplada à massas (GC/MS) e determinação da temperatura de fusão. Os resultados da temperatura de fusão encontram-se no ANEXO B, Tabela 1B. As bandas de absorção dos compostos (CE, CNXE e xantidrol) estão descritas no ANEXO B, Tabela 2B. O cromatograma referente ao CNXE (100 µg L⁻¹ em acetato de etila) encontra-se no ANEXO B, Gráfico 1B. O espectro de massas encontra-se no

Gráfico 2B e as fragmentações propostas para o derivado xantila, na Figura 1B, do ANEXO B.

2.4.6.2 Parâmetros de validação

Todas as amostras foram preparadas em duplicatas, exceto os padrões, que foram em triplicatas. O composto presente nas amostras foi identificado comparando-se seu tempo de retenção com o tempo de retenção do padrão. O método utilizado na quantificação do CE foi o de padronização externa. A partir da solução estoque do CNXE, prepararam-se, por diluição com solução de álcool 50%, as soluções de trabalho nas concentrações que variaram na faixa de 15,0-160,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 8$ pontos). A curva analítica foi obtida por regressão linear, plotando a área do pico *versus* concentração. A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração do analito de interesse foi expressa pela equação da reta (curva analítica) e seu respectivo coeficiente de correlação (r). Os parâmetros de desempenho do método avaliados foram: precisão, recuperação e limites de detecção e de quantificação e estabilidade do analito. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pela razão entre o desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica. O valor resultante foi então, multiplicado por três, para obtenção do LD, e por dez, para obtenção do LQ.

O estudo da faixa linear de trabalho para CNXE foi realizado para definir o intervalo da concentração no qual fosse possível quantificar de forma segura o analito. Para tanto, construiu-se um gráfico, em que o eixo y representa a resposta relativa resultante da razão entre a área do pico e a concentração do analito, e o eixo x, as concentrações correspondentes em escala logarítmica. A construção da curva utilizando essa escala permitiu melhor visualização da faixa linear. As três linhas horizontais e paralelas ao eixo x representam o valor médio

das respostas relativas, e 95,0 e 105% desse valor para as linhas inferior e superior, respectivamente.

O teste de precisão avalia os critérios de repetitividade, muitas vezes denominado de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões, podendo ser expresso em termos de desvio-padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável de DPR geralmente irá depender da metodologia empregada, da concentração do analito na amostra, do tipo de matriz e da finalidade do método; porém, não deve ultrapassar 5% (Soares, 2001). No entanto, em métodos de análises traços são aceitos CV até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004). A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações realizadas no mesmo dia *intra-day* ou em vários dias *inter-day*. A avaliação da precisão do método desenvolvido para análise de CE em cachaças foi feita com base na repetitividade dos dados. Para a realização da precisão *inter-day*, soluções-padrões foram preparadas em triplicatas e em três dias consecutivos, nas concentrações (30,0; 75,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Na precisão *intra-day*, prepararam-se, em duplicata, seis soluções de cada nível. Os resultados foram expressos em termos de coeficiente de variação.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em determinado ensaio. A exatidão foi verificada por ensaios de recuperação adicionando-se quantidades conhecidas do analito à amostra em três concentrações diferentes (30,0; 75,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e realizando os ensaios em triplicata. Para análises em nível de resíduos, recomenda-se a adição de 1, 2 e 10 vezes o valor limite de quantificação (RIBANI et al., 2004). Os resultados foram expressos em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz.

Para gerar resultados confiáveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável (um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade). Frequentemente, em equipamentos automatizados, as corridas cromatográficas são realizadas durante a noite para melhor aproveitamento do funcionamento do laboratório. Essa prática requer maior estabilidade das soluções. A estabilidade das amostras e padrões é importante em termos de temperatura e tempo. Normalmente tempos longos de estocagem de amostras aumentam a probabilidade de degradação dos compostos de interesse (RIBANI et al., 2004). Para avaliar a estabilidade do CNXE, prepararam-se, a partir de uma solução estoque em acetato de etila ($10,0 \mu\text{g L}^{-1}$), duas soluções em álcool 50%, na concentração de $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Uma solução foi acondicionada em frasco transparente envolto com papel-alumínio e armazenada em refrigerador (4°C) durante 20 dias; a outra solução de CNXE foi transferida para um frasco transparente e deixada sobre a bancada à temperatura ambiente. Foram realizadas injeções em dias alternados, totalizando 10 injeções para cada solução. A estabilidade foi expressa com base na diferença relativa entre a resposta do detector durante o período analisado.

2.5 Análise de carbamato de etila por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e microextração em fase sólida

As análises de CE nas amostras de cachaças por GC/MS e com tratamento prévio da amostra por SPME foi baseada nos trabalhos desenvolvidos por Lachenmeier; Nerlich e Kuballa, 2006 e por Zhang e Zhang, 2008).

As separações cromatográficas por GC/MS foram realizadas empregando a coluna CP-Wax ($30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,25\mu\text{m}$). As condições cromatográficas para GC/MS foram: 90°C por 2 min, $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 140°C , depois $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 160°C por 1min, depois $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 220°C por 1 min,

totalizando 16 min. Fluxo 1,0 mL/min, temperatura do injetor 250°C, temperatura do trap 190°C, temperatura do manifold 50°C, e temperatura da interface 220°C.

2.5.1 Solução padrão

Foram preparadas soluções estoque em água na concentração de 100,0 mg L⁻¹ para o CE e o carbamato de metila (CM) separadamente. A partir dessa foram preparadas soluções intermediárias na concentração de 10 mg L⁻¹ para cada um. Para se obter novas concentrações, alíquotas dessas soluções foram utilizadas. As soluções foram mantidas sob refrigeração a 4 °C. Para evitar interferência, a curva analítica foi construída na matriz isenta do analito. Na construção da curva, trabalhou-se com seis pontos. A solução para construção da curva foi composta pela matriz diluída para 10% em teor alcoólico (1750,0 µL), solução tampão pH 7 (2840,0 µL), solução do CE na concentração de cada ponto, padrão interno na concentração de 150,0 µg L⁻¹ e água para completar o volume para 7,0 mL, em vial de capacidade de 9,0 mL. A mistura, foi então, submetida à extração, conforme condições obtidas nos planejamentos. As extrações para os padrões e amostras foram realizadas em duplicatas.

2.5.2 Solução tampão de fosfato/hidróxido de sódio

A solução tampão de fosfato/hidróxido de sódio foi preparada pela mistura de 50,0 mL da solução de hidrogenofosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ com 29,63 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e avolumado a 100,0 mL com água milli-Q. O pH foi verificado em pHmetro digital.

2.5.3 Condicionamento das fibras

Ao utilizar pela primeira vez as fibras de SPME, elas devem ser condicionadas. Esse procedimento consiste em deixar a fibra no injetor do cromatógrafo em determinada temperatura e por um tempo, conforme especificado no manual do fabricante. Após determinado número de extrações, a fibra deve ser condicionada, novamente, para eliminar a interferência “de fundo” ou arraste da amostra. Com uma fibra limpa, amostragem contínua com a mesma fibra é possível, com mínimo arraste de amostra para amostra.

2.5.4 Pré-seleção das fibras

Os testes preliminares foram realizados no modo headspace, com as fibras PA, PDMS/DVB e CAR/PDMS. Posteriormente, foram realizados no modo direto. Assim, 1750,0 μL de cachaça foram adicionados em vial de 9,0 mL, na presença de 2840,0 μL de solução tampão, 0,35 g de NaCl e 175,0 μL de solução aquosa de CE ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) e 175,0 μL de solução aquosa de CM, padrão interno ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$). Adicionaram-se 2060,0 μL de água, completando o volume para 7,0 mL.

2.5.5 Otimização das condições de microextração em fase sólida

Em se tratando do sistema de SPME, em que vários parâmetros devem ser avaliados, é prática entre os pesquisadores a fixação de parâmetros e a variação de um específico, até se atingir o maior rendimento. Esse pode ser o senso comum, mas certamente o procedimento mais fácil é variar todos os parâmetros ao mesmo tempo. A razão pela qual isso é feito é que os parâmetros podem sofrer influências mútuas e o valor ideal para um deles depende

diretamente do valor dos outros. Esse comportamento é chamado de interação entre variáveis. O emprego de conhecimentos estatísticos pode ajudar a resolver alguns desses problemas de forma racional e econômica, usando, para isso, planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, em que se pode extrair o máximo de informação com um número mínimo de experimentos.

A técnica consiste em selecionar um número fixo de níveis e para cada um dos fatores (variáveis) escolhidos, requer-se a execução de experimentos para todas as possíveis combinações entre níveis e fatores. O planejamento em que as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é o mais simples e mais utilizado, sendo denominado de fatorial 2^k . O número de experimentos necessários para um planejamento fatorial completo 2^k aumenta, geometricamente, com k . Se k for grande, e os experimentos realizados forem de duração considerada, sua realização prática fica inviabilizada. Além disso, quando um número relativamente grande de variáveis é escolhido para ser estudado, é comum algumas não possuírem efeito global significativo (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

À medida que o número de fatores for aumentado, a análise tenderá a se tornar mais complicada e, assim, deve-se lançar mão do planejamento composto central, com ensaios realizados no ponto central, para fornecer uma medida do erro e estabilizar a variância da resposta. Os estudos em que se usam superfície de resposta são, por natureza, sequenciais. Dessa forma, as informações adquiridas em uma série de experimentos servem para planejar a série seguinte. O processo começa com a hipótese a respeito de quais fatores influenciam uma resposta de interesse particular. Isso leva ao planejamento de experimentos que forneçam dois tipos de informações: quais fatores entre os escolhidos são realmente importantes para serem estudados e quais podem ser eliminados, por não terem uma influência significativa na resposta. Os experimentos são realizados e os resultados podem levar a novas hipóteses. Um segundo grupo de

experimentos é concebido e conhecimentos adicionais são adquiridos a respeito de como os fatores influenciam a resposta. Assim, o planejamento e a análise dos dados obtidos na metodologia por superfície de resposta podem levar ao conhecimento de quais fatores são importantes.

A fim de obter uma boa resposta na extração por SPME, foi proposto um planejamento experimental, após definição das variáveis independentes.

Essas variáveis foram relatadas por Lachenmeir, Nerlich e Kuballa (2006) e Zhang e Zhang (2008), que desenvolveram uma técnica analítica para a determinação de CE por SPME em bebidas alcoólicas. Baseando-se nesses trabalhos, iniciaram-se os estudos referentes à etapa de extração. No planejamento estatístico, foram considerados os fatores que mais influenciam a SPME, como o tipo de fibra, temperatura de extração, tempo de extração, pH, força iônica do meio, % de álcool, velocidade de agitação e tempo de dessorção.

Inicialmente foram realizados testes para verificar a eficiência de extração das fibras PA, PDMS/DVB e CAR/PDMS no modo de extração headspace, sob agitação constante (com auxílio de um agitador magnético) e volume da amostra de 7,0 mL. A seguir, a otimização multivariada foi iniciada mediante a realização de um planejamento fatorial completo 2^4 (quatro variáveis em dois níveis), totalizando 16 experimentos. Esse planejamento foi aplicado para verificar se os fatores modo de extração, pH da amostra, temperatura e tempo de extração têm ou não influência na extração de CE em bebidas. Foram mantidos fixos os parâmetros: tempo de dessorção (10 min), porcentagem de álcool (4%), porcentagem de sal (12%), velocidade de agitação (900 rpm) e volume final da solução (7 mL). Os níveis e os fatores estudados neste planejamento estão apresentados na Tabela 2. Cada linha da tabela corresponde a uma extração, que deve ser realizada com as variáveis assumindo o valor correspondente à sua coluna.

Tabela 2 Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial completo 2^4
Design $2^{(4-0)}$ spreadsheet 1

| Extração | Modo* | pH | Temp.(°C) | Tempo(min) |
|-----------------|--------------|-----------|------------------|-------------------|
| 1 | 1 | 7 | 30 | 10 |
| 10 | 2 | 7 | 30 | 30 |
| 2 | 2 | 7 | 30 | 10 |
| 3 | 1 | 10 | 30 | 10 |
| 14 | 2 | 7 | 70 | 30 |
| 9 | 1 | 7 | 30 | 30 |
| 6 | 2 | 7 | 70 | 10 |
| 13 | 1 | 7 | 70 | 30 |
| 16 | 2 | 10 | 70 | 30 |
| 4 | 2 | 10 | 30 | 10 |
| 7 | 1 | 10 | 70 | 10 |
| 11 | 1 | 10 | 30 | 30 |
| 12 | 2 | 10 | 30 | 30 |
| 8 | 2 | 10 | 70 | 10 |
| 15 | 1 | 10 | 70 | 30 |
| 5 | 1 | 7 | 70 | 10 |

(1) *headspace (2) *direto

Para a segunda etapa, foi fixada a condição mais significativa do planejamento anterior e novamente testadas as variáveis que não apresentaram diferenças significativas no primeiro planejamento, acrescidas de outras não avaliadas no primeiro planejamento. O segundo delineamento experimental utilizado foi o fatorial completo $2^3 + 3$ (três variáveis em dois níveis) com triplicata no ponto central. Na tabela 3 apresentam-se as variáveis e os níveis usados no planejamento fatorial 2^3 .

Tabela 3 Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial completo 2^3
Design $2^{(3-0)}$ design (Spreadsheet 1)

| Extração | %sal | %álcool | T.dessorção (min) |
|----------|------|---------|-------------------|
| 11(c) | 0 | 20 | 10 |
| 8 | 12,5 | 12 | 6 |
| 4 | 25 | 20 | 10 |
| 6 | 25 | 20 | 2 |
| 10 (c) | 25 | 4 | 10 |
| 1 | 12,5 | 12 | 6 |
| 5 | 0 | 4 | 2 |
| 9 (c) | 0 | 4 | 10 |
| 2 | 12,5 | 12 | 6 |
| 3 | 25 | 4 | 2 |

A análise da significância dos efeitos das variáveis independentes sobre a extração de CE foi avaliada pelo programa Statistica 6.0.

2.5.6 Estudo cinético

No estudo cinético consideraram-se as mesmas concentrações utilizadas para a seleção das fibras, descrita no 2.5.4. Foram avaliados em triplicatas os tempos de 5, 10, 20, 30 e 60 minutos de extração.

2.5.7 Quantificação do carbamato de etila

A identificação do CE no GC/MS foi realizada no modo SIM, por comparação do espectro de massa obtido para o padrão com o espectro disponível na biblioteca “NIST” do próprio instrumento. A quantificação foi

realizada por padronização interna, utilizando o CM. Para o CE, monitoraram íons m/z 44, 62 e 74, enquanto para o CM, o íon monitorado foi o m/z 46. O CM é indicado como um bom padrão interno na quantificação do CE, melhor que o carbamato de propila, que sofre transesterificação, comprometendo o seu uso; porém, a melhor opção de padrão interno, mas também a mais cara, é o CE deuterado ou com ^{15}N (HASNIP et al., 2007).

2.5.8 Parâmetros de validação

Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. As soluções para construção da curva foram preparadas conforme descrita no item 2.5.1 em seis níveis de concentração, na faixa de 5,0 a 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e em duplicata. A curva analítica foi construída plotando a razão entre as áreas m/z 62 e m/z 46, no eixo de y, e a razão entre as concentrações de CE e CM, no eixo x. A relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie de interesse foi expressa por meio da equação da reta e do coeficiente de determinação (r^2). Consideraram-se como evidência de um ajuste ideal dos dados para linha de regressão, valores de $r > 0,9900$ (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção foi calculado considerando os resultados obtidos por análises de uma solução padrão preparada na matriz. Essas foram diluídas em diversas concentrações, de forma a se conseguir uma relação sinal/ruído 3:1, conforme recomendado na literatura. O limite de quantificação foi calculado utilizando-se o mesmo tratamento descrito para o cálculo do limite de detecção, até se obter uma relação sinal/ruído 10:1 (RIBANI et al., 2004).

