



**FRANCIELLI D’CARLOS CRAVO**

**COMPOSIÇÃO DE CACHAÇAS OBTIDAS DE CINCO  
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR E A CORRELAÇÃO  
DA PRESENÇA DE DHURRIN NA CANA COM O  
CARBAMATO DE ETILA.**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**FRANCIELLI D’CARLOS CRAVO**

**COMPOSIÇÃO DE CACHAÇAS OBTIDAS DE CINCO VARIEDADES DE CANA-  
DE-AÇÚCAR E A CORRELAÇÃO DA PRESENÇA DE DHURRIN NA CANA COM  
O CARBAMATO DE ETILA.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos, área de concentração em Processos  
Fermentativos Rudimentares e Industriais, para  
a obtenção do título de Mestre.**

**Orientadora**

**Dra. Maria das Graças Cardoso**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Cravo, Francielli D\Carlos.

Composição de cachaças obtidas de cinco variedades de cana-de-açúcar e a correlação da presença de dhurrin na cana com carbamato de etila. / Francielli D\Carlos Cravo. - 2017.

72 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Cachaça. 2. Carbamato de Etila. 3. Glicosídeos Cianogênicos. I. Cardoso, Maria das Graças. . II. Título.

**FRANCIELLI D’CARLOS CRAVO**

**COMPOSIÇÃO DE CACHAÇAS OBTIDAS DE CINCO VARIEDADES DE CANA-  
DE-AÇÚCAR E A CORRELAÇÃO DA PRESENÇA DE DHURRIN NA CANA COM  
O CARBAMATO DE ETILA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a  
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de agosto de 2017.

Dra. Ana Maria de Resende Machado

CEFET/MG

Dr. David Lee Nelson

UFVJM

Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2017**

*A Deus, aos anjos e santos que são minha força e me ajudam a manter a mente sã;*

*Aos meus pais, que são sempre meu porto seguro;*

*Ao meu irmão, Leandro, grande amigo e conselheiro;*

*Aos meus avós;*

*Ao Roque e Aurora, que são luzes na minha vida.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e glória, por me manter em equilíbrio em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais, Carlinhos e Jaqueline, que em nenhum momento de suas vidas mediram esforços para sonhar junto comigo. Que foram e são meu porto seguro. E que sempre acreditaram em mim ao longo de mais esta vitória.

Ao meu irmão, Leandro, por estar sempre comigo nesta caminhada, apoiando-me e aconselhando-me.

Aos meus avós Francisco e Faustina, Sebastião e Luzia, que são para mim exemplos de persistência e fé, e que também não mediram esforços para que eu completasse meus estudos e que estão sempre comigo em suas orações.

Ao meu marido, Roque, que me acompanha há tanto tempo, que foi um grande incentivador dos meus estudos e que sempre me deu força e coragem para seguir em frente. Obrigada por ser sempre meu melhor amigo e companheiro.

À minha Aurora, minha pequena, luz da minha vida! Que mesmo ainda sem saber, me faz querer mais, querer ir além e não desistir nunca.

À minha orientadora, professora Maria das Graças, que mesmo em poucos anos de convivência me passou os maiores ensinamentos. Que esteve sempre em meu amparo, aconselhando-me e incentivando-me. Agradeço a amizade e compreensão nas horas difíceis que passei.

À técnica Cleusa, sempre prestativa, ajudou-me em todos os momentos deste trabalho. Aos colegas de laboratório da cachaça e dos óleos essenciais. Vocês foram, muitas vezes, meu amparo. Sempre tão prestativos, agradeço pelo carinho e pela partilha dos conhecimentos.

Aos meus amigos de vida, que das mais diversas formas estiveram ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me.

Aos produtores que disponibilizaram as amostras utilizadas neste estudo, sempre muito prestativos e solícitos.

À Universidade Federal de Lavras que, juntamente com o Departamento de Ciência dos Alimentos e o Departamento de Química, concederam-me a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A cachaça é atualmente a bebida destilada mais consumida no Brasil, e por ser produzida em diferentes localidades, cada cachaça tem como diferencial os métodos de produção e as características culturais e históricas de cada região. Apesar de ser um produto genuinamente brasileiro e apresentar elevada importância econômica, a cadeia produtiva da cachaça no país não é tecnologicamente homogênea. A padronização da cachaça é essencial para que a bebida atenda aos padrões exigidos, visando ao aumento das vendas e possibilitando o crescimento nas exportações. Um dos grandes entraves nas exportações da cachaça é a presença do carbamato de etila, um contaminante com alto poder carcinogênico. Pouco se conhece sobre as vias de formação desse composto. Acredita-se que um dos principais precursores para sua formação seria o íon cianeto, proveniente da degradação enzimática dos glicosídeos cianogênicos presentes na cana-de-açúcar. Diante do exposto, no presente trabalho objetivou-se caracterizar o glicosídeo cianogênico dhurrin em cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar, empregando-se a Cromatografia de Camada Delgada (CCD), e analisar sua possível relação com a formação do carbamato de etila em cachaças. Para cada variedade de cana-de-açúcar, foram preparados três extratos: em álcool metílico, acetato de etila e hexano. Os extratos foram submetidos a CCD, em que a fase móvel que mais se adaptou ao processo foi a mistura de álcool metílico e acetato, na proporção 7:3, respectivamente, e fase estacionária utilizada foi a sílica Gel 60 G 245®. As manchas cromatográficas foram reveladas em vapores de iodo. Todas as cachaças analisadas produzidas com as cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar e diferentes processos de produção apresentaram todos os parâmetros físico-químicos dentro das exigências do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Apesar de não ter excedido o limite máximo de carbamato de etila, observou-se uma variação significativa na concentração final do composto para cada amostra analisada. Os testes cromatográficos identificaram valores iguais para o  $R_f$  do padrão dhurrin e, para a variedade de cana-de-açúcar SP 83-2847, valores semelhantes para SP 80-3280 e CTC 11 e díspares para RB 86-7515 e IAC 86-2480.

**Palavras-chave:** cachaça, carbamato de etila, glicosídeos cianogênicos.

## ABSTRACT

Cachaça is currently the most widely consumed distilled beverage in Brazil, and because it is produced in different localities, each cachaça has the method of production and the cultural and historical characteristics of each region as a differential. Despite being a genuinely Brazilian product and presenting high economic importance, the cachaça production chain in the country is not technologically homogeneous. The standardization of cachaça is essential for meeting the required standards, aiming at increasing sales and enabling growth in exports. One of the major obstacles in exports of cachaça is the presence of ethyl carbamate, a contaminant with a high carcinogenic power. Little is known about the pathways of formation of this compound. It is believed that one of the main precursors for its formation would be the cyanide ion, produced via the enzymatic degradation of the cyanogenic glycosides present in sugarcane. In the present work, the objective was to characterize the cyanogenic dhurrin glycoside in five different sugarcane varieties, using thin layer chromatography (TLC), and to analyze its possible relationship with the formation of ethyl carbamate in cachaça. For each variety of sugarcane, three extracts were prepared: in methyl alcohol, ethyl acetate and hexane. The extracts were submitted to TLC, where the mobile phase that was most adequate for separation was the mixture of methyl alcohol and ethyl acetate in a 7:3 ratio, and the stationary phase used was silica Gel 60 G 245®. Chromatographic spots were revealed with iodine vapors. All the physical and chemical parameters for the analyzed cachaças produced from the five different varieties of sugar cane and by different production processes were found to lie within the requirements of the Ministry of Livestock and Supply. Although not exceeding the limit, a significant variation in the final concentration of ethyl carbonate was observed for each sample. The chromatographic tests identified equal values for the R<sub>f</sub> of the dhurrin standard and for the sugarcane variety SP 83-2847. Similar values for SP 80-3280 and CTC 11 and different for RB 86-7515 and IAC 86-2480 were observed .

**Key words:** cachaça, ethyl carbamate, cyanogenic glycosides

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção da cachaça de alambique.....	16
Figura 2 - Equação simplificada da fermentação alcoólica.....	22
Figura 3 - Fórmula estrutural do carbamato de etila ( $H_2NCOOC_2H_5$ ).....	29
Figura 4 - Fórmulas estruturais de dois tipos de glicosídeos cianogênicos. (a) dhurrin (presente no centeio e no trigo) e (b) Linamarin (presente na mandioca, aveia e cereais). .....	32
Figura 5 - Proposta de via biossintética para monossacarídeos cianogênicos (VI) a partir de L-aminoácidos (I), envolvendo N-hidroxiaminoácidos (II), aldoximas (III), nitrilos (IV) e a-hidroxinitrilos (V) como intermediários.....	35
Figura 6 - A via biossintética para o glicosídeo cianogênico dhurrin no sorgo. ....	36
Figura 7 - Esquema da CCD feita para cada variedade de cana-de-açúcar, em que (a) é padrão do glicosídeo cianogênico dhurrin; (b) extrato em metanol; (c) é o extrato em acetato de etila e (d) é o extrato em hexano. ....	39
Figura 8 - Esquema de um cromatograma obtido por CCD, em que $dm$ é a distância total percorrida pelo solvente e $ds'n'$ é a distância percorrida pela mancha. ....	39
Figura 9 - Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: $100,0 \mu g L^{-1}$ . ....	51
Figura 10 - Cromatograma do teor de carbamato de etila (CE) encontrado na amostra F4, com detecção de fluorescência. ....	53
Figura 11 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar RB 86-7515 (F1), após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2. ....	57
Figura 12 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar SP 83-2847 (F2), após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2. ....	58
Figura 13 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar IAC 86-2480 (F3), após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2. ....	59
Figura 14 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar SP 80-3280 (F4), após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2. ....	60

Figura 15 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar CTC 11 (F5), após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2. ....61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informação sobre as amostras de cana-de-açúcar recolhidas.....	37
Tabela 2 - Análises físico-químicas das cachaças para as diferentes variedades de cana-de-açúcar utilizada*.....	44
Tabela 3 - Concentrações de Álcool butílico (butan-1-ol) e Álcool sec-butílico (butan-2-ol) encontradas nas amostras.....	48
Tabela 4 - Valores médios de Rf encontrados para cada mancha e seu respectivo extrato.....	56
Tabela 5 - Valores médios de Rf encontrados para cada mancha e seu respectivo extrato.....	62
Tabela 6 - Similaridade entre os Rf's encontrados e a concentração de CE. ....	63

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Teores máximo e mínimo para os componentes secundários e contaminantes presentes na aguardente de cana e cachaça (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014). .....	15
Quadro 2 - Variedades de cana-de-açúcar mais utilizadas no Brasil, distribuídas por instituição de pesquisa.....	20

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
2.1 A história da cachaça e o mercado atual.....	13
2.2. Cachaça X Aguardente de cana-de-açúcar .....	14
2.3 Cadeia produtiva da cachaça .....	15
2.3.1 Matéria-prima .....	17
2.3.2 Obtenção do mosto .....	22
2.3.3 Fermentação.....	22
2.3.4 Destilação .....	23
2.3.5 Armazenamento e envelhecimento.....	24
2.4 Compostos secundários e contaminantes orgânicos da cachaça .....	25
2.5 Carbamato de etila e suas vias de formação .....	29
2.6. Glicosídeos Cianogênicos.....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1 Coleta do material.....	37
3.2 Preparo do material e obtenção dos extratos brutos .....	37
3.3 Análise cromatográfica dos extratos.....	38
3.4 Análises físico-químicas de aguardentes .....	40
3.4.1 Determinação de grau alcoólico .....	40
3.4.3 Determinação dos ésteres .....	40
3.4.4 Determinação de aldeídos.....	40
3.4.5 Determinação de álcoois superiores .....	41
3.4.6 Determinação de metanol .....	41
3.4.7 Determinação de furfural.....	41
3.4.8 Determinação de cobre .....	41
3.4.9 Determinação de extrato seco.....	42
3.4.10 Determinação de carbamato de etila.....	42
3.5 Análises estatísticas .....	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
4.1 Análises físico-químicas das cachaças .....	43
4.2 Extratos e Cromatografia.....	56
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	64
REFERÊNCIAS .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

A cachaça é atualmente a bebida destilada mais consumida no Brasil, sendo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco e Minas Gerais os principais produtores. Por ser produzida em diferentes localidades, cada cachaça produzida tem como diferencial os métodos de produção e as características culturais e históricas de cada região.

