

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CARBAMATO
DE ETILA: CARACTERIZAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO EM DIFERENTES
PERÍODOS DO ENVELHECIMENTO DA
CACHAÇA EM TONEL DE CARVALHO
(*Quercus* sp)**

JEANCARLO PEREIRA DOS ANJOS

2010

JEANCARLO PEREIRA DOS ANJOS

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CARBAMATO DE ETILA:
CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO EM DIFERENTES
PERÍODOS DO ENVELHECIMENTO DA CACHAÇA EM TONEL DE
CARVALHO (*Quercus* sp)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

Anjos, Jeancarlo Pereira dos.

Compostos fenólicos e carbamato de etila: caracterização e
quantificação em diferentes períodos de envelhecimento da cachaça
em tonel de carvalho (*Quercus* sp) / Jeancarlo Pereira dos Anjos. –
Lavras : UFLA, 2010.

135 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Cromatografia. 2. Armazenamento. 3. Aguardente. 4.
Características físico-químicas. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 663.53

JEANCARLO PEREIRA DOS ANJOS

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CARBAMATO DE ETILA:
CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO EM DIFERENTES
PERÍODOS DO ENVELHECIMENTO DA CACHAÇA EM TONEL DE
CARVALHO (*Quercus* sp)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2010

Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea UFS

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, pela conquista de mais uma vitória.

A minha família,
pela compreensão, apoio e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida.

A meus familiares, pela paciência, compreensão nos meus momentos de ausência, apoio e incentivo.

À Prof^a Maria das Graças Cardoso, pela confiança, ensinamentos, amizade e por todas as oportunidades concedidas nesses anos de convivência.

À Prof^a Adelir Aparecida Saczk, pelo apoio no desenvolvimento das análises cromatográficas e pela amizade.

Ao Prof. Haroldo Silveira Dórea (UFS), pela oportunidade de acompanhar os trabalhos desenvolvidos no LCP/UFS.

À Prof^a Rosane Freitas Schwan (DBI/UFLA), pelas oportunidades concedidas ao longo de minha formação.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Sr. João Mendes e sua família, produtores da Cachaça Artesanal João Mendes, pela valiosa contribuição, ao nos ceder as amostras de cachaça.

Aos professores do DQI/UFLA, pelos ensinamentos e amizade e a todos os funcionários do Depto. de Química.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica: Lidiany, Wilder, Felipe, Leonardo, João, José Masson, Milene, Juliana, Aline, Paula, Marcos, Rafaela, Luís Gustavo, Lucilene, Cíntia, Maria Luíza, Rodrigo e Renata, pela boa convivência e amizade. Em especial, à Ana Maria, pelo companheirismo, amizade e valiosas contribuições.

À Fapemig e ao Programa Reuni/Capes, pelo suporte financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 A cachaça.....	4
2.2 Produção de cachaça artesanal.....	6
2.2.1 Compostos secundários e contaminantes na cachaça.....	14
2.2.2 Carbamato de etila.....	23
2.3 Envelhecimento da cachaça.....	30
2.3.1 Compostos fenólicos.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Obtenção das amostras.....	43
3.2 Análises físico-químicas estabelecidas pela legislação brasileira.....	44
3.2.1 Grau alcoólico.....	44
3.2.2 Extrato seco.....	44
3.2.3 Acidez volátil.....	45
3.2.4 Álcoois superiores.....	45
3.2.5 Aldeídos.....	46
3.2.6 Furfural.....	46
3.2.7 Ésteres.....	47

3.2.8 Metanol	48
3.2.9 Cobre.....	49
3.3 Compostos fenólicos totais	50
3.4 Intensidade da cor	50
3.5 Análises cromatográficas.....	50
3.5.1 Compostos fenólicos.....	51
3.5.1.1 Preparação dos padrões e amostras.....	51
3.5.1.2 Condições cromatográficas.....	52
3.5.1.3 Figuras de mérito	54
3.5.2 Carbamato de etila	58
3.5.2.2 Derivação das amostras	60
3.5.2.3 Condições cromatográficas.....	60
3.6 Análise estatística	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1 Avaliação físico-química das amostras de cachaça	63
4.1.1 Compostos fenólicos totais e intensidade da cor	78
4.2 Análises cromatográficas.....	81
4.2.1 Compostos fenólicos.....	81
4.2.1.1 Certificação do método analítico	83
4.2.2 Carbamato de etila	104
5 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS	128

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Fluxograma do processo de produção da cachaça artesanal	07
FIGURA 2	Equação simplificada da fermentação alcoólica.....	09
FIGURA 3	Fórmula estrutural do carbamato de etila.....	23
FIGURA 4	Esquema simplificado do ciclo da ureia.....	25
FIGURA 5	Estrutura química da lignina.....	32
FIGURA 6	Aspectos macroscópicos da madeira.....	35
FIGURA 7	Conversão de alguns fenóis derivados da lignina.....	39
FIGURA 8	Reação química envolvida na análise de álcoois superiores	45
FIGURA 9	Reações químicas envolvidas na análise de aldeídos.....	46
FIGURA 10	Reações químicas envolvidas na análise de furfural.....	47
FIGURA 11	Reações químicas envolvidas na análise dos ésteres.....	48
FIGURA 12	Reações químicas envolvidas na análise de metanol.....	48
FIGURA 13	Reações químicas envolvidas na análise de cobre.....	49
FIGURA 14	Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas.....	59
FIGURA 15	Variação da graduação alcoólica em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	68
FIGURA 16	Variação do teor de extrato seco em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	69
FIGURA 17	Variação da concentração da acidez volátil em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho	70
FIGURA 18	Variação da concentração dos álcoois superiores em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel	

	de carvalho.....	71
FIGURA 19	Varição da concentração dos aldeídos em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho	72
FIGURA 20	Varição da concentração de furfural em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	73
FIGURA 21	Varição da concentração dos ésteres em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	74
FIGURA 22	Reação de esterificação entre o ácido acético e o etanol durante o processo de maturação.....	75
FIGURA 23	Varição da concentração de metanol em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	75
FIGURA 24	Varição da concentração de cobre em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	77
FIGURA 25	Varição da concentração de compostos fenólicos totais em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	79
FIGURA 26	Evolução da intensidade da cor em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	80
FIGURA 27	Cromatograma da solução padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido <i>p</i> -cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido <i>o</i> -cumárico; (13) eugenol. Concentração de cada padrão: $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	82
FIGURA 28	Cromatograma da cachaça nova (A) e da cachaça nova adicionando-se os padrões de compostos fenólicos numa	

	concentração de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (B). Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido <i>p</i> -cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido <i>o</i> -cumárico; (13) eugenol.....	84
FIGURA 29	Perfil cromatográfico da amostra de cachaça após período de envelhecimento em tonel de carvalho. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido <i>p</i> -cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) ácido <i>o</i> -cumárico; (12) eugenol.....	103
FIGURA 30	Evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça utilizando as técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência.....	105
FIGURA 31	Esquema da reação de oxidação da vanilina a ácido vanílico durante o período de envelhecimento da cachaça..	106
FIGURA 32	Esquema da reação de oxidação do siringaldeído a ácido siríngico durante o período de envelhecimento da cachaça.	107
FIGURA 33	Esquema da ciclização do ácido <i>o</i> -cumárico para a formação da cumarina durante o período de envelhecimento da cachaça.....	108
FIGURA 34	Cromatograma de uma solução-padrão de carbamato de etila (CE) ($75,0 \mu\text{g L}^{-1}$).....	108
FIGURA 35	Cromatograma da amostra de cachaça nova, mostrando o pico relativo ao carbamato de etila (CE).....	109
FIGURA 36	Cromatograma da amostra de cachaça após 12 meses de	

	armazenamento em tonel de carvalho, mostrando o pico relativo ao carbamato de etila (CE).....	110
FIGURA 37	Cromatograma da amostra de cachaça após 12 meses de armazenamento em recipiente de vidro, mostrando o pico relativo ao carbamato de etila (CE).....	110
FIGURA 38	Curva analítica construída para a quantificação do carbamato de etila (5,0-75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	111

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Gradiente de eluição da fase móvel para a análise dos compostos fenólicos.....	54
TABELA 2	Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila.....	61
TABELA 3	Avaliação físico-química das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”.....	64
TABELA 4	Coefficientes de correlação entre o extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade da cor.....	81
TABELA 5	Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos analisados.....	83
TABELA 6	Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas.....	85
TABELA 7	Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada composto na avaliação da repetitividade do método.....	87
TABELA 8	Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada composto na avaliação da precisão intermediária do método.....	88
TABELA 9	Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos.....	90
TABELA 10	Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de cachaça.....	91
TABELA 11	Concentração de compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho.....	101

TABELA 12	Concentração de carbamato de etila nas frações “cabeça”, “coração” (cachaça nova) e “cauda”.....	112
TABELA 13	Concentração de carbamato de etila durante o envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho e durante seu armazenamento em recipiente de vidro.....	114

LISTA DE QUADROS

		Página
QUADRO 1	Teores máximo e mínimo para os componentes secundários e contaminantes presentes na aguardente de cana e cachaça.....	15
QUADRO 2	Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.....	38

LISTA DE SIGLAS

PIQ's - Padrões de Identidade e Qualidade
% v/v - Porcentagem de um líquido compreendido em outro
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
CE - Carbamato de Etila
IARC - International Agency for Research on Cancer
GC - Gas Chromatography
MS - Mass Spectrometry
HECD - Hall Electrolytic Conductivity Detector
FID - Flame Ionization Detector
NPD - Nitrogen Phosphorus Detector
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
FLD - Fluorescence Detector
EC - Eletroforese Capilar
UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography
DAD - Diode Array Detector
RSD - Relative Standard Desviation
CV - Coeficiente de Variação

RESUMO

ANJOS, Jeancarlo Pereira dos. **Compostos fenólicos e carbamato de etila: caracterização e quantificação em diferentes períodos do envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp).** 2010. 135 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A cachaça, tradicional e popular bebida brasileira, vem conquistando cada vez mais apreciadores em diferentes países. No Brasil, é a bebida destilada mais consumida pela população. Sendo assim, faz-se necessário o conhecimento de sua composição química, em que o estudo de compostos potencialmente tóxicos tem sido um fator determinante no controle de qualidade da bebida. Esse fato tem incentivado o surgimento de diversos estudos focados na determinação de carbamato de etila em cachaça, pelo fato de esse composto ser considerado um possível carcinógeno humano. Entre as diversas etapas do processo de produção da cachaça, o envelhecimento possibilita agregar valor ao produto final devido às alterações na composição química, aroma, sabor e cor da bebida, sendo o carvalho a madeira tradicionalmente utilizada para essa finalidade. Diante do exposto, neste trabalho objetivou-se realizar um acompanhamento da qualidade físico-química e da composição fenólica em diferentes períodos do envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp), bem como monitorar a formação do carbamato de etila durante esse período. Foram observadas importantes alterações químicas na bebida, ao longo do período de envelhecimento, estando os parâmetros físico-químicos analisados dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Durante esse período, constatou-se a incorporação progressiva de compostos fenólicos à bebida, sendo o siringaldeído e o ácido gálico os compostos encontrados em maior concentração. O armazenamento da bebida, tanto em tonel de carvalho quanto em recipiente de vidro, influenciou no aumento da concentração do carbamato de etila, estando sua concentração, ao longo do período de monitoramento, muito inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação para esse composto.

* Comitê Orientador: Profa. Maria das Graças Cardoso – UFLA (Orientadora); Profa. Adelir Aparecida Saczk – UFLA e Prof. Haroldo Silveira Dórea - UFS

ABSTRACT

ANJOS, Jeancarlo Pereira dos. **Phenolic compounds and ethyl carbamate: characterization and quantification after different periods of aging of cachaça in oak (*Quercus* sp) barrels.** 2010. 135 p. Dissertation (Master's in Agrochemistry) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Cachaça, a traditional and popular Brazilian drink, is gaining enthusiasts in various countries. In Brazil, it is the distilled beverage most widely consumed by the population. Therefore, its chemical composition should be known, and the study of potentially toxic compounds has been a determining factor in the quality control of the beverage. This fact has led to the emergence of various studies focused on the determination of ethyl carbamate in cachaça because of the fact that this compound is considered to be a possible human carcinogen. Among the various stages of the production of cachaça, aging may increase the value of the final product as a result of changes in the chemical composition, aroma, flavor and color of the drink, and oak wood is traditionally used for this purpose. Therefore, this study sought to follow the changes in the physico-chemical properties and phenol composition after different periods of aging of the cachaça in oak (*Quercus sp*) casks and to monitor the formation of ethyl carbamate during this period. Significant chemical changes in the beverage were observed, during the aging period, being the physico-chemical parameters within the limits set by law. During this period, it was the progressive incorporation of phenolic compounds into the beverage, being syringaldehyde and gallic acid the compounds found in highest concentration. The storage of the drink, both in oak barrels and in the bottle, lead to an increase in the concentration of ethyl carbamate, being its concentration, during the monitoring period, well below the ceiling set by law for this compound.

* Orientation Committee: Profa. Maria das Graças Cardoso – UFLA (Advisor); Profa. Adelir Aparecida Saczk – UFLA and Prof. Haroldo Silveira Dórea - UFS

1 INTRODUÇÃO

A cachaça, tradicional e popular bebida brasileira, é obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar. Sua produção iniciou-se nos tempos da colonização do Brasil, quando os escravos descobriram que os restos do caldo de cana-de-açúcar, deixados nos tachos utilizados para a produção do melaço, fermentava, dando origem a uma bebida de sabor agradável que, mais tarde, após a utilização de técnicas de destilação, foi denominada de cachaça.

Com o crescimento no consumo e na possibilidade de exportação da cachaça, a bebida deixou de ser apreciada apenas pelas classes de menor poder aquisitivo da sociedade e, atualmente, é servida em ambientes requintados e por pessoas de diferentes classes sociais. É uma bebida que vem conquistando cada vez mais apreciadores em diferentes países; no Brasil, é a bebida destilada mais consumida pela população.

Nesse contexto, diversos estudos têm surgido, visando a manter um rígido controle no processo de produção da cachaça, para a obtenção de um produto que se enquadre dentro dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) exigidos pela legislação nacional e pelos países importadores da bebida. Sendo assim, faz-se necessário o conhecimento de sua composição química, mediante a verificação da presença e caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos.

Pelo fato de a cachaça apresentar diferenças na sua composição química, o estudo de compostos potencialmente tóxicos, considerados como contaminantes, tem sido um fator determinante no controle de qualidade. O carbamato de etila (composto potencialmente carcinogênico) tem sido alvo de inúmeras pesquisas, pelo fato de ser encontrado em diversos alimentos e bebidas fermentados, e por ainda não ser bem esclarecida sua origem durante o processo de obtenção da cachaça. Mesmo em pequenas quantidades, esse é um composto

tóxico ao homem. A legislação brasileira estabeleceu um limite máximo de 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para essa substância em aguardentes (Brasil, 2005a), baseando-se na legislação do Canadá, que há algum tempo tem demonstrado preocupação quanto à presença desse composto em alimentos e bebidas. Além disso, a legislação nacional estipulou um prazo até o ano de 2010, para os laboratórios especializados em análises químicas de bebidas otimizarem de metodologias que utilizem técnicas analíticas sensíveis para a quantificação desse contaminante em cachaça.

Entre as diversas etapas do processo de produção da cachaça, o envelhecimento tem recebido merecido destaque, já que possibilita agregar valor ao produto final, apesar dessa não ser uma etapa obrigatória para a produção da bebida. Nessa etapa, ocorrem diversas reações químicas e a incorporação de compostos provenientes das madeiras utilizadas para o armazenamento da bebida, as quais contribuem para significativas alterações nas propriedades químicas e organolépticas da cachaça. Diferentes classes de compostos são extraídos da madeira e incorporados à bebida, destacando-se os compostos fenólicos, que têm sido largamente estudados na tentativa de estabelecer um perfil quanto à caracterização química de cachaças envelhecidas. Esses compostos têm despertado o interesse de estudiosos pelo fato de serem específicos para cada espécie de madeira utilizada para o armazenamento da bebida, bem como por apresentarem conhecidas propriedades antioxidantes. Além disso, tem-se observado uma grande variedade em espécies de madeiras utilizadas para o envelhecimento da cachaça, apesar de o carvalho (*Quercus* sp) ser a madeira tradicionalmente utilizada para esse fim, devido às suas características estruturais favoráveis e às modificações químicas benéficas que ela proporciona à bebida durante o tempo de armazenamento.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho realizar um acompanhamento da qualidade físico-química e da composição fenólica em

diferentes períodos do envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp), bem como identificar e quantificar o carbamato de etila nos diferentes períodos de envelhecimento da bebida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cachaça

A legislação brasileira estabelece uma diferenciação entre a aguardente de cana e a cachaça, definindo a aguardente de cana como a bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% em volume, a 20° C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo-se adicionar açúcares até 6 gramas por litro. A cachaça é definida como a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares (Brasil, 2005a).

A história da cachaça teve início com a história da colonização do Brasil, com a vinda dos portugueses e as primeiras plantações de cana-de-açúcar. Nos tempos da escravidão, os negros plantavam a cana-de-açúcar e moíam-na para a produção do açúcar. Com o passar do tempo, os escravos descobriram que os restos do caldo de cana, deixados no moinho, fermentavam e tornava-se um líquido diferente e de sabor agradável. Passaram a ingerir tal bebida e, rapidamente, a notícia chegou aos senhores de escravos, que já conheciam as técnicas de destilação aplicadas ao mosto fermentado de uva para a produção da bagaceira; decidiram então, aplicá-las ao mosto fermentado de cana-de-açúcar, dando origem à cachaça (Trindade, 2006; Cardoso, 2006).

Inicialmente, a produção da bebida ocorreu em pequenos engenhos e seu consumo foi predominantemente vinculado às camadas mais baixas da população da época, havendo relatos de que escravos e brancos pobres foram os consumidores preferenciais. Apesar de sua importância na economia da época, já que passou a ser utilizada como moeda de troca no tráfico de escravos, a cachaça

nasceu e consolidou-se como um produto de baixo *status*, com sua produção e venda, muitas vezes, às margens da lei ou em pequenos estabelecimentos (Souza, 2004).

Até o início da década de 1980, conceitos, credences e técnicas populares envolviam a fabricação da cachaça de tal forma que cada alambique parecia produzir uma bebida especial e diferente de todas as outras (Bregagnoli, 2006). Com o tempo, as técnicas de produção da bebida foram aprimoradas, o que permitiu o surgimento de várias marcas de alta qualidade no comércio nacional e internacional, estando presente nos melhores restaurantes e adegas residenciais no Brasil e no mundo (Queiroz, 2008).

O Estado de São Paulo é especializado na produção da cachaça industrial, e Minas Gerais é considerado o polo de produção da cachaça artesanal do país. Na diferenciação entre a cachaça de alambique e a cachaça industrial, é necessário que, por meio de pesquisa, seja estabelecido o discernimento da composição físico-química entre esses dois produtos, a fim de dar suporte aos órgãos competentes para estabelecer a diferenciação oficial, uma vez que os processos de produção já são diferenciados (Cançado Júnior et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

Estima-se que, em Minas Gerais, existam cerca de 8.500 produtores artesanais, com 1.516 marcas registradas 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 et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

Apesar das dificuldades encontradas, a cachaça brasileira está conquistando cada vez mais espaço no mercado das bebidas destiladas, estando em terceiro lugar no consumo mundial de destilados. É consumida em diversos

países, com destaque no Paraguai, Alemanha, Inglaterra, Estados Unidos, Holanda, Bélgica e Japão (Cançado Júnior et al., 2009).

A ampliação do mercado consumidor de cachaça vem incentivando melhorias, implementando controles mais rígidos e estudos mais detalhados com relação ao processo de produção da bebida, bem como na melhoria da qualidade química e sensorial da mesma (Reche & Franco, 2009).

2.2 Produção de cachaça artesanal

O processo de produção da cachaça artesanal está apresentado de maneira simplificada na Figura 1:

A matéria prima utilizada para a produção de cachaça é a cana-de-açúcar, uma gramínea da classe das monocotiledôneas. Atualmente, todas as variedades de cana cultivadas em todo o mundo para fins industriais, seja para a produção de álcool, seja para a produção de açúcar ou cachaça, são híbridas envolvendo duas ou mais espécies diferentes e, por isso, o nome científico da cana é *Saccharum spp* (Andrade, 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de 28% da produção, seguido pela Índia. Para a produção da cachaça, estima-se que no país são produzidas mais de 10 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano (Galinaro, 2006; Andrade, 2006).

Para serem considerados como uma boa matéria-prima para a produção da cachaça, os colmos de cana-de-açúcar devem ser utilizados em estágio ideal de maturação, sadios, recém-cortados, normalmente despontados e livres de matéria estranha (Anjos, 2001).

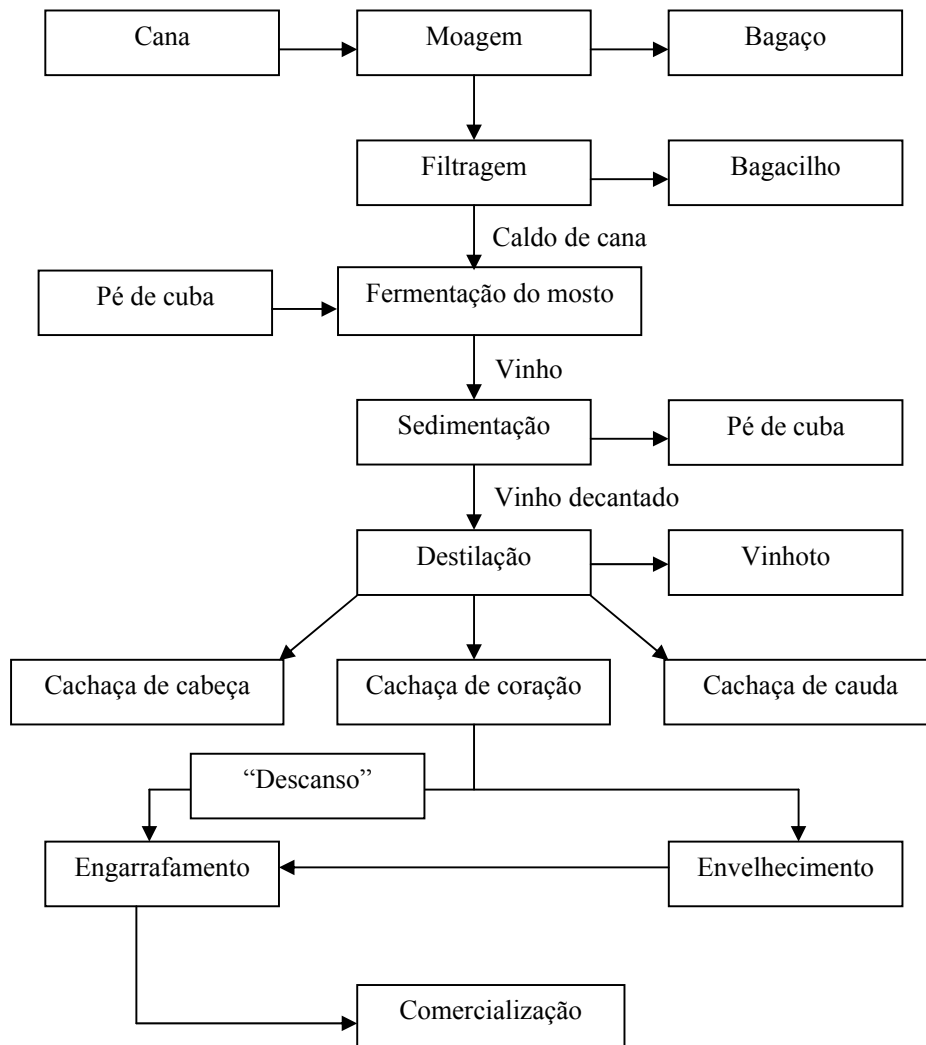


FIGURA 1 Fluxograma do processo de produção da cachaça artesanal
 Fonte: Cardoso, 2006

A composição química da cana-de-açúcar é muito variável quantitativamente; entretanto qualitativamente é semelhante em todas as variedades. Essa composição é influenciada pelo clima, solo, adubação, estágio de desenvolvimento da cultura, variedade, entre outros fatores. Os colmos são constituídos basicamente por água (74,5%), matéria orgânica (25%) e matéria mineral (0,5%), ressaltando que esses constituintes não se encontram nas mesmas proporções na diferentes partes do colmo. Os sólidos solúveis (°Brix) podem ser caracterizados como açúcares e não-açúcares orgânicos e inorgânicos. Os açúcares são representados pela sacarose, glicose e frutose, sendo a sacarose o componente mais importante, com um teor médio no caldo em torno de 18% (Nogueira & Venturini Filho, 2005; Andrade, 2006).

O rendimento médio a partir da moagem de uma tonelada de cana, para a produção de cachaça de alambique (artesanal), é de 60 a 80 litros da bebida, enquanto para um destilador de coluna (industrial), obtêm-se, de 120 a 150 litros de cachaça. Como subprodutos da produção da cachaça, tem-se o bagaço que, após a secagem, pode ser utilizado como fonte de calor na destilação, sendo queimado nas caldeiras, e a vinhaça, que pode ser aplicada na cana-soca ou ser fornecida ao gado adulto. Outros subprodutos são a ponta da cana e a levedura, as quais podem ser utilizadas na alimentação do gado (Andrade, 2006).

A colheita da cana-de-açúcar pode ser realizada manualmente ou mecanicamente. Em algumas propriedades, a colheita é feita após a queima prévia do canavial, sendo essa prática muito observada nas grandes empresas. Esse recurso é utilizado para eliminar a palha e a ponteira da cana e facilitar a colheita manual, além de proteger os cortadores de adversidades oriundas dos canaviais, como folhas afiadas, insetos e animais peçonhentos (Galinaro, 2006; Masson et al., 2007, Tfouni et al., 2007).