A precisão foi determinada em termos de repetibilidade e de precisão intermediária. A precisão intermediária, *inter-day* (n=12), foi realizada por extração de duplicatas para cada nível, 10,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, em três dias

diferentes. A repetibilidade ou precisão *intra-day* foi avaliada por meio da extração de seis replicatas, para cada concentração (10,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados foram expressos em termos de coeficiente de variação.

Para recuperação, preparou-se em cada nível soluções contendo cachaça diluída, tampão, padrão interno, CE na concentração desejada e completado o volume para 7,0 mL e utilizando um vial de 9,0 mL de capacidade, conforme descrito no item 2.5.1. A modificação para a recuperação em solvente foi a troca da amostra pela solução de álcool 40%, mantendo o mesmo volume. Após extração do CE e análise cromatográfica, a recuperação absoluta foi calculada por meio da razão entre as áreas relativas de CE adicionados na matriz e as áreas relativas de CE adicionados à solução de álcool 40%, nas concentrações de 10,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Schott-Knott a 95% de confiança, usando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

O CE foi submetido à derivação para posterior análise por HPLC e a sua quantificação foi baseada na padronização externa.

3.1.1 Caracterização do carbamato de N-xantil etila

Na Figura 1 apresenta-se a equação que representa a derivação do CE. Nesse procedimento, utilizaram-se meio ácido e excesso de reagente para garantir um maior rendimento da reação. Trata-se de uma substituição nucleofílica, em que o grupo amida comporta-se como um nucleófilo.

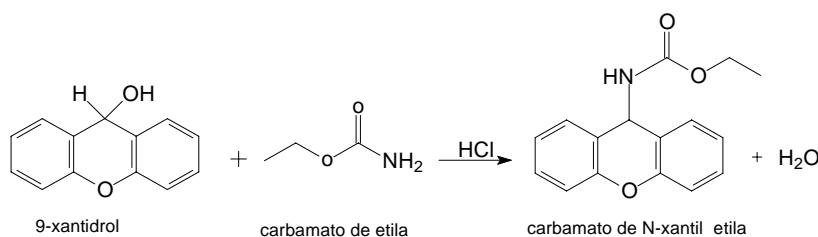


Figura 1 Equação da reação de derivação do CE

O valor encontrado para a temperatura de fusão (168°C) indica a pureza do derivado, uma vez que a temperatura de fusão tabelada (169°C) está muito próxima do valor encontrado, ANEXO B, Tabela 1B (GIACHETTI; ASSANDRI; ZANOLO, 1991). O espectro no infravermelho do CNXE mostrou diferenças significativas nos máximos de absorção, quando comparado aos materiais de partida, com presença de bandas de aromáticos, bandas de NH de

amidas secundárias, de carbonila e ausência da banda de absorção referente à hidroxila, ANEXO B, Tabela 2B. O cromatograma mostra a pureza do CNXE pela presença de um pico, ANEXO B, Gráfico 1B. O espectro de massas do CNXE, ANEXO B Gráfico 2B apresenta os mesmos fragmentos de massas m/z descrito por GIACHETTI; ALESSANDRO; ZANOLO, (1991). As propostas para as fragmentações de massas estão apresentadas na Figura 1B, ANEXO B.

3.1.2 Otimização das condições de análises

Nos Gráfico 1C, 2C, 3C e 4C, ANEXO C, estão apresentados quatro cromatogramas da solução padrão de CNXE ($300,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em álcool 40% obtidos nas diferentes programações de separação. Em todas as programações, a fase móvel utilizada foi água e metanol. As diferentes técnicas utilizadas para verificar a pureza do CNXE mostraram que esse composto estava puro, porém uma solução de $300,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em álcool 40% injetada no cromatógrafo líquido nas quatro programações mostrou a existência de outros picos no cromatograma. A diferença entre as análises de CNXE obtido por GC/MS e por HPLC está no solvente de preparação da solução; na primeira, utilizou-se o acetato de etila, ao passo que para HPLC, empregou-se uma solução em álcool 40%, na qual o CNXE é pouco solúvel, necessitando de uma etapa de sonificação para a sua dissolução.

Observando o cromatograma referente à programação de nº 1, Gráfico 1C, ANEXO C, percebe-se a presença de dois picos alargados na base e o pico referente ao CNXE, com tempo de retenção compreendido entre 19 e 20 min, com um ombro no início do pico e uma cauda, sugerindo, portanto, a existência de coeluição. A alteração na programação da fase móvel levou a uma melhor separação; porém, aumentou o tempo de retenção do analito, além da permanência da cauda, conforme mostrado no Gráfico 2C, ANEXO C. Uma

nova alteração foi realizada na tentativa de reduzir o tempo total de corrida e melhorar a separação cromatográfica dos picos. Essa condição de análise mostrou que a cauda existente no cromatograma anterior referia-se a uma coeluição, como observado no cromatograma referente ao Gráfico 3C, ANEXO C. O quarto teste de programação mostra uma boa separação, em que o pico referente ao CNXE apresenta-se bem fino, conforme Gráfico 4C, ANEXO C. Portanto, a programação de nº 4 foi definida como a mais apropriada, sendo utilizada nos testes posteriores deste trabalho.

Buscando separar melhor os picos que apareceram junto ao CNXE, iniciaram-se estudos variando o solvente da fase móvel (água/acetonitrila), utilizando-se a mesma coluna cromatográfica, mesmo fluxo e mesmo gradiente de eluição do método apresentado na Tabela 1 do item 2.4.5.3. A alteração da fase móvel de água/metanol por água/acetonitrila conduziu a uma boa resolução do cromatograma, pois os contaminantes que anteriormente eluíam entre o padrão de CNXE, nesta condição, saíram antes e os picos foram bem menores, como apresentado no Gráfico 5C, ANEXO C. Nova mudança de fase foi realizada com tampão acetato de sódio/acetonitrila e com alteração do solvente usado na solubilização do CNXE. Assim, a solução de CNXE foi preparada em acetato de etila, não precisando, portanto, do ultra-som para auxiliar na dissolução. O cromatograma mostrou um tempo de retenção bem menor que aqueles encontrados nas condições anteriores e os picos interferentes também diminuíram quase que por completo, Gráfico 6C, ANEXO C. A solução tampão usada como fase móvel apresenta pH 7,1, compatível com o valor de pKa do CE, que é 6,8. Conforme recomendado por Collins; Braga; Bonato (2006), o pH do tampão pode estar dentro da faixa de duas unidades do pKa do composto de interesse ($pK_a \pm 2$); porém, por medida de segurança, para se ter certeza de que o composto está em uma única forma, é preferível adotar $pH = pK_a \pm 1,0$.

Assim, optou-se por essa fase móvel e pela condição da programação de nº 4 descrita no item 2.4.5.3 na Tabela 1, utilizando o acetato de etila na preparação da solução estoque, já as soluções de trabalho foram diluídas em solução alcoólica 50%. Park et al.(2007) e Madrera e Valles (2009) mostraram um cromatograma do padrão de CNXE com diversos picos de substâncias interferentes. Neste trabalho, a purificação do padrão e utilização de acetato de etila na sua dissolução levou à obtenção de um cromatograma bem limpo, com um pico minoritário do interferente, conforme Gráfico 6C, ANEXO C.

3.1.3 Parâmetros de validação

Para faixa linear de trabalho, foi considerada os intervalos nos quais os pontos estavam inseridos entre os limites inferiores e superiores do gráfico representado pelo Gráfico 3. Neste, observa-se a presença de dois pontos que estão acima do limite superior, sendo então descartados na construção da curva analítica. Os intervalos lineares de trabalho obtidos para o CE em cachaça foram de 15,0 a 160,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

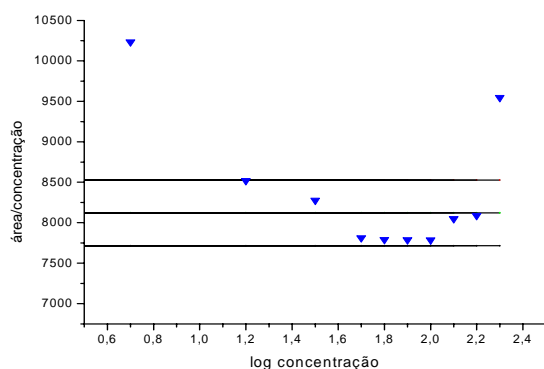


Gráfico 3 Intervalo de faixa linear de trabalho para o CE

A curva analítica foi obtida por regressão linear ($y = 7994,80x - 892,69$) plotando a área dos picos versus concentração, como apresentado no Gráfico 4. O coeficiente de determinação obtido foi de 0,9985, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando-se dos parâmetros da curva analítica, cujos valores encontrados foram 6,39 e 21,32 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

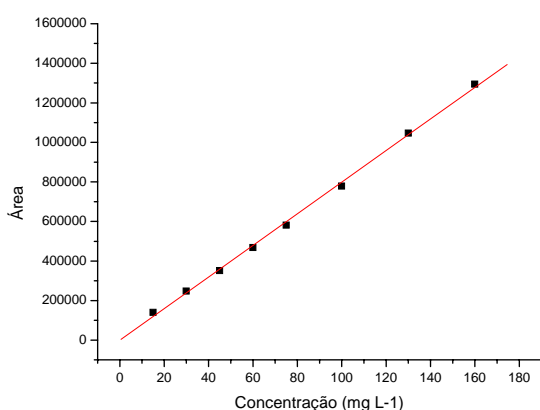


Gráfico 4 Curva analítica obtida a partir das soluções de CNXE. Equação da reta: $y = 7994,80x - 892,69$, coeficiente de correlação linear = 0,9992

O valor obtido para o limite de detecção foi superior ao relatado por Herbert et al. (2002), cujo valor encontrado foi 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, inferior ao descrito por Park et al. (2007), que obteve 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já o limite de quantificação foi quatro vezes maior que o relatado por Madrera e Valles (2009), cujos limites de detecção e quantificação foram 1,64 e 3,56 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Para avaliação da precisão intra day, foram calculados os CV dos ensaios feitos para cada nível de concentração, em um total de doze repetições. Os resultados obtidos foram 4,19%, 3,14% e 3,32%, nas concentrações de 30,0; 75,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente; já para a precisão *inter day*, os valores foram 4,66%, 4,33% e 5,65% referentes às concentrações (30,0; 75,0 e 200,0 μg

L⁻¹), respectivamente. Os valores de CV obtidos para o CNXE encontram-se dentro do limite de 5%, exceto para o maior nível de concentração, que foi um pouco maior. Infere-se, portanto, que o método apresenta precisão para o CE identificado em cachaças. Segundo Brito et al.(2003), para análise de compostos presentes em baixas concentrações, aceita-se que o valor de CV não ultrapasse 5 ou 10%, dependendo da complexidade da amostra, atestando, assim, a precisão do método analítico proposto.

Os resultados para as análises de recuperação foram $83,39 \pm 3,65\%$ ($30,0 \mu\text{g L}^{-1}$); $99,48 \pm 2,83\%$ ($75,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e $101,78 \pm 2,38\%$ ($200,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Os intervalos aceitáveis de recuperação para alguns tipos de análise estão geralmente compreendidos entre 70,0 e 120,0%, com precisão de $\pm 20\%$. Porém, em amostras mais complexas, como o vinho, essa faixa pode ser ampliada para 50,0 a 120,0%, com precisão de $\pm 15\%$ (RIBANI et al. (2004). Com base nessas informações, pode-se concluir que o método apresenta boa recuperação para o CE, pois os valores estão compreendidos entre essa faixa.

A faixa de recuperação encontrada neste trabalho está entre 84,0 a 102,0%. Esses resultados estão próximos daqueles apresentados por Madrera e Valles (2009), que determinaram CE em cidras por HPLC e encontraram uma faixa de recuperação entre 94,0 a 98,0%.

Abreu et al. (2005), comparando diferentes métodos na determinação de CE encontraram $110,0 \pm 9,6\%$ de recuperação quando utilizou a HPLC. Para os autores, esse foi o menor erro relativo encontrado para a recuperação. Os demais métodos apresentaram valores superiores, tanto de recuperação como de coeficientes de variação.

O valor médio da recuperação determinado neste trabalho foi de 94,88%, compatível com aquele descrito por Herbert et al., (2002) que estudando CE, após derivação com 9-xantidrol e determinação por HPLC com

detector de fluorescência em vinhos, encontraram para a recuperação um valor médio de 96,3%.

O valor encontrado, neste trabalho, para recuperação do CE em cachaças pode ser considerado satisfatório, uma vez que concentrações inferiores a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ podem apresentar valores de recuperação entre 40,0 e 120,0% (BRITO et al., 2003).

Com relação à estabilidade do padrão, a solução que permaneceu na geladeira apresentou um coeficiente de variação menor que aquela que permaneceu fora da geladeira, cujos valores foram 4,83 e 6,84%, respectivamente. Esses resultados mostram que a temperatura de acondicionamento não interferiu na estabilidade do composto.

3.1.4 Análise cromatográfica das amostras de cachaça

O cromatograma típico obtido nesta análise reflete bem o perfil cromatográfico qualitativo da bebida, caracterizado pelo baixo teor de CE, com o pico bem separado dos demais, como pode ser observado no cromatograma ampliado do Gráfico 5.

As concentrações de carbamato de etila presentes nas amostras de cachaça analisadas estão descritas na Tabela 4. Comparando as médias para as amostras dos dois tipos de adubos, observa-se que não houve diferença significativa entre elas, conforme o teste Scott-Knott.

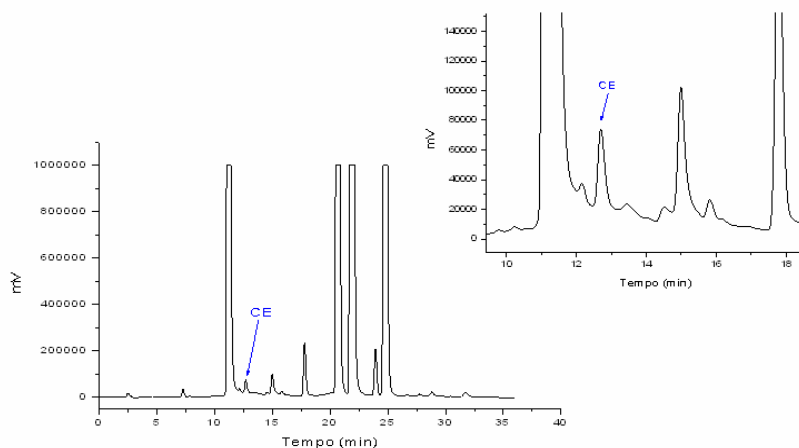


Gráfico 5 Cromatograma típico de uma amostra de cachaça

Observa-se que os valores encontrados para CE compreendem a faixa de 21,21 a 35,83 $\mu\text{g L}^{-1}$, mostrando que essas cachaças apresentam valores inferiores ao estabelecido pela legislação. Esses valores podem ser considerados como característica das cachaças artesanais produzidas na região sul de Minas Gerais, como constatado nos trabalhos de Zacaroni (2009) e Masson (2009). O primeiro avaliou aguardentes envelhecidas, encontrando um valor máximo de 119,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para o CE, e o segundo, pesquisando aguardentes de cana produzidas em alambiques de cobre com diferentes configurações, encontrou o valor médio de 53,34 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Barcelos et al. (2007) avaliando CE em amostras de aguardente de cana de três diferentes regiões do Estado de Minas Gerais (Sul de Minas, Zona da Mata e Vale do Jequitinhonha) obtiveram valores que variaram de não detectado a 700 $\mu\text{g L}^{-1}$, encontrando um teor médio de 243 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dentre as regiões estudadas, apenas as amostras do Vale do Jequitinhonha apresentaram níveis superiores ao estabelecido pela legislação vigente.