Apesar da tradição e importância econômica dessa bebida, a cadeia produtiva da cachaça no país não é tecnologicamente homogênea. Um grande avanço que se tem observado no setor produtivo é a implantação de novas tecnologias que visam a melhorar suas qualidades físico-químicas e sensoriais. O aprimoramento da qualidade e da padronização da cachaça é essencial para que a bebida atenda aos padrões exigidos, visando ao aumento das vendas e a possibilidade do crescimento nas exportações.

Durante toda a cadeia produtiva da cachaça, além dos componentes secundários, podem ser formados contaminantes residuais orgânicos e inorgânicos. Entre os orgânicos, o carbamato de etila é o composto que vem sendo largamente estudado, pelo fato de ser um entrave nas exportações e por ser potencialmente tóxico. Esse composto pode ser encontrado em vários alimentos e bebidas fermentadas e fermento-destiladas, como vinhos, uísques, aguardentes, pães, iogurtes, entre outros. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para elucidar as causas e mecanismos de formação do carbamato de etila, com o objetivo de controlar e minimizar seu aparecimento durante todas as etapas da cadeia produtiva da cachaça.

Pouco se sabe sobre as vias de formação desse composto. A composição do material a ser fermentado e os possíveis precursores presentes no mosto em fermentação podem ocasionar diferentes vias de formação do carbamato de etila. Uma das vias proposta por alguns autores para formação do carbamato de etila durante a fermentação é aquela que envolve compostos que possuem o íon cianeto ( $CN^-$ ) em sua composição. Esse íon é formado pela ação enzimática e clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos, compostos que podem estar presentes na cana-de-açúcar e que, quando sofrem oxidação, formam o cianato ( $HCNO^-$ ), que pode reagir com álcool e formar o carbamato de etila.

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) utilizada para fermentação de cachaça, em suas diversas variedades, é classificada como uma colheita cianogênica. Porém, a fonte específica de cianeto ainda não é conhecida. Devido a poucos estudos relacionados à identificação desses glicosídeos cianogênicos em diferentes variedades de cana-de-açúcar e sua relação com a

formação de carbamato de etila, torna-se importante a realização de pesquisas relacionadas a esse composto e suas vias de formação.

Objetivou-se neste trabalho foram caracterizar o glicosídeo cianogênico dhurrin em diferentes variedades de cana-de-açúcar e sua possível relação com a formação do carbamato de etila em cachaças, por Cromatografia de Camada Delgada.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A história da cachaça e o mercado atual**

No Brasil, dados da literatura mostram que a primeira fabricação de cachaça ocorreu em meados de 1536, quando, por acidente, os escravos descobriram a fermentação da garapa. Logo a bebida ganhou a mesa dos senhores de engenho, sendo às vezes utilizada por eles até como moeda de troca. Em 1635, uma lei proibiu o consumo da cachaça. O motivo seria acabar com a concorrência que a bebida estava gerando com a bagaceira, uma aguardente produzida pelos portugueses a partir do bagaço da uva (IBRAC, 2012).

Em 1647, a Companhia Geral do Comércio passou a ter o monopólio da venda de bebidas alcoólicas na colônia. Com essa atitude, os portugueses não obtiveram muito sucesso, gerando ainda mais ilegalidade na produção, até que, em 1659, a coroa portuguesa emitiu novamente uma ordem para proibir o comércio de aguardente. Um ano após essa decisão, os produtores fluminenses de cachaça se rebelaram contra a ordem criada por Salvador Correa de Sá, tomando o poder do Rio de Janeiro por 5 meses, até a liberação do comércio da bebida e a eliminação das taxas. Essa tomada de poder ficou conhecida como 'Revolta da Cachaça'. Apenas depois de quase 500 anos, a cachaça foi definida e aceita como um produto genuinamente cultural brasileiro (IBRAC, 2012).

Hoje, a bebida ocupa posição de destaque no mercado nacional, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida do país, perdendo apenas para a cerveja. E, no ramo de bebidas destiladas, é a preferência do consumidor brasileiro, ganhando até mesmo do whisky e da vodca (IBRAC, 2017a).

Dois métodos são utilizados para a destilação da bebida: em colunas de aço inox ou em alambiques de cobre. Mais de 80% dessa capacidade destinam-se a obter a bebida pelo método de destilação em colunas de aço inox. O estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor de cachaça por esse método, enquanto Minas Gerais lidera a produção em alambiques de cobre (BNDES, 2015).

Dados do Centro Brasileiro de Referência da Cachaça (CBRC), mostraram que em 2012, no Brasil, existiam aproximadamente 40 mil produtores de cachaça, dos quais 90% eram micro e pequenos produtores, que, em sua maioria, encontravam-se em condições informais de produção. Acredita-se que menos de 2 mil estabelecimentos, somando 4 mil marcas, são devidamente registrados no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e na

Receita Federal, dados esses que acabam por dificultar as estatísticas de produção da bebida (CBRC, 2012).

De acordo com o Sistema de Controle da Produção de Bebidas da Receita Federal (SICOBEBE), o faturamento anual da cadeia produtiva alcançou R\$6,95 bilhões em 2014, quando foram produzidos 468,89 milhões de litros da bebida, de acordo com a produção das principais empresas formais do setor (SICOBEBE, 2014).

Em relação às exportações, no ano de 2016, a cachaça foi exportada para mais de 54 países, com mais de 60 empresas exportadoras, gerando receita de US\$ 13,94 milhões (8,38 milhões de litros). Esses números representam um crescimento de 4,62% em valor e 7,87% em volume, em comparação a 2015. Entre os países importadores, destacam-se: Alemanha, Estados Unidos, Paraguai, Uruguai, França. Apesar dos números crescentes, apenas 1% da cachaça produzida atualmente é exportada. (IBRAC, 2017b).

## 2.2. Cachaça X Aguardente de cana-de-açúcar

Sabe-se que a cachaça é um produto consumido pelas mais variadas classes sociais, e cada vez mais requisitado para as exportações, expondo diretamente a identidade do nosso país, exigindo, portanto, um produto de melhor qualidade. Inúmeros estudos e pesquisas vêm sendo realizados com o objetivo de aprimorar a produção da cachaça como um todo, desde a qualidade da matéria-prima, passando por cuidados durante o processo de produção e armazenamento, até o controle físico-químico de diversos contaminantes (CARDOSO, 2013).

Conforme a Instrução Normativa nº 13 de 2005, do MAPA, denomina-se o produto como aguardente de cana-de-açúcar ou cachaça, de acordo com a graduação alcoólica que ele apresenta. A **cachaça** é definida como sendo toda aguardente de cana-de-açúcar que apresenta graduação alcoólica entre 38 e 48% em v/v, a 20 °C. A **aguardente de cana-de-açúcar** é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v a 20 °C, quando obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L<sup>-1</sup>, expressas em sacarose (BRASIL, 2005).

Em 2014, o MAPA apresentou mudanças na Instrução Normativa de nº 13/2005, publicando a Instrução Normativa nº 28 de 2014, alterando o limite máximo para o carbamato de etila. Essa Instrução Normativa apresenta os Padrões de identidade e Qualidade (PIQ's) para os componentes secundários e contaminantes da cachaça (Quadro 1):

Quadro 1 - Teores máximo e mínimo para os componentes secundários e contaminantes presentes na aguardente de cana e cachaça (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014).

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
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 e hidróximetilfurfural	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Álcoois superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360,0
Álcool sec-butílico (butan-2-ol)	mg/100 mL de álcool anidro	-	10,0
Álcool butílico (butan-1-ol)	mg/100 mL de álcool anidro	-	3,0
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***	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	210,0
Cobre	$\text{mg L}^{-1}$	-	5,0
Arsênio	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	100,0
Chumbo	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	200,0

\*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico.

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

\*\*\* Limite revogado para 210  $\mu\text{g}$  na Instrução Normativa nº 28, publicada no Diário Oficial da União (DOU), dia 11 de agosto de 2014.

Fonte: BRASIL, 2005; BRASIL, 2014.

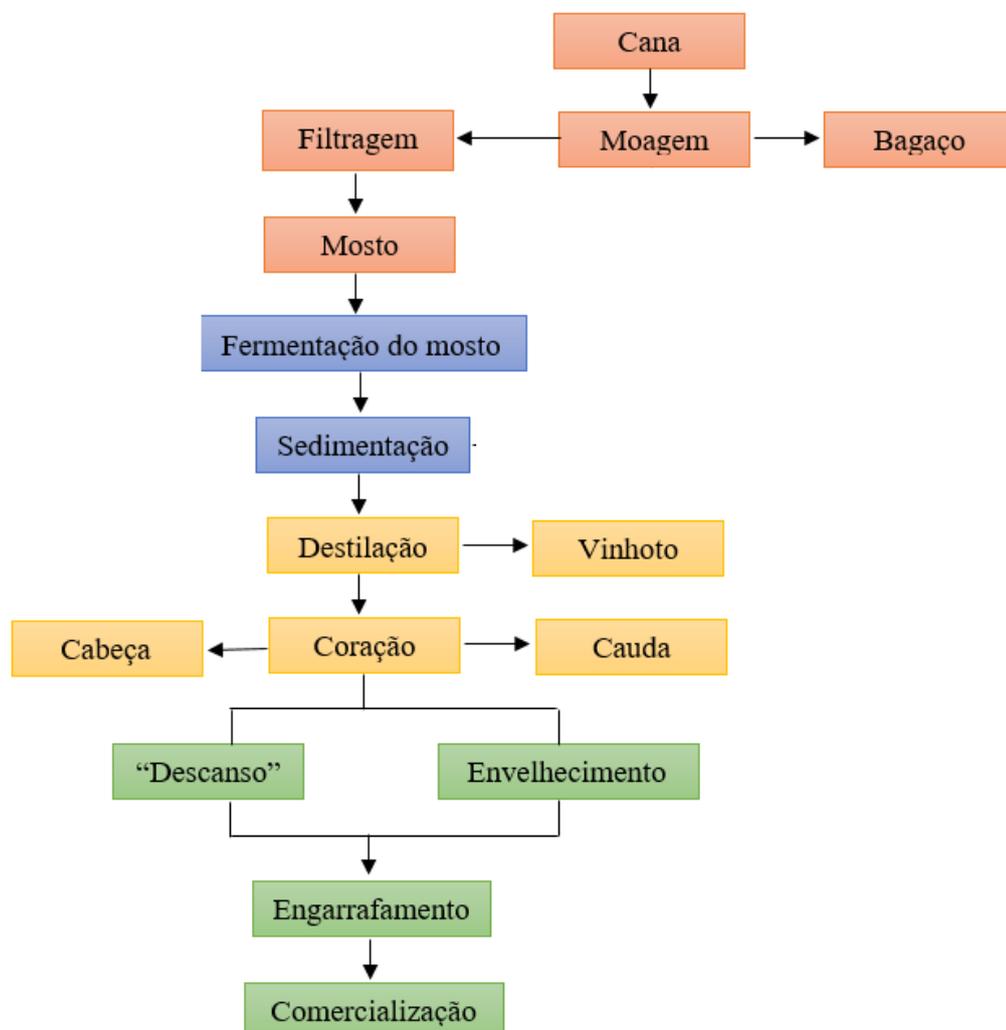
### 2.3 Cadeia produtiva da cachaça

Quando se fala de produção de cachaça, é importante diferenciar a produção em coluna de aço inox da produção de alambique de cobre. Geralmente, as aguardentes/cachaças destiladas em coluna são controladas por grandes empresas e a cana-de-açúcar é cultivada em grandes áreas, enquanto a produção de alambique é produzida em pequenas escalas. Além disso,

no processo em coluna, utilizam-se tonéis de aço inox, colunas de destilação também em aço inox e não se tem separações das frações no destilado final. Já no processo de aguardente de cana/cachaça de alambique, a destilação é feita em alambiques de cobre e o destilado final é separado em três diferentes frações: cabeça, coração e cauda (AQUARONE et al. 2005; CARDOSO, 2013).

Basicamente, a produção de aguardente de cana/cachaça de alambique é dividida em quatro importantes passos: a moagem para a obtenção do mosto, fermentação, destilação e envelhecimento, representado de maneira simplificada na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção da cachaça de alambique



Fonte: Adaptado de SANTIAGO, 2013.