Para a produção de cachaça de qualidade, a cana deve ser utilizada fresca, pois quando ela é queimada, há uma modificação considerável na

fisiologia e morfologia dos colmos. Além disso, a queima do palhiço da cana provoca a exsudação do açúcar, tornando-se um excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas do solo, minerais e outros, além de possibilitar a contaminação da bebida por compostos tóxicos, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas, posteriormente, para o alambique, chegando ao produto final, sendo indesejáveis e reduzindo a qualidade da bebida (Masson et al., 2007; Dórea et al., 2008).

Após a colheita da cana-de-açúcar, inicia-se a obtenção do caldo por meio da trituração da cana em moendas. Em seguida, o caldo é submetido à filtração e decantação, para a retirada de impurezas, para ser então conduzido ao processo de fermentação (Schwan et al., 2006).

O processo de fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares do mosto em etanol, gás carbônico e energia, por meio da ação de enzimas de certos micro-organismos (Figura 2). O principal micro-organismo utilizado na produção de bebidas alcoólicas é a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de já terem sido isoladas outras espécies de leveduras, diferentes da *S. cerevisiae*, provenientes do processo de fermentação da cachaça (Ribeiro & Horii, 1999; Schwan et al., 2006; Nova et al., 2009).

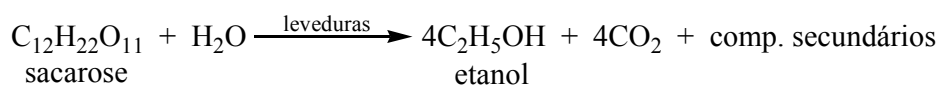


FIGURA 2 Equação simplificada da fermentação alcoólica

Além do etanol, produto majoritário da fermentação alcoólica, são formados outros compostos em quantidades menores quando comparado ao álcool etílico produzido, denominados compostos secundários dentre os quais estão aldeídos, álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos que compõem o sabor e aroma característicos da bebida (Cardoso, 2006). Portanto, entre muitos fatores que podem influenciar na qualidade de bebidas alcoólicas, as condições de fermentação são fundamentais na determinação do sabor, uma vez que a maioria dos compostos secundários é formada durante essa etapa do processo de produção (Schwan et al., 2006; Bernardi et al. 2008; Gomes et al., 2009).

Uma característica da produção de cachaça de alambique é a prática da fermentação espontânea, em que a população microbiota natural do próprio caldo de cana, composta por bactérias e leveduras, é responsável pela fermentação do mosto. O pé de cuba, que consiste na quantidade inicial de leveduras necessária para o início da fermentação, é denominado de “fermento selvagem”, quando propagado exclusivamente a partir das leveduras presentes naturalmente no ambiente do canavial. Entretanto, diversos produtores têm optado pela utilização de cepas de leveduras selecionadas em laboratórios de pesquisa para a fermentação da cachaça, pelo fato de essas apresentarem algumas vantagens em relação à prática da fermentação espontânea (Schwan et al., 2001; Schwan et al., 2006).

O uso de linhagens de leveduras selecionadas para a produção de cachaça apresenta diversas vantagens em relação ao uso de fermentação espontânea, como, por exemplo, o início mais rápido do processo; a fermentação completa do caldo; a produção de baixos níveis de ácido acético; baixos níveis de açúcares residuais; produção de compostos intracelulares que protegem as leveduras dos estresses do processo; capacidade de floculação; baixa produção de gás sulfídrico (H_2S); menores variações no sabor da bebida; produção de

compostos secundários desejáveis e alta produtividade de etanol (Gomes et al., 2009; Silva et al., 2009).

O vinho, produto resultante da fermentação do mosto, contém um grande número de componentes de natureza distinta, podendo ser sólidos, líquidos ou gasosos. Sendo as substâncias voláteis de propriedades químicas e físicas diferentes, é possível sua separação por meio da diferença da temperatura de ebulição delas pelo processo conhecido como destilação (Nogueira & Venturini Filho, 2005).

Na destilação ocorre a separação, a seleção e a concentração dos componentes voláteis oriundos do mosto fermentado e algumas reações químicas, tais como a hidrólise, a esterificação e a acetilação, induzidas pelo calor. Portanto, a qualidade da bebida dependerá também da forma pela qual é conduzida a destilação (Janzanti, 2004).

Quando o vinho é submetido ao processo de destilação, resultam duas frações denominadas flegma e vinhaça: a primeira é o produto principal da destilação do vinho, sendo constituída por uma mistura hidroalcoólica cuja graduação alcoólica e composição dependem do tipo de aparelho utilizado na destilação e da extração das frações destiladas; a vinhaça, que recebe diversas denominações regionais, tais como vinhoto, garapão, restilo, entre outras, é o resíduo da destilação do vinho. Sua riqueza alcoólica deve ser baixa, praticamente nula, acumulando-se todas as substâncias fixas do vinho, juntamente com parte das voláteis (Nogueira & Venturini Filho, 2005; Dias, 2006).

A destilação pode ser realizada em aparelhos descontínuos (destilação simples, por alambiques), utilizados para produção em pequena escala, ou em aparelhos contínuos (destilação sistemática, por torres ou colunas de destilação), que são usados para grandes produções. Os aparelhos de destilação simples, os tradicionais alambiques, são constituídos principalmente de cobre e os

destiladores de colunas de aço inoxidável e cobre (Dias, 2006). Desde o início da produção de bebidas fermento destiladas, o cobre tem sido o material mais utilizado nas construções de alambiques, por apresentar resistência à corrosão e boa condução de calor (Janzanti, 2004).

Quando a destilação é realizada em alambiques, três frações (“cabeça”, “coração” e “cauda”) devem ser separadas com base no seu teor alcoólico. O principal objetivo dessa separação é o de assegurar que o “coração” (fração que deve ser consumida) apresente uma baixa concentração de substâncias tóxicas e compostos que diminuam a qualidade sensorial da bebida, bem como apresentar concentrações aceitáveis de etanol e de compostos que sejam favoráveis ao sabor e aroma da cachaça (Reche et al., 2007). Algumas características das respectivas frações de destilado estão apresentadas a seguir:

- **Destilado de “cabeça”**: corresponde aos primeiros vapores; possui alto teor alcoólico (50-70% v/v) devido à volatilidade do álcool presente no vinho; a separação da fração poderá ser realizada pelo recolhimento de 1 a 5% do volume total do vinho ou 5 a 8% do total do destilado, dependendo da geometria do aparelho; contém altos teores de componentes secundários que se tornam indesejáveis, dependendo da quantidade; deve ser desprezada.

- **Destilado de “coração”**: corresponde ao destilado desejado, “a cachaça”; é recolhido após a separação do destilado de cabeça; apresenta um volume correspondente a 16% do volume total do vinho, dependendo da graduação alcoólica desejada para o produto, ou 80% do destilado, caso todo o álcool contido no vinho tenha se convertido em cachaça.

- **Destilado de “cauda”**: também denominado de “água fraca”, pelo fato de apresentar um baixo teor alcoólico (10-38% v/v); corresponde a 3% do volume total do vinho ou 15% do destilado; assim como a fração “cabeça”, deve ser

desprezada por conter substâncias indesejáveis e tóxicas (Dias, 2006; Souza et al., 2009).

Na destilação realizada em colunas de aço inoxidável (utilizada, principalmente, na produção da cachaça industrial), não ocorre a separação do destilado em frações, pelo fato de que o sistema é contínuo, ou seja, a alimentação da coluna com o vinho e a saída do destilado ocorrem simultaneamente e durante todo o processo (Reche & Franco, 2009).

Após a destilação, a cachaça ainda não está pronta para o consumo, pois apresenta um buquê irregular, por isso, há necessidade de um período de descanso de dois a três meses para completar sua qualidade, devendo ser guardada em recipientes apropriados, em local protegido, evitando altas temperaturas (Barcelos, 2006).

O processo de envelhecimento é uma etapa não obrigatória na produção da cachaça; porém, é uma etapa importante, já que alguns estudos mostram a possibilidade de se agregar valor ao produto final quando essa etapa é inserida no processo de produção da bebida. O envelhecimento natural da cachaça consiste em armazená-la em recipientes de madeira apropriados por um tempo determinado (Mendes et al., 2009). Nesse processo, ocorrem diversas reações químicas que proporcionam a incorporação de compostos provenientes das madeiras utilizadas na confecção dos tonéis, assim como reações entre alguns compostos presentes na bebida, os quais são provenientes de etapas anteriores ao envelhecimento. Tais reações são responsáveis por mudanças químicas, físicas e sensoriais no produto. A incorporação desses compostos à bebida depende exclusivamente da espécie de madeira utilizada para armazenar a cachaça e, também, do tempo de sua permanência no interior dos tonéis (Cardello & Faria, 1998; Cavalheiro, et al., 2003; Aquino et al., 2006a).

Após seguir todas as etapas do processo de produção da bebida de maneira criteriosa, a cachaça deve ser engarrafada em recipientes de vidro. Não é aconselhável a utilização de recipientes de plástico, pois alguns componentes da cachaça podem reagir com componentes do material, comprometendo a qualidade sensorial do produto. Com isso, a bebida está pronta para ser comercializada e ser apreciada por consumidores das mais diferentes classes sociais (Trindade, 2006).

2.2.1 Compostos secundários e contaminantes na cachaça

Apesar de a cachaça ser composta predominantemente por água e etanol, diversos compostos estão presentes em menores quantidades, sendo classificados como contaminantes e congêneres, os quais são formados durante os processos de fermentação e destilação, tendo importante papel nas características organolépticas da bebida (Penteado & Masini, 2009).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina os seguintes limites para os compostos secundários e contaminantes em aguardente de cana e cachaça (Quadro 1):

QUADRO 1 Teores máximo e mínimo para os componentes secundários e contaminantes presentes na aguardente de cana e cachaça

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica (aguardente)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,0	54,0
Graduação alcoólica (cachaça)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,0	48,0
Sacarose, em açúcar refinado, invertido ou glicose	g L ⁻¹	6,0	30,0
Acidez volátil, em ácido acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	150,0
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL de álcool anidro	-	200,0
Aldeídos, em aldeído acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	30,0
Furfural + hidroximetilfurfural	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Álcoois superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360,0
Congêneres**	mg/100 mL de álcool anidro	200,0	650,0
Álcool metílico	mg/100 mL de álcool anidro	-	20,0
Acroleína	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Carbamato de etila	µg L ⁻¹	-	150,0
Cobre	mg L ⁻¹	-	5,0
Arsênio	µg L ⁻¹	-	100
Chumbo	µg L ⁻¹	-	200

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico

**Congêneres: acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores

Fonte: Brasil, 2005a

A formação excessiva de componentes secundários pode estar relacionada às más condições nutricionais para o fermento, contaminações e, ainda, a condições inadequadas na fermentação (temperatura, pH, aeração, entre outras). Durante a destilação, deve-se realizar o corte das frações “cabeça”,

“coração” e “cauda”, sendo a maioria dos componentes secundários encontrados no destilado de “cabeça”. Porém, a parte que deve ser consumida é o destilado de “coração”, devido aos menores teores de contaminantes nessa fração. Um procedimento inicial para diminuir o teor de componentes secundários consiste em avaliar a eficiência do refluxo na coluna do alambique e ajustar o tamanho do destilado de cabeça (Leauté, 1990).

Os aldeídos são formados durante o processo de fermentação alcoólica, sendo indesejáveis na bebida por provocar problemas relacionados com o sistema nervoso central. A formação desses compostos é resultado da ação de leveduras durante os estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer nas etapas finais desde que o meio reacional não sofra aeração. O principal aldeído formado nessa etapa de produção da bebida é o acetaldeído. Os demais aldeídos são obtidos provavelmente pela oxidação de álcoois superiores e queima da cana. Grande parte da fração aldeídica presente no mosto é separada, durante a destilação, como produtos da cachaça de “cabeça” (Pereira et al., 2003; Cardoso, 2006).

O furfural e o hidroximetilfurfural são dois aldeídos que podem ser encontrados no caldo da cana quando essa é submetida à queima, levando à contaminação da cachaça durante o processo de produção, sendo indesejáveis e, conseqüentemente, reduzindo sua qualidade. A queima provoca a desidratação parcial de uma pequena fração dos açúcares presentes na cana-de-açúcar. A desidratação e a degradação térmica dos açúcares são reações de grande relevância nos alimentos. Quando, neste processo, estão envolvidas as pentoses, há a formação do 2-furfural (furfural) e quando estão envolvidas as hexoses, forma-se o 5-hidroximetilfurfural (hidroximetilfurfural). Além disso, a condução inadequada da temperatura de destilação e a presença de compostos não voláteis no vinho podem influenciar negativamente a qualidade do produto, devido a sua participação na formação do furfural (Pereira et al., 2003; Masson et al., 2007).

Masson et al. (2007), estudando 24 amostras de aguardentes de cana provenientes da produção utilizando cana queimada ou não queimada, mostraram que a queima prévia do palhiço da cana está relacionada à contaminação da cachaça por furfural e verificaram que esse procedimento proporcionou um aumento significativo na concentração dessa substância nas amostras analisadas.

Outro aldeído que vem sendo estudado é o 2-propenal, conhecido como acroleína. É altamente tóxico, irritante aos olhos e nariz, apresentando odor picante e amargo. Apresenta-se na forma líquida com coloração que varia de incolor a amarelo. É extremamente tóxico por todas as vias de exposição e, apesar de não estar esclarecido o mecanismo pelo qual produz sintomas tóxicos, tem demonstrado características mutagênicas. É formada durante o processo fermentativo, por meio da desidratação do glicerol, podendo estar associada à presença de bactérias termofermentativas nessa etapa da produção (Cardoso, 2006; Masson, 2009; Zacaroni, 2009).

Em estudos recentes, Masson (2009) avaliou a presença de acroleína em 71 amostras de aguardentes de cana provenientes das regiões norte e sul do estado de Minas Gerais, constatando que os teores desse composto variaram de não detectado a 21,97 mg/100 mL de álcool anidro; 9,85% das amostras analisadas apresentaram concentrações acima do limite máximo especificado pela legislação. Paralelamente, nesse mesmo período, Zacaroni (2009), estudando 12 amostras de cachaças produzidas no sul de Minas Gerais, provenientes de envelhecimento em diferentes madeiras, observou que os teores de acroleína variaram de não detectado a 7,45 mg/100 mL de álcool anidro; apenas uma das amostras apresentou teor acima daquele estabelecido por lei. Contudo, ainda se têm observado poucos relatos na literatura quanto à análise desse contaminante em aguardentes de cana.

Os álcoois com três a cinco átomos de carbono são freqüentemente encontrados em bebidas destiladas; conhecidos como óleo fúsel, geralmente apresentam um odor característico de flores, e juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo *flavour* da aguardente. Os principais álcoois superiores encontrados em aguardentes são o isoamílico (2-metilbutanol-1), amílico (pentanol), isobutílico (2-metilpropanol-1) e propílico (propanol) (Vilela et al., 2007). Segundo Gutierrez (1993), vários fatores influenciam a formação de álcoois superiores pelas leveduras, como a espécie e a linhagem, temperatura e composição do meio.

Pesquisando 33 amostras de aguardentes provenientes de diferentes origens e processos de fabricação, Penteado & Masini (2009) verificaram a predominância dos álcoois isoamílico, propílico e isopropílico, respectivamente. Observaram a grande heterogeneidade de álcoois superiores em aguardentes, resultando na diversidade de características organolépticas da bebida, além da agravante de que algumas amostras apresentaram concentrações excessivas de alguns álcoois, estando acima dos valores especificados pela legislação para a aguardente de cana.

Algumas medidas devem ser evitadas para evitar a formação dos álcoois superiores em excesso, como não armazenar a cana por longo período após o corte, evitando a degradação de aminoácidos, e a posterior formação dos álcoois superiores; não utilizar cana bisada e lavar a cana após o corte, impedindo sua contaminação por bactérias que podem interferir no desempenho das leveduras durante a fermentação (Cardoso, 2006; Fernandes et al., 2007; Vilela et al., 2007).

De acordo com Pereira et al. (2003) e Miranda et al. (2006), os ésteres geralmente são formados por meio das reações de esterificação entre os álcoois e os ácidos carboxílicos formados durante o processo oxidativo. O acetado de etila é o principal éster encontrado na aguardente de cana. É formado por meio de

pequenas quantidades de etanol e ácido acético, provenientes do processo de fermentação, sendo responsável, quando em quantidades limitadas, pela incorporação de um aroma agradável de frutas, desejável nessa bebida. Quando em excesso, confere à aguardente um sabor enjoativo e indesejável.

Nascimento et al. (2008), avaliando o perfil de nove ésteres em 136 amostras de cachaça, 10 amostras de uísque e 10 amostras de rum, comprovaram a maior concentração em cachaça de acetato de etila, seguido pelo lactato de etila. Eles relataram que o lactato de etila, que pode se apresentar em torno de 40% do conteúdo total de ésteres na bebida, pode estar presente devido à contaminação das matérias-primas (cana de açúcar, leveduras e água) por bactérias do gênero *Lactobacillus* spp., responsáveis pela ocorrência da fermentação láctica. Outros ésteres estudados foram o butirato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila, nonanoato de etila, decanoato de etila, octanoato isoamílico e laurato de etila.

Entre os ácidos produzidos durante a fermentação alcoólica, o ácido acético tem sido quantitativamente o principal componente da fração ácida das aguardentes, expresso em acidez volátil. Nascimento et al. (1998), analisando 17 ácidos em cachaças, e outras bebidas alcoólicas, verificaram que a concentração de ácido acético esteve em torno de 90 a 95% da concentração total dos ácidos estudados nas amostras analisadas.

Na presença de oxigênio e utilizando-se o levedo *Saccharomyces cerevisiae*, o açúcar pode ser convertido em ácido acético. Na sua ausência, essa levedura produz apenas pequenas quantidades de ácido acético. Quantidades elevadas desse ácido carboxílico são, freqüentemente, associadas a práticas de estocagem da cana e contaminações do mosto com bactérias acéticas, decorrentes de um tempo excessivo de descanso entre o processo de fermentação e a destilação, além da precária assepsia em todo o processo produtivo e

excessiva aeração do mosto durante o período de fermentação (Pereira et al., 2003; Cardoso, 2006; Fernandes et al., 2007).

O álcool metílico é um álcool particularmente indesejado na cachaça. Essa substância é originada pela degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar em quantidades muito pequenas, que chega até as dornas de fermentação por meio dos bagacilhos, quando não há filtragem do mosto. A formação do metanol é acentuada quando a fermentação ocorre na presença de sucos, ou polpas de frutas ricas em pectina. A ingestão do metanol, mesmo em quantidades reduzidas, por longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira ou mesmo a morte (Valsechi, 1960; Windholz, 1976; Badolato & Duran, 2000).

Bogusz Júnior et al. (2006), avaliando a composição química de 27 cachaças produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, verificaram que a concentração de metanol nas amostras analisadas estava abaixo do limite estabelecido pela legislação, mostrando a preocupação por parte dos produtores quanto à filtragem do caldo de cana antes do processo de fermentação. Resultados similares foram encontrados por Fernandes et al. (2007). Esses autores estudaram a qualidade físico-química de 17 cachaças produzidas no sul de Minas Gerais e observaram que as concentrações de metanol nas amostras analisadas apresentaram-se em níveis relativamente baixos e abaixo da concentração máxima estabelecida pelo MAPA, chegando a não ser detectado em algumas amostras.

Um dos contaminantes orgânicos que vem sendo largamente estudado é o carbamato de etila, que é um composto carcinogênico encontrado naturalmente em baixas concentrações em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados (Barcelos et al., 2007). Diferentes vias de formação para esse composto têm sido propostas, com relevância aos trabalhos que propõem sua formação por meio da degradação enzimática da arginina em ureia, durante o

processo de fermentação, a qual reage com etanol, produzindo o carbamato de etila. Acredita-se também que sua formação seja favorecida pela presença de precursores nitrogenados durante o processo de destilação e por altas temperaturas resultante do mau dimensionamento do sistema de destilação ou operação com níveis de refluxo impróprios (Polastro et al., 2001; Bruno et al., 2007).

Entre os contaminantes inorgânicos encontrados na cachaça, citam-se o cobre, chumbo e arsênio. A quantificação de metais em aguardentes é efetuada com diversas finalidades, sendo a mais importante a verificação da presença de espécies metálicas em níveis tóxicos, atendendo às especificações exigidas pela legislação (Rose & Harrison, 1970).

O cobre é proveniente, principalmente, do material constituinte dos alambiques. Ele contribui na eliminação de certos odores desagradáveis, observados em aguardentes destiladas em alambiques confeccionados com materiais onde não está presente esse metal, tal como aço inox. Isso ocorre, pois, acredita-se que esse metal catalisa as reações de oxidação dos compostos sulfurados a compostos de baixa solubilidade, reduzindo a concentração de compostos sulfurados no destilado. A contaminação da cachaça por cobre ocorre pela solubilização do carbonato básico de cobre (azinhavre), durante o processo de destilação, sendo então arrastado pelos vapores ácidos da bebida. De um modo geral, o que se observam é que a assepsia cuidadosa dos alambiques após o procedimento de alambicagem tende a reduzir consideravelmente os problemas de excesso de cobre nas aguardentes (Cardoso, 2006; Lima et al., 2006).

Vários estudos sobre a presença de cobre em aguardentes têm sido realizados objetivando-se encontrar um bom material adsorvente para a remoção desse metal quando ele se encontra em excesso. Lima et al. (2006), simulando a utilização de carvão ativado para a remoção de cobre em aguardentes,

verificaram que esse adsorvente mostrou-se eficiente na remoção desse metal na bebida. Contudo, há a remoção, além do cobre, de importantes compostos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida, levando a uma depreciação da qualidade. Posteriormente, trabalhos realizados por Lima et al. (2009), empregando carvão ativado, resina de troca iônica e compósito carvão ativado/óxido de ferro na remoção de cobre em cachaças com excesso desse metal, constataram que a resina de troca iônica mostrou-se melhor para o tratamento de cachaça com excesso de cobre, por ser mais específica na troca de íons como o cobre e adsorver menos os compostos orgânicos essenciais à qualidade da bebida.

O chumbo e o arsênio podem estar presentes na bebida devido a certas embalagens ou oriundos de soldas de ligas metálicas endurecidas do material utilizado na construção do destilador (Cardoso, 2006). Além dessas, Caldas et al. (2009) citam outras fontes de contaminação da cachaça por esses metais, como através da matéria-prima, utilização de produtos agroquímicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas) e pelo solo.

O chumbo é um metal altamente tóxico ao organismo, mesmo em níveis traços; uma intoxicação por esse ou por compostos que contenham este metal pode gerar vários danos à saúde e até mesmo causar a morte (Schifer et al., 2005). Assim como o chumbo, o arsênio é um metal tóxico ao homem mesmo em pequenas quantidades, constatando-se que o consumo desse metal, mesmo em quantidades subletais por períodos prolongados, pode provocar alterações na pele e ocorrência de câncer (Assis et al., 2008).

Caldas et al. (2009), avaliando técnicas de análise para a determinação simultânea de cobre, chumbo e arsênio em 10 amostras cachaça, encontraram níveis que chegaram a, respectivamente, 5579,0 µg/L, 1880 µg/L e 16,5 µg/L, utilizando a técnica de absorção atômica com forno de grafite, e 5499 µg/L, 1901 µg/L e 16,2 µg/L, utilizando a técnica de plasma indutivamente acoplado à

espectrometria de massas. Isso demonstra a importância da determinação da presença dessas espécies na bebida, já que foram encontradas concentrações acima do limite máximo estabelecido pela legislação para os metais cobre e chumbo.

2.2.2 Carbamato de etila

O carbamato de etila (CE), também conhecido como uretana, é o éster do ácido carbâmico e apresenta a fórmula estrutural representada na Figura 3. Apresenta-se na forma de cristal incolor, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo. Possui temperatura de fusão entre 48°C e 50°C, temperatura de ebulição entre 182°C e 184°C, sendo sua massa molar 89,09 g mol⁻¹ (Budavari, 2001; Weber & Sharypov, 2008).

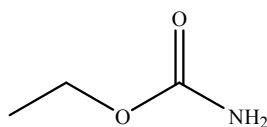
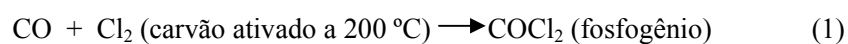


FIGURA 3 Fórmula estrutural do carbamato de etila

Industrialmente, é produzido a partir do fosfogênio, da ureia ou da cianamida. Utilizando-se fosfogênio, que é um gás altamente tóxico, o processo inicia-se com uma reação entre o monóxido de carbono e o cloro, conforme representado nas Equações 1, 2 e 3 (Morrison & Boyd, 1992).

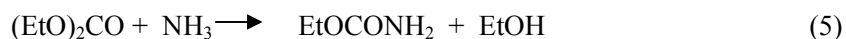


Outra via de formação do CE ocorre por meio da reação da ureia com etanol, conforme está representada na Equação 4 (Aresta et al., 2001).



O CE é formado naturalmente durante processos fermentativos, podendo ser encontrado em diversos alimentos e bebidas, tais como pão, iogurte, vinho, cerveja e, principalmente, em bebidas fermento-destilladas, como uísque, rum, vodka, grapa, cachaça e tiquira (Andrade Sobrinho et al., 2002).

A presença de CE em bebidas recebeu atenção, inicialmente, na década de 70, quando foi relatado que o pirocarbonato de dietila reage com amônia em pH neutro ou alcalino para produzir o CE (Equação 5) e, com isso, a utilização do pirocarbonato de dietila como aditivo antimicrobiano em alimentos foi proibida. Mais tarde, estudos demonstraram que a ureia, um subproduto natural da fermentação, era um dos precursores principais para a formação de CE em bebidas alcoólicas (Jagerdeo et al., 2002; Aresta et al., 2001).



Polastro et al. (2001) e Bruno et al. (2007) citam que o principal mecanismo de formação do CE ocorre por meio do metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo, em que há a degradação enzimática da arginina em ureia (Figura 4), a qual reage com etanol, produzindo o CE. Além da presença de precursores nitrogenados durante o processo de destilação e de altas temperaturas, sob condições ácidas, Iida et al. (2006) citam que essa reação é favorecida quando se utiliza longo período de armazenamento do produto.