Tabela 4 Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de CE em amostras de cachaças

| Amostra | Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | %CV | Amostra | Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | %CV |
|----------------|--|------------|----------------|--|------------|
| URV1 | 35,83 | 2,67 | NAV1 | 31,89 | 2,14 |
| URV2 | 21,21 | 3,41 | NAV2 | 30,85 | 3,23 |
| URV3 | 25,54 | 0,44 | NAV3 | 26,95 | 0,80 |
| URV4 | 28,20 | 5,83 | NAV4 | 34,21 | 1,21 |
| URV5 | 32,26 | 2,43 | NAV5 | 25,04 | 1,36 |
| URP1 | 34,67 | 4,16 | NAP1 | 30,09 | 3,68 |
| URP2 | 22,90 | 0,99 | NAP2 | 30,39 | 1,90 |
| URP3 | 28,40 | 5,95 | NAP3 | 25,36 | 1,23 |
| URP4 | 28,84 | 5,02 | NAP4 | 33,15 | 2,78 |
| URP5 | 32,27 | 0,82 | NAP5 | 25,95 | 1,13 |
| Média | 29,01a | | Média | 29,37a | |
| Média | | | | | |
| Geral | | | | 29,19 | |

Médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo Teste Scott-Knott a 0,05

Os resultados aqui encontrados corroboram com os de Barcelos et al. (2007), Masson (2009) e Zacaroni (2009) os quais não encontraram níveis de CE acima do permitido, nas cachaças provenientes do Sul de Minas Gerais.

Resultados diferentes aos mencionados anteriormente foram encontrados por Andrade-Sobrinho et al. (2002), Baffa Júnior et al. (2007) e por Labanca et al. (2008), que pesquisando esse contaminante em várias amostras de aguardente de cana do estado de Minas Gerais, encontraram teores médios próximos a 1.000, 1.206 e 893 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Em outros estados do Brasil, o CE também vem sendo analisado. Nóbrega et al. (2009) analisaram CE em 25 marcas de cachaças de alambique provenientes de 19 destilarias do estado

da Paraíba e encontraram 70% das amostras na faixa de 55,0-700,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esse estudo possibilitou estabelecer uma ligação entre os níveis de CE e o sistema de refrigeração, pois as amostras destiladas em coluna refrigeradas apresentaram menor teor de CE (55,0 –100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) contra (200,0–700,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), quando não refrigeradas.

3.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise de CE por GC/MS foi realizada no modo SIM e o íon utilizado na quantificação foi o m/z 62. O íon m/z 74 não deve ser utilizado na quantificação, pois como já reportado é um íon comum aos ésteres alquilmetílicos, sendo susceptível à interferência química, mesmo após extensivo clean-up da amostra (LACHENMEIER; FRANK; KUBALLA, 2005). O padrão interno utilizado foi o carbamato de metila (CM) e o íon monitorado foi o m/z 46. Na construção da curva, utilizou-se a razão entre as áreas do CE e CM, e no eixo x, a razão entre as concentrações do CE e CM.

3.2.1 Seleção da fibra

Apesar dos relatos da literatura sobre o uso da SPME no modo headspace para a extração de CE, os resultados preliminares deste trabalho, em que empregou-se a técnica citada não foram eficientes. Analisando a constante de Henry para CE e CM, observou-se que esses apresentam valores inferiores a 0,1 Pa $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ a 25 °C, caracterizando-os como substâncias não voláteis. Da mesma forma, o coeficiente de partição classifica esses compostos como hidrofílicos comprovado pela elevada solubilidade em água. Essas propriedades, aliadas às características estruturais, sugerem interações intermoleculares desses compostos com os componentes da matriz, que além de ser aquosa, contém

inúmeros compostos de natureza polar, não favorecendo, portanto, a volatilização do CE, dificultando a sua extração no modo headspace.

A eficiência de extração das três fibras de SPME foi comparada utilizando o modo de extração direto. No Gráfico 6 apresentam-se os resultados dos testes de extração do CE realizados com as fibras. A fibra PA apresentou uma maior eficiência, observada pela magnitude da área para extrações em triplicatas de cada fibra.

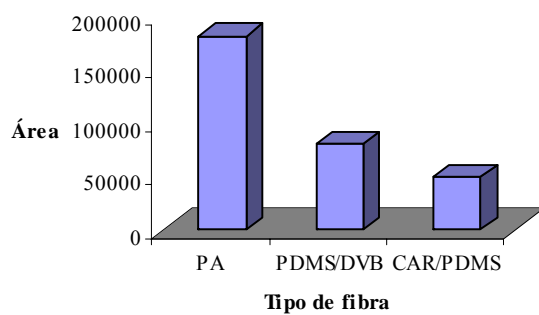


Gráfico 6 Efeito de diferentes fibras na extração do CE

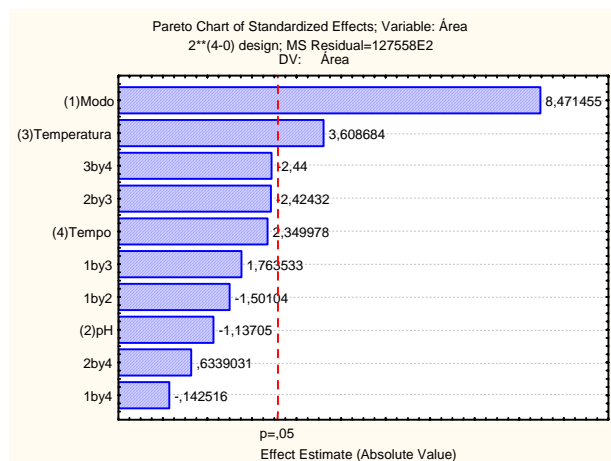
Whiton e Zoecklein (2002) analisaram CE em vinho e encontraram CW/DVB e PA como as melhores fibras na SPME no modo headspace. Lachenmeier, Nerlich e Kuballa (2006) colocam a fibra PA em terceiro lugar na extração desse contaminante em bebidas alcoólicas, considerando a mais efetiva a CW/DVB, seguida da CAR/PDMS. Zhang e Zhang (2008) confirmam os resultados anteriores, ao determinarem CE em vinho e cerveja.

Os resultados obtidos neste trabalho diferem daqueles apresentados anteriormente, pois das três fibras testadas, a PA foi a que extraiu uma quantidade maior de CE, inferindo, portanto, que essa diferença encontrada pode estar no modo de extração utilizado. O modo direto é indicado quando os analitos de interesse são pouco voláteis, como é o caso do CE. Nessa extração, a

fibra está imersa em uma matriz aquosa constituída por uma grande quantidade de compostos, com possibilidade de extrair um número maior de interferentes, o que pode comprometer a extração do analito, devido à competição entre os interferentes pelos sítios da fibra, conduzindo a uma menor extração. Outra desvantagem é a redução da vida útil da fibra. No modo headspace, somente as substâncias voláteis conseguem alcançar a fibra, e assim, a extração é mais seletiva. Contudo, diante das características apresentadas pelo CE, o modo direto foi o mais indicado, por se tratar de substância não volátil.

3.2.2 Otimização das condições de extração

Realizados os ensaios propostos no primeiro planejamento obtiveram-se as áreas referentes a cada condição do ensaio. Com esses dados, foram analisadas as estimativas de efeitos e análise de variância (ANOVA) para a verificação da validade do modelo, encontrando para o coeficiente de determinação (r^2) o valor de 0,95622. A influência das variáveis durante a etapa de extração do CE pode ser visualizada, quando os resultados gerados no planejamento são representados no gráfico de Pareto. Tanto os gráficos de Pareto como os de Superfície de Resposta são usados como parâmetros para decisão dos fatores que mais influenciam na extração. Os valores dos efeitos estimados apresentados no gráfico de Pareto possibilitaram verificar se eles são estatisticamente significativos. A linha vertical vermelha indica o valor mínimo para que isso ocorra, e o efeito é tão mais significativo quanto mais à direita dessa linha ele estiver. No Gráfico 7 apresentam os resultados gerados pelo planejamento fatorial 2^3 , para extração do CE em amostras de cachaça.

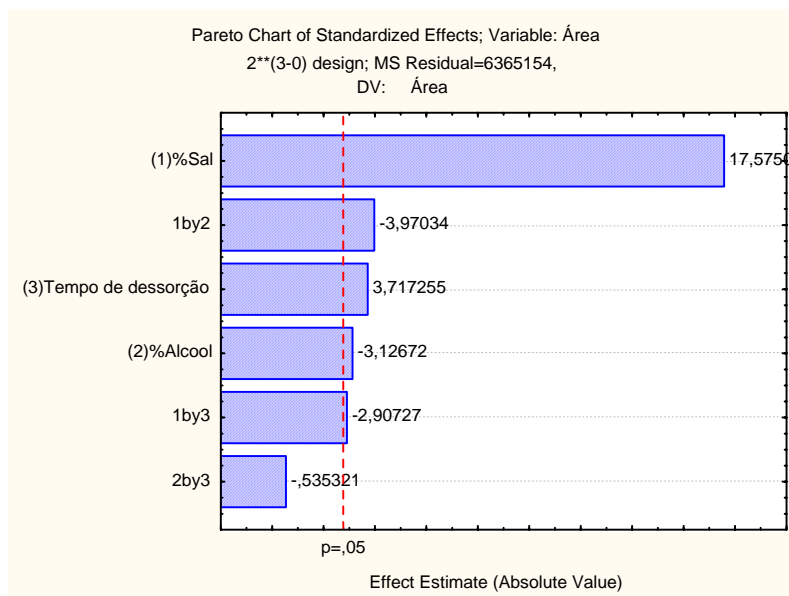


(a linha vertical define 95% do intervalo de confiança).

Gráfico 7 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^4 para CE

Neste gráfico, percebe-se que o modo e a temperatura de extração são as variáveis que mais influenciaram na extração do CE, sendo o modo a variável que exerceu maior influência. As demais variáveis, ou interação entre elas, não apresentaram significância estatística. Por esse motivo, pode-se afirmar que os níveis testados para pH e tempo de extração estão bem próximos do teor ótimo; portanto, foram fixados para um valor intermediário àqueles testados, ou seja, 20 minutos e pH 7.

Os resultados alcançados no segundo delineamento experimental estão representados no gráfico de Pareto, conforme Gráfico 8. Para a estimativa do erro experimental, foram realizadas triplicatas correspondendo ao ponto central.



(a linha vertical define 95% do intervalo de confiança)

Gráfico 8 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 no ponto central para CE

Analisando o gráfico, observa-se que as variáveis, sal e o tempo de dessorção influenciaram significativamente na extração de CE, com maior relevância para o sal. A variável que não apresentou significância estatística, como a porcentagem de álcool, foi fixada em 10%.

3.2.3 Estudo cinético

No Gráfico 9 está representado o gráfico da média das áreas pelo tempo de extração. Observa-se um aumento da quantidade extraída até 20 minutos, com ligeira queda em 30 minutos. A partir desse ponto, ocorreram novamente o aumento da extração. Esses dados mostraram que o CE não alcançou o equilíbrio no tempo estudado. Extrações com tempo superior a 60 minutos tornam-se inviáveis; portanto, optou-se pelo tempo de 20 minutos, valor que já

tinha sido selecionado no primeiro planejamento. Comportamento semelhante foi observado para o CM.

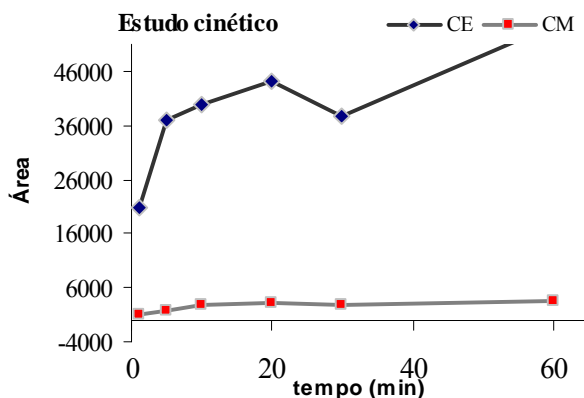


Gráfico 9 Estudo cinético para extração do CE e do CM

Na fibra PA, a fase extratora é constituída de um líquido, ou de um polímero sólido com temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente, em que o mecanismo de extração ocorre por um processo de absorção; neste, o analito é solubilizado pelo recobrimento da fibra, sofrendo uma partição entre essa e a amostra. Por outro lado, quando se tem um sólido poroso, a extração ocorre por processos de adsorção, como nas fibras que contêm carboxen como sorvente. Uma diferença marcante entre os processos de absorção e adsorção é a possibilidade de, neste último, ocorrer competição entre os analitos presentes em uma amostra, sendo a adsorção um fenômeno meramente superficial, o número de sítios adsortivos é relativamente baixo, fazendo com que os analitos disputem entre si esses sítios (Biajoli, 2008).

Lachenmeier, Nerlich e Kuballa (2006), analisando CE em bebidas alcoólicas de frutas, por extração em headspace em sistema automatizado, verificaram que, na etapa de extração, o CE também não alcançou o equilíbrio,

visto que acima de 180 minutos e em temperatura superior a 70°C houve diminuição da extração. Nesse caso, em que prevalece mecanismo de adsorção, seria fácil explicar a diminuição da taxa de extração no tempo de 180 minutos; porém, como na fibra PA o mecanismo de extração se faz por absorção, torna-se muito difícil o analito, uma vez absorvido pela fibra, retornar à matriz. Posteriormente, Zhang e Zhang (2008), avaliando a cinética da extração do CE, observaram que até 120 minutos não foi alcançado o equilíbrio, mostrando que a extração por SPME do CE é realizada em condições de não equilíbrio.

O resultado do estudo cinético da extração do CE realizado nesta pesquisa é compatível com os dois trabalhos mencionados anteriormente; porém, diferem do resultado apresentado por Whiton e Zoecklein (2002), os quais encontraram 30 minutos para o equilíbrio. Na Tabela 5, estão apresentados os resultados da análise de CE, segundo o delineamento realizado para as condições de extração. As variáveis independentes analisadas foram o modo de extração, pH, temperatura e tempo de extração, % de sal e de álcool, tempo de dessorção da fibra e a variável de resposta como concentração de CE.

Tabela 5 Resultados da otimização do método de extração por SPME

| Parâmetros | Resultados |
|-------------------------|-----------------------------|
| Tipo de fibra | PA |
| Modo de extração | direto |
| Amostras | 10% em álcool, diluição 1:4 |
| Tampão | pH = 7 |
| Tempo de extração | 20 minutos |
| Temperatura de extração | 50°C |
| Tempo de dessorção | 10 minutos |
| Velocidade de agitação | 900 rpm |

A adição de sais solúveis à amostra é frequentemente utilizada para aumentar a eficiência extrativa do método, sendo o cloreto de sódio o mais utilizado. Dependendo da natureza do analito, a adição de sal à matriz e, conseqüentemente, o incremento da força iônica, podem diminuir a solubilidade deste, tornando-o mais hidrofóbico, favorecendo a sua migração para a fase extrativa e, conseqüentemente, aumentando a extração devido ao fenômeno de “*salting out*”. Dependendo do analito, o aumento da força iônica da matriz aquosa pode ter vários efeitos sobre a extração, podendo aumentar, diminuir ou não influenciar na eficiência extrativa (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Neste trabalho, o sal foi uma variável de importância significativa na extração do CE; porém, na prática, a extração no modo direto foi comprometida, uma vez que o sal adere na fibra e interfere na extração. O procedimento para extração no modo direto utilizando sal necessita, portanto, de uma limpeza da fibra a cada extração, mesmo assim ainda se observou a presença de sal no liner do injetor, podendo comprometer o sistema cromatográfico. Em se tratando de análise de rotina, esse procedimento torna-se operacionalmente inviável. Apesar de o planejamento experimental apontar a variável sal como significativa, neste estudo, ela foi descartada em virtude do modo de extração utilizado. Diversos trabalhos mostram o uso do sal na extração do CE; porém, elas ocorreram no modo headspace. Reavaliando os parâmetros otimizados no planejamento, observou-se que a extração é mais efetiva no modo direto, sem o uso do sal, quando comparado ao modo headspace. Diante dessa dificuldade, a melhor solução encontrada foi utilizar a extração no modo direto, sem o uso do sal.