### 2.3.1 Matéria-prima

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira, com uma área plantada de aproximadamente cinco milhões de hectares. Na indústria, é utilizada na produção de alimentos como o açúcar, o melado e a cachaça, bem como na produção de combustível (CARDOSO, 2013).

Como toda planta, a cana-de-açúcar possui uma classificação botânica dentro do reino vegetal. Na classificação atual, consta: Reino, Plantae; Divisão, Magnoliophita; Classe, Liliopsida; Ordem, Cyperales (Poales); Família, Poaceae; Tribo, Andropogonae; Subtribo, Saccharininae; Genero, *Saccharum*. As principais espécies são: *Saccharum officinarum* (*S. officinarum*), *Saccharum spontaneum* (*S. spontaneum*), *Saccharum robustum* (*S. robustum*), *Saccharum barbieri* (*S. barbieri*), *Saccharum sinense* (*S. sinense*) e *Saccharum edule* (*S. edule*) (CRONQUIST, 1981).

A cana-de-açúcar desenvolve-se sob a forma de touceiras, cuja parte aérea é formada por colmos, folhas, inflorescências e sementes, enquanto a parte subterrânea é composta por raízes e rizomas. De uma maneira geral, as diferentes variedades diferenciam-se pelo comprimento do internódio, pelo diâmetro do colmo, pela rigidez e pela coloração (ANDRADE, 2013).

Para os produtores de cachaças e indústrias alcooleiras, a colheita da cana-de-açúcar pode ser feita manualmente ou mecanicamente. O corte mecânico é utilizado principalmente pelas grandes indústrias canavieiras; porém, necessita de um estudo prévio sobre a variedade de cana-de-açúcar a ser cortada, uma vez que a maioria das máquinas brasileiras apresentam ruim acabamento no corte em relação ao solo, diminuindo sua eficiência (EMBRAPA, 2017a).

O corte manual é o modo mais comum e utilizado em pequenas plantações de cana-de-açúcar, nas quais o trabalhador utiliza ferramentas e equipamentos de proteção adequados. Porém, é alvo de muitas polêmicas quando realizam a queima da cana antes da colheita. A queima visa a facilitar o corte, mas a elevada quantidade de poluentes que é liberada na atmosfera tem sido muito contestada por diversos segmentos da sociedade (EMBRAPA, 2017b).

Ações do Sistema Integrado de Gestão Ambiental (SIGAM) originaram a Lei da Queima da Cana (Lei nº 11.241/2002), que proíbe a queima no estado de São Paulo e facultativa para os demais, que trata da queima controlada da cana-de-açúcar. Seu objetivo é adequar as áreas de produção ao plano de eliminação de queimadas. A legislação prevê planos diferenciados para áreas mecanizáveis (maiores que 150 hectares e declividade menor ou igual

a 12%). Nesse caso, o prazo para eliminação gradativa das queimadas prevê: 20% de redução imediata da área cortada; 30% a partir de 2006; 50% a partir de 2011; 80% a partir de 2016 e 100% até 2021 (EMBRABA, 2017b; BRASIL, 2002).

Além de prejuízos ambientais, essa prática deve ser evitada, pois a queima do palhiço da cana provoca a exsudação do açúcar, tornando-se um excelente aderente 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 vão para o alambique chegando ao produto final, assim reduzindo a qualidade da bebida. Por isso, fica evidente e de grande importância o uso de cana fresca na produção de cachaça, pois quando ela é queimada, há uma modificação considerável na fisiologia e morfologia dos colmos, acarretando contaminação da bebida (MASSON, 2007; TFOUNI et al. 2007).

Outro fator a considerar é que o intervalo entre o corte e a moagem não seja superior a 48 horas. O ideal é que a cana colhida seja usada no mesmo dia, pois a matéria-prima pode sofrer deterioração fisiológica resultante da transpiração e respiração, causando depreciação do produto e favorecendo a ação microbiológica (CARDOSO, 2013).

A composição química da cana-de-açúcar é muito variável quantitativamente de espécie para espécie. Entretanto, qualitativamente, é muito semelhante entre elas. A composição e a presença de alguns compostos são influenciadas pelo solo, clima, adubação, variedade, tempo de plantio, tipo de colheita, entre outros fatores. Os colmos são constituídos basicamente por água (74,5%), matéria orgânica (25%) e matéria mineral (0,5%); porém, esses constituintes não se encontram nas mesmas proporções nas diferentes partes do colmo (VENTURINI FILHO, 2010).

Considerada como uma colheita cianogênica, alguns dos componentes da cana-de-açúcar que vem despertando interesse nas pesquisas são os compostos nitrogenados. Eles apresentam indícios de serem possíveis precursores das reações de formação de diferentes contaminantes (ARESTA et al. 2001). De acordo com Cardoso (2013), entre esses compostos nitrogenados, citam-se os aminoácidos (0,30 – 0,60%), albuminoides (0,30 – 0,60%), amidas (como asparagina), ácido nítrico, amoníaco, entre outros.

Na cana-de-açúcar, os compostos nitrogenados de maior interesse são os glicosídeos cianogênicos. Esses compostos pertencem aos produtos do metabolismo secundário natural de plantas. Os glicosídeos cianogênicos são amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo

produzidos por mais de 2.600 plantas (UTHURRY et al. 2006). Quimicamente, são definidos como glicosídeos de  $\alpha$ -hidroxinitrilas, e na planta, têm papel de atuar principalmente no seu sistema de defesa. Acredita-se que, na maioria das vezes, os glicosídeos cianogênicos são derivados de cinco aminoácidos hidrofóbicos: valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e tirosina (GANJEWALA et al. 2010; OWUAMANAM, 2010). Embora saiba da sua existência na composição da cana-de-açúcar, não se tem descrito na literatura qual glicosídeo cianogênico está presente (GALINARO, 2015).

### **2.3.1.1. Variedades de cana-de-açúcar**

Visando a garantir a rentabilidade no setor sucroalcooleiro e em todos os setores que utilizam a cana-de-açúcar como matéria-prima, tornou-se importante aumentar a produtividade dessa colheita. O melhoramento genético é considerado um dos principais fatores agronômicos que podem contribuir para o aumento da produtividade, permitindo desenvolver variedades que se adaptem melhor às condições adversas de solo e clima e à incidência de pragas e doenças (MARIN, 2007).

A produtividade média dos canaviais varia a cada ano, fatores como o clima, solo e região influenciam o rendimento da colheita. A máxima produtividade em cana-de-açúcar depende também de um correto planejamento de plantio e de adequado manejo das variedades, as quais devem atender a exigências tanto no campo como na indústria, para maximizar os lucros. Com o avanço da tecnologia, do melhoramento das variedades e das novas técnicas de plantação, o rendimento de cana vem melhorando cada vez mais. Em 2015, por exemplo, a produtividade dos canaviais do Brasil atingiu o melhor resultado desde 2009, com 83 toneladas de cana por hectare (NOVA CANA, 2016).

A existência de muitas variedades é uma vantagem, embora torne difícil a tomada de decisão, já que requer muito mais conhecimento do produtor rural acerca das opções disponíveis e suas exigências. É importante que o produtor possua uma diversidade de variedades e cultivares de cana-de-açúcar na lavoura, pois assim pode diminuir a possibilidade de que uma praga ou doença se prolifere dentro do canavial, causando prejuízos (ANDRADE, 2013).

De acordo com a Agência Embrapa de Informação Tecnológica, as variedades de cana-de-açúcar mais utilizadas no Brasil hoje são divididas em três grupos, representando as Instituições de pesquisas que melhoram geneticamente as variedades de cana-de-açúcar. São elas: Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro - RIDESA

(variedades RB), um programa de melhoramento das Universidades Federais; Cooperativa dos Produtores de cana-de-açúcar e Álcool do estado de São Paulo – Coopersugar (variedade SP), atualmente incorporado pelo Programa de Melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira (variedade CTC); e, por último, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Instituto Agrônomo de São Paulo (variedades IAC). O Quadro 2 apresenta as principais variedades desenvolvidas pelas três Instituições (EMBRAPA, 2017a).

Quadro 2 - Variedades de cana-de-açúcar mais utilizadas no Brasil, distribuídas por instituição de pesquisa.

<b>Variedades de cana-de-açúcar – Planalsucar RIDESA – RB</b>			
RB70141	RB70194	RB705007	RB705051
RB705146	RB705440	RB72454	RB721012
RB725147	RB725828	RB732577	RB735220
RB735275	RB739359	RB739735	RB765418
RB785148	RB75126	RB758540	RB763710
RB83102	RB83160	RB83252	RB83594
RB835019	RB835054	RB835089	RB835486
RB8491	RB8495	RB842021	RB845257
RB8543	RB855035	RB855113	RB855156
RB855453	RB855463	RB855511	RB855536
RB855546	RB855563	RB867515	RB845197
RB845210	RB855036	RB865230	RB928064
RB858927	RB92579	RB93509	RB931530
RB863129	RB943365	RB872552	RB943538
RB932520	RB925211	RB935744	RB925268
RB925345			
<b>Variedades de cana-de-açúcar – Coopersucar – CTC e SP</b>			
SP77-5181	SP80-3280	SP79-1011	SP87-344
SP79-2233	SP85-3877	SP81-320	SP87-365
SP80-1842	SP81-3250	SP86-42	SP87-396
SP83-2847	SP-2233	SP85-5077	SP83-5073
SP86-155	SP80-1816	SP91-1049	
CTC 1	CTC 2	CTC 3	CTC 4
CTC 5	CTC 6	CTC 7	CTC 8
CTC 9	CTC 10	CTC 11	CTC 12
CTC 13	CTC 14	CTC 15	CTC 16
CTC 17	CTC 18		
<b>Variedades de cana-de-açúcar – Instituto Agrônomo de São Paulo – IAC</b>			
IACSP95-3028	IACSP93-2060	IAC91-1099	IACSP95-5000
IACSP93-3046	IACSP94-2101	IACSP94-2094	IACSP94-4004
IAC91-2195	IAC91-2218	IAC91-5155	IAC93-6006
IAC86-2480	IAC82-2045	IAC82-3092	IAC86-2210
IAC87-3396			

Fonte: EMBRAPA, 2017a.

Algumas variedades de cana-de-açúcar se destacam no setor de produção de cachaça e são detalhadas a seguir:

- RB 86-7515: lançada oficialmente pela Ridesa em parceria com a Universidade Federal de Viçosa em 1997, apresenta hábito de crescimento ereto e despalha fácil. O perfilhamento é médio com colmos de diâmetro médio e alta uniformidade. Os colmos possuem entrenós cilíndricos, de cor verde-arroxeados sob a palha. Essa variedade tem melhor desempenho em solos de textura leve e fertilidade média. Essa variedade tem apresentado boa capacidade de brotação mesmo em plantio tardio sob baixas temperaturas e elevado teor de sacarose (RIDESA, 2010).
- SP 83-2847: Desenvolvida pela Coopersugar, apresenta excelente produção e brotação soqueira. Apresenta alto teor de fibra e maturação média. Apesar de apresentar um teor de sacarose menor, se comparado às outras, não é exigente quanto ao solo, apresentando excelente crescimento em solos inférteis (UDOP, 2004).
- IAC 86-2480: Criada em 2002 pelo Instituto Agrônomo de São Paulo, essa cana apresenta como principal característica a despalha espontânea, ou seja, em seu ponto de maturação, as folhas da cana caem sozinhas no chão, fenômeno que desperta grande interesse pelos produtores, uma vez que facilita a colheita da cana. Outra característica muito importante é o alto teor de açúcar, boa produtividade agrícola e maior rendimento no corte (LANDELL et al. 2016).
- SP 80-3280: Desenvolvida também pela Coopersugar, essa cana apresenta maturação de média para tardia. É cultivada por grandes empresas, pois apresenta resistência a diversos tipos de pragas e variação do clima, além de oferecer um elevado teor de sacarose. Entretanto, é muito exigente quanto às características do solo, produzindo bem em solos férteis e úmidos (UDOP, 2004).
- CTC 11: Criada pelo Centro de Tecnologia Canavieira, essa variedade de cana-de-açúcar apresenta maturação média/tardia. É utilizada também por empresas que plantam em grandes quantidades, pois aceita muito bem a colheita mecanizada e não exige solo úmido e fértil. Destaca-se por apresentar um longo período de safra. Em contrapartida, apresenta um teor de sacarose menor, se comparado às outras variedades (COPLANA, 2006).