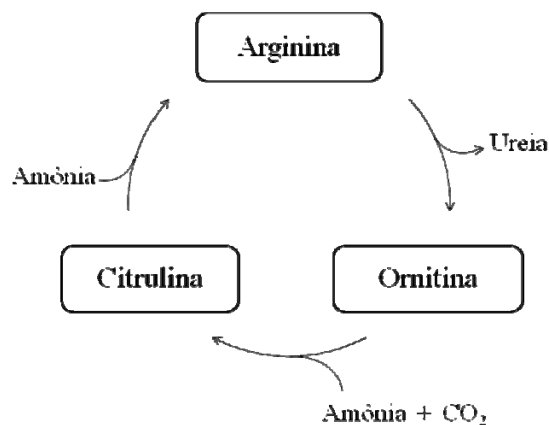
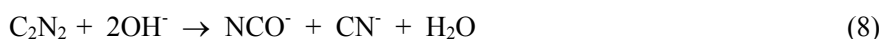
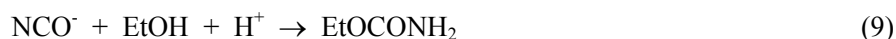


FIGURA 4 Esquema simplificado do ciclo da ureia

Outras reações relevantes que promovem a formação do CE em bebidas alcoólicas envolvem reações entre o etanol e diferentes precursores nitrogenados, tais como fósforo de carbamila e cianeto (Weber & Sharypov, 2008). Masson (2009) menciona que esse último é considerado um precursor durante e após o processo de destilação, sendo propostos dois mecanismos de formação do CE a partir dele.

O primeiro é baseado na complexação do cianeto com Cu(II), proveniente do aparelho destilador, seguido pela oxidação a cianogênio e com subsequente desproporcionamento a cianato. O cianato pode reagir com etanol para formar o carbamato de etila. Tais reações estão apresentadas nas Equações 6 a 9. O cobre, provavelmente, é liberado a partir do aparelho de destilação (Aresta et al., 2001).





O segundo é baseado na auto-oxidação induzida por radiação ultravioleta de compostos insaturados presentes nas bebidas alcoólicas, os quais produzem radicais livres que catalisam a oxidação do cianeto a cianato, como descrito nas equações 10 a 18 (Aresta et al., 2001).

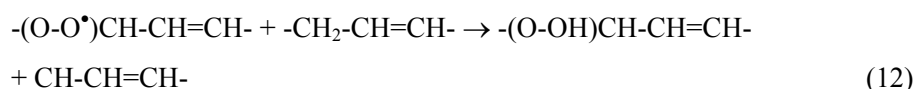
Iniciação



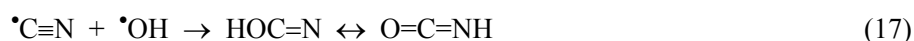
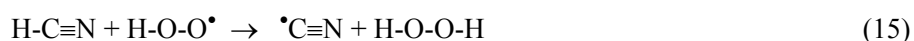
Propagação



Auto-oxidação



Formação de carbamato de etila



Andrade Sobrinho et al. (2009) citaram que as reações responsáveis pela formação do CE são influenciadas pelo tipo de levedura, nutrientes adicionais ao mosto, teor alcoólico, temperatura de fermentação e acidez durante o processo fermentativo.

Diversos estudos têm sido realizados com bebidas a fim de se conhecer o mecanismo e a origem dos precursores para a formação do CE, já que o mecanismo de formação desse composto em bebidas alcoólicas ainda não está bem esclarecido. Alguns autores citaram que o CE pode ser formado, em destilados, antes, durante e depois do processo de destilação (Bruno et al., 2007; Labanca et al., 2008).

O carbamato de etila apresenta-se como um composto genotóxico e cancerígeno para diversas espécies de animais, incluindo ratos, camundongos e macacos, sugerindo que esse possa ser um composto com potencial risco de influenciar o desenvolvimento de câncer em humanos. Baseando-se nesse fato, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou como um possível carcinógeno humano (Beland et al., 2005; Weber & Sharypov, 2008).

Devido à possibilidade de contaminação da cachaça pelo CE, o governo brasileiro, por meio do MAPA, estabeleceu, no ano de 2005, um limite máximo de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ para esse composto na bebida, baseando-se nos limites propostos pela legislação canadense, país pioneiro no controle dos níveis desse contaminante em alimentos e bebidas (Brasil, 2005a).

Trabalhos de Andrade Sobrinho et al. (2002), investigando a presença de CE em amostras de cachaças, tiquira, grapa e uísque, relataram que elas apresentaram teores médios de 0,77; 2,4; 0,045 e $0,14 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, observando que as amostras de cachaça e tiquira apresentaram maiores concentrações para esse composto, quando comparadas àquelas obtidas para as demais bebidas, além de estarem com a concentração de CE acima do limite exigido pela legislação. O estudo comparativo entre as cachaças provenientes da destilação em colunas e alambiques mostrou que aquelas destiladas em coluna apresentaram valores mais elevados de CE.

Barcelos et al. (2007) avaliaram a presença de carbamato de etila em cachaças provenientes de três regiões diferentes de Minas Gerais, obtendo

concentrações, para esse contaminante, que variaram de não detectado a 643,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados mostraram que as amostras provenientes da região do Vale do Jequitinhonha apresentaram maiores teores de CE, com média de concentração acima do limite estabelecido pela legislação brasileira, mostrando a importância da identificação e controle desse composto na bebida.

Masson (2009) analisou o CE em 71 amostras de aguardentes de cana provenientes das regiões norte e sul de Minas Gerais, constatando que 63,63% das amostras provenientes da região norte apresentaram teores acima do limite estipulado pelo MAPA, sendo consideradas como impróprias para o consumo. As da região sul apresentaram-se dentro da legislação vigente, mostrando a possibilidade de se produzir aguardente com níveis baixos e controlados desse contaminante, já que altos níveis dele na bebida pode se tornar um entrave para a exportação do produto.

O método considerado como oficial para a análise de CE em bebidas alcoólicas envolve a utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), após a execução de técnicas de preparação de amostras (etapas de extração e/ou *clean-up*) devido às baixas concentrações desse composto em bebidas. Devido a algumas dificuldades analíticas que essa técnica proporciona, diferentes métodos analíticos têm sido propostos para a análise do CE, por meio do emprego de diferentes métodos de detecção como de condutividade eletrolítica (HECD), de ionização de chama (FID), temoiônico específico (NPD), dentre outros (Abreu et al., 2005).

Labanca et al. (2008) avaliaram a qualidade de aguardentes de cana produzidas ou comercializadas no Estado de Minas Gerais, baseando-se na quantificação do CE. Foi proposto um método analítico para a determinação deste composto utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), com a possibilidade de análise das amostras sem as etapas de extração e purificação. O método foi otimizado e validado, permitindo a

obtenção de teores de CE que variaram de <30 (limite de quantificação) a 2609 $\mu\text{g L}^{-1}$, com apenas 7% das amostras analisadas apresentando valores abaixo do limite estabelecido pela legislação. Neste estudo, não foi constatada correlação entre os teores de CE, pH, cobre e grau alcoólico para as amostras analisadas.

Na tentativa de minimizar as dificuldades encontradas quando se utilizam algumas das técnicas citadas, como o custo e o tempo necessário para a realização das etapas de preparação das amostras, alguns autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD) para a determinação de CE em diferentes matrizes. Esse método tem se apresentado como uma alternativa à substituição ao método oficial, pois apresenta níveis de detecção similares, além de proporcionar maior rapidez na etapa de preparação das amostras, já que não necessita de etapas prévias de extração e concentração do analito. Esse método envolve, como preparação da amostra, apenas a derivação prévia do CE, permitindo, assim, sua detecção utilizando o detector de fluorescência (Abreu et al., 2005; Madrera & Valles, 2009).

Herbert et al. (2002) avaliaram um método diferente de análise de CE em vinhos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (HPLC-FLD), a partir da derivação prévia das amostras. O desenvolvimento dessa metodologia apresentou algumas vantagens com relação a outros métodos utilizados para a determinação desse contaminante, sendo a principal relacionada à etapa de preparação das amostras (derivação), pelo fato de ser simples, rápida e de menor custo, possibilitando a implementação do método proposto em análises de rotina para o CE. O método apresentou uma recuperação média de 96% para as amostras estudadas, limite de detecção de 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e precisão intermediária média de 6,3%. A comparação dos resultados obtidos pelo método avaliado com alguns encontrados utilizando a técnica GC/MS mostrou-se estatisticamente indistinguíveis.

Madrera & Valles (2009) propuseram um método analítico para a determinação de CE em sidras, baseando-se na HPLC-FLD com derivação prévia das amostras. O método proposto apresentou bons resultados para os parâmetros utilizados nos procedimentos de validação, sendo avaliada a linearidade (coeficiente de correlação $> 0,9999$), limites de detecção e quantificação ($1,64$ e $3,56 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), precisão ($<5\%$) e recuperação ($94-98\%$). Os teores de CE obtidos para as amostras analisadas variaram entre menor que o limite de quantificação a $67 \mu\text{g L}^{-1}$. O método mostrou-se simples e rápido, já que requer um mínimo de tratamento de amostra, permitindo sua utilização em análises de rotina desse contaminante.

2.3 Envelhecimento da cachaça

O envelhecimento em recipientes de madeira é uma etapa importante na produção de bebidas destiladas, pois altera acentuadamente a composição química, aroma, sabor e cor dessas bebidas. Existem diferenças significativas, em termos sensoriais, entre bebidas envelhecidas e não envelhecidas. Essa etapa é responsável por melhorias nas características organolépticas da cachaça, tornando seu sabor mais agradável e suave (Faria et al., 1996; Abreu-Lima et al., 2005).

De acordo com o MAPA (Brasil, 2005a), a cachaça armazenada em tonéis de madeira pode receber as seguintes denominações:

- **Cachaça envelhecida:** é a bebida que contém, no mínimo, 50% de cachaça ou aguardente de cana envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 litros, por um período não inferior a um ano.
- **Cachaça Premium:** é a bebida que contém, no mínimo, 100% de cachaça ou aguardente de cana envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 litros, por um período não inferior a um ano.

- **Cachaça Extra Premium:** é a bebida que contém, no mínimo, 100% de cachaça ou aguardente de cana envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 litros, por um período não inferior a três anos.

As mudanças do sabor e do aroma da bebida maturada devem-se a alterações na composição química e na concentração de seus compostos, as quais são causadas pelas diversas reações químicas que ocorrem durante a etapa de maturação (Miranda et al., 2006). Entre as inúmeras transformações químicas que ocorrem durante o processo de envelhecimento da cachaça, Mori et al. (2006) citam as reações entre os compostos secundários provenientes da destilação, a extração direta de componentes da madeira, a decomposição de macromoléculas da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) e a subsequente incorporação desses compostos na bebida, as transformações das substâncias extraídas da madeira, a evaporação de compostos voláteis através da madeira do barril, podendo ocorrer também reações entre os compostos da madeira com os componentes originais do destilado.

No envelhecimento da bebida, ocorre a degradação da madeira pela ação do álcool e da água, e os produtos da hidrólise da hemicelulose e da lignina passam para o destilado (Sherev & Brink, 1980). Os principais compostos extraídos pelos destilados da madeira do tonel são: óleos voláteis, compostos fenólicos, açúcares e glicerol, ácidos orgânicos não voláteis, substâncias tânicas, que modificam o sabor, o aroma e a coloração da bebida (Cardello & Faria, 2000).

Entre os componentes oriundos do envelhecimento em carvalho, os taninos e os derivados da lignina são considerados os mais importantes. A lignina, que é formada por monômeros aromáticos (Figura 5), tem estreita relação com o desenvolvimento de aroma e sabor nos destilados envelhecidos

pois libera para a bebida aldeídos aromáticos durante o período de maturação (Singleton, 1995; Dias, 2009).

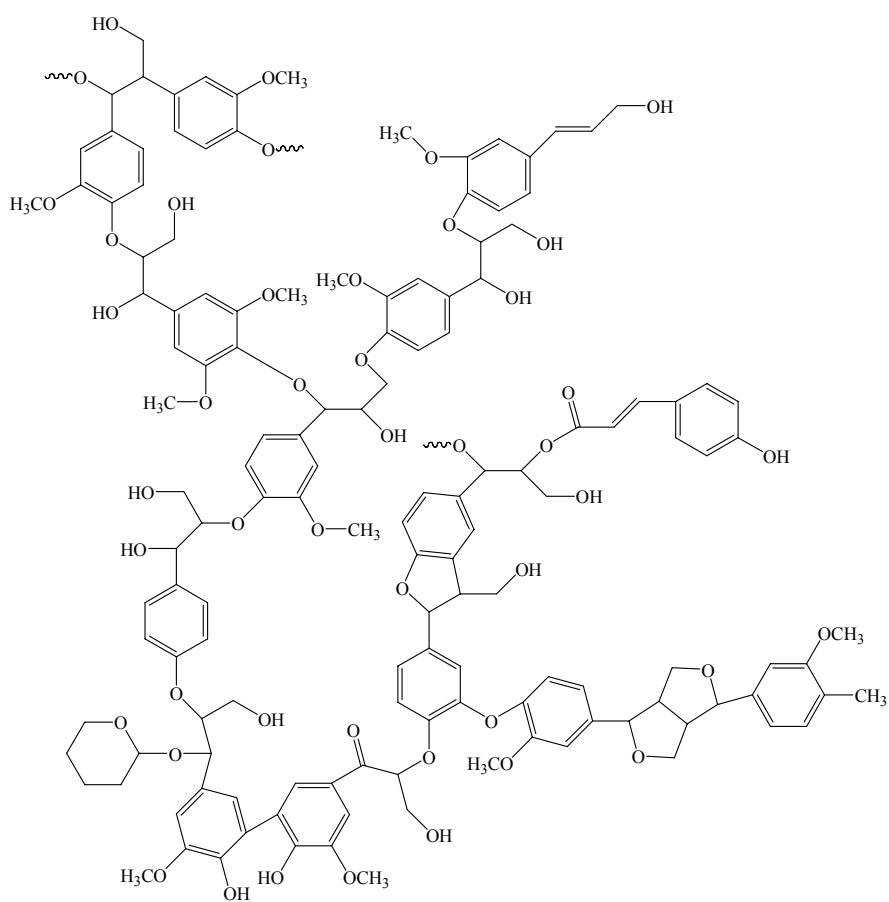


FIGURA 5 Estrutura química da lignina. Fonte: Marx, 2010

Alguns dos fatores mais relevantes que influenciam a qualidade da cachaça envelhecida são: a espécie da madeira e sua composição química, o tamanho e o histórico dos barris, as condições ambientais e o tempo de estocagem da bebida (Dias, 2009).

Campos et al. (2004) citam que o tratamento térmico realizado para facilitar o manuseio da madeira na confecção dos barris e tonéis pode proporcionar uma melhor extração de componentes da hemicelulose e lignina durante o envelhecimento da bebida, apesar de afetar sua coloração.

Algumas técnicas têm sido utilizadas visando acelerar ou melhorar o processo tradicional de envelhecimento ou maturação da cachaça em barris de madeira. Nesse sentido, Miranda et al. (2006) avaliaram a qualidade físico-química e sensorial de cachaças armazenadas em tonéis de carvalho de 20 L submetidos à irradiação gama, verificando que alguns componentes, como aldeídos, taninos, cor e teor de cobre foram influenciados por esse processo, resultando na aceleração da maturação ou envelhecimento da bebida, a qual foi confirmada pela melhor aceitação sensorial.

O carvalho é a madeira tradicionalmente utilizada para o envelhecimento de bebidas destiladas, sendo inicialmente escolhido para a confecção de barris e tonéis devido à sua disponibilidade em várias partes do mundo onde se produziam bebidas alcoólicas e barris, especialmente na Europa. Além das características físicas benéficas dessa madeira (tais como densidade, cor, permeabilidade, resistência mecânica e durabilidade, além da facilidade no manuseio), essa madeira é capaz de modificar favoravelmente as características organolépticas de vinhos e aguardentes submetidos sob maturação nesta (Leão, 2006; Dias, 2009).

De acordo com Corrêa (1978), o carvalho é uma dicotiledônea pertencente à classe das Angiospermas, família Fagacea e gênero *Quercus*, de ocorrência predominante no Hemisfério Norte.

Entre as diferentes espécies de carvalho americano e europeu empregadas no envelhecimento de bebidas destiladas, os componentes das espécies mais utilizadas (*Quercus robur*, *Quercus petraea* e *Quercus alba*) são semelhantes, diferindo basicamente na concentração das substâncias extraídas delas (Madrera et al., 2003).

A madeira do cerne do carvalho (Figura 6) possui ampla composição química, e pode ser classificada em função de sua capacidade de liberação de compostos, conforme Leão (2006):

- **Compostos solúveis:** liberados espontaneamente durante o processo de envelhecimento de vinhos e aguardentes; geralmente são moléculas pequenas, como as cumarinas, os ácidos fenólicos, os aldeídos fenólicos, os elagitaninos e alguns cátions e ânions.
- **Substâncias extrativas:** para serem liberadas passam, obrigatoriamente, por reações de hidrólise, pirólise ou oxidações que permitem reduzir seu grau de retenção; são os polisacarídeos e as ligninas que, quando quebrados em compostos menores, permitem sua extração.
- **Substâncias fixas:** são totalmente insolúveis; correspondem às formas oxidadas e condensadas dos elagitaninos, dos polissacarídeos e das ligninas.

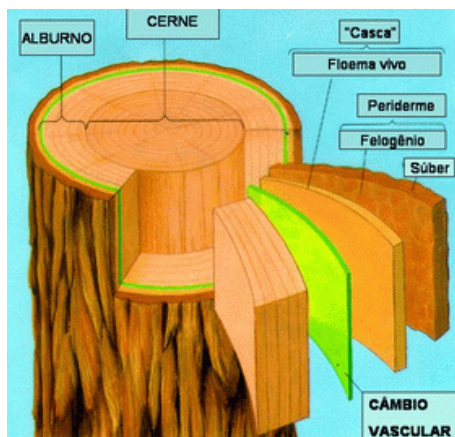


FIGURA 6 Aspectos macroscópicos da madeira

Diferentes tipos de madeiras têm sido utilizados para o armazenamento e envelhecimento da cachaça devido à dificuldade de aquisição e alto custo do carvalho no Brasil, além das inúmeras reutilizações dos tonéis antes de serem utilizados na maturação da cachaça (Miranda et al., 2006). Com isso, diversos estudos têm surgido com o objetivo de avaliar a qualidade química e sensorial das bebidas envelhecidas. Faria et al. (2003), por meio da análise de aceitação sensorial de cachaças armazenadas em 8 diferentes madeiras (amarelo, amendoim, bálsamo, jatobá, louro, pau d'arco, pau d'óleo e pereiro), sugeriram que o amendoim e o pereiro, seguidos pelo jatobá, apresentaram-se como boas madeiras na substituição ao carvalho para a construção de barris de madeira utilizados no envelhecimento da cachaça.

Em alguns trabalhos da literatura, verifica-se que diversos compostos têm sido considerados como marcadores de envelhecimento em bebidas, tais como uísque, vinho, cachaça e tequila (Aquino et al., 2006a; Canas et al., 2008b; Muñoz-Muñoz et al., 2008). Entre estes, os compostos fenólicos de baixo peso molecular têm assumido um papel importante na avaliação química de bebidas

envelhecidas devido às suas significativas influências nas características químicas e sensoriais. A ocorrência desses compostos em bebidas alcoólicas é resultado dos processos de degradação e oxidação da lignina, sendo considerada como uma evidência de que a bebida foi autenticamente envelhecida em barris de madeira (Muñoz-Muñoz et al., 2008). Aquino et al. (2006b) relatam que os aldeídos furânicos, que pertencem a outro grupo de compostos que são extraídos da madeira, também têm sido estudados como marcadores de envelhecimento em bebidas, apesar de não afetarem diretamente as características organolépticas da bebida.

Muñoz-Muñoz et al. (2008) verificaram a importância de se desenvolver métodos de análise para marcadores de envelhecimento em bebidas destiladas, já que constataram que, por meio da análise de 11 compostos considerados como marcadores de envelhecimento em tequilas, foi possível uma diferenciação entre as bebidas submetidas a diferentes tempos de armazenamento em tonéis de carvalho.

Aquino et al. (2006a) avaliaram a presença de compostos fenólicos e furânicos em cachaças provenientes do Estado do Ceará, sendo considerados como marcadores de envelhecimento em bebidas, o que possibilitou inferir que a análise desses compostos é bastante útil no controle de qualidade da bebida, já que podem ser um indicativo da autenticidade de armazenamento em tonéis de madeira, uma vez que essas substâncias não são encontradas em cachaças não envelhecidas.

2.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande variedade de estruturas que possuem pelo menos um anel aromático no qual, pelo menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila

e/ou metoxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos micro-organismos (Soares, 2002; Carvalho et al., 2007).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Angelo & Jorge, 2007).

De acordo com Carvalho et al. (2007), os compostos fenólicos podem ser classificados conforme sua ocorrência no reino vegetal, como:

- **Compostos fenólicos amplamente distribuídos:** são geralmente encontrados em todo o reino vegetal, mas, às vezes, podem estar localizados em uma só planta; nesse grupo, estão os derivados de ácidos benzoicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides, e derivados de polimerização (taninos e ligninas);

- **Compostos fenólicos de distribuição restrita:** apresentam-se em um número reduzido, embora sejam encontrados com certa frequência; nesse grupo encontram-se os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol, além dos aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, como a vanilina.

Outra classificação que os compostos fenólicos podem receber é quanto ao tipo de esqueleto principal, conforme representado no Quadro 2, em que C6 corresponde ao anel benzênico e CX, à cadeia substituinte, com X átomos de carbono (Carvalho et al., 2007).

QUADRO 2 Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	ácidos fenólicos
C6-C2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	naftoquinonas
C6-C1-C6	xantonas
C6-C2-C6	estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	lignanas
(C6-C3-C6) ₂	diflavonoides
(C6) _n	melaninas vegetais
(C6-C3) _n	ligninas
(C6-C1) _n	taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	taninos condensados

Na literatura, constata-se que já foram detectados mais de 8.000 compostos fenólicos em plantas. Esses compostos são largamente estudados pelo fato de apresentarem atividades farmacológicas e antinutricionais, e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos, bem como participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em diversos alimentos e bebidas (Mamede & Pastore, 2004).

Conforme mencionado anteriormente, a incorporação de compostos provenientes da madeira utilizada no armazenamento e envelhecimento de

bebidas destiladas está diretamente ligada à degradação da lignina. Dias (2009) cita que alguns autores propuseram um modelo de degradação da lignina, o qual evidencia a influência do oxigênio na formação dos produtos fenólicos incorporados à bebida (Figura 7) (Puech, 1981; Puech et al., 1984).

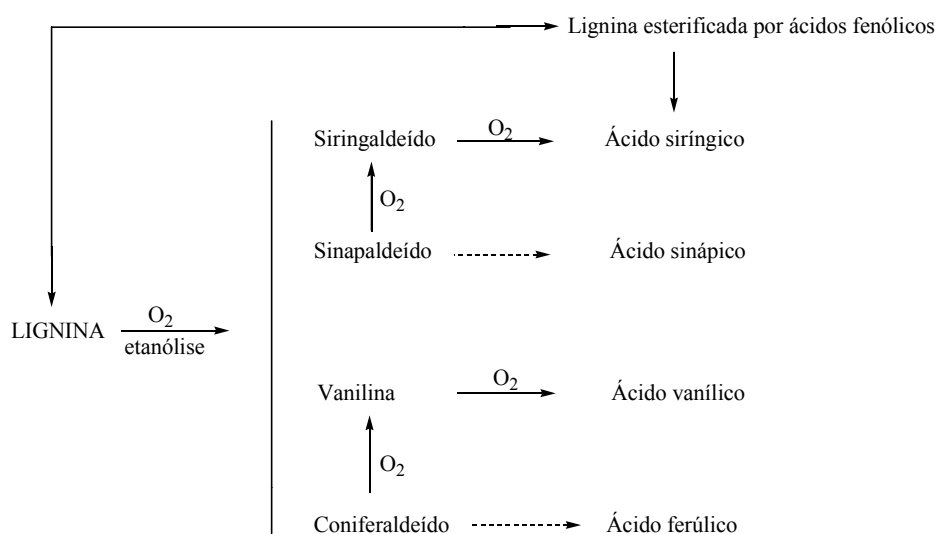


FIGURA 7 Conversão de alguns fenóis derivados da lignina. Fonte: Dias, 2009

Já foram identificados, em destilados alcoólicos envelhecidos em tonéis de carvalho, numerosos aldeídos e ácidos fenólicos, tais como a vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído, os quais são aparentemente provenientes da alcoólise ácida, à temperatura ambiente, da lignina. Outros ácidos fenólicos identificados são o gálico, *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, cinâmico, siríngico e vanílico (Firme, 2003; Zacaroni, 2009). Aquino et al. (2008b) citam que, geralmente, o siringaldeído e a vanilina são os compostos fenólicos predominantemente encontrados em bebidas alcoólicas envelhecidas.

Dias et al. (1998) e Dias et al. (2009), que avaliaram a presença de compostos fenólicos em aguardente de cana armazenada em tonéis de diferentes tipos de madeiras (amburana, bálsamo, jequitibá, jatobá, ipê e carvalho-europeu), constataram a predominância de diferentes compostos fenólicos para cada tipo de madeira utilizada no armazenamento da bebida, indicando a possibilidade de se ter um perfil químico diferenciado para a bebida armazenada em cada uma das madeiras estudadas.

Souza et al. (2007) realizaram um estudo com cachaças envelhecidas em quatro madeiras diferentes (amburana, jequitibá, bálsamo e carvalho) procurando estabelecer um perfil (“impressão digital”) da composição fenólica para as amostras armazenadas em cada uma das madeiras estudadas, já que cada madeira incorpora diferentes compostos fenólicos à bebida. Os autores obtiveram espectros de massas diferenciados para as amostras provenientes de cada uma das madeiras, evidenciando perfis característicos para cada cachaça. Além disso, estudaram amostras de cachaças envelhecidas em carvalho por 1, 2 e 3 anos, a fim de avaliar o perfil químico da bebida ao longo do tempo de armazenamento da bebida. Esse fato levou-os a constatar maiores alterações na composição de alguns compostos, principalmente para as cachaças armazenadas por menos tempo, tendendo a estabilizar a partir do segundo ano de envelhecimento do produto.