Outra variável importante a ser estudada é a quantidade de álcool presente na matriz. Lachenmeir, Nerlich e Kuballa (2006) observaram que soluções aquosas com mais de 20% de álcool continham micelas ricas em etanol envolvendo o analito e, conseqüentemente, diminuindo a extração, no caso de headspace. Neste trabalho, observou-se que, no modo direto, as maiores

concentrações de álcool favoreceram a formação de gotículas sobre a fibra, reduzindo a sua superfície de contato e, concomitantemente, diminuindo a quantidade de analito absorvido. O conveniente seria trabalhar com uma quantidade menor de álcool, abaixo de 10%, mas isso implicaria uma maior diluição da matriz e também do analito, levando a uma não detecção deste.

3.2.4 Parâmetros de validação

A análise do CE foi realizada após otimização da etapa de extração, e a quantificação foi realizada por padronização interna, em que a curva analítica foi obtida por regressão linear ($y = 0,30185x - 0,80157$) plotando a área dos picos *versus* concentração, como apresentado no Gráfico 10.

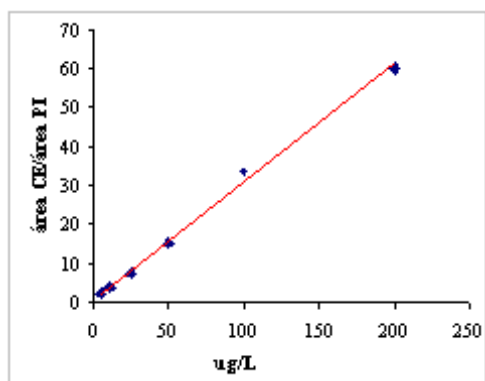


Gráfico 10 Curva analítica obtida a partir das soluções de CE na matriz

O CM foi usado como padrão interno, por apresentar estrutura química semelhante à do analito de interesse, e eluir adequadamente da coluna, separando-se de todos os outros compostos da amostra e próximo ao CE. O CM apresentou estabilidade nas condições de análise, forneceu maior intensidade de resposta em m/z 46. Labanca, Glória e Afonso (2008) também utilizaram o CM

como padrão interno na quantificação de CE em cachaças; porém, o íon monitorado foi m/z 75 como íon principal.

Os parâmetros obtidos para a metodologia analítica podem ser observados na Tabela 6. Pelo coeficiente de determinação, observou-se que o método apresentou boa linearidade, 0,9965. Esse valor mostra uma forte correlação linear entre a concentração do composto analisado e a área do pico com valores acima de 0,99 (BRITO et al., 2003). O valor encontrado neste trabalho para os limites de detecção e quantificação foram inferiores aos relatados por Lachenmeir, Nerlich e Kuballa (2006), ($3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e por Zhang e Zhang (2008), ($30,0$ e $110,0 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente, e por Whiton e Zoecklein (2002), que encontraram $9,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para o LD.

Tabela 6 Parâmetros obtidos na validação do método

| Parâmetros | Resultado |
|---------------------------|--|
| Faixa linear | 5,0 a $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$ |
| r^2 | 0,99653 |
| LD | $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ |
| LQ | $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ |
| Precisão <i>intra day</i> | 7,3% ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) 9,2% ($80 \mu\text{g L}^{-1}$) |
| Precisão <i>inter day</i> | 11,9% ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) 9,9 % ($80 \mu\text{g L}^{-1}$) |
| Recuperação | 87,1 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) (R_M/R_S) 94,5 ($80 \mu\text{g L}^{-1}$) |

Bruno et al., (2007) avaliaram a influência do sistema de destilação na concentração de CE em 28 amostras de cachaças coletadas em várias regiões do Rio de Janeiro, encontrando para os LD e LQ os valores de 3,7 e 11,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para as análises realizadas em GC/MS no modo SIM.

Labanca, Glória e Afonso (2008), analisando CE, sem tratamento prévio da amostra, por GC/MS no modo SIM, encontraram para LD e LQ os valores de 10,0 e 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Posteriormente, Andrade-Sobrinho et al., (2009) encontraram valores similares ao quantificar CE, em 380 amostras de cachaça por GC/MS e obtiveram para os LD e LQ os valores de 10,0 e 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Nesse mesmo período Zacaroni, (2009) analisando CE em cachaças artesanais envelhecidas, encontrou 15,7 e 52,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os LD e LQ, respectivamente.

Comparando os resultados para LD e de LQ determinados para CE em amostras de cachaças utilizando a GC/MS e operando no modo SIM, sem tratamento prévio da amostra, com os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se inferir que a etapa de extração contribuiu para diminuir estes limites.

Na avaliação da precisão, utilizou-se da repetitividade da análise nos níveis testados, que devem apresentar concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizado sob as mesmas condições de medição. Pelos dados da Tabela 7, observa-se que o coeficiente de variação da repetibilidade, também conhecido como *intra day* ou *intra-ensaios*, mostrou diferenças entre os níveis avaliados. Para o menor nível, 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, o coeficiente de variação foi menor. A precisão intermediária ou precisão *inter day*, também apresentou diferenças no coeficiente de variação entre os níveis, a menor concentração apresentou o maior coeficiente de variação.

Comparando os resultados de precisão *intra* e *inter day* com aqueles reportados por Zhang e Zhang (2008), observou-se que, para mesma concentração avaliada, os resultados são maiores. Da mesma forma,

Lachenmeier, Nerlich e Kuballa (2006) encontraram para a precisão *intra day* e *inter day* valores de coeficiente bem menores que aqueles encontrados neste trabalho. Vale ressaltar que o menor nível de concentração avaliado foi dez vezes maior que o maior nível aqui testado, em que na precisão *intra day* encontraram-se 4,3% (800,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 3,8% (5000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), e na *inter day*, os valores encontrados foram 8,2% (800,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 7,5% (5000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

O coeficiente de variação está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra, e sua variação é tão maior quanto menor for a sua concentração. Concentrações até 1,0 mg L^{-1} podem apresentar valores de coeficiente de variação até 16,0%; entre 1,0 a 0,1 mg L^{-1} , o valor do coeficiente aumenta para 23,0%; de 0,1 a 0,01 mg L^{-1} para 32,0%; e de 0,01 mg L^{-1} a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ o coeficiente de variação pode alcançar valores de até 45,0%. Diante desses resultados, pode-se afirmar que os valores encontrados neste trabalho para a precisão são aceitáveis, pois encontram-se dentro dos valores estabelecidos para o nível de concentração. (BRITO et al., 2003).

Zhang e Zhang (2008) encontraram para a recuperação de CE nas concentrações de 10,0 e 160,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ valores de 92,8 e 97,5%, respectivamente. Esses valores são compatíveis com aqueles encontrados neste trabalho, levando-se em consideração que a recuperação foi determinada em relação à solução alcoólica. Foi observado que a recuperação em solução alcoólica apresentou valores bem superiores àqueles obtido na matriz; portanto, a recuperação relativa apresenta valores bem menores que a absoluta; provavelmente, essa diferença deve-se aos interferentes presentes na amostra que, por sua vez, é muito complexa.

3.2.5 Análise cromatográfica das amostras de cachaça

No Gráfico 11 apresenta-se o cromatograma do padrão de CE na concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ obtido na análise GC/MS no modo SIM, monitorando os íons m/z 89, 74, 62 e 44 para CE e os íons 75 e 46 para CM. O tempo de retenção para CM e CE foi de 7,859 e 8,783 minutos, respectivamente. Durante as análises, observaram-se pequenas variações no tempo de retenção, decorrentes da injeção manual.

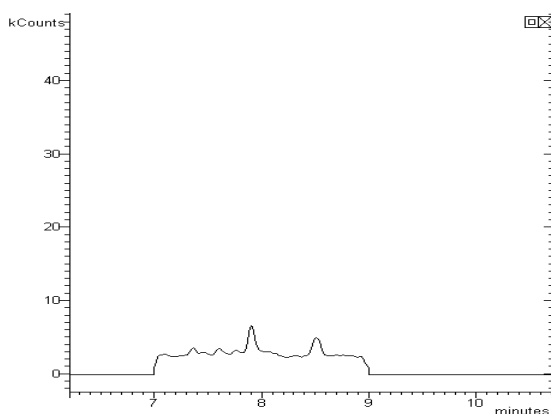


Gráfico 11 Cromatograma de íons dos padrões CE e CM

No Gráfico 12, apresentam-se dois cromatogramas, em que (a) refere-se ao cromatograma de íons de uma amostra de cachaça, com diversos picos referentes às substâncias presentes na matriz e (b) refere-se ao íon m/z 62, que é o íon mais estável do CE; portanto, utilizado na sua quantificação. Os íons m/z 74 e 44 são suscetíveis a interferências, pois na cachaça estão presentes substâncias com íons similares ao CE, como os ésteres alquilmetílicos.

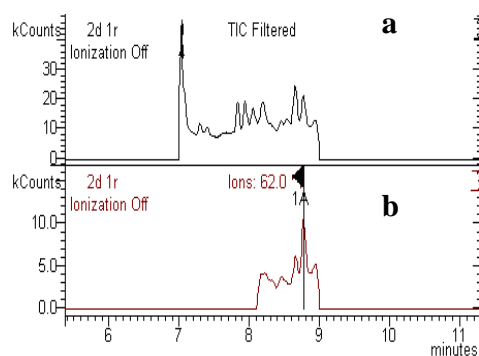


Gráfico 12 Cromatograma de íons totais no modo SIM, de uma amostra de cachaça (a), cromatograma do íon m/z 62 do CE de uma amostra de cachaça (b).

No Gráfico 13 apresentam-se o espectro de massas do CE em uma amostra de cachaça, cujo tempo de retenção é o mesmo obtido para o padrão. No espectro do CE, observam-se os fragmentos relativos aos íons m/z 90, 89, 74 e 62. O íon molecular aparece no espectro de massas acrescido de uma unidade de massa, m/z 90, tanto no espectro da amostra quanto do padrão, mostrando que houve uma protonação. Isso foi relatado por Clegg e Frank (1988) ao quantificarem CE em bebidas alcoólicas por GC/MS no modo SIM com detector de massas *íon trap*. Horman e Traitler (1989) discutiram a formação de pseudo íon molecular por impacto de elétrons em detector *íon trap*, observando sua formação em ésteres de ácidos graxos. Os autores ressaltam que o pico do pseudo íon aumenta com o aumento da quantidade de amostra, mas o espectro de massas não demonstra diferença, quando comparado com o da biblioteca de dados consultada.

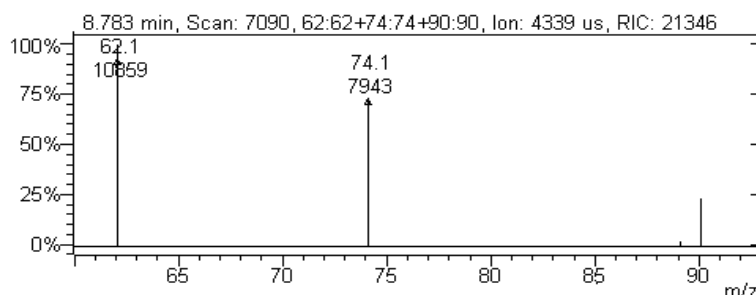


Gráfico 13 Espectro de massas do CE

As fragmentações do espectro de massas para o CE estão apresentadas na Figura 2. Provavelmente, o íon m/z 62 deve ser o mais estável porque sua estrutura é estabilizada por ressonância.

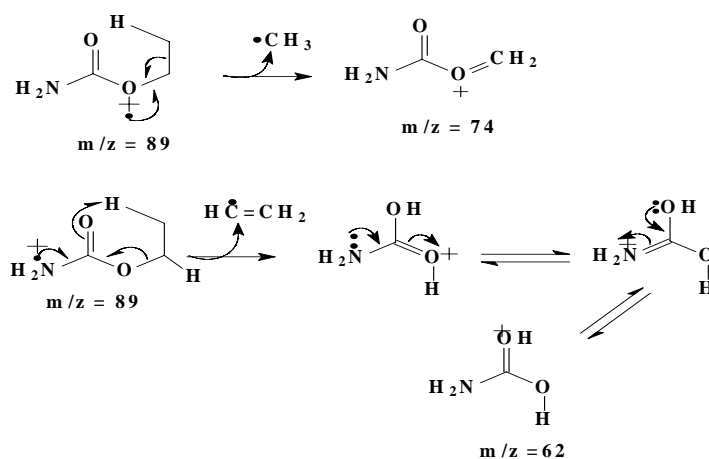


Figura 2 Fragmentações propostas para o CE

Os resultados das análises das cachaças artesanais produzidas a partir de cana adubada com ureia e nitrato de amônio e acondicionadas em recipientes de vidro e em bombonas estão apresentadas na Tabela 7. Essas foram submetidas à extração nas condições estabelecidas pelo planejamento fatorial.

Analisando os dados apresentados na Tabela 7, observa-se que os valores das concentrações de CE são baixos, considerando que o limite estabelecido é de $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e, neste estudo, a faixa encontrada compreende de 22,12 a $38,29 \mu\text{g L}^{-1}$. Para o coeficiente de variação, encontraram-se valores superiores a 5%; porém, levando em consideração a concentração analisada, esse valor é aceitável (BRITO et al., 2003). Comparando as médias das amostras para os dois tipos de adubos, observa-se que não houve diferença significativa entre as médias, conforme teste Scott-Knott.

Andrade-Sobrinho et al. (2009) analisaram CE, por GC/MS no modo SIM, em 380 amostras de cachaça produzidas no período de 2001 a 2006. Entre essas, 108 foram produzidas no estado de SP; 202 foram adquiridas no comércio em São Paulo; e 70, sem especificação da procedência. Os dados indicaram de forma mais consistente a mesma tendência observada em trabalhos anteriores para amostras de cachaça procedentes das diversas regiões produtoras do país, onde a bebida artesanal apresenta menor concentração de CE, com valores médios de $70,0 \mu\text{g L}^{-1}$, quando comparada com a bebida industrial, cuja média foi três vezes maior.

Reche e Franco (2009) analisaram 115 amostras de cachaça artesanais e industriais, com o intuito de diferenciar quimicamente esses dois tipos de bebida e contribuir para a tipificação do destilado nacional. Entre todos os compostos analisados nas amostras de cachaça, as destiladas em colunas apresentaram teores elevados de CE e benzaldeído, ao passo que a diferença principal nas amostras destiladas em alambique foi em relação às concentrações de cobre e ácido acético.

Os trabalhos realizados por Masson (2009), Zacaroni (2009) e Anjos (2010) vêm confirmar outra peculiaridade do contaminante, preconizada por Barcelos et al. (2007), mostrando que o CE em cachaças procedentes da região

do sul de Minas Gerais não compromete a qualidade da bebida, uma vez que a sua presença está abaixo do limite estabelecido.