De acordo com Andrade (2013), a safra de cana-de-açúcar na Região Sudeste do Brasil inicia-se em maio/junho e perdura até o fim do ano, isto é, outubro/novembro. Nesse contexto,

as variedades podem ser classificadas de acordo com sua época de maturação: **precoce**, que são adequadas para serem colhidas no início da safra (maio/junho); **média**, que será colhida no meio da safra (julho/agosto/setembro); e **tardia**, que será colhida no final da safra (outubro/novembro). Para a produção de cachaça, não se exige uma variedade de cana-de-açúcar específica. Cada região e cada produtor opta por uma variedade de cana-de-açúcar de sua preferência, que normalmente são as que mais se adaptam ao clima e ao solo do local.

### 2.3.2 Obtenção do mosto

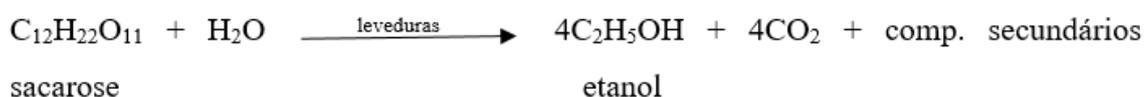
Após a colheita, a cana madura, fresca e limpa é submetida à moagem para separar o caldo do resíduo fibroso. É comum a passagem do bagaço várias vezes pela moenda para se retirar o máximo de caldo. O caldo então passa por um processo de limpeza, com o uso de sistemas de filtração e decantação (CARDOSO, 2013).

Esse caldo extraído, chamado por alguns de garapa, é constituído de água (65-75%), açúcares (11-18%), pequenas quantidades de substâncias nitrogenadas, ceras, lipídios, pectinas, materiais corantes e sais minerais. Seu pH é pouco ácido (4,8-6,0), o que favorece o desenvolvimento de micro-organismos (SCHWAN et al. 2013). Opcionalmente, a concentração de açúcares pode ser ajustada para um maior controle do processo de fermentação. A partir de então, esse caldo passa a ser chamado de mosto, estando pronto para a adição do fermento (CARDOSO, 2013).

### 2.3.3 Fermentação

A fermentação alcoólica é a principal etapa da produção de cachaça, responsável pela transformação dos açúcares e outros componentes do mosto em etanol, gás carbônico e uma série de compostos secundários. A equação geral é descrita pela Figura 2.

Figura 2 - Equação simplificada da fermentação alcoólica.



Fonte: CARDOSO, 2013.

Na produção de cachaça, o fermento é constituído por leveduras, sendo a principal a *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação na produção de cachaça é um processo relativamente rápido, se comparado com outras bebidas, como o vinho e a cerveja. Sua duração, em média, é de 24 horas. A fermentação pode ser conduzida por sistemas contínuos, semicontínuos ou intermitentes (PATARO et al. 2002; VENTURINI FILHO, 2010).

Ao iniciar o processo fermentativo, é desejável uma fermentação sadia, regular, e que apresente altos rendimentos. Com a finalidade de obter essas características, faz-se o que pode ser chamado de “pé de cuba”, “inóculo”, “pé de fermentação” ou “levedo”. Esse processo consiste na introdução de fermentos de qualidade reconhecidamente boa ao mosto a ser fermentado, podendo o pé de cuba ser preparado por leveduras selvagens ou selecionadas (CAMPOS et al. 2010).

Diversos fatores são levados em conta quando se utiliza a seleção de linhagens de *Saccharomyces*, entre estes alguns relacionados às propriedades fisiológicas específicas, como: início rápido da fermentação, boa taxa de fermentação; baixo requerimento de vitaminas, ácidos graxos e oxigênio; tolerância à alta concentração de etanol; tolerância à alta pressão osmótica e a altas temperaturas; fermentar completamente o caldo; não produzir espuma excessiva; ser eficiente na utilização dos açúcares; produção mínima de SO<sub>2</sub>; não produzir ácido acético; produzir componentes do aroma, a exemplo, ácidos orgânicos e glicerol; alto rendimento na produção de etanol e relativa resistência a baixos valores de pH. Para que ocorra uma fermentação eficiente e de qualidade, o mosto deve apresentar uma concentração de açúcares e nutrientes compatíveis com a condição ótima de trabalho da levedura. (SCHWAN et al. 2013).

Quando se tem o açúcar do mosto reduzido a praticamente zero, o produto resultante é chamado de vinho e contém um grande número de componentes de natureza distinta, podendo ser sólidos, líquidos ou gasosos. Como as substâncias voláteis apresentam propriedades químicas e físicas diferentes, é possível sua separação por meio da diferença da temperatura de ebulição delas pelo processo conhecido como destilação (VENTURINI FILHO, 2010).

#### **2.3.4 Destilação**

A finalidade da destilação é a separação dos componentes voláteis presentes no vinho, que ocorre por meio do aquecimento do líquido em alambique e posterior condensação dos vapores formados. Durante a destilação, ocorrem algumas reações químicas, tais como hidrólise, esterificação e acetilação, induzidas pelo calor. A maneira como a destilação é

conduzida determinará quais compostos serão carregados pelo vapor para a bebida, influenciando diretamente a qualidade da cachaça produzida (CARDOSO, 2013).

Quando se fala de destilação, existem diferenças importantes entre as cachaças de alambiques e de coluna. A cachaça de coluna é produzida em maior escala por meio de equipamentos conhecidos por colunas de destilação que, em geral, são fabricados de aço inoxidável. Tem como característica principal uma produção relativamente rápida por apresentar processos contínuos. Nesse tipo de produção, a cachaça não passa por processo de separação de frações (MACHADO et al. 2012; BNDES, 2015).

Já a cachaça de alambique geralmente é produzida em menor escala em alambiques de cobre, material dotado de propriedades que resultam em características exclusivas quanto aos sabores e aromas. Nesse processo, tem-se a separação de três frações dotadas de diferentes teores de grau alcoólico que permitem refinar a bebida. Essas frações são conhecidas como cabeça, onde estão as substâncias mais voláteis; a cauda, onde estão as substâncias menos voláteis; e o coração, que é a fração intermediária e mais nobre, representando a cachaça em si, com média de 80% do volume final da produção (MACHADO et al. 2012; LIMA et al. 2011).

Após a destilação, a cachaça ainda não está pronta para o consumo, pois apresenta um *bouquet* irregular; por isso, há necessidade de um período de descanso de pelo menos dois a três meses para completar sua qualidade, devendo ser armazenada em recipientes apropriados, em local protegido e evitando altas temperaturas (CARDOSO, 2013).

### 2.3.5 Armazenamento e envelhecimento

A cachaça **armazenada** é aquela estocada em recipientes de aço inox ou em barris de madeira em um prazo inferior a um ano. O armazenamento da cachaça de pelo menos três meses é muito importante, uma vez que, após a destilação, a cachaça ainda não está apta ao consumo, necessitando um período mínimo de descanso. Esse período é conhecido vulgarmente pelos produtores como “período de amaciamento, descanso ou maturação da bebida”.

No Brasil, a etapa de envelhecimento da aguardente é optativa, não sendo realizada quando se deseja uma cachaça/aguardente ‘branca’ ou também por alguns produtores devido ao tempo requerido pelo processo e aos custos introduzidos pelo armazenamento da bebida em tonéis por alguns anos. Essa etapa é indispensável quando se deseja agregar valor a uma bebida destilada. O envelhecimento da cachaça é realizado em tonéis de diferentes tipos de madeira, como carvalho, bálsamo, amburana, jequitibá, entre outros. (ANJOS et al. 2011a; MIRANDA et al. 2008).

A legislação vigente estipula parâmetros para que a bebida seja considerada envelhecida. A **cachaça envelhecida** refere-se à bebida que contiver, no mínimo, 50% de cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano (BRASIL, 2005).

A **cachaça premium** refere-se à bebida que contiver 100% de aguardente de cana/cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano. A **cachaça extra premium** refere-se à bebida que contiver 100% de aguardente de cana/cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a três anos (BRASIL, 2005). Após essas etapas, a bebida está pronta para ser engarrafada e levada ao mercado consumidor.

#### 2.4 Compostos secundários e contaminantes orgânicos da cachaça

Diversos compostos são formados durante o processo de fermentação do mosto da cana-de-açúcar provenientes da transformação dos açúcares e de outras reações químicas. Entre esses compostos, o produto majoritário é o álcool etílico. Porém, nesse mesmo processo, vários outros são formados em menores quantidades e são denominados de compostos secundários. Em quantidades adequadas, a presença desses componentes é de extrema importância, pois irão contribuir para o *flavour* da bebida final. Destacam-se como compostos secundários os aldeídos, álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos (CARDOSO, 2013).

A presença excessiva desses compostos não é desejável à produção, podendo ocasionar características indesejáveis para o produto final, que podem estar relacionadas a diversos fatores, como más condições higiênico-sanitárias do alambique, más condições nutricionais do mosto para o fermento, fermento contaminado, condições inadequadas de temperatura, pH, aeração, entre outras. O ideal é que essas quantidades respeitem as exigências do MAPA por meio da Instrução Normativa nº 13 de 2005 e nº 28 de 2014 (CARDOSO, 2013; BRASIL, 2005; BRASIL, 2014).

Em relação a todos esses compostos formados durante o processo, a cachaça é dividida em duas frações: a parte orgânica e a parte inorgânica. A primeira é constituída basicamente de compostos orgânicos, como: álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, carbamato de etila e compostos sulfurados.

O **álcool etílico** (etanol) é o principal composto formado durante a fermentação. Os álcoois com três, quatro ou cinco átomos de carbono são chamados **álcoois superiores** e são

frequentemente encontrados em bebidas destiladas. Apresentam, quantitativamente, o maior grupo de substâncias voláteis nas bebidas destiladas. Geralmente apresentam um odor característico de flores e, juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo *flavour* da aguardente. Os principais álcoois superiores encontrados em cachaças são os álcoois isoamílico (2-metilbutan-1-ol), amílico (pentan-1-ol), isobutílico (2-metilpropan-1-ol) e propílico (propano-1-ol) (VILELA et al. 2007).

A IN nº 13/2005 incluiu na lista dos Padrões de Identidade e Qualidade de Aguardente de Cana e de Cachaça duas substâncias que fazem parte dos álcoois superiores, álcool butílico (butan-1-ol) e álcool sec-butílico (butan-1-ol), mas que devem ser quantificadas separadamente. Além disso, limites foram estabelecidos para essas substâncias (BRASIL, 2005).

Pode-se ter também a formação do **álcool metílico** (metanol), que, no entanto, é um álcool particularmente indesejado na cachaça. Sua ingestão, mesmo em quantidades reduzidas, mas por longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira ou mesmo a morte. Para Cardoso (2013), a oxidação do metanol origina o ácido fórmico, o dióxido de carbono e a água. Tanto o ácido fórmico quanto o dióxido de carbono apresentam características ácidas e, assim, promovem a acidose no sangue e, como consequência, distúrbios no sistema respiratório, levando até ao coma.

Essa substância é originada na 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 correta do mosto. A fim de minimizar e/ou evitar sua formação, deve-se evitar uma fermentação realizada na presença de frutas ricas em pectina, como laranja, maçã, abacaxi e também a presença de bagacilhos no caldo da cana a ser fermentado (BADOLATO; DURAN, 2000).

Um procedimento inicial para controlar e/ou diminuir o teor de álcoois superiores consiste em avaliar a eficiência do refluxo na coluna de destilação do alambique e ajustar o tamanho da primeira fração do destilado: a cabeça (LEAUTÉ, 1990). Outras providências podem ser tomadas, 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, 2013).

Os **aldeídos** são formados durante o processo de fermentação alcoólica. A sua formação tem origem na ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer nas etapas finais pela oxidação a ácido acético, formado principalmente

durante a aeração excessiva do mosto. O principal aldeído formado nessa etapa de produção da bebida é o acetaldeído. Os demais aldeídos são obtidos provavelmente a partir da oxidação de álcoois superiores. A intoxicação por aldeídos pode levar a sérios problemas relacionados ao sistema nervoso central. Uma das maneiras de minimizar e controlar grandes quantidades de aldeídos é a correta separação da primeira fração do destilado (cabeça) (PEREIRA et al. 2003; CARDOSO, 2013).