Campos et al. (2004) estudaram a composição fenólica de cachaças armazenadas em barris de diferentes madeiras submetidas a tratamento térmico, verificando que houve mudanças significativas na incorporação dos compostos fenólicos provenientes da madeiras submetidas ao tratamento. Os autores sugeriram que, para cada madeira, é necessário um tratamento térmico diferenciado, pois foi observada redução na incorporação de compostos, como o ácido vanílico e vanilina, nas cachaças armazenadas em tonel de bálsamo após o

tratamento térmico da madeira, enquanto houve aumento na concentração dos compostos na cachaça armazenada em amburana.

Canas et al. (2008a) relatam que em diversos estudos tem sido demonstrado que o consumo de alimentos e bebidas com altos teores de compostos fenólicos está relacionado à redução de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, bem como à redução do índice de mortalidade por câncer. Além disso, em alguns trabalhos relatam-se os múltiplos efeitos fisiológicos dos compostos fenólicos, incluindo sua atividade antioxidante. Rakic et al. (2007) citam a importância de compostos antioxidantes para a vida e a saúde humana, já que muitos processos biológicos importantes são fortemente influenciados pela presença dessas substâncias no organismo humano.

Os métodos analíticos utilizados na determinação de compostos fenólicos incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa como a técnica mais utilizada, ou outra técnica de separação, tais como a cromatografia gasosa (GC) ou eletroforese capilar (CE), seguidas pela detecção ultravioleta, eletroquímica, fluorescente ou espectrométrica de massas (Gruz et al., 2008).

Zacaroni (2009) otimizou um método analítico utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, para a análise de 16 compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, relatando que o método proposto mostrou-se simples e eficiente para a determinação simultânea dos compostos fenólicos estudados. Foi observada uma certa heterogeneidade com relação à presença e predominância dos compostos fenólicos para as cachaças envelhecidas nas respectivas madeiras.

Em alguns trabalhos tem sido avaliada a técnica de cromatografia por meio da utilização de métodos de detecção acoplados em sequência para a análise de compostos fenólicos em bebidas. Silva (2006) utilizou a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV-vis acoplado com

um detector de fluorescência para identificar e quantificar 16 compostos fenólicos em cachaças e outras bebidas destiladas envelhecidas em tonéis de madeiras. Esse autor cita a importância da utilização do detector de fluorescência na análise dos compostos, pelo fato de esse apresentar uma melhor seletividade, a qual possibilitou a análise de compostos que, utilizando a metodologia proposta, apresentaram picos coeluídos utilizando o detector de UV-vis. Esse autor encontrou o ácido vanílico, a vanilina e o siringaldeído como compostos fenólicos majoritários em todas as análises.

Gruz et al. (2008) desenvolveram um método para análise qualitativa e quantitativa de 17 ácidos fenólicos em diferentes bebidas, utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada com espectrometria de massas tandem (MS/MS). O método proposto mostrou-se rápido e eficiente para a determinação dos compostos fenólicos em amostras de bebidas, dispensando a realização de pré-tratamento das amostras devido à alta seletividade de detecção do MS/MS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

A cachaça utilizada foi produzida na unidade produtora da Cachaça Artesanal João Mendes, situada no município de Perdões/MG, no período da safra de 2008. Após o processo de destilação do vinho, foi coletada parte das frações “cabeça”, “coração” (denominada de cachaça nova) e “cauda” do destilado.

Para o envelhecimento da bebida, o produto correspondente ao destilado do “coração” foi armazenado em tonel de madeira. O tonel foi mantido em galpão fechado com temperatura e umidade do ar não controladas, e colocado na posição horizontal para possibilitar o maior contato da bebida com a madeira e distanciado de outros tonéis para possibilitar as trocas gasosas. Nessa etapa, foram adotados os seguintes parâmetros:

- volume de cachaça armazenado: aproximadamente 100 litros
- madeira utilizada para o armazenamento da bebida: carvalho (*Quercus* sp)
- capacidade do tonel utilizado para o armazenamento da cachaça: 200 litros

Após armazenar a bebida em tonel de madeira, conforme descrito acima, alíquotas foram coletadas a cada mês por um período de 12 meses, para o acompanhamento da composição química da bebida. Conforme a legislação, esse período corresponde ao tempo mínimo em que a bebida deve ser armazenada em recipientes de madeira para ser considerada envelhecida. Até a data de realização das respectivas análises, todo o material coletado foi mantido sob refrigeração.

3.2 Análises físico-químicas estabelecidas pela legislação brasileira

As análises físico-químicas das amostras de cachaça, durante o período de envelhecimento em tonel de carvalho, foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardentes do Departamento de Química da UFLA, de acordo as metodologias recomendadas pela Instrução Normativa nº 24, de 08/09/2005, do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2005b). Inicialmente as amostras foram redestiladas em triplicata e acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração para a realização das análises de grau alcoólico, álcoois superiores, aldeídos, furfural, ésteres e metanol. Para as demais análises, não foi necessária a redestilação da bebida. As metodologias empregadas para as análises estão descritas a seguir.

3.2.1 Grau alcoólico

Foi determinado por densimetria, sendo o resultado expresso em % em volume. O teor alcoólico foi obtido a partir de medidas a 20°C, com o auxílio de um densímetro digital DensiMat Gibertini.

3.2.2 Extrato seco

A análise foi efetuada por meio de métodos gravimétricos. Inicialmente, uma cápsula de alumínio foi previamente pesada em balança analítica. Em seguida, uma alíquota de 25 mL da amostra sem redestilar foi transferida para a cápsula e evaporada em banho de vapor, a 95°C, por 3 horas. Após esse período, levou-se à estufa a 100°C por 30 minutos e, posteriormente, o material foi resfriado em dessecador. O resíduo sólido remanescente foi pesado em balança analítica (Marte/AM - 220) e os resultados obtidos foram expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra.

3.2.3 Acidez volátil

Foi determinada por titulação volumétrica de neutralização. Os ácidos voláteis foram extraídos da bebida por arraste de vapor, utilizando o Destilador Eletrônico Enochimico Gibertini. Posteriormente, titulou-se o extrato com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de fenolftaleína 1%. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de ácido acético por 100 mL de álcool anidro.

3.2.4 Álcoois superiores

A quantidade total de álcoois superiores foi determinada por meio de reação colorimétrica e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-160-1PC a 540 nm. Eles foram determinados pela adição de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e posterior acidificação das amostras com ácido sulfúrico concentrado. As concentrações foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1. A quantidade total desses compostos foi expressa em miligramas por 100 mL de álcool anidro. A reação ocorrida nesse processo está representada na Figura 8.

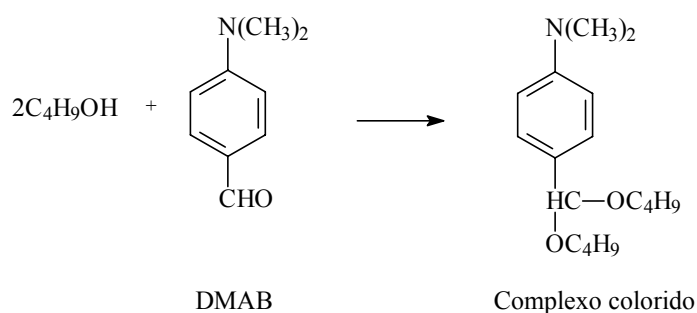
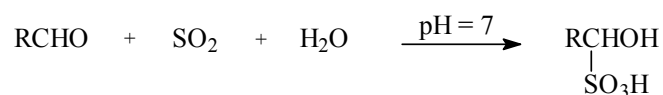


FIGURA 8 Reação química envolvida na análise de álcoois superiores

3.2.5 Aldeídos

Foram analisados pelo método titulométrico direto com iodo 0,05 N, titulando o SO₂ formado por meio das reações envolvidas na análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em miligramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro. As reações referentes a esse processo estão representadas na Figura 9.



o SO₂, em excesso, reage com I₂, em meio ácido:



em meio alcalino, o aldeído é então determinado:

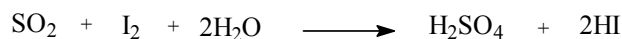


FIGURA 9 Reações químicas envolvidas na análise de aldeídos

3.2.6 Furfural

A quantificação foi realizada por meio da adição de anilina e ácido acético glacial nas amostras, efetuando-se medidas espectrofotométricas a 520 nm utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. As quantidades desse composto foram obtidas por comparação das absorbâncias observadas nas amostras da bebida, 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 miligramas de furfural por 100 mL de álcool anidro. A reação colorimétrica envolvida nesse processo está descrita na Figura 10.

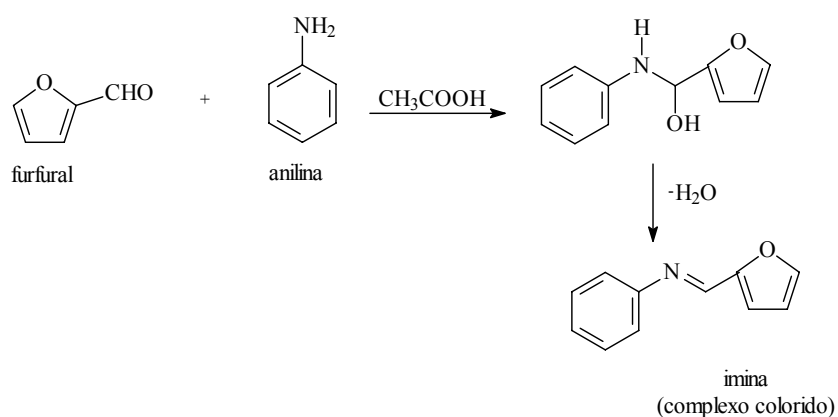


FIGURA 10 Reações químicas envolvidas na análise de furfural

3.2.7 Ésteres

Os ésteres foram determinados pela titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas amostras. Suas quantidades foram expressas em miligramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro. As reações que ocorrem durante a análise dos ésteres estão representadas na Figura 11.

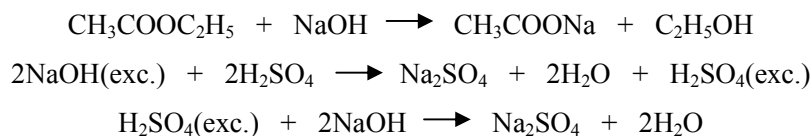


FIGURA 11 Reações químicas envolvidas na análise dos ésteres

3.2.8 Metanol

O metanol foi quantificado por reações colorimétricas e leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601 PC) a 575 nm. As quantidades desse composto foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de metanol por 100 mL de álcool anidro. As reações químicas envolvidas na análise do metanol estão representadas na Figura 12.

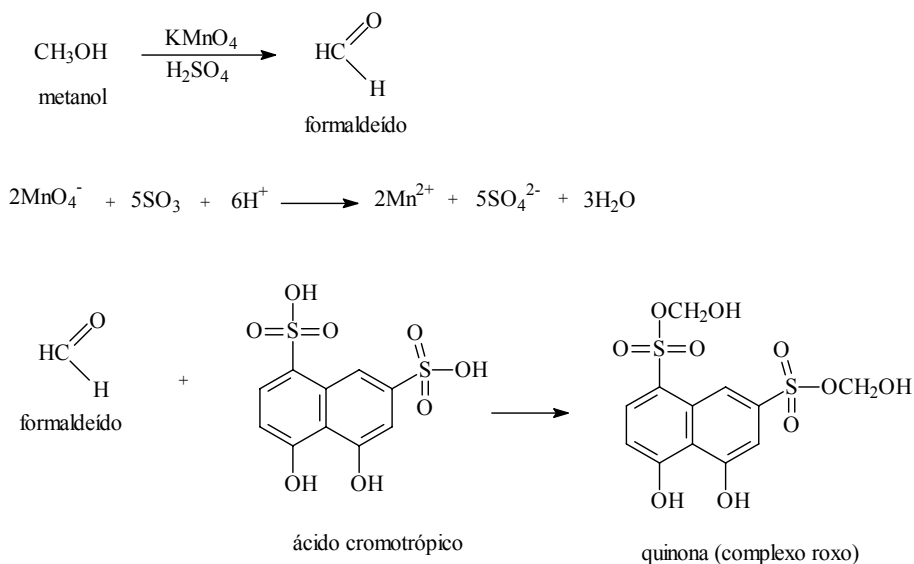


FIGURA 12 Reações químicas envolvidas na análise de metanol

3.2.9 Cobre

Para a quantificação do cobre, foram adicionados cloridrato de hidroxilamina e acetato de sódio para promover uma redução do Cu^{2+} presente nas amostras para Cu^+ . Em seguida, adicionou-se solução de 2,2-diquinolilo em álcool isoamílico, formando-se um complexo de coloração violeta entre o cobre reduzido e tal solução. Realizaram-se medidas espectrofotométricas na região visível do espectro, a 546 nm, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. As quantidades de cobre foram determinadas por meio da construção de uma curva analítica utilizando-se sulfato de cobre como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em mg L^{-1} e as reações envolvidas nessa análise estão descritas na Figura 13.

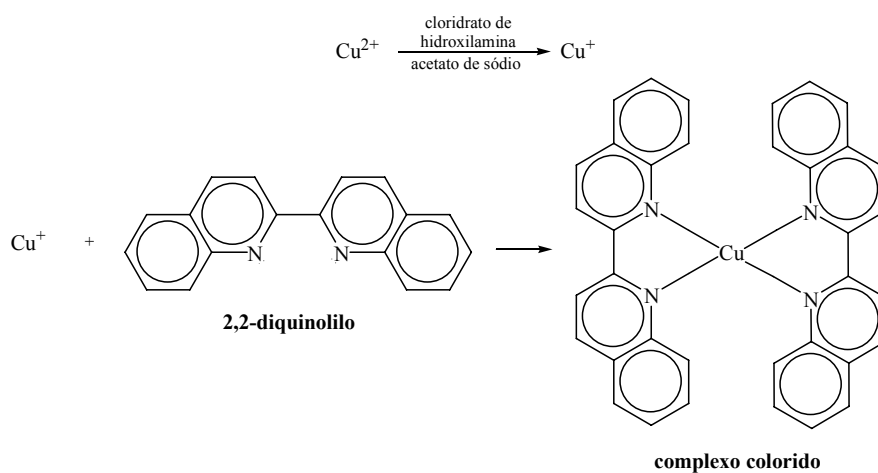


FIGURA 13 Reações químicas envolvidas na análise de cobre

3.3 Compostos fenólicos totais

Para a determinação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras de cachaça, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu modificado (Singleton & Rossi, 1965; Lin et al., 2005).

A 1 mL da amostra, foram adicionados 1 mL de etanol 40% e 5 mL de água destilada. Agitou-se, adicionou-se 0,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 50% e, após 5 minutos, 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 5% foi adicionado à mistura reacional. Após agitação, os tubos foram deixados em repouso por 60 minutos. Decorrido esse tempo, realizaram-se leituras espectrofotométricas a 725 nm (Shimadzu UV-1601 PC). As concentrações foram determinadas por meio da construção de uma curva analítica utilizando diferentes concentrações de ácido gálico em etanol 40% (10-100 mg L⁻¹). A concentração de polifenóis totais foi expressa em mg equivalente de ácido gálico por litro.

3.4 Intensidade da cor

Para a determinação da intensidade de cor das cachaças, foram realizadas leituras espectrofotométricas a 420 nm, utilizando-se cubetas de quartzo, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC (Faria et al., 2003; Miranda et al., 2006). A cachaça nova, sem armazenamento no tonel de carvalho, foi considerada como branco na realização das leituras. Não foi realizado tratamento prévio das amostras para a realização desta análise, sendo, portanto, efetuadas leituras diretas da bebida.

3.5 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas dos compostos fenólicos e carbamato de etila foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardentes do Departamento de Química da UFLA, utilizando a técnica de

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme especificações de cada análise descritas a seguir.

3.5.1 Compostos fenólicos

A metodologia utilizada para a análise dos compostos fenólicos nas amostras de cachaça armazenadas em tonel de madeira foi realizada baseando-se em metodologias propostas na literatura para a análise dessas substâncias nesse tipo de bebida (Aquino et al., 2006a; Aquino et al., 2006b; Silva, 2006; Zacaroni, 2009).

Os padrões empregados para análise dos compostos fenólicos foram ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, cumarina, 4-metilumbeliferona, ácido *o*-cumárico e eugenol, todos adquiridos da Sigma–Aldrich ou da Acros Organics. Os compostos químicos utilizados como solventes para cromatografia foram de grau analítico para HPLC: metanol (Merck) e ácido acético glacial (J.T. Baker) e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q.

3.5.1.1 Preparação dos padrões e amostras

Foram preparadas soluções-estoque com concentração de 1000 mg L⁻¹, para cada um dos padrões de compostos fenólicos, solubilizados em álcool etílico 40%.

O método utilizado para a quantificação dos compostos foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições de uma solução intermediária, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo que essa foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas. Na solução intermediária, os padrões encontravam-se nas seguintes concentrações: ácido gálico (6,80 mg/L), catequina (11,61 mg/L), ácido vanílico (6,73 mg/L), fenol (3,76 mg/L), ácido siríngico (7,93 mg/L),

vanilina (6,08 mg/L), siringaldeído (7,29 mg/L), ácido *p*-cumárico (6,56 mg/L), ácido sinápico (8,97 mg/L), cumarina (5,85 mg/L), 4-metilumbeliferona (7,05 mg/L), ácido *o*-cumárico (6,56 mg/L) e eugenol (6,56 mg/L). As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação (R^2) de 0,9900.

As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45 μm (Millipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. As injeções das amostras foram realizadas em duplicata e a identidade dos analitos foi confirmada pelo tempo de retenção e o perfil dos picos da amostra, comparados aos dos padrões. Os padrões foram injetados em triplicata.

3.5.1.2 Condições cromatográficas

As análises dos compostos fenólicos foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência UPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-6AD, um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A₃, interface modelo CBM-20A e injetor automático com autoamostrador modelo SIL-10AF. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 μm).

Inicialmente adotou-se a metodologia otimizada por Zacaroni (2009), a qual analisou 16 compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras. Porém, utilizando essa metodologia, não foi possível uma boa separação entre os compostos analisados, sendo necessária pequena modificação no gradiente proposto por esse autor. Acredita-se que não foi possível uma boa separação entre os compostos fenólicos utilizando a metodologia de Zacaroni (2009) pelo fato de esse autor ter utilizado um equipamento composto por forno e, para o desenvolvimento deste estudo, utilizou-se outro equipamento

desprovido de forno. Portanto, fica evidente a importância do forno na condução de uma boa separação cromatográfica para o método proposto por esse autor.

Os solventes utilizados como fase móvel foram: solução de ácido acético 2% em água (Solvente A) e metanol:água:ácido acético (70:28:2% v/v) (Solvente B). As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente apresentado na Tabela 1, já que com essa programação obteve-se a melhor separação entre os compostos analisados. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões. A construção das curvas analíticas foi realizada por meio da diluição da solução intermediária previamente preparada, obtendo-se soluções com as respectivas faixas de concentração para os padrões: ácido gálico (0,068 - 1,361 mg/L), catequina (0,116 - 2,322 mg/L), ácido vanílico (0,067 - 1,345 mg/L), fenol (0,038 - 0,753 mg/L), ácido siríngico (0,079 - 1,585 mg/L), vanilina (0,061 - 1,217 mg/L), siringaldeído (0,073 - 1,457 mg/L), ácido *p*-cumárico (0,066 - 1,312 mg/L), ácido sinápico (0,090 - 1,794 mg/L), cumarina (0,058 - 1,169 mg/L), 4-metilumbeliferona (0,070 - 1,409 mg/L), ácido *o*-cumárico (0,066 - 1,312 mg/L) e eugenol (0,262 - 1,312 mg/L).

TABELA 1 Gradiente de eluição da fase móvel para a análise dos compostos fenólicos

Tempo (min.)	Fase móvel*	
	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)
0,01	100	0
25,00	60	40
40,00	45	55
43,00	40	60
50,00	0	100
55,00	100	0
60,00	100	0

*Fase móvel: Solvente A: solução de ácido acético 2%, em água
Solvente B: metanol:água:ácido acético (70:28:2% v/v)

3.5.1.3 Figuras de mérito

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método, sendo avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

A) Seletividade:

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de maneira inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Esse procedimento permite distinguir o analito de todo o resto que possa estar presente na amostra. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras: comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz

adicionada com essa substância (padrão); comparando o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, por meio da utilização de detectores modernos; por meio do método de adição padrão; coletando o composto de interesse e realizando nova análise por outro método ou técnica que são específicos para a estrutura da substância de interesse (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

Para a avaliação da seletividade do método proposto, foi realizado o procedimento de comparação da matriz isenta das substâncias de interesse (compostos fenólicos) e a matriz adicionada com os padrões dos analitos.

B) Linearidade:

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

A relação matemática entre o sinal e a concentração das espécies de interesse foi expressa por meio da equação da reta (curva analítica) e os respectivos coeficientes de determinação (R^2). Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,9900 (Ribani et al., 2004; Azevêdo, 2007; Harris, 2008).

C) Precisão:

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Pode ser avaliada por meio do desvio-padrão absoluto (σ) ou pela estimativa do desvio-padrão absoluto (s), quando o número de determinações é pequeno, pelo intervalo de confiança médio, ou mesmo pela estimativa do desvio-padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Neste estudo, para estimativas da precisão do método, foram determinados os coeficientes de variação (CV) de uma série de medidas, por meio da utilização da seguinte equação matemática: $CV(\%) = (s/CMD) \times 100$, em que, s = estimativa do desvio-padrão; CMD = concentração média determinada. Segundo Snyder et al. (1997), para a análise de compostos presentes em baixas concentrações, o valor de CV não deve ultrapassar 5 ou 10%, dependendo da complexidade da amostra, atestando, assim, a precisão do método analítico proposto.

A precisão, em validação de métodos, é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intracorrída. Para a avaliação da repetitividade do método, foi realizada a análise de soluções-padrão, correspondentes a três níveis de concentração, submetidas a cinco diferentes preparações, sendo, então, estimado o CV correspondente para cada nível de concentração.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório em razão de eventos, como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Para isso, foi realizada a análise, em 5 dias diferentes, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração, sendo estimado o CV ao final das sucessivas repetições.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamento, etc.). Deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em

farmacopeias, procedimentos do Codex, etc., e, por isso, não foi considerada neste estudo (Ribani et al., 2004; Azevêdo, 2007; Harris, 2008).

D) Limite de detecção:

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva analítica.

Para a determinação do LD, foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática:

$LD = 3 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

E) Limite de quantificação:

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

Os mesmos critérios adotados para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, porém, utiliza-se a relação 10:1.

Para a determinação do LQ, foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática:

$LD = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

F) Exatidão:

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro, ou seja, define a “proximidade do valor verdadeiro”.

Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: comparação com materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão.

O número de ensaios varia de acordo com a legislação, diretriz adotada e, também, com as características da pesquisa; alguns órgãos estabelecem um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração (Ribani et al., 2004; Harris, 2008).

Com isso, a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando 3 amostras, escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações diferentes. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática:

$$\% \text{Recuperação} = [(\text{concentração medida}) / (\text{concentração esperada})] \times 100.$$

Os valores aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$; porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani et al., 2004).

3.5.2 Carbamato de etila

O método utilizado para a quantificação do carbamato de etila (CE) consistiu na derivação prévia das amostras para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (Herbert et al., 2002; Park et al., 2007; Madrera & Valles, 2009). Os reagentes empregados para análise foram padrão de carbamato de etila (Acros Organics), etanol, propanol, hexano, ácido

clorídrico (HCl), acetato de etila, acetato de sódio, acetonitrila grau HPLC (Merck), água ultrapura e 9-xantidrol (Acros Organics). Para as análises, foi realizada a purificação do 9-xantidrol por meio de sucessivas recristalizações em hexano.

3.5.2.1 Derivação do padrão de carbamato de etila

A reação química envolvida na etapa de derivação do carbamato de etila está apresentada na Figura 14.

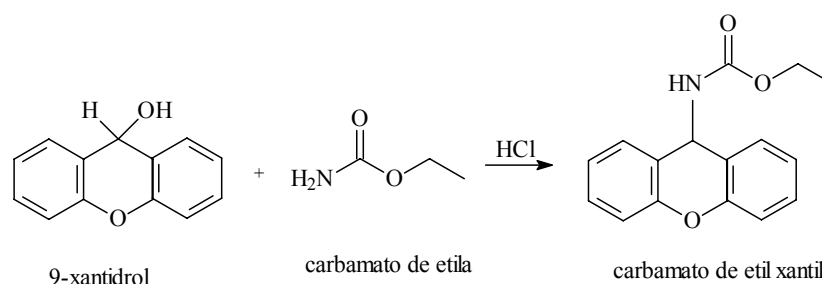


FIGURA 14 Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas

Em frasco âmbar, preparou-se uma solução de 9-xantidrol $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em propanol; a ela, foram adicionados 20 mL de uma solução padrão de carbamato de etila $4,0 \text{ g L}^{-1}$, preparada em etanol 40%. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de HCl 15 mol L^{-1} e, então, a mistura reacional foi mantida sob agitação por aproximadamente 1 minuto; após agitação, foi mantida em repouso por 60 minutos. Os cristais obtidos foram filtrados e recristalizados em hexano.