Tabela 7 Concentrações de CE em cachaças procedentes de cana adubada

| Amostra | Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | CV(%) | Amostra | Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | CV(%) |
|--------------------|--|--------------|----------------|--|--------------|
| URV1 | 36,74 | 5,49 | NAV1 | 32,18 | 6,65 |
| URV2 | 22,12 | 8,01 | NAV2 | 38,29 | 3,10 |
| URV3 | 26,20 | 1,38 | NAV3 | 24,63 | 0,39 |
| URV4 | 27,37 | 7,04 | NAV4 | 31,51 | 6,75 |
| URV5 | 29,53 | 1,75 | NAV5 | 24,94 | 6,62 |
| URP1 | 33,81 | 3,67 | NAP1 | 30,04 | 5,11 |
| URP2 | 22,23 | 7,59 | NAP2 | 30,90 | 7,09 |
| URP3 | 34,47 | 6,22 | NAP3 | 32,17 | 4,31 |
| URP4 | 29,99 | 1,96 | NAP4 | 36,14 | 3,46 |
| URP5 | 29,62 | 2,75 | NAP5 | 27,94 | 4,12 |
| Média | 29,21a | | Média | 30,87a | |
| Média Geral | | | | 30,04 | |

Médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo Teste Scott-Knott a 0,05

3.3 Adubação nitrogenada da cana versus formação do CE em cachaças artesanais

A formação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas ocorre espontaneamente e os mecanismos operantes na fermentação são bem esclarecidos, sempre associando a disponibilidade dos precursores nitrogenados na matéria-prima e a reação deles com o álcool formado durante essa etapa. Os mecanismos de formação do CE em cachaça parecem seguir o mesmo caminho

do vinho; portanto, são importantes os precursores de CE, como os aminoácidos arginina e citrulina e os derivados, o fosfato de carbamila e ureia. Todas essas substâncias podem estar presentes durante a fermentação ou até mesmo serem formadas como é o caso da ureia. Os aminoácidos presentes na cachaça são provavelmente provenientes da hidrólise de proteínas e/ou aminoácidos livres presentes na própria matéria-prima. A quantidade média de aminoácido na cana madura é de 0,45%; a arginina e ureia já foram identificadas na cachaça, provavelmente por falhas de operação no processo de destilação ou por contaminação do açúcar utilizado para adoçar a bebida (ANDRADE, 2006; AQUINO et al., 2008).

Partindo do princípio de que o CE tem sua origem nos aminoácidos e que esses podem ser afetados pela concentração de nitrogênio no colmo, procedente da adubação nitrogenada, na qual o nitrogênio fornecido à cultura de cana é absorvido e acumulado em alguma parte da cana, era de se esperar que a maior quantidade de adubo produzisse maior quantidade de compostos nitrogenados e, por sua vez, quantidades maiores de CE. Os dados mostraram pequenas variações na concentração de CE entre as amostras; porém, as maiores concentrações referem-se às amostras cuja cana que não recebeu adubação, exceto NAV4 e NAP4, em que a dose de adubo na cana foi de 80 kg de nitrato de amônio por hectare. Comparando as amostras provenientes de diferentes adubos, observam-se variações entre elas; porém, a média foi a mesma para os dois adubos.

3.4 Comparação dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Os dados obtidos pelos dois métodos não apresentaram diferença significativa, pelo teste Scott-Knott (Tabela 8). As diferenças marcantes entre as técnicas ficaram a cargo de outras observações, que podem justificar a escolha de uma em relação à outra. Para a HPLC, o tempo de análise foi menor. A grande desvantagem sentida na GC/MS foi os maiores coeficiente de variação, as diferenças nos tempos de retenção, devido à injeção manual e à impossibilidade de utilizar o sal no modo de extração direto, já que esse parâmetro foi apontado como significativo no processo de extração.

Tabela 8 Comparação das médias das concentrações de CE encontradas nas duas técnicas

| Técnica | Conc. média ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Conc. média geral ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|----------------|--|--|
| HPLC | 29,20 ^a | 29,62 |
| GC/MS | 30,04 ^a | |

Médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo Teste Scott-Knott a 0,05

A comparação do desvio-padrão para cada amostra analisada nas duas técnicas mostrou uma variação mais elevada na GC/MS. A diferença pode ser atribuída à etapa do pré-tratamento, praticamente inexistente no método da HPLC. O estudo mostrou a possibilidade do uso do método por HPLC com detector de fluorescência como alternativa mais simples ao método de referência por GC/MS para determinação do CE em bebidas alcoólicas. Esses resultados destacam a necessidade de executar um estudo colaborador, a fim avaliar melhor os parâmetros do novo método e compará-los com o método de referência.

4 CONCLUSÕES

As baixas concentrações de CE apresentadas pelas amostras de cachaça, cuja cana foi adubada como ureia e nitrato de amônio, mostraram que a adubação não interferiu na produção de CE.

Os resultados das análises de CE por HPLC e GC/MS foram similares, e a utilização de uma ou de outra técnica depende mais da escolha particular do analista do que propriamente das vantagens de uma técnica sobre a outra; porém, vale ressaltar que a GC/MS não gera resíduos e é considerada uma “técnica limpa”.

REFERÊNCIAS

ABREU, S. M. et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, p. 498-503, May 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 02 jun. 2010.

ANJOS, J. P. **Compostos fenólicos e carbamato de etila**: caracterização e quantificação em diferentes períodos do envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho (*quercus* sp). 2010. 153 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2010.

ALPMANN, A.; MORLOCK, G. Improved online coupling of planar chromatography with electrospray mass spectrometry: extraction of zones from glass plates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 386, n. 5, p. 1543-1551, Nov. 2006.

ANDRADE, L. A. de B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 25-67.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas: cachaça, tiquira, uísque e grapa. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1074-1077, nov./dez. 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.

AQUINO, F. W. B. et al. Amino acids profile of sugar cane spirit (cachaça), rum, and whisky. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 2, p. 784-793, May 2008.

BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças comerciais da região da zona da mata mineira – MG. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 4, p. 371-373, 2007.

BARCELOS, L. V. F. et al. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1009-1011, jul./ago. 2007.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3. ed. Campinas: UNICAMP, 2007, 480 p.

BIAJOLI, A. F. P. **Fibras para spme (microextração em fase Sólida) recobertas com novos ormosils Sol-gel**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 3, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUNO, S. N. F. et al. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 4, p.1345-1352, 2007.

CLEGG, B. S.; FRANK, R. Detection and quantitation of trace levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 36, n. 3, p. 502-505, May 1988.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 456 p.

GIACHETTI, C.; ASSANDRI, A.; ZANOLO, G. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate as the xanthylamide derivative in Italian aqua vitae (grappa) samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 585, n. 1, p 111-115, Oct. 1991.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6, Build 61. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.

HASNIP, S. et al. Survey of ethyl carbamate in fermented foods sold in the United Kingdom in 2004. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 7, p. 2755-2759, Apr. 2007.

HERBERT, P. et al. New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1616-1620, June 2002.

HORMAN, I.; TRAITLER, H. Pseudo molecular ions in ion trap detector electron impact mass spectra: practical consequences. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 61, n. 17, p. 1983-1984, Sept. 1989.

LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação de carbamato de etila em aguardente de cana por GC/MS. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1860-1864, 2008.

LACHENMEIER, D. W.; FRANK, W.; KUBALLA, T. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the routine analysis of ethyl carbamate in stone-fruit spirits. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v.19, n. 2, p. 108-112, Jan. 2005.

LACHENMEIER, D.W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1108, n. 1, p. 116-120, Mar. 2006.

MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 139-143, Feb. 2009.

MASSON, J. **Determinação dos teores de carbamato de etila e de acroleína de aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

NÓBREGA, I. C. C. et al. Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions. **Food Chemistry**, London, v. 117, n. 4, p. 693-697, Dec. 2009.

PARK, S. K. et al. Analysis of ethyl carbamate in Korean soy sauce using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection or tandem mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 8, p. 975-982, Aug. 2007.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 9, p. 565-574, Oct. 2003.

RECHE, R. V.; FRANCO, D. W. Distinção entre cachaças destiladas em alambique e em colunas usando quimiometria. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 332-336, 2009.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, set./out. 2004.

SOARES, M. L. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n.1, p.79-84, 2001.

WHITON, R. S; ZOECKLEIN B. W. Determination of ethyl carbamate in wine by solidphase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 1, n. 53, p. 60-63, Mar. 2002.

ZACARONI, L. M. **Compostos fenólicos e curmarinas**: Certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ZHANG, Y.; ZHANG, J. Optimization of heaspace solid-phase microextração for analysis of ethyl carbamato in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 627, n. 2, p. 212-218, Oct. 2008.

CAPÍTULO 5

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HPAS POR GC-MS EM
CACHAÇAS PROVENIENTES DE CANA COM ADUBAÇÃO
NITROGENADA E ACONDICIONADAS EM VIDROS E “BOMBONAS”
DE PEAD**

RESUMO

A cachaça é uma bebida destilada obtida da fermentação do caldo de cana-de-açúcar que, dependendo das práticas realizadas na cadeia produtiva de armazenamento, torna-se susceptível à contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Procedimentos comuns na etapa de produção, como a queima da palha da cana antes de sua colheita, utilização de graxas nas engrenagens da moenda, utilização de recipientes que contêm soldas, reaproveitamento de tonéis para o envelhecimento da bebida e o uso de recipientes de plástico para o seu acondicionamento são fontes de contaminação da bebida por HPAs. Os HPAs representam uma importante classe de compostos com características carcinogênica e/ou mutagênica oferecendo risco à saúde humana. Assim, objetivou-se neste capítulo apresentar uma avaliação preliminar da presença e dos níveis de concentração de 16 HPAs (naftaleno, acenaftileno; acenafteno; fluoreno; fenantreno; antraceno; fluoranteno; pireno; benzo(a)antraceno; criseno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; benzo(ghi)pirileno; indeno(1,2,3-c,d)pireno e dibenzo(a,h)antraceno) em cachaças acondicionadas em vidros e bombonas de polietileno de alta densidade(PEAD). A determinação foi realizada por GC/MS, em que as amostras de cachaça foram previamente concentradas por extração em fase sólida (*SPE*). O método apresentou uma boa separação cromatográfica para os compostos analisados. As amostras acondicionadas em bombonas de plástico PEAD apresentaram teores médios totais de HPAs de $49,24 \mu\text{g L}^{-1}$; nas outras, o valor médio encontrado foi de $6,89 \mu\text{g L}^{-1}$. Pelos resultados, concluiu-se que o tipo de recipiente utilizado no acondicionamento da cachaça pode influenciar ou resultar na presença/ausência desses contaminantes no produto final; e que a adubação da cana não influenciou na formação desses contaminantes na bebida.

Palavras-chave: HPAs. Bombonas. GC/MS.

ABSTRACT

Cachaça is a distilled beverage obtained by fermentation of sugar cane juice. Depending on which of the activities undertaken in the production chain store, It becomes susceptible to contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as a result of storage procedures adopted in the production chain. Common procedures in the production stage, such as the burning of sugar cane straw before harvesting, the use of grease in the gears of the crusher, use of containers containing solders, reusing barrels for aging the beverage, and the use of plastic containers for packaging can be sources of contamination of the beverage. The plastic containers can are sources of contamination by PAHs. PAHs represent an important class of compounds with carcinogenic and mutagenic characteristics that pose a risk to human health. Thus, this chapter presents a preliminary assessment of the presence and concentration levels of 16 PAHs (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, Anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, benzo(ghi)pyrilene, indeno(1,2,3-c, d)pyrene and dibenzo(a, h)anthracene) in cachaça packed in glass and plastic drums of high density polyethylene (HDPE). The determination was performed by GC/MS, where samples of cachaça were previously concentrated by solid phase extraction (SPE). The method presented a good chromatographic separation for the compounds analyzed. The samples packaged in plastic HDPE containers showed average total PAH levels ranging from 49.24 mg L⁻¹, while the average level encountered in samples stored in other types of container was 6.89 mg L⁻¹. It was concluded that the type of container used for packaging of cachaça can influence the presence/absence of these contaminants in the final product, while sugarcane fertilization did not influence the formation of these contaminants in the drink.

Key words: PAHs. Containers. GC/MS.

1 INTRODUÇÃO

O setor de bebida alcoólica brasileira tem se desenvolvido intensamente a partir de melhorias nos processos de produção, tecnologia e inovação, realizadas pelas grandes indústrias-“cachaças industriais”, e pelos pequenos e médios produtores-“cachaças artesanais”. O aumento nas exportações de cachaça, principalmente para a Alemanha, Inglaterra, Portugal e Japão, chamou atenção de órgãos oficiais, que passaram a apoiar iniciativas de fomento do setor, visando a melhorar as condições de competitividade e possibilitar a disputa de mercado com outros destilados já tradicionais, como tequila, vodka e rum.

O Brasil produz anualmente 1,3 bilhão de litros, sendo os principais produtores os Estados de São Paulo, seguido por Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba. Dessa produção somente 30% são de responsabilidade da cachaça artesanal, representada por 30% dos produtores registrados que se utilizam de plantações próprias, sem agrotóxicos, com colheita manual, sem uso de queimadas, sendo a cana cortada crua. A fermentação é realizada de modo natural e a comercialização no próprio alambique é mais expressiva do que a comercialização externa. Já a cachaça industrial é produzida em grande escala, com a colheita mecanizada e uso esporádico de queima da palhada.

O estado de Minas Gerais é o principal produtor de cachaça de alambique do país com 230 milhões de litros. O estado conta hoje com 8.500 alambiques e 600 marcas registradas no MAPA (SEBRAE, 2008). Em razão do grande crescimento de produção e da clandestinidade vigente nesse setor, novas exigências na qualidade do produto são requeridas. Falhas nas etapas de produção da bebida levam à sua contaminação por diversos compostos. Os contaminantes podem ser formados durante a produção da cachaça ou serem incorporados nela pelo contato com fontes portadoras de contaminantes.

Diversas substâncias de natureza tóxica fazem parte da lista dos padrões de identidade e qualidade da aguardente de cana e da cachaça; porém, os HPAs, que são um grupo de compostos de características carcinogênicas vêm sendo identificados com frequência na bebida, mas ainda não existe legislação apropriada. As principais fontes de contaminação de HPAs em cachaça são a localização da plantação, queima da cana antes da colheita, o emprego de lubrificantes nos equipamentos, a utilização de recipientes não adequados para o armazenamento da bebida, como bombonas de plástico, tanques revestidos com resinas asfálticas ricas em HPAs, açúcar adicionado na bebida e os tonéis de madeira tratados termicamente durante o envelhecimento.

Assim, objetivou-se neste capítulo apresentar uma avaliação preliminar por GC/MS da presença e dos níveis de concentração de 16 HPAs (naftaleno, acenaftileno; acenafteno; fluoreno; fenantreno; antraceno; fluoranteno; pireno; benzo(a)antraceno; criseno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; benzo(ghi)pirileno; indeno(1,2,3-c,d)pireno e dibenzo(a,h)antraceno) em cachaças acondicionadas em vidros e bombonas de polietileno.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras provenientes da cana adubada com ureia e nitrato de amônio foram acondicionadas por 24 meses em recipientes de vidro tipo garrações denominadas URV1, URV2, URV3, URV4, URV5, NAV1, NAV2, NAV3, NAV4 e NAV5 e em bombonas de plástico nomeadas URP1, URP2, URP3, URP4, URP5, NAP1, NAP2, NAP3, NAP4 e NAP5, conforme descrito no item 2.,1 do capítulo 2. Após esse período, as amostras foram coletadas para as análises cromatográficas.

2.2 Reagentes e solventes

Os padrões e padrões internos utilizados para a análise dos HPAs foram todos de pureza analítica (Fluka, Aldrich e Supelco) e estão listados a seguir: acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e benzo(a)pireno. Esses padrões foram selecionados de acordo com os HPAs, monitorados pela Agência de Proteção Americana (*USEPA*). Como padrão interno utilizaram-se naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12, pirileno-d12 e o p-terfenil-d14, e como solventes, acetonitrila, metanol, etanol (J.T. Backer, USA) e diclorometano, hexano e acetato de etila (Tedia, USA), todos de pureza cromatográfica. A água utilizada foi previamente destilada e, em seguida, deionizada por um sistema Milli-Q plus (Millipore).