Os **ésteres** constituem a maior classe de compostos aromáticos, que são, em sua maioria, responsáveis pelo aroma em bebidas alcoólicas, os comumente encontrados são: acetato de etila, formiato de etila (sabor artificial de rum), acetato de pentila (aroma de banana), acetato de octila (laranja), butirato de etila (abacaxi) e butirato de pentila (abricó) (STELLA, 2010).

A maioria significativa dos ésteres é formada durante o metabolismo secundário intracelular das leveduras, cujos componentes-chave da reação são o acetil-CoA e o etanol. O acetato de etila é o principal éster formado nessa etapa, representando aproximadamente 80 % dos ésteres totais presentes na cachaça e na aguardente. Em quantidades desejáveis, confere à bebida um sabor e aroma frutado. Já em quantidades indesejáveis, acaba por oferecer um sabor e aroma enjoativos e desagradáveis (PARAZZI et al. 2008).

No processo de envelhecimento, a formação de ésteres ocorre por reações químicas diretas (esterificação) entre os ácidos carboxílicos da madeira e álcoois presentes no destilado. Fatores, como a quantidade e o tipo do fermento, aeração, pH, temperatura e quantidade de mosto interferem significativamente em sua formação (CARDOSO, 2013).

Outros componentes secundários formados durante a fermentação alcoólica são os **ácidos carboxílicos**, que em sua maioria, apresentam-se como ácido acético. Esse tem sido quantitativamente o principal componente da fração ácida das cachaças, expresso em acidez volátil. Quantidades elevadas desse ácido carboxílico estão frequentemente associadas à prática de estocagem da cana e contaminações do mosto por bactérias acéticas, decorrentes de um tempo excessivo de descanso entre o processo de fermentação e a destilação (CARDOSO, 2013).

Ainda na fração orgânica da cachaça, pode-se encontrar alguns compostos secundários que não são desejáveis nem em pequenas quantidades. Esses compostos são denominados de contaminantes ou compostos secundários indesejáveis. Destacam-se o metanol, já citado anteriormente, o furfural, o hidróximetilfurfural, a acroleína e o carbamato de etila. Esse último vem despertando grande interesse devido ao seu alto potencial carcinogênico (CARDOSO, 2013).

O **furfural** e o **hidroximetilfurfural** não são aceitos na bebida por serem considerados nocivos à saúde. A legislação define teores máximos em conjunto de 5 mg por 100 mL de álcool anidro na bebida para esses compostos, que podem ser provenientes da desidratação de açúcares, pentoses e hexoses, durante as etapas do processo de produção (CARDOSO, 2013).

A queima provoca a desidratação parcial de uma pequena fração dos açúcares presentes na cana-de-açúcar, tornando-se, assim, um excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas, e posteriormente, para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural e hidroximetilfurfural, chegando ao produto final. Quando, nesse processo, estão envolvidas as pentoses, há a formação do 2-furfural (furfural), e quando estão envolvidas as hexoses, forma-se o 5-hidroximetil-2-furfural (hidroximetilfurfural) (PEREIRA et al. 2003; MASSON et al. 2012).

O propenal-2, também conhecido como **acroleína**, é um composto extremamente tóxico por todas as vias de exposição. Entretanto, seu mecanismo de formação ainda não é bem conhecido. Apresenta características mutagênicas e a exposição prolongada provoca irritação no sistema respiratório de animais e humanos. Além disso, sabe-se que o composto causa reações cruzadas no DNA, inibindo a atividade de algumas enzimas (incluindo o citocromo P450 e a glutatona-S-transferase) *in vitro*, reagindo com os grupos sulfidrílo (MASSON et al. 2012; ZACARONI et al. 2011).

A formação de acroleína ocorre durante o processo de fermentação por meio da desidratação do glicerol associado a bactérias termofermentativas. Acredita-se que o aroma penetrante e apimentado em bebidas destiladas novas, uísques, conhaques ou rum é causado pela presença de acroleína (CARDOSO, 2013).

O **carbamato de etila**, devido ao seu alto poder carcinogênico, vem despertando grande interesse entre os pesquisadores, uma vez que sua presença pode ser um entrave na exportação da cachaça, visto que alguns países não permitem a presença desse composto nas bebidas.

Na fração inorgânica da cachaça, pode-se citar também alguns compostos que, em quantidades superiores às exigidas pela legislação, irão comportar-se como contaminantes do processo (CARDOSO, 2013).

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, 2013). Além dessas, Caldas, Oliveira e Gomes Neto (2009) citam

outras fontes de contaminação da cachaça por esses metais, como por meio da matéria-prima, utilização de produtos agroquímicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas) e pelo solo.

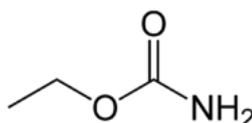
O **cobre**, um dos metais mais encontrados na cachaça, é proveniente principalmente, do material constituintes dos alambiques. Acredita-se que ele contribui como um catalisador para algumas reações e também na eliminação de certos odores desagradáveis encontrados na bebida. Uma maneira de evitar o excesso desse metal na bebida é observar a assepsia cuidadosa dos alambiques, após o procedimento de alambicagem. Esse processo de higienização tende a reduzir consideravelmente os problemas de excesso de cobre nas aguardentes (LIMA et al. 2006; CARDOSO, 2013).

Como o excesso desse composto é uma agravante na qualidade final do produto, alguns autores vêm desenvolvendo trabalhos a fim de reduzir o nível desse composto na bebida. Duarte et al. (2014) avaliaram o efeito de argilas na remoção do cobre em cachaças e observaram uma diferença significativa na sua remoção, Lima et al. (2009) avaliaram o efeito do uso de carvão ativado, resina de troca iônica e composto carvão ativado/óxido de ferro na remoção de cobre e observaram que a resina obteve o melhor desempenho, uma vez que não retirou outros componentes orgânicos importantes na cachaça, enquanto o carvão ativado, além não remover cobre suficiente para reduzir sua concentração, retirou quantidades significativas dos outros compostos secundários necessários para a qualidade da bebida.

## 2.5 Carbamato de etila e suas vias de formação

Conhecido também como uretana ou etiluretana, o carbamato de etila (CE) é o éster etílico do ácido carbâmico, apresentando-se na forma de cristal incolor, inodoro e de sabor levemente amargo. Apresenta massa molar de 89,09 g/mol, temperatura de fusão entre 48° e 50 °C e temperatura de ebulição entre 182° e 184 °C (MERCK®, 2001). Sua fórmula estrutural é representada pela Figura 3.

Figura 3 - Fórmula estrutural do carbamato de etila (H<sub>2</sub>NCOOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>).



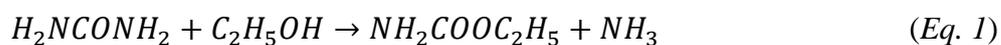
Fonte: MERCK, 2001

Nos últimos anos, uma atenção considerável foi direcionada ao CE, um composto suspeito de ser cancerígeno, que pode estar presente em alimentos fermentados e bebidas destiladas. Esse contaminante é considerado genotóxico e está incluído no Grupo 2 do IARC - *International Agency for Research on Cancer* - como um provável carcinógeno humano (IARC, 2010).

A presença de diferentes níveis de CE é comum em diversos alimentos e bebidas onde ocorrem processos fermentativos, como vinhos, iogurtes, queijos, cervejas, dentre outros (MACHADO et al. 2012). Com concentrações acima de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , é usualmente encontrado em bebidas destiladas a base de plantas consideradas cianogênicas como a mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) e frutas com caroço como drupa e pêssego (LACHENMEIER et al. 2010).

Pouco se conhece sobre os mecanismos de formação desse composto. Devido aos altos teores de CE encontrados em alimentos e bebidas, vários experimentos têm sido realizados em bebidas fermento-destiladas para se conhecer o mecanismo e a origem dos precursores para a formação desse composto (MASSOM et al. 2014; MENDONÇA et al. 2016).

De acordo com Aresta et al. (2001), para fins de pesquisa, industrialmente, o CE é obtido pela reação direta de ureia com etanol (Eq. 1).



Segundo Galinaro et al. (2015), outra forma de obtenção do CE industrialmente é a partir do fosfogênio, um gás altamente tóxico. O processo inicia-se com uma reação entre o monóxido de carbono e o cloro e são descritas nas equações abaixo (Eq. 2, 3 e 4):



O início das pesquisas sobre o CE se deu por volta de 1970, quando se estudavam o vinho. Nessa época, sua formação (Eq. 5) foi proposta a partir do carbonato de dietila, que é um composto usado como aditivo alimentar para controlar a atividade microbiana (LOFROTH & GEJVALL, 1971).



Em estudos posteriores, os pesquisadores observaram que o CE não estava relacionado com o carbonato de dietila e sim com a concentração de ureia, em que tal concentração aumentava substancialmente com o aumento da temperatura. A maioria da ureia que se forma no vinho vem da hidrólise da arginina pela arginase. Observaram também forte ligação entre as uvas que eram fertilizadas com compostos nitrogenados, que apresentavam alto índice de ureia e, conseqüentemente, o teor de carbamato de etila aumentava (OUGH et al. 1988; OUGH et al. 1989).

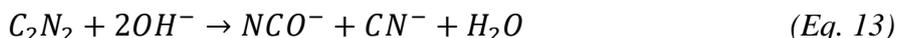
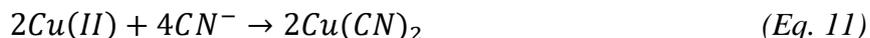
Em 1997, Aresta e Quaranta propuseram a formação do carbamato de etila em vinhos por meio da reação do fosfato de carbamila (FC) com o etanol (Eq. 6). O FC é produzido pelo metabolismo natural das *Saccharomyces cerevisiae* e vem da síntese de arginina catalisada pela carbamil-sintase, envolvendo ATP, CO<sub>2</sub> e amônia.



Para Mackenzie et al. (1990), a formação de carbamato de etila em cachaças pode ocorrer em diversos momentos durante o processamento. Para o autor, a formação desse composto pode ocorrer antes, durante e após o processo de destilação. Os autores e Jones (1998), pesquisando os precursores do CE, propuseram que um dos precursores mais encontrados nos destilados seria o íon cianeto (CN<sup>-</sup>). Esse íon seria formado quando glicosídeos cianogênicos, como o dhurrin e o linamarin, (Figura 4) presentes, por exemplo, na mandioca e em diversos cereais, são degradados enzimaticamente, liberando o cianeto, passível de ser oxidado a cianato (CNO<sup>-</sup>), o qual reage com o etanol para formar o CE.



cianato. O cianato pode reagir com etanol para formar CE. O mecanismo é detalhado a seguir pelas Eq. 11, 12, 13 e 14 (BEATTIE & POLYBLANK, 1995):



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 (GUERAIN & LEBLOND, 1992).

Assim, a hipótese para a formação de carbamato de etila está apresentada nas Eq. 15 a 19.



Entretanto, vários fatores ainda precisam ser pesquisados a fim de elucidar as reações que geram o CE a partir de precursores nitrogenados em bebidas destiladas (ZACARONI et al. 2011).

O método mais utilizado para determinação de CE em bebidas alcoólicas é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Todavia, alguns autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD). O método envolve a derivação prévia do CE, permitindo, assim, sua detecção em diferentes matrizes. Essa última vem surgindo como uma alternativa, apresentando níveis de detecção similares com os obtidos em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Além disso, a cromatografia líquida proporciona uma maior rapidez na etapa de preparação das amostras, uma vez que não são necessárias etapas de extração e concentração do analito, apenas a derivação prévia do carbamato de etila (ANJOS et al. 2011b; MACHADO et al. 2012).