Para a análise quantitativa, preparou-se uma solução-estoque do carbamato de etila derivado, numa concentração de 10 mg L^{-1} , em acetato de etila. Para a construção da curva analítica, foram realizadas diluições em etanol

50% a partir da solução-estoque previamente preparada, sendo preparadas soluções de trabalho em concentrações que variaram de 5,0 a 75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.5.2.2 Derivação das amostras

Em frasco âmbar, adicionaram-se 4,0 mL de cachaça seguidos de 0,8 mL de solução de xantidrol 0,02 mol L^{-1} (preparada em propanol). Após agitação, adicionou-se 0,4 mL de HCl 1,5 mol L^{-1} , mantendo a mistura reacional sob agitação por 1 minuto. Em seguida, ela foi mantida em repouso por 60 minutos, sendo, posteriormente, filtrada em membranas de polietileno 0,45 μm (Millipore).

Para as análises do carbamato de etila (CE), foram consideradas, além das amostras coletadas ao longo do período de envelhecimento da bebida em tonel de carvalho, alíquotas da cachaça armazenada em recipiente de vidro ao longo dos 12 meses em que a cachaça foi mantida sob maturação, a fim de avaliar a influência do armazenamento da bebida, em diferentes recipientes, na concentração de carbamato de etila.

3.5.2.3 Condições cromatográficas

As análises do carbamato de etila foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência UPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-6AD, um detector de fluorescência (FLD) modelo RF-10AXL, degaseificador modelo DGU-20A₃, interface modelo CBM-20A e injetor automático com autoamostrador modelo SIL-10AF. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 μm).

A quantificação do carbamato de etila foi realizada utilizando-se o método de padronização externa. Os comprimentos de onda de excitação e

emissão empregados foram 233 nm e 600 nm, respectivamente. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,75 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema do tipo gradiente (Tabela 2), sendo a fase móvel composta por solução de acetato de sódio 20 mM (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B).

TABELA 2 Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila

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 mM
Solvente B: acetonitrila

Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com exceção das soluções de trabalho do padrão de carbamato de etila derivado, que foram analisadas em triplicata.

3.6 Análise estatística

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação físico-química das amostras de cachaça

Os resultados obtidos para a avaliação físico-química das frações “cabeça” e “cauda” estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 Avaliação físico-química das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”*

64

	“Cabeça”	“Coração”	“Cauda”	Limite mínimo	Limite máximo
Grau alcoólico ¹	51,34 ± 0,10 (a1)	44,41 ± 0,16 (a2)	23,27 ± 0,10 (a3)	38,00	54,00
Acidez volátil ²	43,71 ± 1,48 (b1)	52,83 ± 1,82 (b2)	214,79 ± 4,35(b3)	-x-	150,0
Ésteres ²	79,25 ± 0,90 (c1)	19,54 ± 1,17 (c2)	50,15 ± 0,22 (c3)	-x-	200,0
Aldeídos ²	58,64 ± 0,54 (d1)	19,55 ± 0,22 (d2)	7,40 ± 0,29 (d3)	-x-	30,00
Álcoois superiores ²	551,06 ± 6,29 (e1)	321,97 ± 14,74 (e2)	86,50 ± 0,96 (e3)	-x-	360,0
Cobre ³	6,31 ± 0,06 (f1)	1,12 ± 0,04 (f2)	1,98 ± 0,04 (f3)	-x-	5,00
Metanol ²	7,07 ± 0,24 (g1)	5,75 ± 0,39 (g2)	ND (g3)	-x-	20,00
Furfural ²	0,12 ± 0,01 (h1)	0,15 ± 0,05 (h1)	2,84 ± 0,12 (h2)	-x-	5,00

*Média ± desvio-padrão; Médias seguidas de mesma letra e número são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$); ¹% v/v; ²mg/100 mL álcool anidro; ³mg L⁻¹; ND = não detectado

Conforme citado por Janzanti (2004), os compostos voláteis da cachaça destilam segundo três critérios: temperatura de ebulição, afinidade com álcool/água e teor alcoólico no vapor da destilação, os quais favorecem a diferenciação da composição química de cada fração coletada durante a destilação da bebida. Essa diferenciação na composição química de cada fração foi mostrada na Tabela 3, por meio da análise de variância. Portanto, compostos mais voláteis e com maior afinidade com álcool/água tendem a estar presentes em maior quantidade nas primeiras frações da destilação, principalmente na fração “cabeça”.

Pelos resultados obtidos para a avaliação físico-química das frações “cabeça” e “cauda”, constata-se que elas apresentaram quantidades inadequadas e fora dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para alguns dos componentes analisados, não sendo, portanto, recomendado o consumo dessas frações. Observa-se que a “cauda” apresentou graduação alcoólica e acidez volátil fora dos limites estabelecidos pelo MAPA. Para a “cabeça”, constatou-se um excesso de aldeídos, álcoois superiores e cobre.

Janzanti (2004) menciona que o metanol e o acetaldeído são destilados principalmente na fração “cabeça”, já que essas substâncias apresentam volatilidades significativamente altas. Esse fato pode ser constatado pelos resultados obtidos, já que as maiores concentrações dessas substâncias foram obtidas para a respectiva fração, estando a concentração de aldeídos (58,64 mg/100 mL álcool anidro) acima do limite máximo estabelecido pela legislação.

Apesar de a fração “cabeça” ser mais rica em substâncias voláteis, outras menos voláteis podem estar presentes nessa fração, como é o caso dos álcoois superiores, já que são arrastados pelos vapores hidroalcoólicos durante a destilação (Vilela, 2005).

Furtado (1995), analisando as frações “cabeça” e “cauda” de diferentes aguardentes, verificou que as maiores concentrações de álcoois, acetaldeído e

acetato de etila foram encontradas na fração mais volátil das amostras analisadas, ou seja, nas frações “cabeça”, enquanto a “cauda” apresentou maiores teores de ácido acético. Pelos resultados obtidos, constata-se que, além dos aldeídos, os álcoois superiores apresentaram concentração de 551,06 mg/100 mL álcool anidro, estando acima do limite máximo estabelecido pelo MAPA, na fração “cabeça”.

De acordo com Reche & Franco (2009), o ácido acético encontra-se em maior quantidade nas frações finais da destilação, pois sua destilação inicia-se durante a destilação da fração “coração”, em razão de sua solubilidade em água e por sua temperatura de ebulição ser maior que a da água. Esse fato corrobora com os resultados obtidos para a avaliação físico-química dessa fração, já que as maiores concentrações dessa substância foram encontradas para o destilado de “cauda” (214,79 mg/100 mL álcool anidro).

A grande concentração de cobre na fração “cabeça” (6,31 mg L⁻¹) deve-se principalmente ao fato de esse metal, que se encontra na forma de carbonato básico de cobre ou “azinhavre” [CuCO₃.Cu(OH)₂] nas paredes internas do alambique, ser arrastado pelos vapores alcoólicos ácidos da bebida durante o processo de destilação (Lima et al., 2006; Lima et al., 2009). Nas primeiras frações da destilação, há a coleta de grande parte dos ácidos voláteis e etanol da bebida, favorecendo a solubilização e contaminação pelo cobre no início da destilação.

A “cauda”, muitas vezes, é denominada de água fraca devido ao baixo teor alcoólico que apresenta, sendo obtido um valor de 23,27% (v/v) para a graduação alcoólica dessa fração analisada. Segundo Vilela (2005), além da baixa graduação alcoólica, essa fração é rica em compostos indesejáveis, como é o caso da maior concentração de furfural, conforme se pode observar na Tabela 3.

Contudo, os destilados de “cabeça” e “cauda” podem prejudicar o sabor e aroma da cachaça, podendo ser prejudicial à saúde do consumidor quando incorporadas à bebida, devido à presença de substância em concentrações indesejáveis nessas frações (Souza, 2006).

Os resultados das análises físico-químicas, obtidos para as amostras de cachaça durante o período de armazenamento no tonel de carvalho, estão apresentados nas Figuras 15 a 24.

Com relação ao grau alcoólico, constatou-se uma ligeira redução ao longo do período de armazenamento da bebida (Figura 15), pelo fato da possibilidade de perda de álcool pelos poros da madeira do tonel, que pode ser influenciada pela temperatura e umidade do ar. Além disso, a redução da graduação alcoólica da bebida pode ser influenciada pela reação do etanol com outras substâncias características da bebida, durante o período de envelhecimento, levando à formação de outros compostos. Vários componentes das aguardentes têm suas concentrações modificadas durante o envelhecimento, devido à evaporação parcial do etanol e da água, sendo comuns perdas de álcool em torno de 3 a 4% ao ano (Miranda et al., 2006; Parazzi et al., 2008).

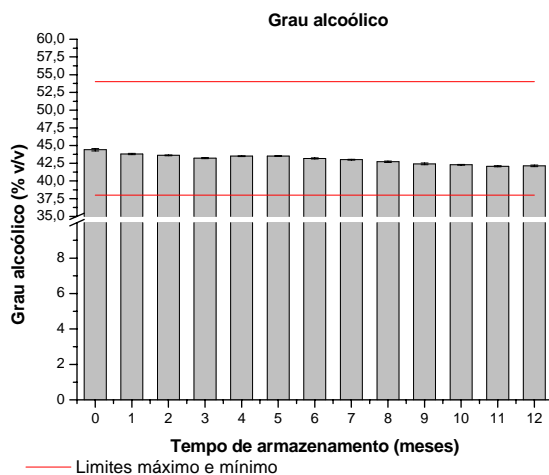


FIGURA 15 Variação da graduação alcoólica em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

Constatou-se uma redução de, aproximadamente, 5% na graduação alcoólica da bebida ao final dos 12 meses de armazenamento da bebida em tonel de madeira, ocorrendo uma variação de 42,13% v/v a 44,41% v/v. Segundo Miranda et al. (2006), as perdas durante o ano dependem, além de variações climáticas, de outros fatores, como a dilatação e contração da cachaça dentro do tonel, vazamentos e expulsão de cachaça por frestas e consequente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, além do modo de armazenamento.

Para o extrato seco, observou-se um aumento significativo ao longo do período de armazenamento da bebida, apresentando um valor inicial de 0,031 mg L⁻¹ e final de 0,229 mg L⁻¹ (Figura 16). Durante o envelhecimento, o aumento nos valores de extrato seco na aguardente ocorre devido à degradação da lignina pelo etanol em compostos aromáticos, levando à incorporação deles à bebida (Miranda et al., 2008).

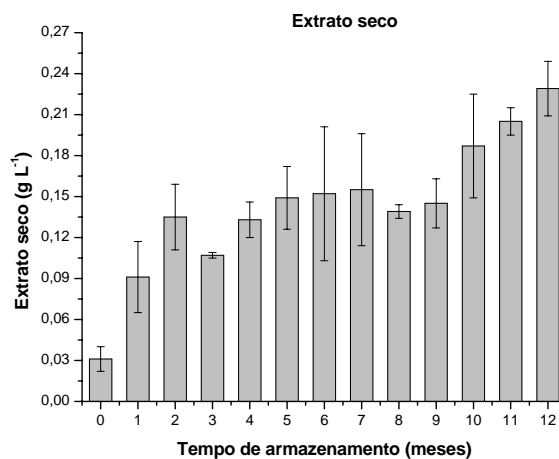


FIGURA 16 Variação do teor de extrato seco em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

Em vinhos, entre os principais grupos que compõem o extrato seco total, encontram-se os ácidos fixos, sais orgânicos e minerais, poliálcoois, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, açúcares e polissacarídeos, os quais são compostos análogos à composição química da aguardente (Rizzon & Miele, 1996). Com isso, espera-se que a evolução do extrato seco na bebida seja proporcional à extração de compostos fenólicos e, conseqüentemente, à intensidade da sua cor. Segundo Mendes et al. (2009), durante o envelhecimento em barril de madeira, observa-se um aumento progressivo no teor de extrato seco, em que os taninos e os compostos fenólicos chegam a representar até 40%.

A acidez volátil apresentou um aumento progressivo ao longo do tempo de armazenamento da cachaça (Figura 17), proporcionado pela reação de oxidação do etanol, o qual contribui para a formação de acetaldeído que, por sua vez, leva à formação de ácido acético (Cardoso, 2006). A incorporação de alguns compostos da madeira, tais como ácidos orgânicos não voláteis, componentes secundários, taninos e compostos fenólicos favorecem o aumento

da acidez em aguardentes submetidas ao processo de envelhecimento (Parazzi et al., 2008). O teor de acidez volátil na bebida apresentou um acréscimo de, aproximadamente, 22,01 mg/100 mL álcool anidro, sendo observada uma variação de 52,83 a 74,84 mg/100 mL álcool anidro.

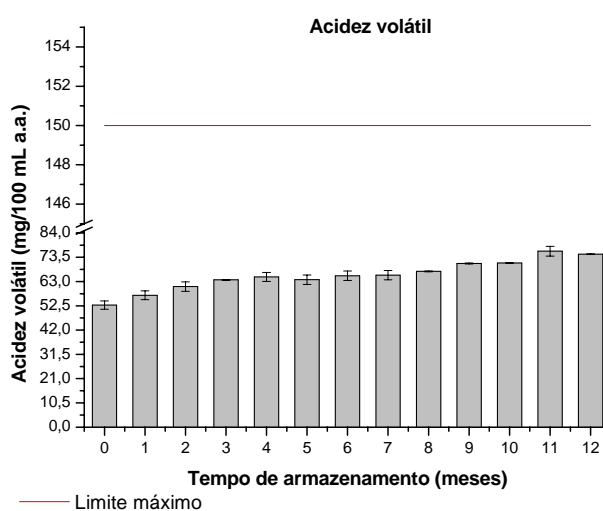


FIGURA 17 Variação da concentração da acidez volátil em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

Observou-se uma ligeira redução na concentração dos álcoois superiores ao longo do tempo de armazenamento da cachaça (Figura 18). Possivelmente, esses compostos foram esterificados, já que Parazzi et al. (2008) citaram que, durante o envelhecimento de bebidas, os principais ésteres encontrados são ésteres de álcoois superiores. Verificou-se que, inicialmente, a concentração de álcoois superiores apresentou-se em 321,8 mg/100 mL álcool anidro, havendo variação na sua concentração durante o período de armazenamento da bebida,

chegando a uma concentração de 315,5 mg/100 mL álcool anidro, no final do período de envelhecimento.

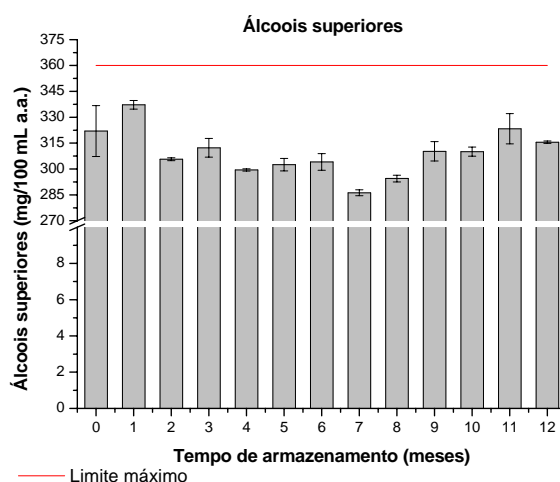


FIGURA 18 Variação da concentração dos álcoois superiores em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

De maneira geral, a concentração de aldeídos apresentou pequena variação durante o período de análise da bebida, apesar de ter sido constatada uma pequena redução na concentração deles ao longo do tempo de envelhecimento, a qual inicialmente estava em 19,55 mg/100 mL álcool anidro, chegando a 19,10 mg/100 mL álcool anidro (Figura 19).

Segundo Miranda et al. (2008), algumas das reações químicas mais importantes durante a maturação de bebidas são a oxidação (que, a partir dos aldeídos, leva à formação dos ácidos orgânicos) e a formação de acetal. Os equilíbrios entre acetal e aldeídos são particularmente importantes para um aroma específico, pois aldeídos frequentemente têm odor desagradável e

pungente, enquanto os acetais são agradáveis e frutados (Piggot & Conner, 2003).

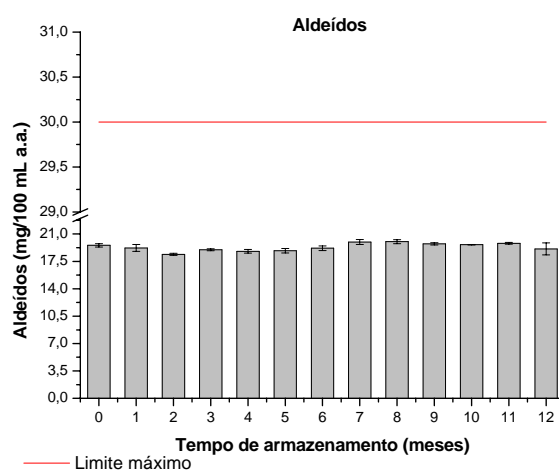


FIGURA 19 Variação da concentração dos aldeídos em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

O furfural apresentou um aumento significativo durante o armazenamento da bebida, sendo constatadas as maiores variações em sua concentração durante os 3 primeiros meses de maturação da cachaça. Para a cachaça nova, foi encontrada uma concentração de furfural de 0,15 mg/100 mL álcool anidro, ao passo que, para a cachaça envelhecida, a concentração desse contaminante esteve em 0,84 mg/100 mL álcool anidro (Figura 20). Apesar de ser formado, principalmente, durante a destilação do vinho, a concentração de furfural tende a aumentar durante o período de maturação de bebidas destiladas devido à degradação de pentoses e seus polímeros (hemicelulose) da madeira do tonel (Miranda et al., 2006; Miranda et al., 2008).

Pelos resultados, verificou-se também que a concentração de furfural tendeu a se estabilizar a partir do quarto mês de armazenamento da bebida, sendo observada uma menor variação da concentração nesse período (0,95-0,84 mg/100 mL álcool anidro).

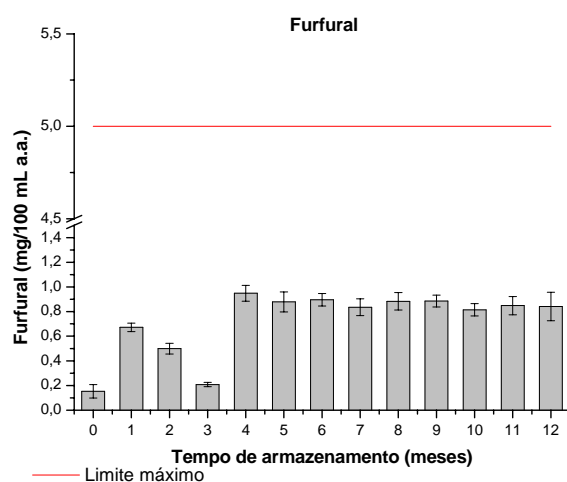


FIGURA 20 Variação da concentração de furfural em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

A presença desse composto na bebida é indesejável devido à toxicidade que este apresenta ao organismo humano. Apesar do aumento na concentração desse contaminante, durante o envelhecimento da bebida, pode-se constatar que essa substância apresentou-se com concentração bastante inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (5 mg/100 mL álcool anidro).

Para os ésteres, foi constatada uma significativa variação em sua concentração ao longo do tempo de armazenamento da cachaça, ocorrendo um aumento expressivo, principalmente a partir do sétimo mês de armazenamento

da bebida (Figura 21). Pelos resultados obtidos, foi possível verificar uma variação na concentração desses congêneres de 19,54 mg/100 mL álcool anidro a 32,75 mg/100 mL álcool anidro, com concentração máxima chegando a 36,98 mg/100 mL álcool anidro (observada no décimo primeiro mês de maturação da cachaça).

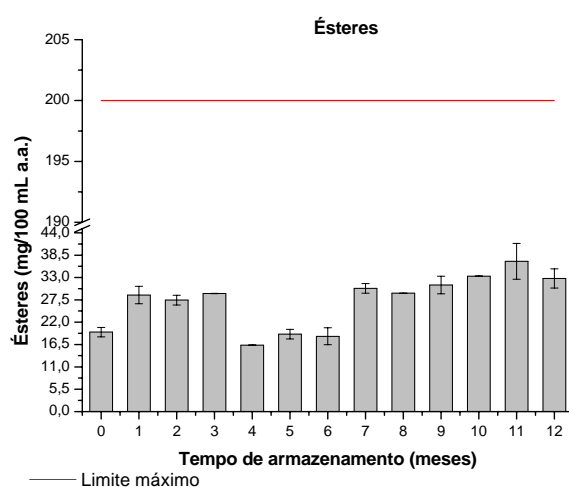


FIGURA 21 Variação da concentração dos ésteres em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

A aguardente envelhecida tende a apresentar um aumento na concentração de ésteres, pois, além das reações de esterificação entre os álcoois e ácidos da bebida, os ésteres são um dos principais compostos extraídos da madeira pelos destilados (Miranda et al., 2008). O acetato de etila é o componente majoritário desse grupo de substâncias, sendo responsável pelo odor agradável das bebidas envelhecidas (Cardoso, 2006; Parazzi et al., 2008). Segundo Silva (2006), o aumento na concentração de acetato de etila ao longo do envelhecimento da aguardente pode ser atribuído ao aumento na acidez da

bebida, havendo deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação (Figura 22), favorecendo a formação desse éster.

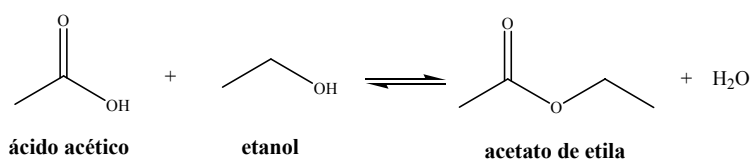


FIGURA 22 Reação de esterificação entre o ácido acético e o etanol durante o processo de maturação

Foi observado um aumento significativo na concentração de metanol durante o período de maturação da cachaça. Os resultados obtidos apresentaram variação de 5,75 mg/100 mL álcool anidro a 17,43 mg/100 mL álcool anidro para essa substância, com concentração máxima obtida para o nono mês de armazenamento da bebida (18,16 mg/100 mL álcool anidro) (Figura 23).

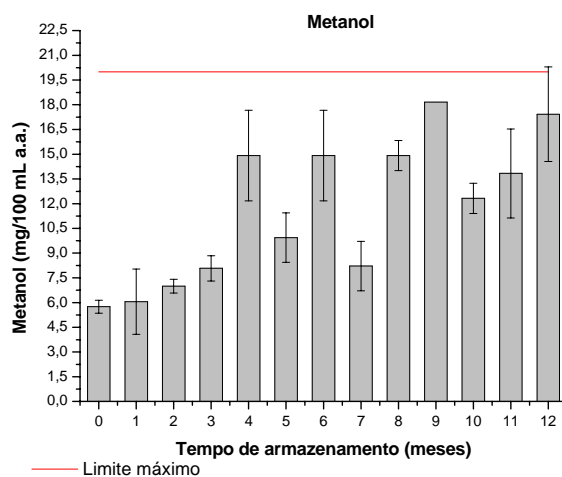


FIGURA 23 Variação da concentração de metanol em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

A presença de metanol na aguardente é indesejável, sendo considerado um contaminante na bebida, devido à sua toxicidade para a saúde. Apesar de ter sido constatado um aumento na concentração dessa substância ao longo do processo de envelhecimento, o metanol apresentou-se abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (20 mg/100 mL álcool anidro).

Alguns estudos realizados com aguardentes envelhecidas não apontaram uma variação significativa na concentração de metanol durante o processo de envelhecimento da bebida (Parazzi et al., 2008). O incremento constatado para esse composto pode estar relacionado à degradação de macromoléculas da madeira (como a lignina), as quais apresentam diversos grupos metílicos em sua estrutura, podendo ser liberados para a bebida durante o processo de envelhecimento. Além disso, o tratamento térmico da madeira promove a liberação de substâncias, às quais o metanol pode estar associado, como é o caso do ácido pirolenhoso (uma mistura de água, metanol, acetona, ácido acético, entre outros), que é obtido da madeira quando ela é submetida a uma temperatura de 250°C, levando, então, à contaminação da bebida por esse contaminante (Silva, 2006).

Os resultados obtidos para o acompanhamento da concentração de cobre nas amostras analisadas estão apresentados na Figura 24, por meio das quais se pode constatar que o envelhecimento da cachaça proporcionou um decréscimo significativo da concentração desse metal, sendo observada uma variação de 1,12 mg L⁻¹ a 0,58 mg L⁻¹, representando uma diferença de, aproximadamente, 48% entre a concentração inicial e final de cobre na cachaça envelhecida. Estudos de Cavalheiro et al. (2003), avaliando a influência do envelhecimento na concentração de cobre em aguardentes, mostraram que houve uma redução média de 74,1% entre a concentração de cobre das amostras recém-destiladas e das amostras envelhecidas.

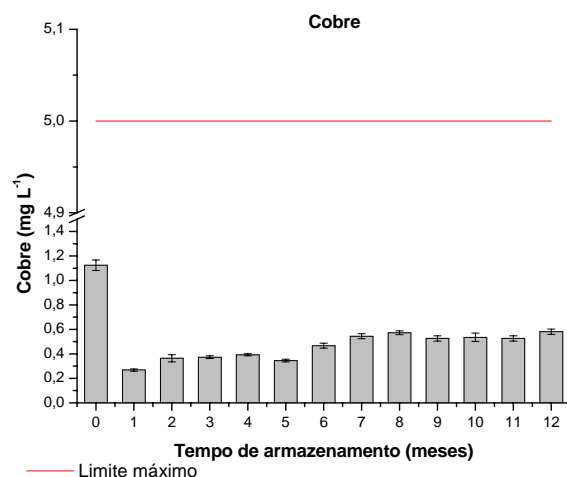


FIGURA 24 Variação da concentração de cobre em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

Para Miranda et al. (2008), a redução na concentração de cobre durante o período de envelhecimento da cachaça pode estar relacionada à absorção ou adsorção desse elemento pelos tonéis de madeira. Esse fato pode ser influenciado pela propriedade dos compostos fenólicos em se complexarem com metais, favorecendo a retenção do cobre na madeira do tonel utilizado para o armazenamento da bebida (Carvalho et al., 2007). Diante disso, acredita-se que o envelhecimento seja uma possível alternativa para o controle do excesso de cobre na cachaça, já que a presença desse metal em altas concentrações pode trazer danos à saúde do consumidor.