2.3 Equipamentos e materiais

Os equipamentos e materiais utilizados foram: Balança analítica marca Marte modelo AM – 220, com resolução de 0,1mg; Deionizador Millipore, Bedford, MA, USA; Evaporador rotatório (Fisatom 802D); Compressor aspirador, FANEM (modelo 089-CRL); Manifold (coletor) para SPE, Varian; Cromatógrafo a gás Varian CP 3800, acoplado a espectrômetro de massas Varian 4000 MS íon Trap, autoinjeter – CP 8400; Micropipeta 10-25 μL (Drummond Microdispenser, made in USA); Micropipeta 50-100 μL (Nichiryo model 800); Cartucho C_{18} (octadecil silano) Supelco 3 mL, com 500 mg de fase sólida.

2.4 Preparo da solução padrão

A partir de uma solução estoque contendo 16 HPAs de concentração 2000,0 mg L^{-1} , procederam-se as diluições sucessivas em acetato de etila, sendo preparados 6 níveis de concentração, nos intervalos de 2,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 140,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para os seguintes compostos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno. Para os demais HPAs, o primeiro ponto da curva foi 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todas as soluções foram estocadas sob refrigeração, à temperatura de aproximadamente 4°C.

Na construção da curva analítica, foram adicionados cinco padrões internos na concentração de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os HPAs foram agrupados e, para cada grupo, foi utilizado um padrão interno. Para o naftaleno, o padrão interno utilizado foi o naftaleno d-8; já para o acenaftileno, acenafteno e fluoreno, foi usado o acenafteno d-10, para o fenantreno, antraceno e fluoranteno, o padrão usado foi o fenantreno d-10. O criseno d-12 foi utilizado na quantificação do

pireno, benzo(a)antraceno, criseno e indeno(1,2,3-cd)pireno e, por último, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno foram quantificados por perileno d-12. O p-terfenil d14 foi utilizado como surrogate na concentração de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Na construção da curva, foram preparadas duplicatas dos padrões.

2.5 Teste de solubilidade na preparação da curva

Seguindo o mesmo procedimento para os padrões, procederam-se às diluições sucessivas em acetona e, na matriz, foram preparados os mesmos níveis de concentração anteriores.

2.6 Extração das amostras

Os procedimentos utilizados para as análises dos HPAs seguiram as recomendações de Dórea et al. (2008). A extração foi realizada pela técnica de SPE. Cada cartucho foi ativado com 5,0 mL de diclorometano, 5,0 mL de metanol e, por último, 5,0 mL de água. Depois de condicionados, passaram-se através deles alíquotas de 60,0 mL, previamente preparada com 50,0 mL da amostra, 10,0 mL de acetonitrila e 50,0 μL de solução de surrogate ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$). Os analitos foram eluídos com 50,0 mL de acetato de etila. O extrato coletado foi concentrado em evaporador rotatório e adicionados 50,0 μL da mistura de padrão interno ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$). O volume final foi ajustado sob um suave fluxo de nitrogênio, reconstituído em 1,0 mL de acetato de etila. A extração das amostras foi realizada em duplicata.

2.7 Análise quantitativa dos HPAs

As separações cromatográficas por GC/MS foram realizadas empregando a coluna HP 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As condições cromatográficas para GC/MS foram: 40°C por 1 min, 40°C/min até 120°C por 1 min, depois 5°C/min até 300°C por 5 min, depois 20°C/min até 220°C por 1 min, totalizando 45 min. Fluxo 1,0 mL/min, temperatura do injetor 250°C, temperatura do trap 220°C, temperatura do manifold 50°C, e temperatura do injetor 280°C. Modo de injeção splitless. Injeção de 1,0 μ L.

A quantificação foi realizada através das curvas analíticas de cada HPA, plotando, na ordenada, a relação entre a área do analito e a área do padrão interno e, na abscissa, a relação entre a concentração do analito e a concentração do padrão interno que o quantifica. As concentrações dos analitos foram calculadas utilizando as equações 1 e 2.

$$C_{\text{Analito}} = \frac{C_{\text{PI}} \times \text{Área}_{\text{Analito}}}{\text{FR} \times \text{Área}_{\text{PI}}} \quad (1)$$

$$\text{FR} = \frac{C_{\text{PI}} \times \text{Área}_{\text{p}}}{C_{\text{p}} \times \text{Área}_{\text{PI}}} \quad (2)$$

Em que C_{p} é a concentração do padrão, C_{PI} é a concentração do padrão interno, e **FR** é o fator de resposta.

O fator de resposta é uma constante de proporcionalidade entre as concentrações injetadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração das amostras

A quantificação dos HPAs foi realizada através da padronização interna e o espectrômetro de massas foi operado com monitoramento seletivo de íon (SIM), garantindo uma maior sensibilidade. Os íons monitorados dos respectivos HPAs e o tempo de retenção estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros de aquisição de dados no detector de massas

| Pico | Compostos | Abrev | t _R (min) | Íons* |
|------|------------------------|-------|----------------------|------------------------------|
| | naftaleno-d8 | - | 6,032 | <u>136</u> |
| 1 | naftaleno | Naf | 6,069 | <u>128</u> , 129, 127 |
| 2 | acenaftileno | Acti | 10,407 | <u>152</u> , 151, 153 |
| | acenafteno-d10 | - | 10,972 | <u>162</u> , 164, 160 |
| 3 | acenafteno | Acte | 11,090 | <u>153</u> , 154, 152 |
| 4 | fluoreno | Flu | 13,029 | <u>165</u> , 166 |
| | fenantreno-d10 | - | 16,902 | <u>188</u> , 187 |
| 5 | fenantreno | Fen | 16,993 | <u>178</u> , 179, 176 |
| 6 | antraceno | Ant | 17,191 | <u>178</u> , 176, 179 |
| 7 | fluoranteno | Flut | 22,354 | <u>202</u> , 203 |
| | p-terfenil d14 | - | 24,535 | <u>244</u> , 243 |
| 8 | pireno | P | 23,296 | <u>202</u> , 200, 203 |
| 9 | benzo(a)antraceno | BaA | 28,931 | <u>228</u> , 226, 229 |
| | criseno-d12 | - | 28,971 | <u>240</u> , 236 |
| 10 | criseno | Cri | 29,100 | <u>228</u> , 226, 229 |
| 11 | benzo(b)fluoranteno | BbFlu | 33,609 | <u>252</u> , 253 |
| 12 | benzo(k)fluoranteno | BkFlu | 33,716 | <u>252</u> , 253 |
| | Pirileno-d12 | - | 35,073 | <u>264</u> , 260, 265 |
| 13 | benzo(a)pireno | BaP | 34,826 | <u>252</u> , 250, 253 |
| 14 | indeno(1,2,3,cd)pireno | IcdP | 38,906 | <u>276</u> , 277, 274 |
| 15 | dibenzo(a,h)antraceno | DahA | 39,128 | <u>278</u> , 279, 276 |
| 16 | benzo(g,h,i)perileno | BgPe | 39,710 | <u>276</u> , 277, 274 |

*Os compostos foram identificados baseados na abundância relativa dos íons.

Íons em negrito e sublinhado representa o pico-base. t_R = tempo de retenção.

Os íons sublinhados e em negrito correspondem ao fragmento de massas do pico base. Os demais íons foram também monitorados levando em conta a abundância relativa, para facilitar a identificação do analito.

3.2 Solubilidade dos padrões

Em função da baixa solubilidade dos HPAs, a qual decresce com o aumento da massa molar, a preparação dos respectivos compostos, seja na amostragem, seja na extração ou clean-up, pode ser prejudicada por causa da sua adsorção nas paredes dos recipientes. Na extração de HPAs em cachaça, Dórea et al., (2008) recomendam a adição de acetonitrila à amostra, antes da extração, para evitar esse problema. Foram observadas diferenças na resposta dos HPAs em relação ao solvente utilizado na preparação dos padrões. No preparo da curva analítica foram testados três solventes: a acetona, acetato de etila e a matriz.

Pela comparação dos resultados, verificou-se que a maioria dos analitos é solúvel em acetato de etila, com exceção do naftaleno, que apresentou uma área maior quando o solvente utilizado foi acetona. No Gráfico 1 verifica-se a sobreposição dos cromatogramas do padrão de naftaleno ($200,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em acetona e em acetato de etila. Isso se deve ao caráter mais polar do naftaleno em relação aos demais compostos da série; portanto, se dissolve com mais facilidade em solventes de natureza mais polar, como é o caso da acetona. Por outro lado, o aumento da massa molar desses contaminantes favorece o aumento do caráter apolar, o que explica a facilidade de dissolução em acetato de etila, solvente de natureza mais apolar.

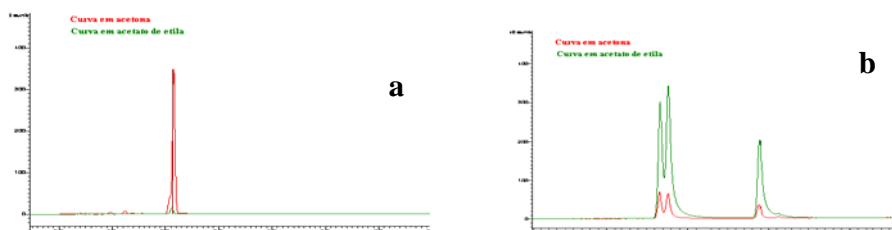


Gráfico 1 Sobreposição dos cromatogramas referente ao pico do naftaleno (a) e do benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno (b) para a curva de HPAs preparada em acetona e acetato de etila

O efeito da solubilidade dos HPAs em acetato de etila é observado em toda a série desse grupo de compostos; porém, é mais acentuado nos HPAs de cadeias maiores, como o benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, que apresentaram uma melhor resposta em acetato de etila (Gráfico 2).

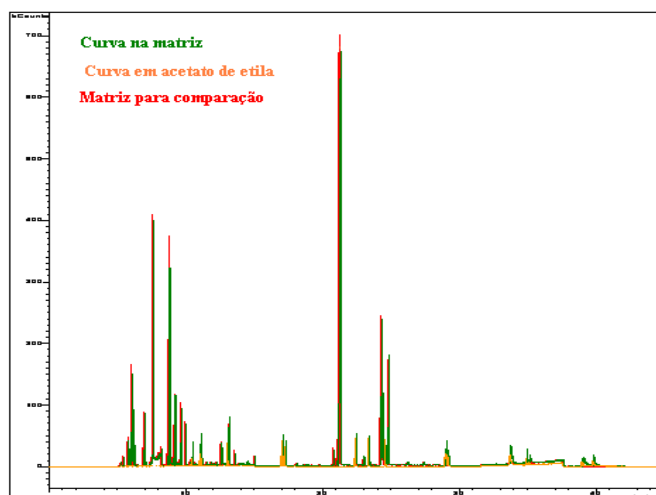


Gráfico 2 Cromatogramas com sobreposição dos picos dos padrões em acetato de etila e em matriz e uma matriz isenta dos padrões

Apesar de a cachaça conter uma grande quantidade de compostos, a curva construída na matriz apresentou melhor resultado, quando comparada aos dois solventes testados. A maioria dos interferentes presentes na bebida apresentou tempo de retenção menor que 10 minutos, não comprometendo a separação dos HPAs que saem após esse tempo com exceção do naftaleno. Na Figura 2 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas dos padrões em acetato de etila e na matriz. Um terceiro cromatograma, da matriz, isenta dos padrões, para efeito de comparação, também foi sobreposto aos outros dois. A análise dos cromatogramas mostrou que a matriz apresenta um poder maior de dissolução sobre os HPAs, pois os picos mostraram-se mais intensos e os interferentes presentes na bebida não comprometem a identificação dos HPAs.

Os cromatogramas dos padrões em acetona, acetato de etila e na matriz apresentaram picos bem separados; porém, com diferenças na resposta para alguns analitos. Assim, para a quantificação dos HPAs em cachaça, preparou-se a curva na matriz.

3.3 Separação cromatográfica

A análise dos HPAs apresentou uma boa separação para uma solução contendo a mistura de 16 padrões de HPAs, preparada na matriz, em que a separação cromatográfica foi alcançada em 45 minutos (Gráfico 3).

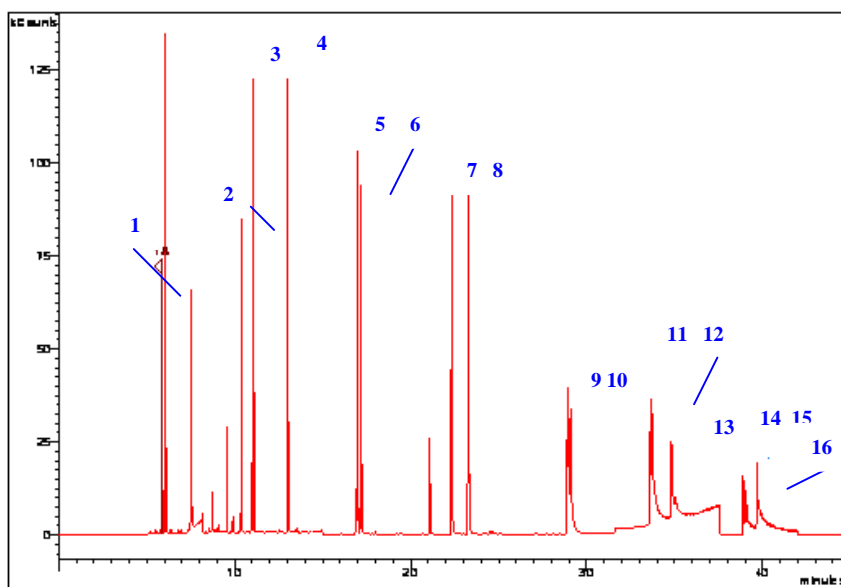


Gráfico 3 Cromatogramas da curva na matriz contendo os 16 padrões de HPAs

No cromatograma referente ao Gráfico 3, os picos foram numerados e os compostos referentes a cada pico estão descritos na Tabela 1. Observa-se uma boa separação; porém, os HPAs mais pesados apresentaram cauda.

3.4 Quantificação dos HPAs

A determinação das concentrações dos HPAs na amostra foi realizada com base na equação 1, mas, inicialmente, calculou-se o fator de resposta de cada analito de acordo com a equação 2.

Os dados referentes às curvas analíticas dos HPAs em cachaaças estão representados na Tabela 2. Observam-se coeficientes de correlação superiores a 0,999 (Snyder et al., 1997), indicando forte correlação linear entre as concentrações das substâncias e as áreas dos picos, com exceção dos HPAs maiores, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno,

indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,hi)perileno, cujos coeficientes de correlação foram de 0,9970, 0,9907 e 0,9973, 0,9975, 0,9981 e 0,9832, respectivamente. Esses resultados corroboram com aqueles apresentados por Galinaro; Cardoso e Franco (2007), exceto para benzo(k)fluoranteno e benzo(g,hi)perileno, cujos valores de coeficiente foram menores.