## 2.6 Glicosídeos Cianogênicos

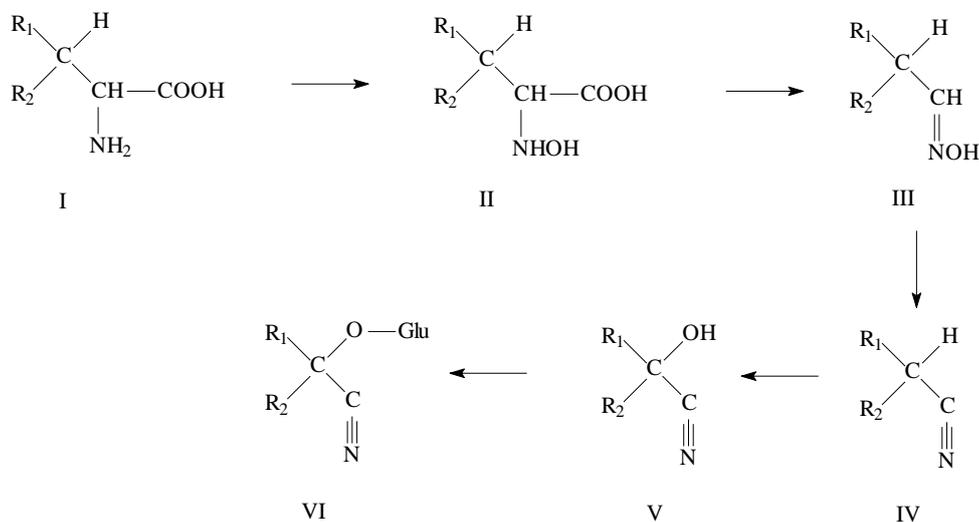
São consideradas plantas cianogênicas aquelas que contêm como princípio ativo o ácido cianídrico (HCN). Esse é um líquido incolor, muito volátil, considerado como uma das substâncias mais tóxicas que se conhece. Nas plantas, o HCN encontra-se ligado a carboidratos denominados glicosídeos cianogênicos, sendo liberado após sua hidrólise. Os glicosídeos cianogênicos têm sido constatados em plantas de muitas famílias, como: as Rosaceae, Poaceae, Leguminosae, Gramíneae, Araceae, Passifloraceae e Euforbiceae. Acredita-se que mais de 2.650 espécies de plantas de mais de 550 gêneros e 130 famílias são conhecidas por serem cianogênicas (VETTER, 2000).

Em qualquer que seja a família ou espécie, a concentração e o tipo dos glicosídeos cianogênicos são variáveis, e numa mesma espécie, varia dependendo do clima e outras condições que influenciam o crescimento da planta, como adubação nitrogenada, deficiência de água e idade da planta, pois quanto mais nova e de crescimento rápido, maior será o seu teor em glicosídeos cianogênicos. Isso se deve à intensa atividade celular, principalmente observada nas folhas e sementes em germinação (EGEKEZE; OEHME 1980).

Os glicosídeos cianogênicos são solúveis em água e produzidos pelo metabolismo secundário das plantas. Localizam-se no vacúolo celular, onde sua principal função para as plantas é a defesa. As enzimas que degradam os glicosídeos encontram-se no citoplasma. Um possível dano mecânico no tecido vegetal, como corte, trituração ou mastigação, contendo glicosídeos cianogênicos, rompe o vacúolo celular e o citoplasma, resultando em sua degradação pela ação sequencial de glucosidases e hidroxinitrilases e liberação de cianeto de hidrogênio (JONES et al. 2000).

A maioria dos glicosídeos cianogênicos são derivados dos cinco aminoácidos hidrofóbicos: tirosina, fenilalanina, valina, leucina e isoleucina. Os cianogênios ciclopentenoides provavelmente se originam da ciclopentenilglicina. Em uma via biossintética, proposta com base em experimentos de rastreamento *in vivo* em sorgos, pôde-se observar a conversão dos aminoácidos específicos em seus correspondentes  $\alpha$ -hidroxinitrilos com N-hidroxiaminoácidos, aldoximas e nitrilas, que servem como intermediários (Figura 5) (HALKIER, 1988).

Figura 5 - Proposta de via biossintética para monossacarídeos cianogênicos (VI) a partir de L-aminoácidos (I), envolvendo N-hidroxi aminoácidos (II), aldoximas (III), nitrilos (IV) e a-hidroxinitrilos (V) como intermediários.



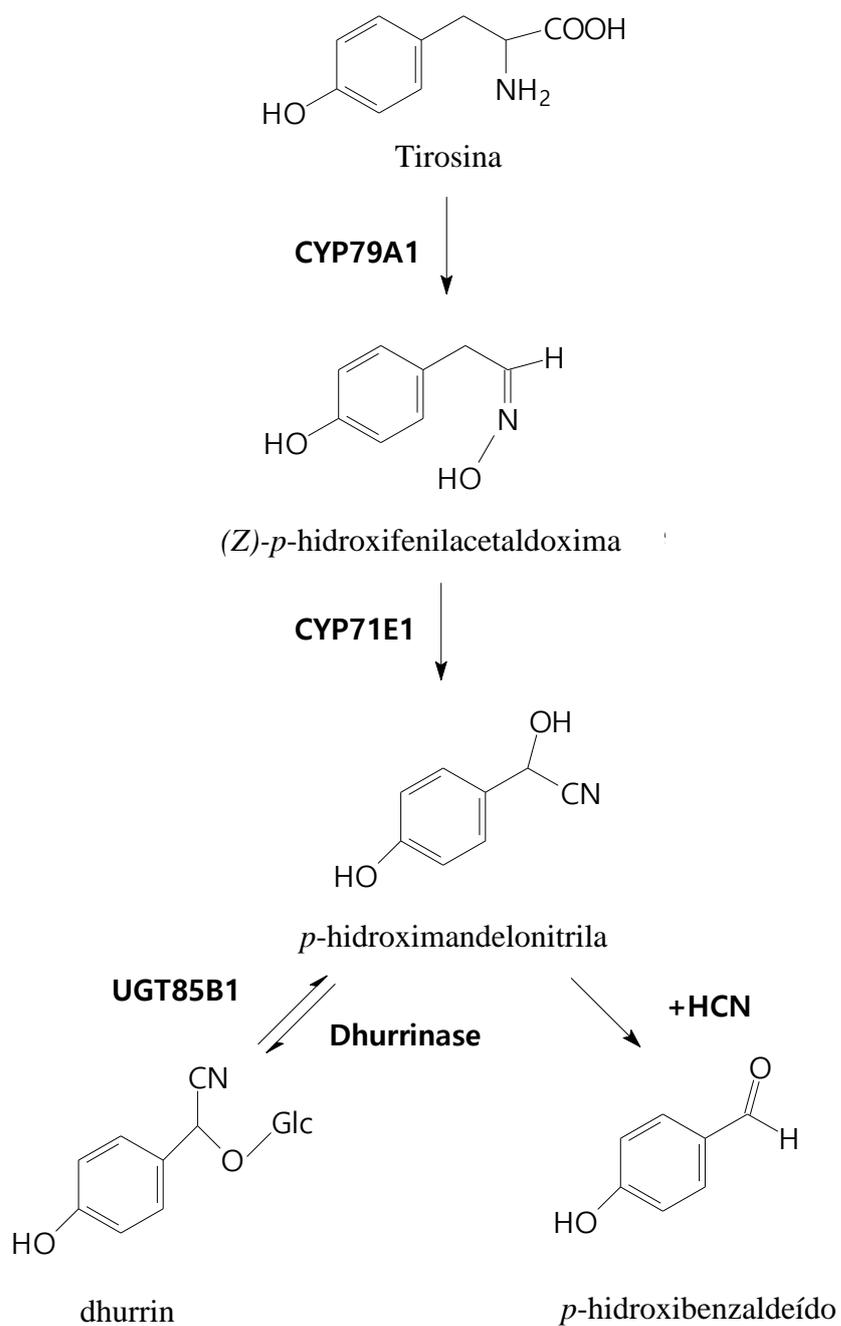
Fonte: HALKIER, 1988.

Os estudos mais elaborados sobre a biossíntese de glicosídeos cianogênicos concentraram-se no *dhurrin* por mudas de sorgo. O *dhurrin* constitui 30% do peso seco das pontas do sorgo, mas está ausente nas sementes e raízes. A distribuição de *dhurrin* e seu sistema de síntese na parte superior do sorgo mostra que tanto a produção quanto o seu armazenamento estão localizados no mesmo local dentro das mesmas células. Acredita-se que, assim como no sorgo, o *dhurrin* encontra-se presente na maioria das plantas cianogênicas da família Poaceae (HALKIER et al. 1988).

Kahnetal e Fahrendorf (1999) mostram esquematicamente a participação das enzimas biossintética na formação do *dhurrin* no sorgo (Figura 6). Na via de formação, as duas primeiras enzimas para a síntese de *dhurrin*, CYP79A1 e CYP71E1, são enzimas que estão ligadas à membrana e que catalisam a conversão de tirosina em *p*-hidroxymandelonitrila. Esse é o ponto crucial na síntese de *dhurrin*, uma vez que a enzima CYP79A1 exibe alta especificidade pelo seu substrato.

Em sequência, a enzima CYP71E1 faz a conversão de (*Z*)-*p*-hidroxifenilacetaldeído em *p*-hidroximandelonitrila. Finalmente, uma glicosiltransferase solúvel em açúcar-UDP converte *p*-hidroximandelonitrila no *dhurrin* (JONES et al. 1998). Os estudos com conversão de tirosina para *p*-hidroxialoronitrila indicaram que a atividade biossintética aumenta nos dois primeiros dias após a germinação e que a atividade das enzimas envolvidas na formação do *dhurrin* são encontradas na parte superior do sorgo (BUSK & MOLLER, 2002).

Figura 6 - A via biossintética para o glicosídeo cianogênico dhurrin no sorgo.



Fonte: BUSK & MOLLER, 2002.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do material

Foram coletadas cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar em diferentes regiões dos estados de Minas Gerais e São Paulo, utilizadas nos dois diferentes tipos de processamentos agroindustriais: cana-de-açúcar, para produção de cachaça em coluna de aço inox e cana-de-açúcar para produção em alambique de cobre. Além das amostras de cana-de-açúcar, foram coletadas amostras das aguardentes produzidas com essas canas, sem que fossem beneficiadas com armazenamento ou envelhecimento.

Foram recolhidos aproximadamente 500 g de cada variedade, que foram encaminhados ao Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardente, do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, em Minas Gerais. A Tabela 1 apresenta as variedades de cana utilizadas, assim como o local de recolhimento, tipo de fermentação e destilação de cada variedade.

Tabela 1 - Informação sobre as amostras de cana-de-açúcar recolhidas.

<b>Código</b>	<b>Variedade de Cana-de-açúcar</b>	<b>Cidade Estado</b>	<b>Tipo de fermento</b>	<b>Tipo de destilação</b>
<b>F1</b>	RB 86-7515	Perdões Minas Gerais	Levedura selecionada	Alambique de cobre
<b>F2</b>	SP 83-2847	Divinópolis Minas Gerais	Fermento caseiro (fubá)	Alambique de cobre
<b>F3</b>	IAC 86-2480	Pimenta Minas Gerias	Fermento caseiro (fubá)	Alambique de cobre
<b>F4</b>	SP 80-3280	Piracicaba São Paulo	Levedura selecionada	Coluna de aço inox
<b>F5</b>	CTC 11	Piracicaba São Paulo	Levedura selecionada	Coluna de aço inox

#### 3.2 Preparo do material e obtenção dos extratos brutos

As amostras de cana-de-açúcar foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 5% contendo 100 ppm (2 mL de hipoclorito de sódio/ L de água) (COELHO, 2014). As quais foram imersas na solução sanitizante, e após dez minutos, foram enxaguadas em água potável e corrente. Posteriormente, as amostras foram trituradas em um triturador Marconi®, modelo MA345/H e mantidas sob temperatura de congelamento.

O extrato bruto foi obtido pesando-se 70 g de cada amostra em uma balança analítica (Gehaka®, modelo BG 1000), que foram colocadas em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, utilizando, separadamente, 200 mL de três diferentes tipos de solventes: etanol, hexano e acetato de etila.

Os balões com as amostras foram colocados em mantas aquecedoras, controlando a temperatura, até que a mistura entrasse em ebulição, deixando-a em refluxo lento por 8 horas. Após o refluxo, as amostras foram filtradas em um funil de Büchner, descartando a torta e evaporando o solvente em um evaporador rotatório modelo Buchi® R-114, sob pressão reduzida, obtendo-se assim o extrato bruto.