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que a concentração desse metal nas amostras analisadas apresentou-se abaixo do limite máximo estabelecido pelo MAPA (5 mg L^{-1}), havendo uma tendência de estabilização da concentração a partir do sétimo mês de armazenamento da bebida, demonstrada

pela pequena variação de sua concentração, no período de 7 a 12 meses (0,54-0,58 mg L⁻¹).

Um fato importante a ser considerado para as análises realizadas refere-se à amostragem obtida ao longo do período de coleta da bebida, visto que não foi efetuada homogeneização da amostra armazenada no tonel de madeira durante a coleta do produto. Esse fato pode ter influenciado as variações ocorridas para alguns dos parâmetros analisados, principalmente para o metanol e o furfural nos primeiros meses de análise.

4.1.1 Compostos fenólicos totais e intensidade da cor

Os resultados obtidos para a concentração de compostos fenólicos totais estão apresentados na Figura 25.

Pelos resultados obtidos, constata-se que a concentração de compostos fenólicos totais variou de não detectado a 18,50 mg L⁻¹. Até o oitavo mês de armazenamento da bebida, foi constatado um aumento expressivo na concentração desses compostos na cachaça, havendo uma tendência de estabilização da concentração a partir do nono mês de maturação. Miranda et al. (2008) mostraram que o acréscimo mais significativo no teor de compostos fenólicos ocorreu nos 5 primeiros meses do período de envelhecimento das cachaças analisadas, ao passo que, para Parazzi et al. (2008), foi observado um aumento expressivo até o sexto mês de armazenamento da bebida.

Além das amostras apresentadas na Figura 26, foi realizada a análise dos compostos fenólicos totais nas frações “cabeça” e “cauda”, não sendo detectada a presença desses compostos nas respectivas frações utilizando o método espectrofotométrico.

De acordo com Mendes et al. (2009), os compostos fenólicos, provenientes da madeira, incorporam-se progressivamente à bebida durante o

período de envelhecimento, tornando-a amarelada e de paladar mais suave, atenuando a sensação desidratante do álcool presente.

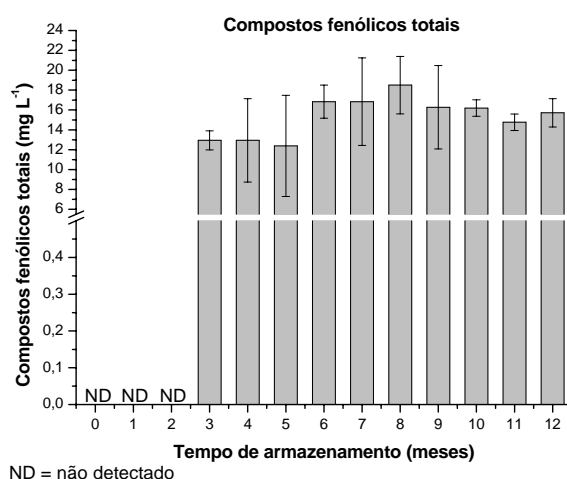


FIGURA 25 Variação da concentração de compostos fenólicos totais em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

Para Miranda et al. (2008), com relação à extração de taninos durante o envelhecimento da aguardente, deve-se considerar a razão superfície/volume, em que tonéis de menor capacidade têm maiores relações superfície/volume, o que, conseqüentemente, resulta em maior rapidez de extração de componentes, havendo maiores taxas de evaporação de álcool e água. Outros autores ainda citam que quanto maior a graduação alcoólica do destilado a ser envelhecido, mais lenta é a extração de taninos, já que a degradação hidrolítica da madeira requer água (Miranda et al., 2006).

Foi realizada também a avaliação da intensidade da cor na cachaça armazenada em tonel de carvalho (Figura 26). Pelos resultados obtidos,

verificou-se um aumento progressivo durante o período de estoque da bebida no tonel de madeira, sendo observada a evolução da coloração amarelada da bebida ao longo do período de maturação.

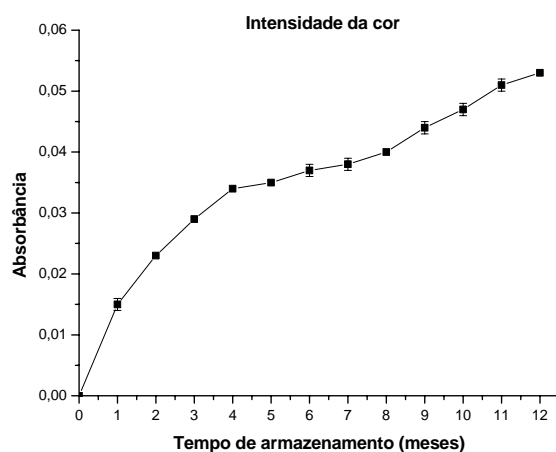


FIGURA 26 Evolução da intensidade da cor em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho

A evolução da intensidade de cor da cachaça envelhecida está relacionada à incorporação de componentes da madeira à bebida durante o período de armazenamento. Os principais responsáveis pelo progressivo escurecimento ou intensificação da cor amarelo-alaranjada em bebidas sob maturação em madeiras são os taninos e seus produtos de oxidação (Miranda et al., 2008).

Constatou-se correlação linear positiva significativa (Tabela 4) entre a concentração de compostos fenólicos totais e a intensidade da cor, mostrando que as variações ocorridas no aumento da intensidade da cor das amostras

analisadas podem ser explicadas pelo aumento na incorporação de compostos fenólicos ao longo do envelhecimento da bebida.

TABELA 4 Coeficientes de correlação entre o extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade da cor

	Extrato seco	Compostos fenólicos totais	Intensidade da cor
Extrato seco	1,0000	0,6652	0,9409
Compostos fenólicos totais	0,6652	1,0000	0,8500
Intensidade da cor	0,9409	0,8500	1,0000

Como mencionado anteriormente, o aumento no teor de extrato seco é proporcional à incorporação de compostos fenólicos e ao aumento da intensidade da cor. Neste trabalho, encontrou-se correlação linear positiva significativa entre o extrato seco e a concentração de compostos fenólicos totais, e entre o extrato seco e a intensidade da cor, evidenciando que boa parte das variações ocorridas no aumento do extrato seco são explicadas pelo aumento na extração de compostos fenólicos e, conseqüentemente, pelo aumento na intensidade da cor da bebida durante o período de maturação.

4.2 Análises cromatográficas

4.2.1 Compostos fenólicos

Na Figura 27 ilustra-se o perfil cromatográfico da solução padrão dos compostos fenólicos, podendo-se observar a separação de todos os compostos.

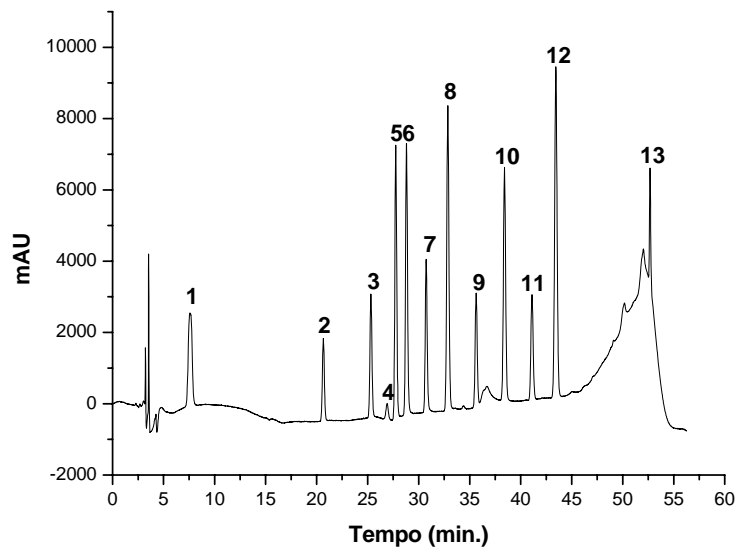


FIGURA 27 Cromatograma da solução padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido *p*-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido *o*-cumárico; (13) eugenol. Concentração de cada padrão: $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

Na Tabela 5, verifica-se o tempo de retenção médio obtido para cada composto analisado.

TABELA 5 Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos analisados

Compostos fenólicos	t_R (minutos)*
Ácido gálico	8,12 ± 0,16
Catequina	22,04 ± 0,31
Ácido vanílico	27,03 ± 0,36
Fenol	28,67 ± 0,45
Ácido sirínico	29,63 ± 0,31
Vanilina	30,74 ± 0,33
Siringaldeído	32,81 ± 0,29
Ácido <i>p</i> -cumárico	35,12 ± 0,43
Ácido sinápico	38,10 ± 0,30
Cumarina	41,04 ± 0,26
4-metilumbeliferona	43,96 ± 0,30
Ácido <i>o</i> -cumárico	46,46 ± 0,35
Eugenol	55,97 ± 0,86

* Média ± desvio-padrão (n = 21)

4.2.1.1 Certificação do método analítico

Os parâmetros avaliados na validação do método proposto foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

Nas condições cromatográficas empregadas, constatou-se que as amostras não apresentaram substâncias interferentes nos tempos de retenção dos compostos fenólicos analisados, os quais podem ser observados por meio do cromatograma da cachaça nova (isenta dos compostos analisados) e dessa mesma amostra fortificada com os padrões dos compostos analisados, numa

concentração de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para cada composto (Figura 28), atestando, assim, a seletividade do método analítico.

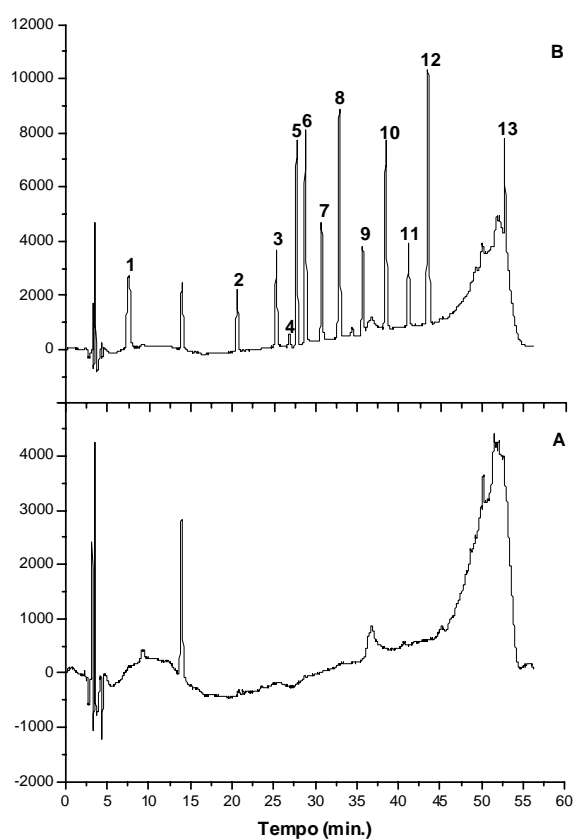


FIGURA 28 Cromatograma da cachaça nova (A) e da cachaça nova adicionando-se os padrões de compostos fenólicos numa concentração de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (B). Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido *p*-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido *o*-cumárico; (13) eugenol.

Por meio da construção das curvas analíticas, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de determinação referentes às equações das curvas, obtidas por regressão linear. Foram obtidos coeficientes de determinação variando de 0,9900 a 0,9999, mostrando a forte correlação linear entre a concentração dos compostos analisados e as áreas dos picos, com valores acima de 0,99 para o coeficiente de correlação, conforme recomendado na literatura (Snyder et al., 1997) (Tabela 6).

TABELA 6 Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas*

Composto	b	a	R^2
Ácido gálico	55590,01104	-500,74905	0,9982
Catequina	14683,88485	-31,86382	0,9998
Ácido vanílico	38230,9352	-306,4308	0,9998
Fenol	9652,01251	-20,43278	0,9993
Ácido siríngico	67062,87563	-281,25731	0,9998
Vanilina	90530,65283	-144,68423	0,9997
Siringaldeído	41267,298	-148,19036	0,9999
Ácido <i>p</i> -cumárico	104621,40798	58,64023	0,9998
Ácido sinápico	25839,18478	-174,02398	0,9985
Cumarina	92651,83523	-560,30231	0,9998
4-metilumbeliferona	35614,09263	-421,8559	0,9996
Ácido <i>o</i> -cumárico	127886,57858	-508,64043	0,9998
Eugenol	21025,02462	1722,76449	0,9900

*Regressão linear: $y = bx + a$

A precisão do método analítico foi avaliada em relação aos níveis de repetitividade e precisão intermediária, estimando o coeficiente de variação (CV) para cada composto analisado, mediante sucessivas medições, para três níveis de concentração.

Pelos resultados obtidos mediante os testes de repetitividade, obtiveram-se os CV, que variaram de 2,01% (ácido *o*-cumárico) a 23,3% (fenol), na concentração de $4,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, de 0,27% (vanilina) a 5,39% (fenol), na concentração de $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, e de 0,13% (ácido *o*-cumárico) a 2,90% (eugenol), na concentração de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (Tabela 7).

Para os testes realizados na avaliação da precisão intermediária, foram obtidos valores para o CV que variaram de 2,32% (sirngaldeído) a 17,9% (fenol), na concentração de $4,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, de 0,20% (ácido *p*-cumárico) a 6,98% (eugenol), na concentração de $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, e de 0,08% (ácido *o*-cumárico) a 2,45% (eugenol), na concentração de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (Tabela 8).

TABELA 7 Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada composto na avaliação da repetitividade do método

Composto	mg L ⁻¹	Áreas	CV (%)	mg L ⁻¹	Áreas	CV (%)	mg L ⁻¹	Áreas	CV (%)
Ácido gálico	0,068	3049,4	10,5	0,680	38126,8	2,08	1,361	78517,6	1,28
Catequina	0,116	1568,2	5,29	1,161	17188,4	0,37	2,322	34882,5	0,42
Ácido vanílico	0,067	2205,8	3,97	0,673	25591,9	1,07	1,345	51596,0	0,15
Fenol	0,038	335,3	23,3	0,376	3646,3	5,39	0,753	7503,8	1,67
Ácido siríngico	0,079	4868,1	1,90	0,793	53102,9	0,37	1,585	107570,4	0,34
Vanilina	0,061	5050,4	2,10	0,608	55989,2	0,27	1,217	111849,5	0,26
Siringaldeído	0,073	2620,6	4,34	0,729	30805,0	0,58	1,457	61291,8	0,41
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,066	6255,1	2,86	0,656	65615,6	0,61	1,312	135748,6	0,26
Ácido sinápico	0,090	1709,4	4,65	0,897	23150,6	2,98	1,794	47524,9	2,09
Cumarina	0,058	4727,9	3,18	0,585	55995,8	0,65	1,169	111529,5	0,67
4-metilumbeliferona	0,070	2007,9	7,90	0,705	24755,5	1,33	1,409	50250,8	0,60
Ácido <i>o</i> -cumárico	0,066	7485,9	2,01	0,656	83811,5	0,61	1,312	169147,1	0,13
Eugenol	-	-	-	0,656	14919,4	4,34	1,312	28771,1	2,90

TABELA 8 Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada composto na avaliação da precisão intermediária do método

Composto	mg L ⁻¹	Áreas	CV (%)	mg L ⁻¹	Áreas	CV (%)	mg L ⁻¹	Áreas	CV (%)
Ácido gálico	0,068	2745,1	7,24	0,680	35457,2	1,39	1,361	69747,8	0,93
Catequina	0,116	1513,1	5,01	1,161	16771,6	0,71	2,322	33440,1	0,37
Ácido vanílico	0,067	2073,2	6,29	0,673	25339,1	0,33	1,345	50734,5	0,33
Fenol	0,038	247,8	17,9	0,376	3255,2	4,85	0,753	7440,6	1,86
Ácido siríngico	0,079	4665,5	2,65	0,793	52476,4	0,22	1,585	105260,1	0,21
Vanilina	0,061	5004,7	2,52	0,608	54733,3	0,32	1,217	109625,7	0,21
Siringaldeído	0,073	2659,3	2,32	0,729	29715,0	0,63	1,457	59964,1	0,34
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,066	7317,1	2,78	0,656	68162,8	0,20	1,312	136793,0	0,27
Ácido sinápico	0,090	1736,8	7,01	0,897	22719,5	1,29	1,794	44737,0	1,23
Cumarina	0,058	4570,8	4,41	0,585	53128,3	0,44	1,169	106791,5	0,25
4-metilumbeliferona	0,070	2236,5	4,57	0,705	24592,0	0,75	1,409	49376,5	0,53
Ácido <i>o</i> -cumárico	0,066	7601,9	2,42	0,656	83193,4	0,26	1,312	166405,4	0,08
Eugenol	-	-	-	0,656	14459,5	6,98	1,312	28232,6	2,45

De maneira geral, tanto para os testes de repetitividade quanto para a precisão intermediária, os valores encontrados para o CV estão abaixo do limite de 5% para a maioria dos compostos analisados, conforme é recomendado, sendo os maiores valores obtidos para o menor nível de concentração testado. Apesar de alguns compostos apresentarem CV acima de 5%, o método apresenta precisão para a maioria dos compostos fenólicos analisados em cachaça, devendo-se considerar a complexidade das amostras de cachaça envelhecida.

Vale ressaltar que, apenas para o eugenol, não foi possível a realização dos testes de precisão no menor nível de concentração, adotado para os compostos, já que esse apresentava-se fora da curva analítica construída para esse composto.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para o método analítico estão apresentados na Tabela 9.

Os limites de detecção e quantificação encontrados para os compostos fenólicos variaram de 0,016 a 0,131 mg L⁻¹ e de 0,055 a 0,437 mg L⁻¹, respectivamente, correspondendo aos valores encontrados para a cumarina e para o eugenol. Os valores obtidos apresentaram-se inferiores aos encontrados por Aquino et al. (2006b) e Zacaroni (2009), estando, entretanto, mais próximos àqueles obtidos pelo segundo autor, o que demonstra a boa sensibilidade do método para a análise dos compostos fenólicos em cachaça armazenada em tonel de madeira. Ribani et al. (2004) afirmam que diferenças nesses parâmetros podem ser provenientes de diferenças nas condições cromatográficas, como na aparelhagem e/ou metodologias adotadas para a quantificação dos compostos.

TABELA 9 Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos

Composto	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Ácido gálico	0,064	0,215
Catequina	0,040	0,132
Ácido vanílico	0,022	0,074
Fenol	0,021	0,071
Ácido siríngico	0,027	0,090
Vanilina	0,022	0,075
Siringaldeído	0,017	0,058
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,020	0,068
Ácido sinápico	0,076	0,253
Cumarina	0,016	0,055
4-metilumbeliferona	0,032	0,106
Ácido <i>o</i> -cumárico	0,021	0,070
Eugenol	0,131	0,437

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em que a concentração dos compostos fenólicos foi calculada pelo aumento das áreas dos picos, obtida após a adição de uma quantidade conhecida dos padrões a 3 amostras escolhidas aleatoriamente. Os resultados referentes à porcentagem de recuperação estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de cachaça

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			% Recuperação	CV (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Ácido gálico	ND	0,068	0,072	106	11,1
	ND	0,680	0,704	104	2,65
	ND	1,361	1,466	108	0,66
	0,930	0,068	0,964	96,6	0,12
	0,930	0,680	1,567	97,3	2,01
	0,930	1,361	2,099	91,6	2,15
	1,121	0,068	1,183	99,5	1,01
	1,121	0,680	1,734	96,3	0,59
	1,121	1,361	2,383	96,0	0,36
		Média**	99,5	2,29	
Catequina	<LQ	0,116	0,122	59,6	13,8
	<LQ	1,161	1,158	92,7	1,82
	<LQ	2,322	2,430	101	0,13
	ND	0,116	0,134	115	10,7
	ND	1,161	1,214	105	1,60
	ND	2,322	2,425	104	1,02
	<LD	0,116	0,170	124	4,40
	<LD	1,161	1,225	104	0,11
	<LD	2,322	2,350	100	1,35
		Média**	101	3,88	
Ácido vanílico	ND	0,067	0,063	93,7	1,00
	ND	0,673	0,656	97,5	0,61
	ND	1,345	1,369	102	0,19
	0,203	0,067	0,132	48,8	14,0
	0,203	0,673	0,867	99,0	0,47
	0,203	1,345	1,529	98,8	1,35
	0,245	0,067	0,317	102	0,24
	0,245	0,673	0,892	97,1	1,01
	0,245	1,345	1,530	96,2	1,06
		Média**	92,8	2,21	

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação
**CV= coeficiente de variação; n = 18

...continua...

TABELA 10 Continuação.

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			% Recuperação	CV (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Fenol	ND	0,038	0,032	83,8	11,1
	ND	0,376	0,316	84,0	4,27
	ND	0,753	0,778	103	1,53
	0,480	0,038	0,043	8,36	3,53
	0,480	0,376	0,376	43,9	2,65
	0,480	0,753	0,765	62,0	0,01
	0,571	0,038	0,028	4,57	10,5
	0,571	0,376	0,373	39,4	5,43
	0,571	0,753	0,777	58,7	0,79
			Média**	54,2	4,42
Ácido siríngico	ND	0,079	0,075	94,9	2,42
	ND	0,793	0,781	98,5	0,03
	ND	1,585	1,615	102	0,18
	0,451	0,079	0,508	95,8	1,13
	0,451	0,793	1,184	95,2	0,07
	0,451	1,585	1,885	92,6	2,78
	0,552	0,079	0,535	84,8	0,65
	0,552	0,793	1,265	94,1	0,08
	0,552	1,585	2,015	94,3	0,08
			Média**	94,7	0,82
Vanilina	ND	0,061	0,071	116	1,16
	ND	0,608	0,605	99,5	0,52
	ND	1,217	1,234	101	0,45
	0,214	0,061	0,278	101	1,19
	0,214	0,608	0,811	98,7	0,38
	0,214	1,217	1,374	96,1	0,96
	0,265	0,061	0,304	93,2	0,17
	0,265	0,608	0,840	96,2	0,15
	0,265	1,217	1,419	95,7	0,33
			Média**	99,7	0,59

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação
**CV= coeficiente de variação; n = 18

...continua...

TABELA 10 Continuação.

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			% Recuperação	CV (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Siringaldeído	ND	0,073	0,078	106	1,27
	ND	0,729	0,733	100	0,47
	ND	1,457	1,513	104	0,18
	0,946	0,073	0,901	88,5	0,32
	0,946	0,729	1,492	89,1	0,41
	0,946	1,457	2,187	91,0	1,84
	1,090	0,073	1,119	96,2	0,53
	1,090	0,729	1,659	91,2	0,06
	1,090	1,457	2,304	90,5	0,23
		Média**	95,2	0,59	
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	0,066	0,057	85,9	0,52
	ND	0,656	0,620	94,5	0,28
	ND	1,312	1,315	100	0,36
	<LQ	0,066	0,144	138	0,72
	<LQ	0,656	0,715	103	0,32
	<LQ	1,312	1,337	99,0	4,21
	<LQ	0,066	0,049	43,6	4,28
	<LQ	0,656	0,745	106	1,34
	<LQ	1,312	1,416	104	0,42
		Média**	97,1	1,38	
Ácido sinápico	ND	0,090	0,058	64,2	3,51
	ND	0,897	0,910	101	0,91
	ND	1,794	1,914	107	0,85
	<LQ	0,090	0,129	66,7	11,7
	<LQ	0,897	0,919	91,8	1,90
	<LQ	1,794	2,007	106	6,72
	<LQ	0,090	0,074	36,5	1,65
	<LQ	0,897	0,917	90,8	0,54
	<LQ	1,794	1,885	98,8	0,33
		Média**	84,8	3,12	

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação

**CV= coeficiente de variação; n = 18

...continua...

TABELA 10 Continuação.

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			% Recuperação	CV (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Cumarina	ND	0,058	0,065	112	1,18
	ND	0,585	0,611	104	0,29
	ND	1,169	1,249	107	0,35
	<LQ	0,058	0,054	47,9	6,21
	<LQ	0,585	0,600	93,8	0,11
	<LQ	1,169	1,205	98,5	0,23
	<LQ	0,058	0,056	50,5	2,07
	<LQ	0,585	0,577	90,5	0,16
	<LQ	1,169	1,192	97,6	0,12
			Média**	89,1	1,19
4-metilumbeliferona	ND	0,070	0,070	99,8	4,60
	ND	0,705	0,687	97,4	0,47
	ND	1,409	1,442	102	0,23
	ND	0,070	0,077	110	4,89
	ND	0,705	0,698	99,0	0,35
	ND	1,409	1,415	100	0,26
	ND	0,070	0,073	105	6,31
	ND	0,705	0,671	95,2	0,23
	ND	1,409	1,389	98,6	0,39
			Média**	101	1,97
Ácido <i>o</i> -cumárico	ND	0,066	0,063	95,9	2,57
	ND	0,656	0,645	98,3	1,13
	ND	1,312	1,332	101	0,25
	<LD	0,066	0,109	143	0,01
	<LD	0,656	1,072	161	3,26
	<LD	1,312	1,793	136	5,73
	<LD	0,656	0,443	66,1	11,7
	<LD	1,312	1,126	84,8	1,61
			Média**	111	3,28

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação
 **CV= coeficiente de variação; n = 18

...continua...

TABELA 10 Continuação.

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			%	CV (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Eugenol	<LD	0,066	0,031	29,3	32,9
	<LD	0,656	0,640	92,1	12,1
	<LD	1,312	1,466	108	0,68
	ND	0,066	0,045	68,5	23,5
	ND	0,656	0,776	118	4,06
	ND	1,312	2,077	158	0,77
	ND	0,066	0,111	167	18,2
	ND	0,656	0,813	124	5,88
	ND	1,312	1,505	115	6,28
			Média**	109	11,6

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação

**CV= coeficiente de variação; n = 18

Com base nos limites aceitáveis para a porcentagem de recuperação (entre 70 e 120%), constata-se que o método apresentou boa recuperação para os compostos ácido gálico (99,5%), catequina (101%), ácido vanílico (92,8%), ácido siríngico (94,7%), vanilina (99,7%), siringaldeído (95,2%), ácido *p*-cumárico (97,1%), ácido sinápico (84,8%), cumarina (89,1%), 4-metilumbeliferona (101%), ácido *o*-cumárico (111%) e eugenol (109%), cujos valores médios incluíam-se nos limites aceitáveis. Considerando que para amostras complexas o limite aceitável pode ser considerado de 50 a 120%, este intervalo possibilita a inclusão da recuperação obtida para o fenol (54,2%). Trabalhos de Aquino et al. (2006b) e Zacaroni (2009) apresentaram porcentagens de recuperação similares para a maioria dos compostos fenólicos analisados. Vale ressaltar que, para o fenol, houve diferença significativa entre a recuperação obtida neste estudo e aquela observada por Zacaroni (2009) (92,97%).