Tabela 2 Curvas analíticas e coeficientes de determinação (r^2) usadas na quantificação dos HPAs

| Compostos | r^2 | Equação da reta |
|------------------------|--------|----------------------------------|
| Naftaleno | 0,9996 | $y = 1,492895885x + 0,180749347$ |
| Acenaftileno | 0,9994 | $y = 2,055612805x + 0,013388301$ |
| Acenafteno | 0,9996 | $y = 1,599619607x + 0,015626731$ |
| Fluoreno | 0,9996 | $y = 1,748509506x + 0,003076294$ |
| Fenantreno | 0,9994 | $y = 1,530530303x + 0,016059877$ |
| Antraceno | 0,9994 | $y = 1,381200887x - 0,003813355$ |
| Fluoranteno | 0,9998 | $y = 1,880816903x - 0,024760200$ |
| Pireno | 0,9994 | $y = 2,163521220x - 0,049731281$ |
| Benzo(a)antraceno | 0,9998 | $y = 1,047899198x + 0,004516105$ |
| Criseno | 0,9999 | $y = 0,596263225x + 0,007414658$ |
| Benzo(b)fluoranteno | 0,9940 | $y = 1,434858315x - 0,102310673$ |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,9810 | $y = 3,167310618x - 0,583705859$ |
| Benzo(a)pireno | 0,9946 | $y = 1,335377960x - 0,115871872$ |
| Indeno(1,2,3,cd)pireno | 0,9950 | $y = 0,454772032x - 0,000500163$ |
| Dibenzo(a,h)antraceno | 0,9962 | $y = 0,517071876x - 0,043809610$ |
| Benzo(g,h,i)perileno | 0,9667 | $y = 2,182448535x - 0,503732702$ |

Cavalcante et al. (2008) quantificaram HPAs em sedimento de estuário e encontraram para o coeficiente de determinação(r^2) valores que variaram de 0,9899 a 0,9989. Esses valores são condizentes com os menores coeficientes de determinação encontrados em nosso trabalho. Os resultados das análises de HPAs em cachacas acondicionadas em vidros e bombonas de PEAD estão descritos nas Tabelas 3 e 4. Observa-se na bebida acondicionada em vidro a presença dos contaminantes de massa molar mais baixa, como naftaleno,

fluoreno e fenantreno. Desses, somente o fluoreno apresentou limite menor que o permitido, enquanto aqueles de quatro ou mais anéis, não foram detectados, exceto o pireno e o fluoranteno, que foi detectado, mas em concentração abaixo do limite de detecção.

Nas cachaças acondicionadas em vidros, não foram encontrados acenafteno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(a)pireno, criseno, benzo(k)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno. Resultados similares foram obtidos pelos pesquisadores Bettin e Franco (2005), que não detectaram a presença do benzo(a)antraceno e criseno em aguardentes provenientes de cana não queimada.

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que somente em duas amostras de cachaça armazenada em bombonas não foram detectados HPAs com massas molares mais elevadas, acima de 4 anéis. Nas demais cachaças, esses compostos estão presentes e em uma concentração superior ao limite estabelecido pela legislação Escocesa e Alemã (DENNIS; MASSEY, 1983; MORET; CONTE, 2000). As duas bebidas (vidro e bombona) mostraram um perfil qualitativo e quantitativo diferente para os HPAs. Observam-se que os compostos comuns às duas bebidas apresentam até 3 anéis, mas a diferença marcante está na presença dos contaminantes mais pesados nas amostras acondicionadas em recipientes de plástico, tipo bombonas.

Tabela 4 Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) de HPAs em amostras de cachaça acondicionadas em bombonas de PEAD

| Amostras | URP1 | URP2 | URP3 | URP4 | URP5 | NAP1 | NAP2 | NAP3 | NAP4 | NAP5 |
|------------------------|------|------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|
| Compostos | | | | | | | | | | |
| Naftaleno | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Acenaftileno | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | ND | ND | < LD | < LD | < LD |
| Acenafteno | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Fluoreno | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | ND |
| Fenantreno | 2,73 | 3,57 | 3,23 | 20,38 | 3,13 | 5,87 | < LD | 6,54 | 8,48 | 9,73 |
| Antraceno | < LD | < LD | ND | ND | ND | < LD | ND | < LD | < LD | ND |
| Fluoranteno | 2,35 | < LD | 2,01 | 4,47 | < LD | 3,86 | < LD | 2,88 | 2,89 | 5,82 |
| Pireno | < LD | < LD | 26,08 | 2,74 | < LD | < LD | ND | < LD | 2,37 | 3,31 |
| Benzo(a)antraceno | ND | ND | < LD | 3,12 | < LD | 2,95 | < LD | 2,84 | 2,58 | 3,10 |
| Criseno | < LD | ND | 9,80 | 16,42 | 9,91 | 14,14 | 8,82 | 15,20 | 12,68 | 14,85 |
| Benzo(b)fluoranteno | ND | ND | < LD | 5,50 | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Benzo(k)fluoranteno | ND | ND | < LD | 9,46 | < LD | 6,59 | < LD | 7,21 | 7,20 | 7,56 |
| Benzo(a)pireno | ND | ND | < LD | 5,87 | < LD | < LD | < LD | < LD | 5,33 | 5,81 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | ND | ND | < LD | 9,95 | < LD | 5,40 | < LD | 6,53 | 7,32 | 7,64 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | ND | ND | 17,44 | 26,29 | 9,66 | 16,41 | 8,95 | 12,82 | 19,56 | 21,83 |
| Benzo(g,h,i)perileno | ND | ND | 7,85 | 12,58 | < LD | 7,85 | < LD | 7,76 | 8,99 | 10,13 |

ND – Não detectado < LD menor que o limite de detecção.

Na Tabela 5, encontram-se descritas as concentrações médias dos HPAs presentes nas bebidas armazenadas nos dois diferentes recipientes. Observa-se para as cachaças armazenadas em vidros a presença do naftaleno e fenantreno, cuja concentração foi superior a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, valor limite para alimentos. Nas cachaças acondicionadas em bombonas, detectou-se a presença de 13 HPAs, dos 16 avaliados, dos quais 9 apresentaram concentrações superiores ao permitido em alimentos.

Tabela 5 Concentração média de HPAs em amostras de cachaça acondicionadas em vidros e em bombonas, em $\mu\text{g L}^{-1**}$

| HPAS | *Limite | Cachaça (vidro) | Cachaça (bombonas) | LD | LQ |
|------------------------|---------|-----------------|--------------------|------|------|
| Naftaleno | 1,00 | 3,61 | < LD | 1,18 | 3,53 |
| Acenaftileno | - | < LD | < LD | 0,31 | - |
| Acenafteno | 1,00 | ND | ND | 0,80 | 2,40 |
| Fluoreno | 1,00 | 0,32 | ND | 1,37 | 4,13 |
| Fenantreno | 1,00 | 2,96 | 2,44 | 1,34 | 4,03 |
| Antraceno | 1,00 | ND | ND | 1,58 | 4,76 |
| Fluoranteno | 2,00 | < LD | 2,66 | 1,13 | 3,40 |
| Pireno | 2,00 | < LD | 3,45 | 1,78 | 5,34 |
| Benzo(a)antraceno | 2,00 | ND | 1,46 | - | 7,22 |
| Criseno | 2,00 | ND | 10,18 | 1,98 | 5,95 |
| Benzo(b)fluoranteno | 2,00 | ND | 0,55 | 0,49 | - |
| Benzo(k)fluoranteno | 2,00 | ND | 3,80 | 1,58 | - |
| Benzo(a)pireno | 2,00 | ND | 2,20 | 0,99 | - |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | - | ND | 3,68 | 1,87 | 5,63 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | 2,00 | ND | 13,30 | 0,68 | - |
| Benzo(g,h,i)perileno | 2,00 | ND | 5,52 | 0,58 | - |
| HPAs total | 25 | 6,89 | 49,24 | | |

* Limite estabelecido pela legislação escocesa. (DENNIS; MASSEY, 1983)

**Valor médio ($\mu\text{g L}^{-1}$) com base no resultado de 10 amostras para cada recipiente.

LD – valores abaixo do limite de detecção. ND – Não detectado.

LD limite de detecção; LQ limite de quantificação.

Os limites de detecção e de quantificação obtidos neste trabalho, para cada HPA, são maiores que os descritos por Galinaro, Cardoso e Franco (2007) e Bettin e Franco (2005).

Os valores encontrados para os HPAs nas cachaças acondicionadas em bombonas de polietileno são superiores aos relatados na literatura para cachaça procedente de cana queimada. O benzo(a)pireno foi detectado somente nas cachaças procedentes de bombonas .

Caruso e Alaburda (2009) quantificaram benzo(a)pireno em 20 amostras de cachaças, cujas concentrações variaram de não detectado ($LD < 0.03 \mu\text{g L}^{-1}$) a $0.49 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos por outros autores. Bettin e Franco (2005) analisaram 28 amostras de cachaça provenientes de cana queimada e não queimada e encontraram níveis de benzo(a)pireno entre $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ a $1,55 \mu\text{g L}^{-1}$, relatando que houve uma maior contaminação nas cachaças produzidas a partir de cana queimada. Tfouni et al. (2007) analisaram 25 marcas de cachaça e encontraram níveis de BaP que variaram de $0,011 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$. Paralelamente, nesse mesmo ano, Galinaro; Cardoso e Franco, analisando HPAs em 131 amostras de cachaça provenientes de cana queimada e não queimada, encontraram valores de $0,045 \mu\text{g L}^{-1}$ para benzo(a)pireno.

A legislação brasileira não estabeleceu limite de benzo(a)pireno em bebidas alcoólicas; no entanto, o regulamento europeu estabelece um limite máximo de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para alimentos,

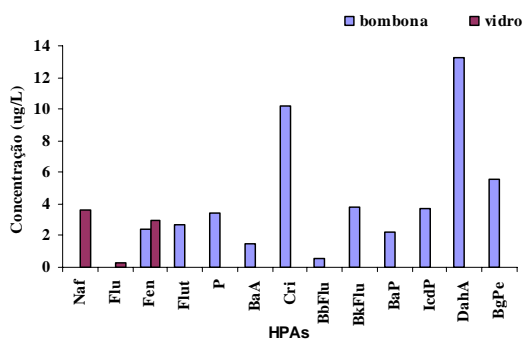


Gráfico 4 Histograma da concentração de HPAs em amostras de cachaças acondicionadas em vidro e bombonas de PEAD

No gráfico 4, observa-se a presença do fenantreno nas amostras de cachaça acondicionadas em vidros, e em uma concentração ligeiramente menor, nas cachaças acondicionadas em bombonas, sugerindo que a contaminação da bebida com fenantreno ocorreu antes do acondicionamento. O fluoreno, da mesma forma, pois foi detectado nos dois tipos de bebida, apesar de que nas amostras armazenadas em bombona, foi abaixo do limite de detecção. Partindo do pressuposto de que a diferença das bebidas está no recipiente de acondicionamento, pode-se inferir que a bombona de polietileno de alta densidade é uma fonte de contaminação de HPAs de cadeias maiores, acima de 4 anéis.

4 CONCLUSÕES

Nas cachaças acondicionadas em bombonas, identificou-se a presença de 13 HPAs dos 16 avaliados, dos quais 9 apresentaram concentrações superiores ao permitido em alimentos. Já as amostras acondicionadas em vidros, somente 3 HPAs foram identificados, dos quais dois deles, apresentaram limites acima da legislação. A adubação nitrogenada da cana não interferiu na formação de HPAs na cachaça.

As concentrações de HPAs, nas amostras de cachaças armazenadas em bombonas de polietileno de alta densidade, foram superiores às aquelas armazenadas em recipientes de vidro, indicando o recipiente de plástico como fonte de contaminação de HPAs em cachaça.

REFERÊNCIAS

BETTIN, S. M.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 234-238, abr./jun. 2005.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Optimization of the benzo(a)pyrene determination procedure in cachaça. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 502-508, 2009.

CAVALCANTE, R. M. et al. Técnicas de extrações e procedimentos de *clean-up* para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em sedimentos da costa do Ceará. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p.1371-1377, 2008.

DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C. Analysis of polycyclic hydrocarbons in UK total diets. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 569-574, Oct. 1983.

DÓREA, H. S. et al. Análise de poluentes orgânicos tóxicos na cachaça. **Revista da Fapese**, Aracajú, v.4, n. 2, p.5-18, jul./dez. 2008.

GALINARO, C. A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO D. W. Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian sugar cane spirits: discrimination between cachaças produced from nonburned and burned sugar cane crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 8, p. 3141-3147, Apr. 2007.

MORET, S.; CONTE, L. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: Occurrence and analytical methods. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 882, n. 1/2, p. 245-253, June 2000.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS.
Cachaça artesanal estudos de mercado. Brasília, 2008. 42 p. Disponível em:
<<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em: 30 jun. 2010.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development.** 2nd ed. New York: J. Wiley, 1997. p. 694-697.

TFOUNI, A. V. S. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaca by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 334-338, 2007.

ANEXOS**ANEXO A – Reações referentes aos parâmetros físico-químicos**

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figura 1A | Reações envolvidas na análise de álcoois superiores..... | 258 |
| Figura 2A | Reações envolvidas na análise de aldeídos..... | 259 |
| Figura 3A | Reações envolvidas na análise de furfural..... | 260 |
| Figura 4A | Reações envolvidas na análise de ésteres..... | 260 |
| Figura 5A | Reações envolvidas na análise de cobre | 261 |
| Figura 6A | Reações envolvidas na análise de metanol..... | 262 |

1 Álcoois superiores

Um dos métodos oficiais de determinação de álcoois superiores em bebidas envolve a reação prévia, em meio ácido, entre o p-dimetilaminobenzaldeído e os álcoois superiores presentes, formando um composto colorido em absorve a 540 nm, conforme apresentado na Figura 1A. Nesta reação os álcoois reagem por adição à carbonila do aldeído, em meio ácido com formação de acetais. A quantificação é baseada na curva analítica construída com uma solução de álcool isoamílico.

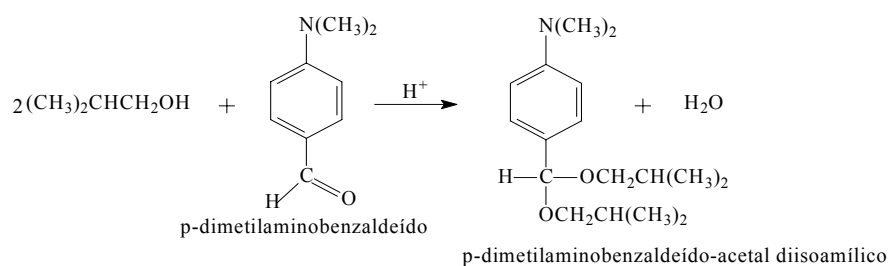


Figura 1A Reações envolvidas na análise de álcoois superiores

2 Aldeídos

O método baseia-se na reação de adição, com ataque nucleofílico do íon bissulfito à carbonila do aldeído seguido da ligação do próton ao oxigênio carbonílico. Por se tratar de uma reação reversível em meio ácido e em meio alcalino, trabalha-se inicialmente com solução tamponante a pH neutro. O bissulfito em excesso reage com iodo, em meio fortemente ácido (pH 2,0), para impedir a dissociação dos compostos aldeído-bissulfito, que é estável neste pH. Finalmente, o bissulfito que está combinado com o aldeído é liberado em meio alcalino (pH 9,0), sendo titulado com a solução de iodo (Figura 2A).

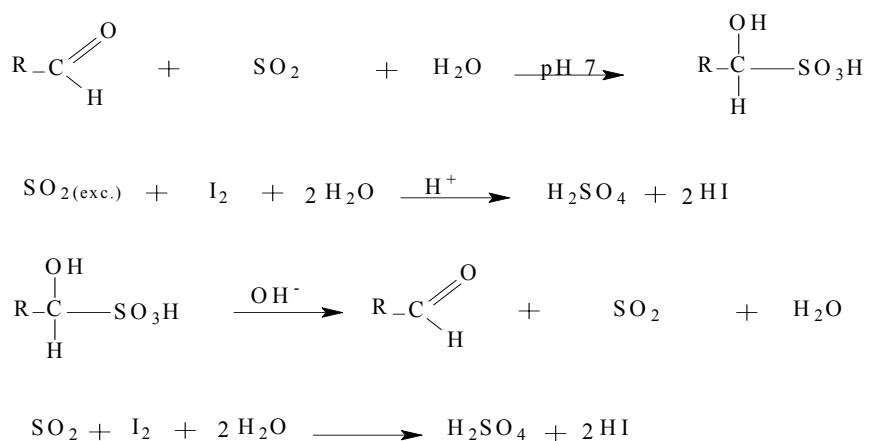


Figura 2A Reações envolvidas na análise de aldeídos

3 Furfural

A determinação do furfural baseia-se na reação entre amina e aldeídos ou cetonas formando um composto denominado imina. A imina formada entre furfural e anilina, em meio ácido, absorve em 520 nm, como mostrado na Figura 3A. A quantificação de furfural é feita por meio da curva analítica do padrão.