### **3.3 Análise cromatográfica dos extratos**

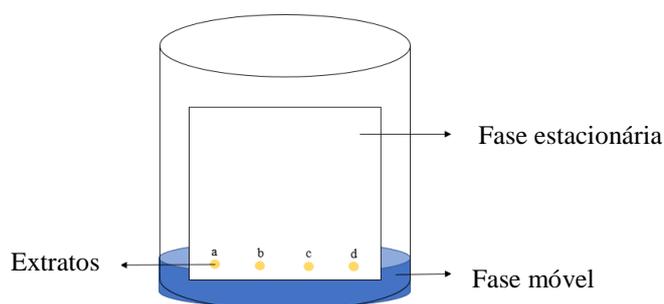
Inicialmente, para que fosse realizada a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos, foram testadas diferentes misturas para o glicosídeo cianogênico dhurrin, propostas pelos autores Nahrstedt et al. (1964) e Towers et al. (1964), a fim de analisar em qual fase móvel o extrato iria se comportar melhor. As misturas testadas foram: acetato de etila, álcool metílico e água (7:2:1); acetato de etila, álcool metílico e água (6:3:1); álcool metílico, acetato de etila e água (7:2:1); acetato de etila, álcool etílico, etanol e água (5:3:1:1); álcool metílico e acetato de etila (7:3); propano-2-ol e água (7:3); propano-2-ol e água (8:2). Todas essas misturas foram testadas com todos os extratos das diferentes variedades de cana e a corrida foi realizada em placas de sílica. As placas cromatográficas foram feitas utilizando uma mistura de Sílica Gel 60 G 245 (Merk®) e clorofórmio.

Analisou-se e escolheu-se uma única fase em que os extratos tiveram um melhor comportamento (álcool metílico e acetato de etila, 7:3). Em seguida, correu-se nas mesmas condições, para cada extrato de cada variedade de cana, 70 placas 10 cm x 10 cm com repetição. Após revelação em iodo, recolheram-se com o auxílio de uma espátula fina as manchas obtidas. Elas foram filtradas nos respectivos solventes e acondicionadas em recipientes de vidro sob proteção de luz e calor.

Nas mesmas condições que as anteriores (fase estacionária: Sílica Gel 60 G; fase móvel: álcool metílico e acetato de etila, 7:3), separaram as manchas filtradas por variedade de cana e essas foram submetidas aos testes cromatográficos finais, juntamente com a solução padrão do glicosídeo cianogênico dhurrin, de modo a se comparar os seus fatores de retenção ( $R_f$ ), como mostra a Figura 7.

Os extratos foram aplicados com auxílio de capilares para a deposição de microgotas nas placas cromatográficas. O desenvolvimento cromatográfico se procedeu de forma unidimensional ascendente. As placas foram reveladas em atmosfera de iodo, determinando posteriormente o  $R_f$

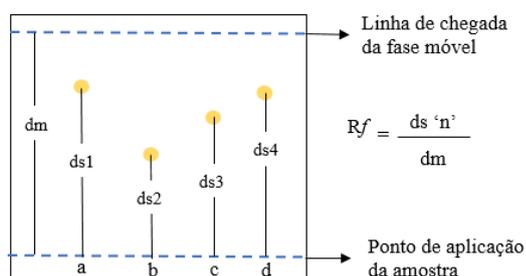
Figura 7 - Esquema da CCD feita para cada variedade de cana-de-açúcar, em que (a) é padrão do glicosídeo cianogênico dhurrin; (b) extrato em metanol; (c) é o extrato em acetato de etila e (d) é o extrato em hexano.



Fonte: COLLINS, 1977.

O fator de retenção foi medido manualmente com o auxílio de uma régua milimétrica e calculado conforme o cromatograma apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema de um cromatograma obtido por CCD, em que  $dm$  é a distância total percorrida pelo solvente e  $ds'n'$  é a distância percorrida pela mancha.



Fonte: COLLINS, 1977.

### **3.4 Análises físico-químicas de aguardentes**

As análises das amostras foram realizadas conforme as especificações estabelecidas pela Instrução Normativa nº 24, de 08/09/2005 do MAPA (BRASIL, 2005). Os parâmetros analisados foram o grau alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural, metanol, carbamato de etila, cobre e extrato seco. As metodologias empregadas para as análises estão especificadas a seguir.

#### **3.4.1 Determinação de grau alcoólico**

Foi determinado destilando-se 250 mL das amostras e, posteriormente, o grau alcoólico foi medido utilizando-se um densímetro eletrônico DensiMat Gibertini, a 20°C.

#### **3.4.2 Determinação de acidez volátil**

A acidez volátil das amostras foi determinada por meio da extração dos ácidos voláteis, empregando a técnica de arraste a vapor de água utilizando um destilador eletrônico Enochimico Gibertini. O extrato obtido foi titulado pelos métodos de titulação ordinários com hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> em presença de fenolftaleína 1%. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de ácido acético por 100 mL de álcool anidro.

#### **3.4.3 Determinação dos ésteres**

A determinação dos ésteres foi realizada por meio da titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas amostras. A quantificação dos ésteres foi feita com base em sua hidrólise alcalina, seguida da titulação dos ácidos liberados com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>. As quantidades encontradas foram expressas em miligramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro.

#### **3.4.4 Determinação de aldeídos**

A determinação da concentração de aldeídos foi realizada por meio de métodos iodométricos, titulando-se o SO<sub>2</sub> produzido durante a sequência de reações envolvidas nesse tipo de análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro.

### **3.4.5 Determinação de álcoois superiores**

Os álcoois superiores foram determinados pela adição de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e posterior acidificação das amostras com ácido sulfúrico concentrado. A quantidade total foi determinada por meio de medidas espectrofotométricas efetuadas a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. As quantidades desse composto foram determinadas mediante a construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1(v/v). A quantidade total desses compostos foi expressa em miligrama por 100 mL de álcool anidro.

### **3.4.6 Determinação de metanol**

O metanol foi determinado por meio de medidas espectrofotométricas, efetuadas a 575 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, após adição de permanganato de potássio 3% e posterior resfriamento das amostras. Sua determinação baseia-se na sua oxidação a formaldeído, o qual reage com o ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico concentrado, formando um composto colorido. As quantidades foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol.

### **3.4.7 Determinação de furfural e hidróximetilfurfural**

A quantificação do furfural e hidróximetilfurfural foi realizada pela adição de anilina e ácido acético glacial às amostras, efetuando medidas espectrofotométricas a 520 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. As quantidades desse composto foram obtidas pela construção de curvas analíticas de soluções padrão de etanol/furfural. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de furfural por 100 mL de álcool anidro.

### **3.4.8 Determinação de cobre**

A quantificação do cobre foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro (Shimadzu UV-1601 PC) a 546 nm, comparando a valores de absorvância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando sulfato de cobre como padrão primário. A análise de cobre ocorre após redução do  $\text{Cu}^{2+}$ , presente na bebida, a  $\text{Cu}^+$ , formando posteriormente um complexo colorido com a solução de 2,2-diquinolilo em álcool isoamílico.

### **3.4.9 Determinação de extrato seco**

O extrato seco foi determinado utilizando 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-maria 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.

### **3.4.10 Determinação de carbamato de etila**

Utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), descrita por Anjos et al. (2011a), que consiste na derivação prévia da amostra para a análise dessa substância. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3, interface modelo CBM-20A e injetor automático modelo SIL-10AF.

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método. Os reagentes empregados para análise foram: padrão de carbamato de etila, etanol absoluto, propanol, hexano, ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico, metanol, ácido acético glacial, acetato de sódio, acetonitrila grau HPLC (Merck), água ultrapura e 9-xantidrol.

## **3.5 Análises estatísticas**

Empregou-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em esquema de parcelas subdivididas no espaço. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade, usando o programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2003).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Análises físico-químicas das cachaças**

Na Tabela 2 estão representados os resultados obtidos para as avaliações físico-químicas das amostras de cachaças recolhidas e respectivas variedades de cana-de-açúcar com que elas foram feitas.

Tabela 2 - Análises físico-químicas das cachaças para as diferentes variedades de cana-de-açúcar utilizada\*.

<b>Análises</b>	<b>Variedade RB 86-7515</b>	<b>Variedade SP 83-2847</b>	<b>Variedade IAC 86-2480</b>	<b>Variedade SP 80-3280</b>	<b>Variedade CTC 11</b>	<b>Limites estabelecidos</b>
Grau alcoólico <sup>1</sup>	38,95 ± 0,290(a)	43,81 ± 0,141(b)	38,25 ± 0,233(a)	46,87 ± 0,099(c)	45,89 ± 0,064(d)	38,0 – 48,0 38,0 – 54,0 **
Acidez volátil <sup>2</sup>	48,57 ± 0,361(a)	33,14 ± 0,107(b)	34,19 ± 0,628(b)	12,39 ± 0,026(c)	30,06 ± 0,865(b)	150,0**
Ésteres <sup>2</sup>	33,95 ± 0,801(a)	20,14 ± 0,309(b)	26,72 ± 0,987(c)	19,08 ± 1,325(b)	23,20 ± 1,345(c)	200,0**
Aldeídos <sup>2</sup>	26,48 ± 2,254(a)	12,15 ± 0,326(b)	17,47 ± 1,362(c)	15,70 ± 0,308(c)	5,91 ± 0,008(d)	30,00**
Álcoois Superiores <sup>2</sup>	170,8 ± 0,655(a)	131,3 ± 0,382(b)	184,07 ± 1,032(c)	170,80 ± 1,096(a)	164,22 ± 0,240(a)	360,00**
Cobre <sup>3</sup>	0,38 ± 0,008(a)	4,84 ± 0,132(b)	1,80 ± 0,137(c)	0,36 ± 0,081(a)	0,35 ± 0,033(a)	5,00**
Metanol <sup>2</sup>	3,22 ± 0,008(a)	3,08 ± 0,008(b)	3,11 ± 0,008(b)	2,98 ± 0,008(c)	3,07 ± 0,008(b)	20,00**
Furfural <sup>2</sup>	0,27 ± 0,035(a)	1,52 ± 0,029(b)	3,31 ± 0,174(c)	0,22 ± 0,012(a)	0,17 ± 0,007(a)	5,00**
Extrato Seco <sup>4</sup>	0,084 ± 0,010(a)	0,080 ± 0,007(a)	0,248 ± 0,001(b)	0,064 ± 0,004(a)	0,128 ± 0,001(b)	60,00**
Carbamato de Etila <sup>3</sup>	4,47 ± 0,177(a)	32,45 ± 1,117(c)	2,32 ± 0,096 (a)	49,98 ± 2,143(c)	9,26 ± 1,217(b)	210,00***

\*Média ± desvio-padrão; Médias seguidas de mesma letra nas linhas são consideradas iguais pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ); <sup>1</sup> % v/v; <sup>2</sup> mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro; <sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>; <sup>4</sup> g L<sup>-1</sup>; ND = não detectado; \*\* Brasil, 2005; \*\*\*Brasil, 2014.

De acordo com as características organolépticas, todas as amostras de cachaças analisadas estavam límpidas e cristalinas, próprias para condução das análises, sem nenhum tipo de impureza sólida ou turbidez.

Os valores obtidos para o **grau alcoólico** (Tabela 2) mostraram que todas as amostras apresentaram valores dentro dos padrões exigidos para se denominar cachaça. O grau alcoólico é considerado como um dos parâmetros de grande importância, pois é por meio dele que se caracteriza o produto, denominando-o cachaça ou aguardente de cana-de-açúcar. Apesar de apresentarem diferenças significativas, observa-se que todas as amostras apresentaram grau alcoólico variando de 38,25 a 46,87% (v/v).

Segundo Miranda et al. (2007), possíveis imprecisões nos equipamentos utilizados pelos produtores na determinação do teor alcoólico e possíveis erros na execução da destilação ou na diluição afetam diretamente o teor alcoólico presente na bebida.

Outro fator também a ser considerado é o tipo de destilação em que a bebida foi destilada. Na destilação feita em alambiques de cobre, geralmente o produtor separa as frações manualmente, podendo ocorrer mais variações e erros na padronização do teor alcoólico. Já na destilação feita em colunas de aço inox, que é um processo industrial mecanizado, em que não se tem separações das frações, geralmente têm-se teores alcoólicos maiores e uma padronização maior do grau alcoólico final da bebida (SAKAI, 2013). Pelos resultados apresentados, pode-se observar que as amostras F1, F2 e F3, destiladas em alambiques de cobre, apresentaram menores valores para o grau alcoólico, abaixo de 45 °GL, enquanto as amostras F4 e F5, destiladas em colunas de aço inox, apresentaram teores acima de 45 °GL, resultados característicos da produção, uma vez que não há separação das frações.