4.2.1.2 Quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de cachaça

Os resultados obtidos para a quantificação dos compostos fenólicos ao longo do período de envelhecimento da cachaça estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 Concentração de compostos fenólicos (mg L⁻¹) ao longo do período de envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho

Tempo de armazenamento (meses)	Compostos													Evolução (vezes)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ácido gálico	ND	0,293 ± 0,008	0,420 ± 0,005	0,577 ± 0,021	0,678 ± 0,009	0,787 ± 0,011	0,930 ± 0,038	0,927 ± 0,019	1,075 ± 0,061	1,053 ± 0,002	1,121 ± 0,002	0,985 ± 0,169	1,012 ± 0,032	3,83
Catequina	<LQ	<LQ	<LD	ND	ND	ND	ND	<LD	ND	<LD	<LD	<LQ	<LQ	-
Ácido vanílico	ND	<LQ	0,097 ± 0,001	0,128 ± 0,001	0,151 ± 0,009	0,173 ± 0,010	0,203 ± 0,001	0,204 ± 0,012	0,228 ± 0,002	0,232 ± 0,000	0,245 ± 0,001	0,270 ± 0,009	0,293 ± 0,007	3,02
Fenol	ND	0,145 ± 0,004	0,232 ± 0,011	0,273 ± 0,002	0,335 ± 0,004	0,402 ± 0,001	0,480 ± 0,051	0,477 ± 0,025	0,509 ± 0,020	0,541 ± 0,007	0,571 ± 0,017	0,690 ± 0,081	0,825 ± 0,072	5,69
Ácido siríngico	ND	0,154 ± 0,003	0,217 ± 0,001	0,280 ± 0,004	0,332 ± 0,000	0,386 ± 0,005	0,451 ± 0,001	0,461 ± 0,001	0,496 ± 0,009	0,523 ± 0,001	0,552 ± 0,001	0,614 ± 0,008	0,630 ± 0,003	4,09
Vanilina	ND	0,084 ± 0,002	0,116 ± 0,001	0,143 ± 0,003	0,171 ± 0,001	0,183 ± 0,006	0,214 ± 0,000	0,215 ± 0,005	0,232 ± 0,003	0,245 ± 0,001	0,265 ± 0,000	0,284 ± 0,010	0,311 ± 0,002	3,70
Siringaldeído	ND	0,318 ± 0,015	0,467 ± 0,006	0,608 ± 0,004	0,711 ± 0,034	0,757 ± 0,007	0,946 ± 0,001	0,920 ± 0,056	1,037 ± 0,003	1,060 ± 0,014	1,090 ± 0,013	1,150 ± 0,026	1,173 ± 0,006	3,69
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	ND	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,104 ± 0,003	0,111 ± 0,001	1,07
Ácido sinápico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-
Cumarina	ND	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	0,055 ± 0,000	<LQ	<LD	<LD	-

*ND = não detectado; <LD = menor que limite de detecção; <LQ = menor que limite de quantificação

...continua...

“TABELA 11 Cont.”

Tempo de armazenamento (meses)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Evolução (vezes)
Compostos														
4-metilumbeliferona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Ácido <i>o</i> -cumárico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,356 ± 0,224	0,322 ± 0,090	1,11
Eugenol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LD	-
Somatório dos compostos fenólicos	ND	0,994	1,549	2,009	2,378	2,688	3,224	3,204	3,577	3,709	3,844	4,453	4,677	-

*ND = não detectado; <LD = menor que limite de detecção; <LQ = menor que limite de quantificação

O perfil cromatográfico obtido para a amostra de cachaça após o período de envelhecimento (12 meses) em tonel de carvalho está apresentado na Figura 29.

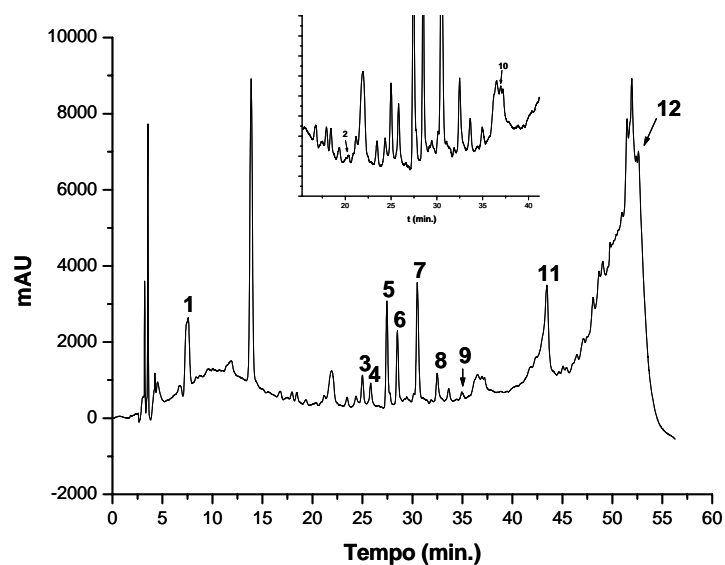


FIGURA 29 Perfil cromatográfico da amostra de cachaça após período de envelhecimento em tonel de carvalho. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido *p*-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) ácido *o*-cumárico; (12) eugenol.

Pelos resultados obtidos, foi possível constatar a evolução na concentração dos compostos analisados ao longo do período de envelhecimento da cachaça, já que a maioria dos compostos apresentou um aumento progressivo na concentração. Essa evolução pode ser observada por meio do somatório da concentração dos compostos fenólicos, que apresentou valores que variaram de $0,994 \text{ mg L}^{-1}$ (para a cachaça com 1 mês de armazenamento no tonel de

carvalho) a 4,677 mg L⁻¹ (para a cachaça ao final dos 12 meses de armazenamento no tonel de carvalho).

Os compostos fenólicos que se apresentaram menos expressivos durante o tempo de armazenamento da cachaça foram 4-metilumbeliferona, catequina e eugenol, já que, na maioria das amostras analisadas, esses compostos não foram detectados, corroborando com os resultados obtidos por Zacaroni (2009).

Foi possível constatar a predominância de siringaldeído e ácido gálico incorporados à bebida ao longo do período analisado, estando de acordo com pesquisas realizadas com cachaças envelhecidas em carvalho. Anjos (2007) mostrou que, entre os compostos fenólicos analisados em cachaça envelhecida em carvalho, aqueles que apresentaram maior concentração foram o siringaldeído e o ácido gálico.

Em estudo realizado com cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, Zacaroni (2009) encontrou como compostos fenólicos predominantes, para as amostras envelhecidas em carvalho, os compostos siringaldeído, ácido elágico e ácido *p*-cumárico, apesar de mencionar a heterogeneidade dos compostos encontrados para as cachaças envelhecidas em uma mesma espécie de madeira. Entretanto, anteriormente, Dias et al. (1998) demonstraram a predominância de ácido elágico e ácido vanílico ao longo de 6 meses de estocagem da cachaça em barris de carvalho, resultados esses diferentes daqueles encontrados neste trabalho.

Alguns fatores podem ser determinantes na extração de compostos da madeira ao longo do período de armazenamento da bebida, como tamanho e pré-tratamento do barril, condições ambientais, tempo de envelhecimento e teor alcoólico da bebida, tornando diferenciada a quantidade e composição de compostos fenólicos extraídos da madeira durante o processo de envelhecimento da bebida (Miranda et al., 2006).

Na Figura 30, observa-se a evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça, por meio de dados obtidos para os compostos fenólicos totais (método espectrofotométrico) e o somatório dos compostos fenólicos analisados por cromatografia.

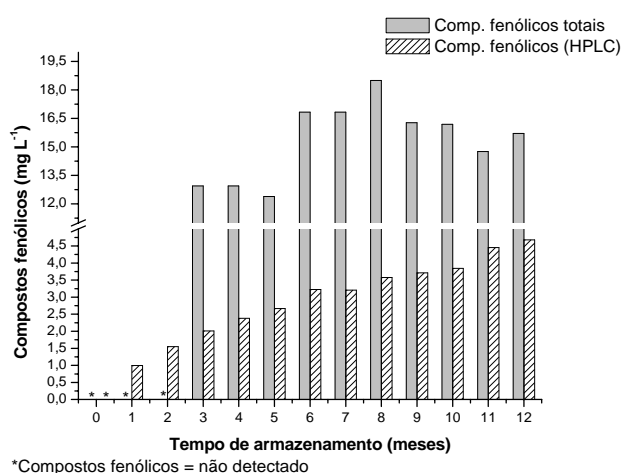


FIGURA 30 Evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça utilizando as técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência

Pela comparação entre os dados obtidos para ambas as técnicas de análise dos compostos fenólicos, constatou-se que a soma dos compostos fenólicos obtidos por cromatografia representou, em média, 21,8% do valor total obtido para os compostos fenólicos totais, mostrando que muito ainda se tem para estudar com relação à composição fenólica da cachaça envelhecida.

Para Dias et al. (1998), de modo geral, o tempo de estocagem acarreta elevação progressiva das concentrações de compostos fenólicos na aguardente

estocada em diferentes barris; apesar de complexo, o mecanismo do aumento gradativo nos teores de ácidos e aldeídos parece seguir o seguinte esquema: aldeídos cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído), aldeídos benzoicos (vanilina e siringaldeído) e ácidos benzoicos (ácido vanílico e ácido siríngico).

Considerando as transformações entre os compostos incorporados à bebida durante o período de envelhecimento, realizou-se a avaliação do coeficiente de correlação entre a concentração de alguns compostos, como vanilina e ácido vanílico, e siringaldeído e ácido siríngico.

Nesse sentido, foi constatada correlação linear positiva significativa entre a concentração de vanilina e ácido vanílico (0,9987), evidenciando que as variações ocorridas no aumento da concentração de ácido vanílico podem estar relacionadas ao aumento da concentração de vanilina, já que, durante o processo de envelhecimento da bebida, além da extração direta de ácido vanílico da madeira, esse composto pode ser proveniente da oxidação da vanilina, conforme mostra a Figura 31.

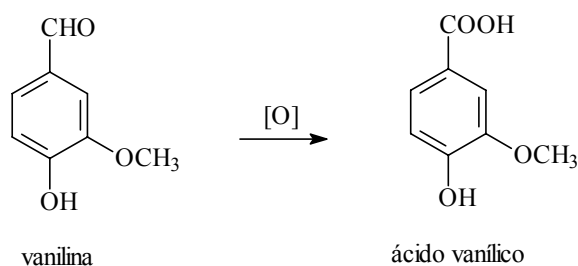


FIGURA 31 Esquema da reação de oxidação da vanilina a ácido vanílico durante o período de envelhecimento da cachaça

Também foi constatada correlação linear positiva significativa entre a concentração de siringaldeído e ácido siríngico (0,9940) pelo fato de que, assim

como ocorre entre a vanilina e o ácido vanílico, o aumento na concentração de ácido siríngico pode estar relacionado à oxidação do siringaldeído a ácido siríngico (Figura 32), ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de madeira. Alguns fatores podem influenciar as oscilações nos teores dos componentes fenólicos, associadas à oxidação, como as características peculiares de cada madeira (permeabilidade, porosidade, entre outros), além das condições de armazenamento, tamanho e geometria dos barris utilizados para o armazenamento da bebida (Dias et al., 1998).

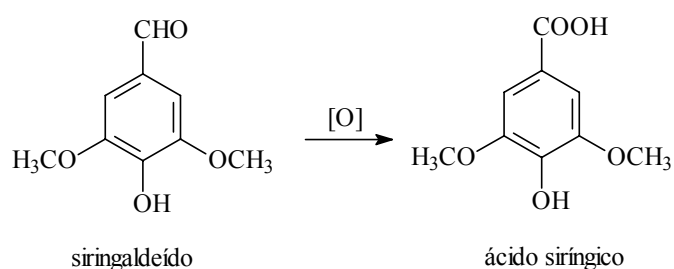


FIGURA 32 Esquema da reação de oxidação do siringaldeído a ácido siríngico durante o período de envelhecimento da cachaça

Era de se esperar que fosse encontrada uma correlação linear negativa entre a concentração de cumarina e ácido *o*-cumárico, evidenciando que o aumento na concentração de um desses compostos pode proporcionar uma diminuição na concentração do outro, já que, segundo Carvalho et al. (2007), a cumarina pode ser originada pela ciclização do ácido *o*-cumárico (Figura 33). Porém, não foi possível estabelecer um coeficiente de correlação entre esses compostos devido às baixas concentrações encontradas para ambos, estando abaixo do limite de detecção na maioria das amostras analisadas. Vale ressaltar que a presença desses compostos não é desejada na bebida, pela toxicidade da

cumarina para a saúde humana, apesar de essa substância ter sido utilizada como aromatizante em alimentos industrializados, tendo seu uso banido em diversos países (Kuster & Rocha, 2007).

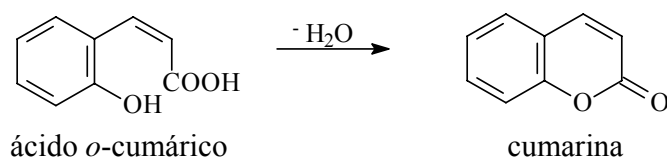


FIGURA 33 Esquema da ciclização do ácido *o*-cumárico para a formação da cumarina durante o período de envelhecimento da cachaça

4.2.2 Carbamato de etila

Na Figura 34 verifica-se o cromatograma obtido para o padrão de carbamato de etila, na concentração de $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

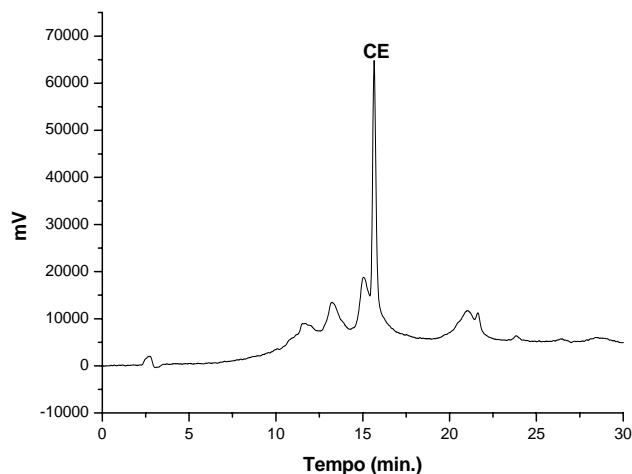


FIGURA 34 Cromatograma de uma solução-padrão de carbamato de etila (CE) ($75,0 \mu\text{g L}^{-1}$)

Os cromatogramas obtidos para as amostras de cachaça nova, para a cachaça após 12 meses de armazenamento em tonel de carvalho e para a cachaça após 12 meses de armazenamento em recipiente de vidro estão apresentados nas Figuras 35, 36 e 37, respectivamente.

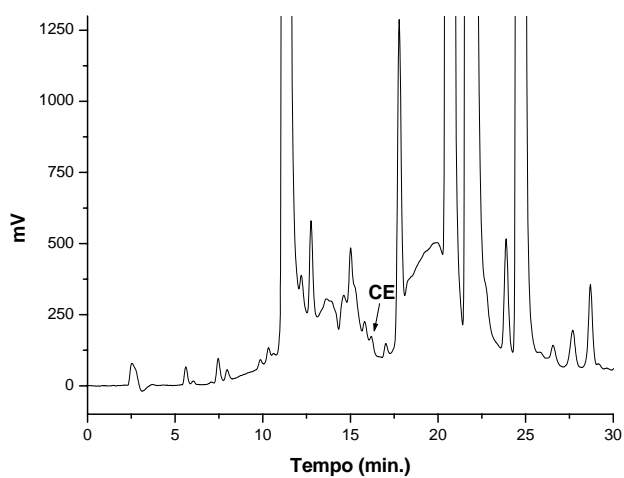


FIGURA 35 Cromatograma da amostra de cachaça nova, mostrando o pico relativo ao carbamato de etila (CE)

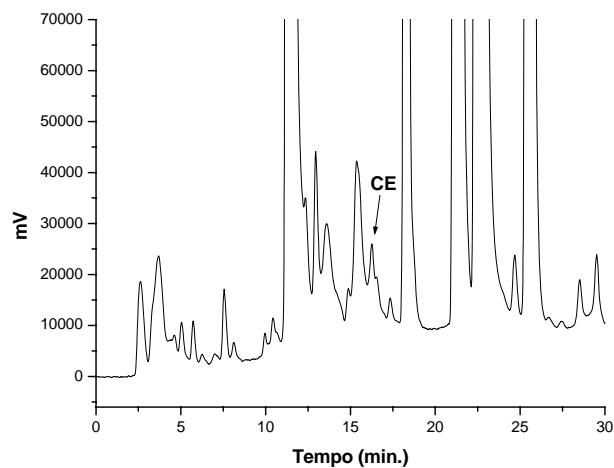


FIGURA 36 Cromatograma da amostra de cachaça após 12 meses de armazenamento em tonel de carvalho, mostrando o pico relativo ao carbamato de etila (CE)

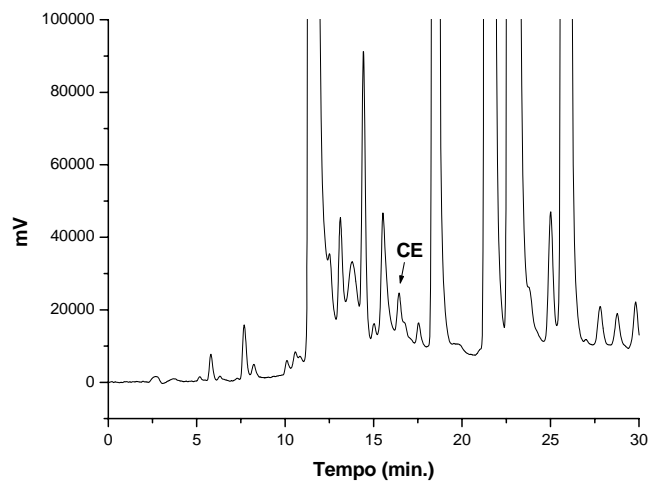


FIGURA 37 Cromatograma da amostra de cachaça após 12 meses de armazenamento em recipiente de vidro, mostrando o pico relativo ao carbamato de etila (CE)

O tempo de retenção médio obtido para o CE foi de $13,1 \pm 0,1$ minutos. A quantificação do CE nas amostras de cachaça foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 7112,82726x + 40192,22186$; onde, y = área do pico e x = concentração de CE), plotando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução-padrão (Figura 38), sendo o coeficiente de determinação obtido de 0,9981. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, conforme especificado por Harris (2008), encontrando-se os valores de $3,93 \mu\text{g L}^{-1}$ e $13,09 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

O LD e o LQ obtidos utilizando o método proposto estão próximos aos encontrados em trabalhos desenvolvidos recentemente para a determinação de CE em diferentes matrizes, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção de fluorescência (HPLC-FLD), com derivação prévia do carbamato de etila. Em alguns trabalhos realizados com diferentes bebidas alcoólicas, observam-se valores que variam de $1,64$ a $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$, para o limite de detecção, e de $3,56 \mu\text{g L}^{-1}$ a 4mg L^{-1} , para o limite de quantificação (Herbert et al., 2002; Weber & Sharypov, 2008; Madrera & Valles, 2009).

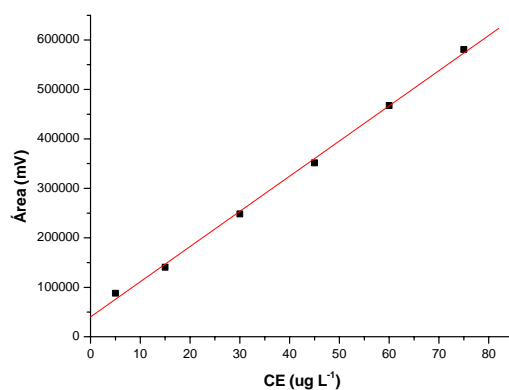


FIGURA 38 Curva analítica construída para a quantificação do carbamato de etila ($5,0$ - $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$)

Na Tabela 12 verificam-se os resultados obtidos para a quantificação do CE nas frações “cabeça”, “coração” (cachaça nova) e “calda”.

TABELA 12 Concentração de carbamato de etila nas frações “cabeça”, “coração” (cachaça nova) e “cauda”

Fração da destilação	Carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$)*
“Cabeça”	< LD
“Coração” (cachaça nova)	< LD
“Cauda”	< LD

*< LD = menor que limite de detecção

Pelos resultados obtidos, constata-se que esse contaminante apresentou-se abaixo do limite de detecção para as respectivas frações. Andrade Sobrinho et al. (2009) relataram que as maiores concentrações de CE são encontradas na fração “cabeça”, seguido das frações “coração” e “cauda”, devido ao fato de o CE ser mais solúvel em etanol ($1,2 \text{ g mL}^{-1}$) que em água ($0,10 \text{ g mL}^{-1}$). Por esse fato, torna-se previsível que a “cabeça” apresente uma maior concentração de CE, já que ela apresenta uma maior graduação alcoólica, conforme resultados apresentados na Tabela 3, tendendo o teor alcoólico da bebida reduzir-se ao longo do processo de destilação; portanto, a separação eficiente das frações durante a destilação da cachaça de alambique pode ser uma alternativa na redução dos níveis de CE no destilado.

Para alguns autores, a realização da destilação da cachaça em alambiques de cobre poderia ser uma agravante na formação do carbamato de etila, já que há a possibilidade de esse metal atuar como catalisador nas reações de formação desse contaminante (Aresta et al., 2001). Porém, em alguns estudos realizados recentemente, como os de Barcelos et al. (2007), Zacaroni (2009) e

Masson (2009), demonstrou-se que não houve correlação entre as concentrações de cobre e carbamato de etila em cachaça. Portanto, devem ser investigados outros fatores e etapas do processo de produção que podem influenciar a formação do CE na bebida, já que a presença de cobre não se mostrou relevante para a formação deste.

Com o intuito de avaliar a influência da etapa de envelhecimento da cachaça na formação do CE, realizou-se a quantificação desse contaminante durante o período de envelhecimento da cachaça, em tonel de carvalho, e durante o período de armazenamento em recipiente de vidro (Tabela 13).

Pelos resultados obtidos, pode-se constatar que a concentração de CE nas amostras de cachaça analisada variou de <LD a $17,46 \mu\text{g L}^{-1}$, para o acompanhamento realizado com a cachaça armazenada em tonel de carvalho, e de <LQ a $18,51 \mu\text{g L}^{-1}$, para a cachaça armazenada em recipiente de vidro.

Em diversos trabalhos realizados com aguardentes tem sido demonstrado que muitas das amostras analisadas apresentaram concentrações de CE acima do limite máximo estabelecido pela legislação ($150 \mu\text{g L}^{-1}$) (Barcelos et al., 2007; Masson, 2009; Zacaroni, 2009). Nota-se que, mesmo havendo um aumento na concentração de CE ao longo do período de estocagem da cachaça, a concentração desse contaminante esteve muito inferior ao limite máximo estabelecido pelo MAPA ($150 \mu\text{g L}^{-1}$).

TABELA 13 Concentração de carbamato de etila durante o envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho e durante seu armazenamento em recipiente de vidro

Tempo de armazenamento (meses)	Carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Tonel de madeira	Vidro
1	<LD	<LQ
2	<LQ	13,63 \pm 0,07
3	<LQ	15,67 \pm 0,13
4	<LQ	16,24 \pm 1,27
5	<LQ	17,01 \pm 0,05
6	<LQ	17,49 \pm 0,75
7	<LQ	18,37 \pm 0,21
8	<LQ	19,11 \pm 0,13
9	13,81 \pm 0,59	17,60 \pm 0,91
10	14,53 \pm 0,74	15,27 \pm 2,91
11	<LQ	17,44 \pm 0,00
12	17,46 \pm 1,60	18,51 \pm 0,37
Média geral*	10,81 a1	16,65 a2

*Médias seguidas de mesma letra e número são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

Por meio do teste de variância aplicado às médias de cada procedimento de estocagem da cachaça, constatou-se uma diferença significativa na concentração de CE para ambos os procedimentos, nos quais observou-se um aumento na concentração de CE, sendo esse aumento mais expressivo para a cachaça armazenada em recipiente de vidro. Apesar disso, pode-se notar uma tendência de estabilização na concentração do CE para a cachaça proveniente do recipiente de vidro, ao passo que, para a cachaça envelhecida, o aumento na

concentração de CE tendeu a ser progressivo durante o período de estocagem da bebida. Esses resultados estão condizentes com aqueles obtidos por Madrera & Valles (2009), os quais apontaram um aumento progressivo na concentração de CE em cidras submetidas a diferentes níveis de maturação.

Andrade Sobrinho et al. (2009) simularam o tempo de “descanso” da cachaça, como também o tempo de permanência da bebida na prateleira, antes de seu consumo, e constataram que a concentração de CE após 36 meses de estocagem da cachaça variou de -5,3 a 6,7%, sugerindo a estabilidade na concentração desse composto após a sua formação.

Apesar de mencionar que, aparentemente, não foi encontrada associação entre a concentração de CE e a coloração de cachaças (que, segundo os autores, a coloração amarelada indicaria o armazenamento em barris de madeira) analisadas de diferentes destilarias da Paraíba, Nóbrega et al. (2009) citam que de duas das destilarias estudadas, a concentração de CE encontrada para a cachaça branca foi maior do que para a cachaça amarelada. Isso mostra que, possivelmente, esse contaminante pode ser formado não somente quando a bebida é mantida estocada em recipientes que não são de madeira, mas também quando há a estocagem da cachaça em barris e tonéis de diferentes espécies de madeiras.