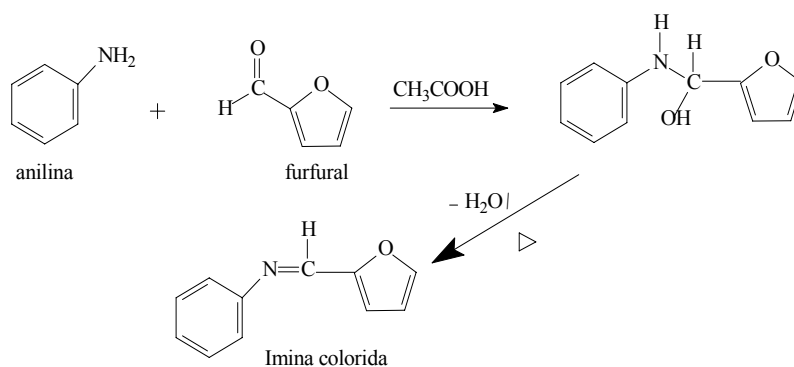


Figura 3A Reações envolvidas na análise de furfural

4 Ésteres

A quantificação dos ésteres é feita a partir da hidrólise alcalina destes, presentes na cachaça, seguida da titulação dos ácidos liberados com solução padronizada de hidróxido de sódio, demonstrado na Figura 4A.

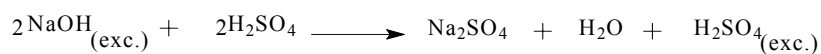


Figura 4A Reações envolvidas na análise de ésteres

5 Cobre

A análise de cobre ocorre após redução do Cu^{2+} presente na bebida a Cu^{1+} formando posteriormente um complexo colorido com a solução de 2,2 diquinolilo em álcool isoamílico (Figura 5A). As leituras são realizadas em espectrofotômetro a 546 nm.

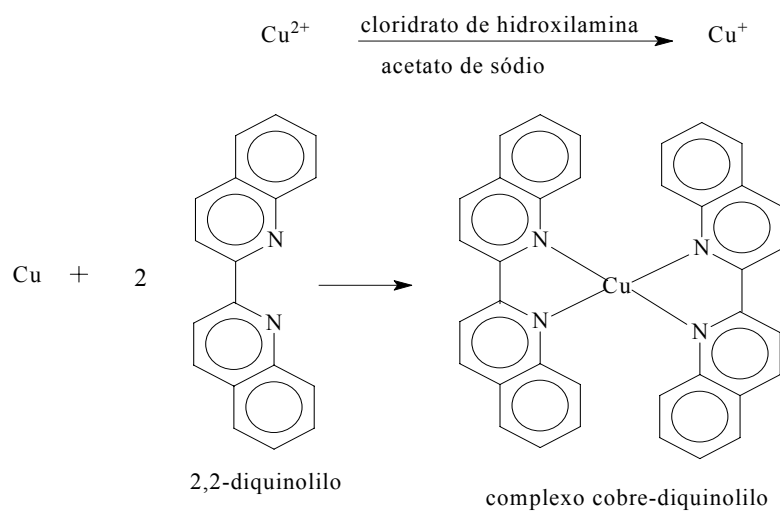


Figura 5A Reações envolvidas na análise de cobre

6 Metanol

O método espectrofotométrico do ácido cromotrópico em meio de ácido sulfúrico concentrado se destaca no contexto analítico por apresentar grande sensibilidade e alta seletividade. Nesse método, o metanol oxida o formaldeído, que reage com o ácido cromotrópico em meio sulfúrico concentrado produzindo um composto colorido (dibenzoxantílica monocatiônica) que tem seu máximo de absorção a 575 nm. A quantificação é realizada por construção de curva analítica (Figura 6A).

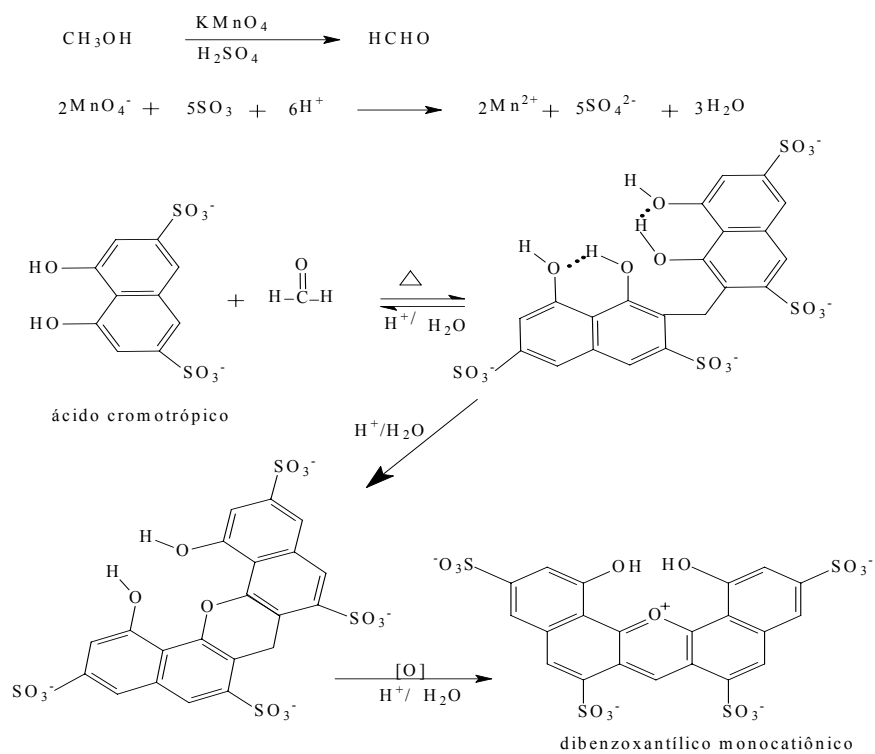


Figura 6A Reações envolvidas na análise de metanol

ANEXO B – Caracterização do carbamato de xantil etila

| | | |
|------------|---|-----|
| Tabela 1B | Temperatura de fusão do CNXE..... | 264 |
| Tabela 2B | Bandas espectrais dos grupos específicos no infravermelho para CE, CNXE. E Xantidrol... | 264 |
| Gráfico 1B | Cromatograma de íons totais do CNXE..... | 264 |
| Gráfico 2B | Espectro de massas do CNXE..... | 265 |
| Figura 1B | Fragmentações de massas do CNXE. | 265 |

Tabela 1B Temperatura de fusão do CE, CNXE e do xantidrol

| Composto | Tf observado (°C)* | Tf literatura (°C) |
|-----------|--------------------|--------------------|
| CE | - | 48 |
| CNXE | 168±2 | 169 |
| Xantidrol | 125±2 | 126 |

*Média de três repetições.

Tabela 2B Bandas espectrais no infravermelho para CE, CNXE e xantidrol

| Composto | Frequência (cm ⁻¹) | Atribuição |
|-----------|--------------------------------|--|
| CE | 3450, 3400 | duas bandas de deformação axial N-H amida primária |
| | 1700 | C=O |
| | 3400 | uma banda de deformação N-H amida secundária |
| CNXE | 1750 | C=O |
| | 1610, 1645 | C=C aromático |
| | 1150 | banda intensa C-O-C |
| | 3350 | O-H |
| Xantidrol | 1610, 1465 | C=C aromático |
| | 1150 | banda intensa C-O-C |

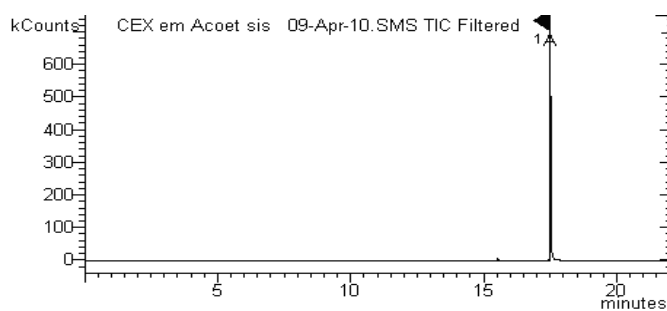


Gráfico 1B Cromatograma de íons totais do CNXE

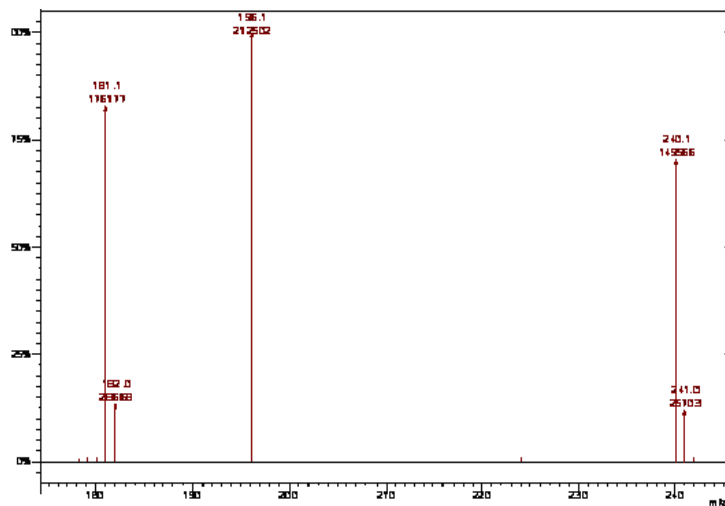


Gráfico 2B Espectro de massas do CNXE

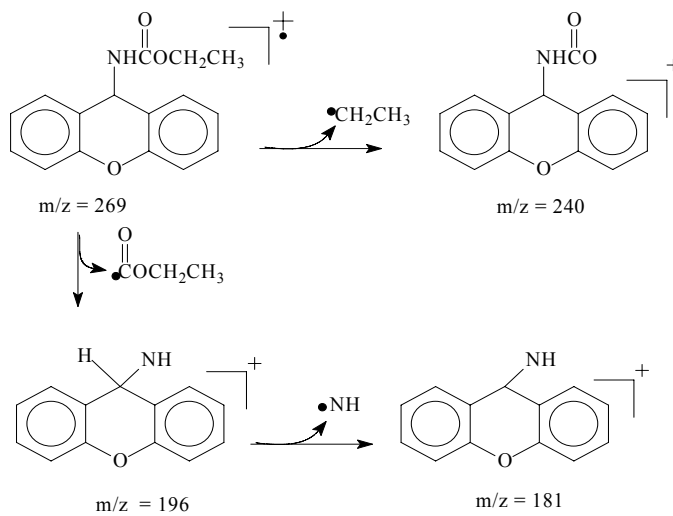


Figura 1B Fragmentações propostas para o carbamato de N-xantil etila

ANEXO C Desenvolvimento do método para análise de CNXE por CLAE

| | | |
|------------|---|-----|
| Gráfico 1C | Cromatograma referente ao CNXE 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ programação n° 1 Fase móvel água e metanol | 267 |
| Gráfico 2C | Cromatograma referente ao CNXE 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ programação n° 2 Fase móvel água e metanol | 267 |
| Gráfico 3C | Cromatograma referente ao CNXE 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ programação n° 3 Fase móvel água e metanol | 267 |
| Gráfico 4C | Cromatograma referente ao CNXE 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ programação n° 4 Fase móvel água e metanol | 268 |
| Gráfico 5C | Cromatograma referente ao CNXE 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ programação n° 4 fase móvel água e acetonitrila. | 268 |
| Gráfico 6C | Cromatograma referente ao CNXE 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ programação n° 4 Fase móvel tampão acetato de sódio e acetonitrila. | 269 |

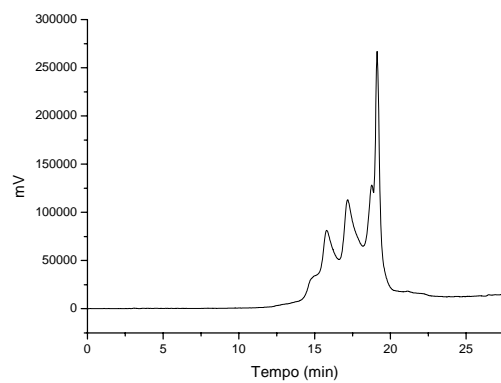


Gráfico 1C Cromatograma referente à programação n° 1 do CNXE

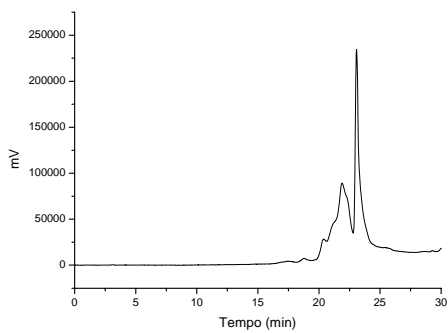


Gráfico 2C Cromatograma referente à programação n° 2 do CNXE

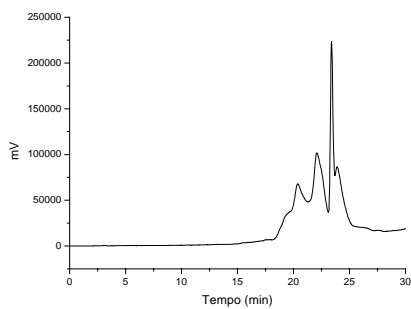


Gráfico 3C Cromatograma referente à programação n° 3 do CNXE

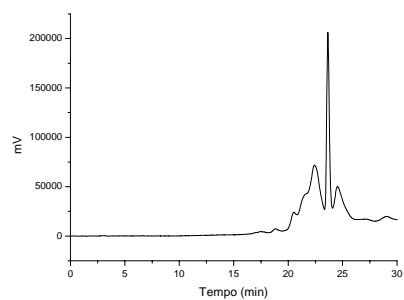


Gráfico 4C Cromatograma referente à programação n°4 do CNXE

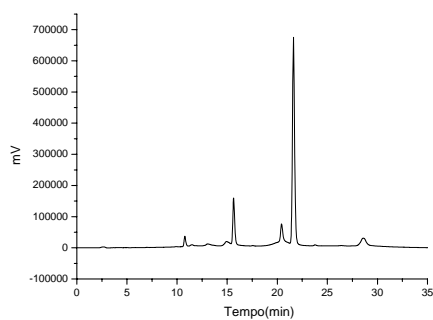


Gráfico 5C Cromatograma referente à programação n°4 do CNXE fase móvel água/acetonitrila.

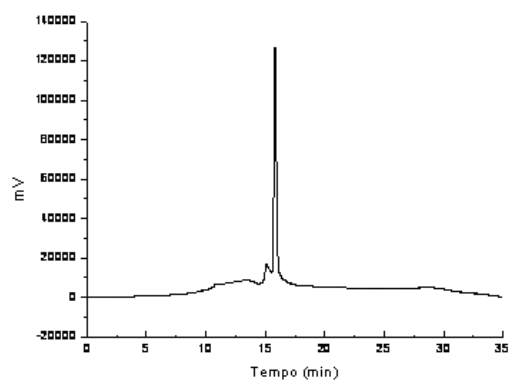


Gráfico 6C Cromatograma referente à programação n°4 do CNXE fase móvel tampão de acetato de sódio/acetonitrila