Acredita-se que a formação do CE durante o período de armazenamento da cachaça ocorra de maneira gradativa, por meio da reação entre o etanol e a ureia formada pela degradação de precursores nitrogenados, intrínsecos do processo de produção da bebida, sendo os principais deles os aminoácidos arginina, ornitina e citrulina. Além desses, outros compostos nitrogenados têm sido estudados como possíveis precursores para a formação do carbamato de etila antes e após o processo de destilação, como é o caso do fosfato de carbamila e do íon cianeto (Cook et al., 1990; Lawrence et al., 1990).

Estudos de Hasnip et al. (2004), avaliando a influência do tempo de estocagem e da temperatura na concentração de carbamato de etila e seus precursores em vinhos, mostraram uma diminuição nas concentrações de ureia e citrulina, ao passo que houve um aumento na concentração de CE. Esse fato evidencia a participação desses compostos na formação do CE, possibilitando a análise cinética da formação dessa substância associada à concentração de etanol, ureia e citrulina em vinhos.

Stevens & Ough (1993) estudaram o efeito do tempo e da temperatura de estocagem de vinhos, durante um período de 2 anos, na formação do CE. Eles avaliaram a formação do CE por meio da reação do etanol com ureia e com citrulina, sob diferentes temperaturas de estocagem em garrafas de 125 mL. Pelos resultados, verificou-se que a concentração de ureia e de citrulina e a temperatura de estocagem do vinho influenciaram de maneira positiva a formação de CE durante o período de estocagem da bebida.

5 CONCLUSÕES

Os parâmetros físico-químicos apresentaram diferenças entre as frações “cabeça”, “coração” e “cauda” e mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira ao longo do período de envelhecimento da cachaça.

O método cromatográfico proposto foi certificado e mostrou-se eficiente para a análise simultânea de 13 compostos fenólicos em amostras de cachaça.

Durante o período de envelhecimento da cachaça, ocorreu um aumento progressivo na incorporação de compostos fenólicos à bebida, sendo os principais compostos agregados: siringaldeído e ácido gálico.

O armazenamento da bebida, tanto em tonel de carvalho quanto em recipiente de vidro, influenciou a formação do carbamato de etila, proporcionando um aumento significativo na concentração desse contaminante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-LIMA, T. L.; MAIA, A. B. R. A.; OLIVEIRA, E. S. Efeitos sensoriais da adição de extratos de diferentes madeiras à cachaça. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 347-360, 2005.

ABREU, S. M.; ALVES, A.; OLIVEIRA, B.; HERBERT, P. 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, 2005.

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.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1074-1077, 2002.

ANDRADE SOBRINHO, L. G.; CAPPELINI, L. T. D.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; BUSHVISER, S. F.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. 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.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANJOS, I. A. **Produtividade agrícola, rendimento e qualidade da aguardente artesanal de diferentes variedades de cana-de-açúcar**. 2001. 102 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANJOS, J. P. **Avaliação físico-química e quantificação de compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras**. 2007. 39 p. Monografia (Graduação em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AQUINO, F. W. B.; NASCIMENTO, R. F.; RODRIGUES, S.; CASEMIRO, A. R. S. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 145-149, 2006a.

AQUINO, F. W. B.; RODRIGUES, S.; NASCIMENTO, R. F.; CASEMIRO, A. R. S. Simultaneous determination of agind markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 569-574, 2006b.

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, p. 2819-2824, 2001.

ASSIS, R. A.; KÜCHLER, I. L.; MIEKELEY, N.; SILVEIRA, C. L. P. Elementos-traço e sódio em suco de uva: aspectos nutricionais e toxicológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1948-1952, 2008.

AZEVÊDO, L. C. **Estudo de compostos carbonílicos e os respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos em vinhos**. 2007. 159 p. Tese (Doutorado em Ciência - Química Analítica) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BADOLATO, E. S. G.; DURAN, M. C. Risco de intoxicação por metanol pela ingestão de bebidas alcoólicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 1-5, 2000.

BARCELOS, L. V. F. **Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes aguardentes produzidas em Minas Gerais**. 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; ANJOS, J. P. 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, 2007.

BELAND, F. A.; BENSON, R. W.; MELLICK, P. W.; KOVATCH, R. M.; ROBERTS, D. W.; FANG, J.; DOERGE, D. R. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F₁ mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, p. 1-9, 2005.

BERNARDI, T. L.; PEREIRA, G. V. M.; CARDOSO, P. G.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 2705-2712, 2008.

BOGUSZ JÚNIOR, S.; KETZER, D. C. M.; ANDRADES, L.; GOBO, A. B. Composição química da cachaça produzida na região Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 793-798, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jun. 2005a. Seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2005b. Seção 1, p. 11.

BREGAGNOLI, F. C. R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 69 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

BRUNO, S. N. F.; VAITSMAN, D. S.; KUNIGAMI, C. N.; BRASIL, M. G. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 1345-1352, 2007.

BUDAVARI, S. **Merck index**. 13. ed. Rahway: Merck, 2001.

CALDAS, N. M.; OLIVEIRA, S. R.; GOMES NETO, J. A. Feasibility of internal standardization in the direct and simultaneous determination of As, Cu and Pb in sugar-cane spirits by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 636, p. 1-5, 2009.

CAMPOS, J. O. S.; AQUINO, F. W. B.; NASCIMENTO, R. F.; COSTA, J. G. M.; KEUKELEIRE, D.; CASIMIRO, A. R. S. Influence and effect of thermal treatment in elaboration of regional wood extracts for cachaça. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, p. 179-185, 2004.

CANAS, S.; CASANOVA, V.; BELCHIOR, A. P. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, p. 626-633, 2008a.

CANAS, S.; SILVA, V.; BELCHIOR, A. P. Wood related chemical markers of aged wine brandies. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Runa, v. 23, n. 1, p. 45-52, 2008b.

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

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612000000100007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 out. 2009.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000200005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 set. 2009.

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

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2007. 1102 p.

CAVALHEIRO, S. F. L.; SOBRINHO, L. G. A.; FARIA, J. B.; CARDELLO, H. M. A. B. Influência do envelhecimento no teor de cobre em cachaças. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 99-108, 2003.

COOK, R.; MCCAIG, N.; MCMILLAN, J. M. B.; LUMSDEN, W. B. Ethyl carbamate formation in grain-based spirits: part III: the primary source. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, p. 233-244, 1990.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978. 6 v.

DATO, M. C. F.; PISAURO JÚNIOR, J. M.; MUTTON, M. J. R. Análise dos componentes secundários produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras selvagens durante a produção de cachaça. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, jan./mar. 2005. doi: 10.1590/S1517-83822005000100014

DIAS, S.; MAIA, A.; NELSON, D. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 169-175, 1998.

DIAS, S. M. B. C. Fatores que influenciam no processo de envelhecimento da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 32-40, 2009.

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

DIAS, S. M. B. C.; MAIA, A. B. R. A.; NELSON, D. L. Utilização de madeiras nativas no envelhecimento da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 49-54, 2009.

DÓREA, H. S.; CARDOSO, M. G.; NAVICKIENE, S.; EMÍDIO, E. S.; SILVA, T. C. S.; SILVA, M. M. S. Análise de poluentes orgânicos tóxicos na cachaça. **Revista da FAPES**, Aracaju, v. 4, n. 2, p. 5-18, 2008.

FARIA, J. B.; CARDELLO, H. M. A. B.; BOSCOLO, M.; ISIQUE, W. D.; ODELLO, L.; FRANCO, D. W. Evaluation of Brazilian woods as an alternative to oak for cachaças aging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, p. 83-87, 2003.

FARIA, J. B.; CARDELLO, H. M. A. B.; FRANCO, D. W.; BÔSCOLO, M. Influência de tipo de tonéis para o envelhecimento de aguardente de cana em sua aceitabilidade. In: SIMPÓSIO ÍBERO AMERICANO DE ANÁLISE SENSORIAL, 1., 1996, Campinas. **Resumos...** Campinas: UNICAMP, 1996. p. 57.

FERNANDES, W. J.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; MORAIS, A. R.; SILVA, V. F.; NELSON, D. L. Physicochemical quality of a blend of domestic cachaças from the South of Minas Gerais. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 257-261, 2007.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6: build 61. Lavras: UFLA, 2003.

FIRME, L. F. V. **Utilização de madeiras de eucalipto para envelhecimento de cachaça**. 2003. 29 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FURTADO, S. M. B. **Avaliação sensorial descritiva de aguardente de cana (*Saccharum officinarum*, L.) influência da composição em suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas.** 1995. 99 p. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GALINARO, C. A. **Distinção entre cachaça produzida com cana-de-açúcar queimada e não-queimada.** 2006. 193 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

GOMES, F. C. O.; BADOTTI, F.; SILVA, P. A. B.; CAMPOS, C. R. A.; SALES, A. C.; SCHWAN, R. F.; ROSA, C. A. Produção de cachaça de alambique utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 25-31, 2009.

GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, London, v. 111, p. 789-794, 2008.

GUTIERREZ, L. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 50, n. 3, p. 464-472, out./dez. 1993.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868 p.

HASNIP, S.; CAPUTI, A.; CREWS, C.; BRERETON, P. Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. **Food Additives & Contaminants: Part A**, London, v. 21, n. 12, p. 1155-1161, 2004.

HERBERT, P.; SANTOS, L.; BASTOS, M.; BARROS, P.; ALVES, A. 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, 2002.

IIDA, Y.; SUGANUMA, Y.; MATSUMOTO, K.; SATOH, I. Novel determination system for urea in alcoholic beverages by using a FIA system with an acid urease column. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 22, p. 173-176, 2006.

JAGERDEO, E.; DUGAR, S.; FOSTER, G. D.; SCHENCK, H. 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, p. 5797-5802, 2002.

JANZANTTI, N. S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. 2004. 178 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS/ UFSC, 2007. 1102 p.

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

LAWRENCE, J. F.; PAGE, B. D.; CONACHER, H. B. S. **Advice Environment Science Technology**, [S.l.] v. 23, p. 457, 1990.

LEÃO, M. M. **Influência do termotratamento na composição química da madeira de amburana (*Amburana cearensis*), bálsamo (*Myroxylon balsamum*) e carvalho (*Quercus sp.*) e o impacto no aroma de uma solução modelo de cachaça**. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais - Tecnologia de Produtos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

LEAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.

LIMA, A. J. B.; CARDOSO, M. G.; GUERREIRO, M. C.; PIMENTEL, F. A. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 247-250, 2006.

LIMA, A. J. B.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; LIMA, J. M.; NELSON, D. L. 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.

LIN, Y. T.; VATTEN, D.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 2059-2065, 2005.

MADRERA, R. R.; GOMIS, D. B.; ALONSO, J. J. M. Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on composition of cider brandy in phenolic and furanic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 27, p. 7969-7973, 2003.

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

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MARX, D. E. **Ativadores oxidantes TAML™: Agentes branqueadores verdes para a indústria de papel**. Disponível em: <<http://www.academic.scranton.edu/.../inorganic/imageNMM.jpg>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

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

MASSON, J.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R.; ANJOS, J. P. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos de aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1805-1810, 2007.

MENDES, L. M.; MORI, F. A.; TRUGILHO, P. F. Potencial da madeira de agregar valor à cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 41-48, 2009.

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, 2006.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 84-89, 2008. Suplemento.

MORI, F. A.; MENDES, L. M.; SILVA, J. R. M.; TRUGILHO, P. F. Influência da qualidade da madeira no envelhecimento da aguardente. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 243-270.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química orgânica**. 6. ed. Lisboa: PHB, 1992. 1325 p.

MUÑOZ-MUÑOZ, A. C.; GRENIER, A. C.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H.; CERVANTES-MARTÍNEZ, J. Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1213, p. 218-223, 2008.

NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; FRANCO D. W. Quantitative ester analysis in cachaça and distilled spirits by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 5488-5493, 2008.

NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO D. W. Determination of acids in brazilian sugar cane spirits and other alcoholic beverages by HRGC-SPE. **Chromatographia**, New York, v. 48, n. 11/12, p. 751-757, 1998.

NASCIMENTO, R. F.; MARQUES, J. C.; LIMA NETO, B. S.; KEUKELEIRE, D.; FRANCO, D. W. 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, p. 13-23, 1997.

NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; PAIVA, J. E.; LACHENMEIER, D. W. 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, 2009.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: UNESP, 2005.

NOVA, M. X. V.; SCHULER, A. R. P.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; MORAIS JÚNIOR., M. A. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 460-466, 2009.

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, 2009.

PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R. 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, 2008.

PARK, S.; KIM, C. T.; LEE, J.; JHEE, O. H.; OM, A. S.; KANG, J. S.; MOON, T. W. 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, p. 975-982, 2007.

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, N. E.; CARDOSO, M. G.; AZEVEDO, S. M.; MORAIS, A. R.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1068-1075, 2003.

PIGGOT, J. R.; CONNER, J. M. Whiskies. In: LEA, A. G. H.; PIGGOT, J. R. (Ed.). **Fermented beverage production**. 2. ed. New York: Klumer Academic/Plenum, 2003. p. 239-262.

POLASTRO, L. R.; BOSO, L. M.; ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 78-81, 2001.

PUECH, J. L. Extraction and evolution of lignin products in armagnac natured in oak. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, p. 111-114, 1981.

PUECH, J. L.; LEAUTE, R.; CLOT, G.; NOMDEDUE, L. Evolution de divers constituents volatiles et phenolique des eau de vie de cognac au cours de leur vieillissement. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 4, p. 65-80, 1984.

QUEIROZ, L. **História da cachaça**. Disponível em: <<http://www.museudacachaca.com.br/>>. Acesso em: 29 set. 2008.

RAKIC, S.; PETROVIC, S.; KUKIC, J.; JADRANIN, M.; TESEVIC, V.; POVRENOVIC, D.; SILER-MARINKOVIC, S. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 830-834, 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.

RECHE, R. V.; LEITE NETO, A. F.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; OSTI, R. Z.; FRANCO, D. W. Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of brazilian cachaças. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 6603-6608, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Extrato seco total de vinhos brasileiros: comparação de métodos analíticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 297-300, 1996.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**. London: Academic, 1970.

SCHIFER, T. S.; BOGUSZ JÚNIOR, S.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Infarma**, Brasília, v. 17, n. 5/6, p. 67-72, 2005.

SCHWAN, R. F.; CARVALHO, F. P.; DIAS, D. R.; CASTRO, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 101-135.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA JÚNIOR, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, p. 89-96, 2001.

SHEREV, R. N.; BRINK, J. A. Indústria de fermentação. In: SHEREV, R. N. **Indústrias de processos químicos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980. cap. 31, p. 469-495.

SILVA, A. A. **Compostos fenólicos em madeiras brasileiras**. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos.

SILVA, C. L. C.; VIANNA, C. R.; CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; GOMES, F. C. O.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, p. 203-210, 2009.

SINGLETON, V. L. Maturation of wines and spirits: comparison, facts and hypotheses. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 1, p. 98-115, 1995.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 20, n. 2, p. 144-158, 1965.

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

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, M. D. C. A. **Identificação, quantificação e comparação das substâncias químicas responsáveis pelos aromas da cachaça de alambique e do rum comercial tratados pelo processo de irradiação**. 2006. 121 p. Tese (Doutorado em Ciência - Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOUZA, P. P.; OLIVEIRA, L. C. A.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, D. V.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, R. Brazilian cachaça: “Single shot” typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry**, London, v. 115, p. 1064-1068, 2009.

SOUZA, P. P.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, D. V.; NETO, W. B.; AMORIM, V. M.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of brazilian artisan cachaça aged in different wood casks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 2094-2102, 2007.

SOUZA, R. L. Cachaça, vinho, cerveja: da colônia ao século XX. **Estudos históricos**, Rio de Janeiro, n. 33, p. 1-22, 2004.

STEVENS, D. F.; OUGH, C. S. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 44, n. 3, p. 309-312, 1993.

TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; TOLEDO, M. C. F. Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 76-82, 2007.

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

VALSECHI, O. **Aguardente de cana de açúcar**. 4. ed. São Paulo: Livrocere, 1960. 120 p.

VILELA, A. F. **Estudo da adequação de critérios de boas práticas de fabricação na avaliação de fábricas de cachaça de alambique**. 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VILELA, F. J. V.; CARDOSO, M. G.; MASSON, J.; ANJOS, J. P. Determinação das composições físico-químicas de cachaça do Sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, 2007.

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, 2008.

WINDHOLZ, M. (Ed.). **The merck index**. Rahway: Merck, 1976.

ZACARONI, L. M. **Compostos fenólicos e cumarinas: 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

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Análise de variância para a análise de grau alcoólico das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”	129
TABELA 2A	Análise de variância para a análise de acidez volátil das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”	129
TABELA 3A	Análise de variância para a análise de ésteres das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”	129
TABELA 4A	Análise de variância para a análise de aldeídos das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”	130
TABELA 5A	Análise de variância para a análise de álcoois superiores das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”..	130
TABELA 6A	Análise de variância para a análise de cobre das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”	130
TABELA 7A	Análise de variância para a análise de metanol das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”	131
TABELA 8A	Análise de variância para a análise de furfural das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”	131
TABELA 9A	Análise de variância para a análise de carbamato de etila da cachaça armazenada em diferentes recipientes.	131

TABELA 1A Análise de variância para a análise de grau alcoólico das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	641,494033	40975,488	0,0000
Erro	6	0,015656		
CV (%) = 0,32		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 2A Análise de variância para a análise de acidez volátil das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	27823,403244	3221,175	0,0000
Erro	6	8,637656		
CV (%) = 2,83		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 3A Análise de variância para a análise de ésteres das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	2674,829144	3614,851	0,0000
Erro	6	0,739956		
CV (%) = 1,73		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 4A Análise de variância para a análise de aldeídos das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	2151,196344	15142,161	0,0000
Erro	6	0,142067		
CV (%) = 1,32		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 5A Análise de variância para a análise de álcoois superiores das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	161872,171300	1885,546	0,0000
Erro	6	85,848967		
CV (%) = 2,90		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 6A Análise de variância para a análise de cobre das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	23,120211	9373.059	0,0000
Erro	6	0,002467		
CV (%) = 1,58		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 7A Análise de variância para a análise de metanol das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	42,958678	604.390	0,0000
Erro	6	0,071078		
CV (%) = 6,21		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 8A Análise de variância para a análise de furfural das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	2	7,325992	1307,538	0,0000
Erro	6	0,005603		
CV (%) = 7,21		Número de observações: 9		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

TABELA 9A Análise de variância para a análise de carbamato de etila da cachaça armazenada em diferentes recipientes

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Amostra	1	409,033633	41,377	0,0000
Erro	46	9,885460		
CV (%) = 22,89		Número de observações: 48		

FV = fator de variação; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação

	Página
ANEXO B	
FIGURA 1B	
Curvas analíticas construídas para a quantificação dos compostos fenólicos.....	133

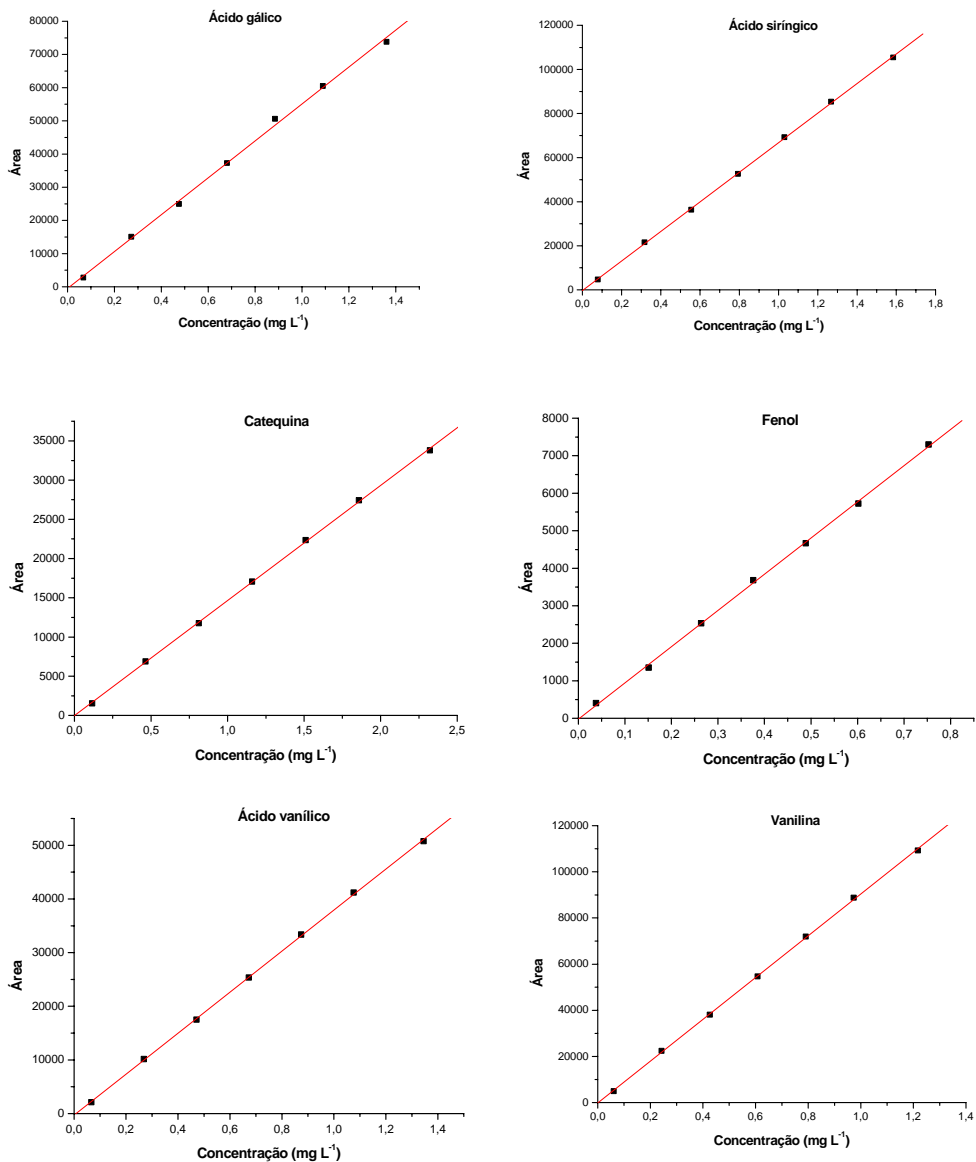
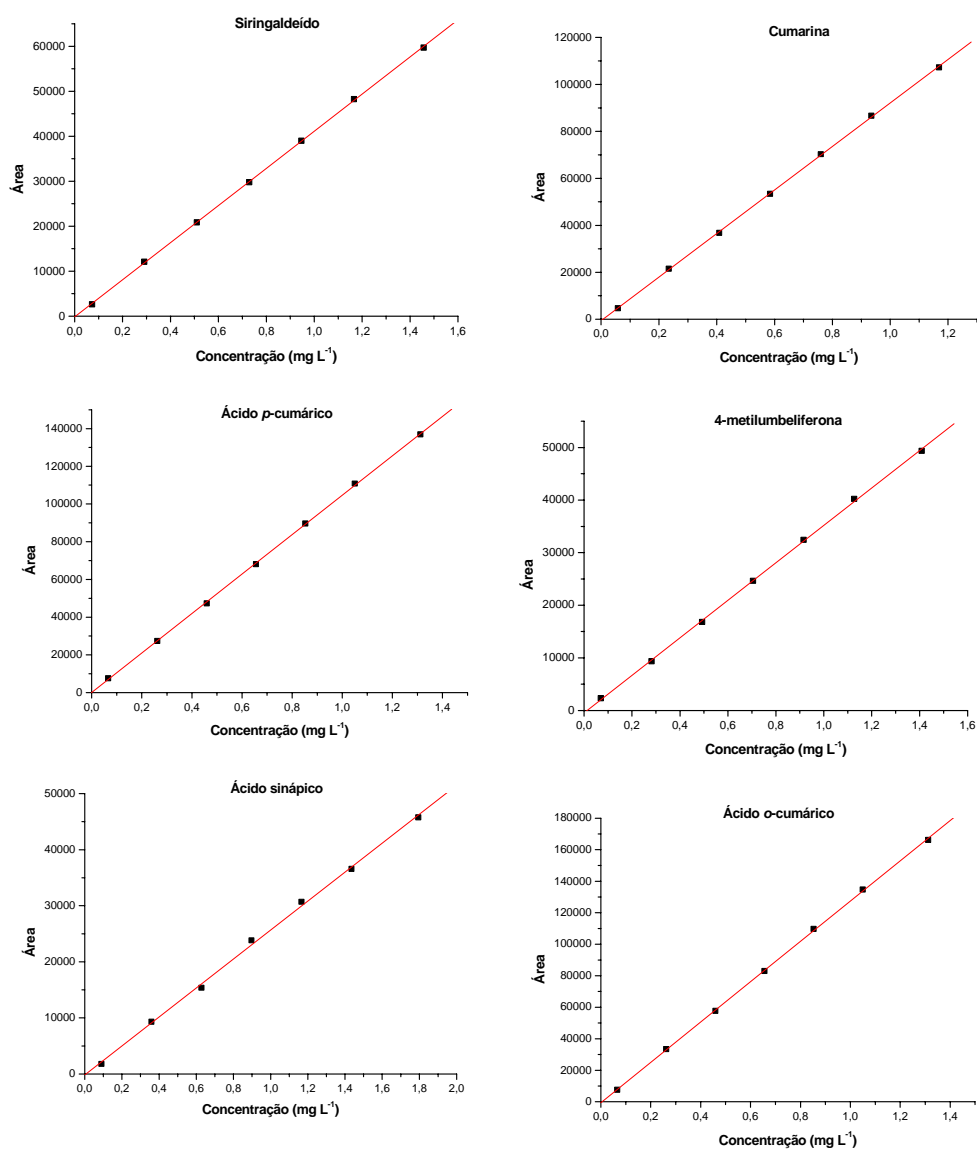


FIGURA 1B Curvas analíticas construídas para a quantificação dos compostos fenólicos (...continua...)

“FIGURA 1B, Cont.”



“FIGURA 1B, Cont.”