Os resultados obtidos para as análises de **acidez volátil** (Tabela 2) mantiveram-se todos dentro dos padrões exigidos pelo MAPA, que é de 150 mg/100 mL de álcool anidro. Os valores da acidez em cachaças e aguardentes podem variar muito, uma vez que vários fatores podem interferir nessa característica. Uma elevada acidez na cachaça pode ser atribuída à contaminação da cana-de-açúcar ou do mosto por bactérias acéticas, fazendo com que parte do substrato sofra fermentação acética, aumentando assim a acidez e diminuindo o rendimento do etanol. Uma má condução da destilação também pode elevar o nível de acidez da cachaça, tendo como reflexo um produto final de baixa qualidade. O ideal é que não se armazene a cana por mais de 24 horas após a colheita, a fim de evitar essa contaminação (CARDOSO, 2013).

Outro fator descrito por autores são os tipos de fermentos utilizados durante a fermentação da bebida. Silva et al. (2009), estudando compostos em cachaças produzidas por

diferentes tipos de leveduras, em que o tipo de fermentação era espontânea, demonstraram a variância da acidez para diferentes linhagens de levedura. No presente estudo não houve variação significativa da acidez relacionada com o tipo do fermento utilizado. Todas as amostras apresentaram valores relativamente baixos.

Miranda et al. (2007) avaliaram 94 amostras de cachaça de todo o Brasil e encontraram níveis de acidez variando de 6,06 a 247,88 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. Masson et al. (2012) encontraram uma média de 79,12 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro para acidez volátil, nas 71 amostras do interior de Minas Gerais que foram estudadas. No presente estudo, observou-se uma média geral de 31,65 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro para acidez volátil, resultados que mostram variação da acidez para as cachaças produzidas em todo o Brasil.

De acordo com a legislação brasileira, os teores de acidez volátil são mantidos elevados visando resguardar a cachaça envelhecida, uma vez que sua acidez pode aumentar com o tempo de envelhecimento em função da oxidação de etanol com formação de ácido acético e acetaldeído (LITCHEV, 1989). Desse modo, uma cachaça de baixa acidez inicial pode revelar seu grau de maturação. Esse fato condiz com os resultados apresentados uma vez que as cachaças eram recém-destiladas e não passaram por processos de envelhecimento.

Os **ésteres** são formados durante a fermentação pelas leveduras e também pela esterificação de ácidos graxos com etanol, sendo o acetato de etila o componente majoritário desse grupo, correspondendo a aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça. Podem ser formados também durante o processo de destilação e no envelhecimento, devido às reações com componentes da madeira (PEREIRA et al. 2003). O limite máximo para os ésteres estabelecido pelo MAPA é de 200 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. Todas as amostras analisadas apresentaram teores dentro do limite permitido, variando de 19,08 a 33,93 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro (Tabela 2).

Fernandes (2013), analisando cachaças produzidas por 5 diferentes cultivares de cana, encontrou valores muito baixos para o acetato de etila, que variaram de 4,27 a 8,56 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. O autor atribuiu essas pequenas concentrações ao fato de todas as suas cachaças avaliadas serem recém-destiladas.

As concentrações de **aldeídos** encontradas nas amostras estudadas estão de acordo com a legislação vigente, que é de 30 mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro (BRASIL, 2005). Observou-se uma variação entre 5,91 à 26, 48 mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro (Tabela 2), sendo esse último valor considerado alto em relação às outras e muito próximo ao valor máximo exigido pelo MAPA.

Assim como a maioria dos compostos presentes nas cachaças do país, os valores de aldeídos podem variar muito. Cardoso et al. (2012), analisando 54 amostras de cachaças de Minas Gerais, observaram que a concentração de aldeídos variou de 5,52 a 33,93 mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro. Anteriormente, Miranda et al. (2007), estudando 94 amostras de cachaça, encontraram valores variando de 2,77 a 84,27 mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro.

Formados principalmente no processo de fermentação, o principal aldeído relacionado com a fermentação alcoólica é o acetaldeído. Outra forma de obtenção desses compostos é por meio da oxidação de álcoois superiores. De acordo com Cardoso (2013), valores elevados de aldeídos observados em cachaças destiladas em alambiques de cobre podem estar associados a erros no processo do corte entre as frações de cabeça e coração. Esses erros ocorrem quando o produtor não calcula previamente a graduação alcoólica da bebida desejada e/ou não calcula o volume de mosto fermentado correspondente e/ou não acompanha a mudança do grau alcoólico do destilado que está saindo do alambique. Porém, quantidades razoáveis desses compostos são desejáveis, uma vez que, juntamente com os álcoois superiores, ésteres e ácidos são responsáveis pela formação do seu sabor e aroma, compondo assim o chamado “*flavour* ou *buquê*” da bebida.

Pelos dados descritos na Tabela 2, observa-se que os valores dos **álcoois superiores totais** encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pelo MAPA (360 mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro) para todas as amostras. Os álcoois superiores são produtos metabólicos decorrentes de crescimento de leveduras. Sua formação depende das condições do meio de fermentação, da quantidade e viabilidade do inóculo, da temperatura, do teor alcoólico final do vinho, entre outros fatores. Dependendo do equipamento e do processo de destilação, o teor no produto final pode variar bastante, tendendo a acumular até oito vezes o teor no vinho. (LEAUTÉ, 1990).

Segundo Cardoso (2013), os principais álcoois superiores encontrados nas cachaças são: o álcool isoamílico (3-metilbutan-1-ol), amílico (pentan-1-ol), isobutílico (2-metilpropan-1-ol) e propílico (propano-1-ol). A Instrução Normativa de n. 13, de junho de 2005, incluiu na lista dos Padrões de Identidade e Qualidade de Aguardente de Cana e de Cachaça duas substâncias que fazem parte dos álcoois superiores, álcool butílico (butan-1-ol) e álcool sec-butílico (butan-2-ol), que devem ser quantificadas separadamente e ainda estabeleceu limites permitidos para elas (BRASIL, 2005).

A Tabela 3 representa os valores para essas substâncias separadamente.

Tabela 3 - Concentrações de Álcool butílico (butan-1-ol) e Álcool sec-butílico (butan-2-ol) encontradas nas amostras.

<b>Amostra/ Concentração</b>	<b>Butan-1-ol</b>	<b>Butan-2-ol</b>
F1	1,39 ± 0,014	3,84 ± 0,276
F2	<b>3,53 ± 0,035</b>	1,54 ± 0,007
F3	1,11 ± 0,131	1,7 ± 0,014
F4	0,89 ± 0,092	<b>10,45 ± 0,008</b>
F5	0,87 ± 0,085	<b>12,44 ± 0,014</b>

\*Média (mg/100 mL de álcool anidro) ± desvio-padrão; \*\*Limites máximos: Álcool sec-butílico (butan-2-ol) 10 mg/100 mL de álcool anidro e Álcool butílico (butan-1-ol) 3,0 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005).

Pelos dados descritos na Tabela 3, observou-se que a amostra F2 apresentou limite superior ao exigido pela legislação para o álcool butílico e as amostras F4 e F5, para o álcool sec-butílico.

Penteado e Masini (2009) analisaram 33 amostras de aguardentes produzidas em alambique de cobre e coluna de aço inox coletadas em quatro Estados do Brasil. Observaram uma grande variação na concentração dos álcoois superiores. Entre as amostras pertencentes ao grupo de aguardentes destiladas em coluna de aço inox, encontraram concentrações de álcool sec-butílico acima da legislação. Já para cachaças destiladas em alambique de cobre, as concentrações desse contaminante estiveram dentro da faixa de valores permitidos pela legislação. Esses resultados são compatíveis com aqueles reportados neste estudo, em que as cachaças destiladas em colunas de aço inox apresentaram valores de álcool sec-butílico acima do permitido pela legislação.

De acordo com Cardoso (2013), a formação dos álcoois superiores em excesso pode ser evitada tomando algumas medidas, 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.

Quando analisado o teor de **cobre** nas amostras, observa-se que nenhuma das amostras apresentou valores superiores ao exigido pela legislação, que é de 5 mg L<sup>-1</sup>. Porém, desperta-se atenção para a amostra F2, uma vez que apresentou valor alto se comparado às outras e bem próximo ao máximo permitido.

A presença desse metal na cachaça se deve principalmente à dissolução do carbonato básico de cobre (azinhavre;  $\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) presente nas paredes internas do alambique, que é arrastado pelos vapores alcoólicos ácidos durante a destilação. Uma maneira de se evitar o excesso desse metal na cachaça é fazer a higienização adequada para remoção do azinhavre, bem como encher o alambique e as serpentinas com água para reduzir a oxidação do cobre (CARDOSO, 2013). O uso de filtros de resinas de troca iônica é uma boa alternativa para remover o cobre da bebida contaminada, sem, contudo, remover componentes secundários responsáveis pela qualidade sensorial do aperitivo (DUARTE et al. 2014).

Anjos (2001) analisou a presença desse elemento em aguardentes produzidas com cultivares de cana-de-açúcar de ciclo precoce, médio e tardio em três épocas de colheita, e não constatou diferença significativa para os valores médios de cobre nas amostras, dentro de cada época. Miranda et al. (2007) encontraram valores de cobre variando de 0 a  $12,25 \mu\text{g L}^{-1}$  para 94 amostras diferentes produzidas em todo Brasil.

O **metanol** é indesejável na cachaça, devido às suas características de toxicidade, mesmo em baixas concentrações. A origem desse composto está associada à presença de bagacilhos no processo fermentativo, uma vez que ocorrerá a degradação da pectina presente na cana-de-açúcar (CARDOSO, 2013).

De acordo com a legislação vigente, o limite máximo para esse composto é de 20 mg/100 mL de álcool anidro. De acordo com a Tabela 2, todas as amostras analisadas apresentaram teores de metanol bem abaixo do exigido pela MAPA.

Os resultados aqui encontrados corroboram com aqueles encontrados por Zacaroni et al. (2011) e Miranda et al. (2007), que caracterizaram e quantificaram diferentes contaminantes em aguardentes de cana, não sendo detectada a presença de metanol em valores superiores ao exigido pela legislação.

Vilela et al. (2007) mostraram que o baixo teor de metanol observado em cachaças está relacionado com o cuidado no armazenamento da bebida em recipientes apropriados e a adoção de boas práticas de fabricação pelos produtores, como limpeza adequada dos destiladores, peneiramento do caldo para eliminar o bagacilho e correta separação da fração de cabeça, que contém a maior parte desse composto.

Pelos dados da Tabela 2, pode-se observar que todas as amostras se encontram dentro do padrão exigido pela legislação para o furfural, variando entre 0,17 a  $3,31 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  de álcool anidro. O **furfural** é um contaminante tóxico ao organismo humano e não deve estar presente em cachaças. É formado principalmente durante o processo fermentativo da

aguardente e também durante a destilação, principalmente quando ela é realizada em alambiques a fogo direto. Sua concentração pode aumentar quando a cachaça passa pela etapa de envelhecimento, devido à degradação de pentoses e hemicelulose da madeira do tonel (PEREIRA et al. 2003; CARDOSO, 2013).

Masson et al. (2007), ao estudarem a presença de furfural em aguardentes de cana, produzidas com e sem queima prévia do palhiço da cana-de-açúcar, verificaram que a queima influenciou significativamente a concentração do furfural. Os autores concluíram que o açúcar exsudado durante a queima do palhiço torna-se um excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. Os pesquisadores relatam que quando a cana é processada, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas e, posteriormente, para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural, chegando ao produto final e aumentando as chances de contaminação do destilado. Por essa razão, a queima do canavial é prejudicial para a qualidade final do produto, devendo ser evitada sempre que possível.

Miranda et al. (2007), analisando várias amostras de cachaças, encontraram valores médios variando de 0 a 1,28 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro. Posteriormente, Cardoso et al. (2012), pesquisando 54 amostras de Minas Gerais, observaram valores de furfural variando de 0,09 a 21,01 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro, mostrando que ainda existem produtores que não se atentam para práticas que evitam o excesso de furfural.

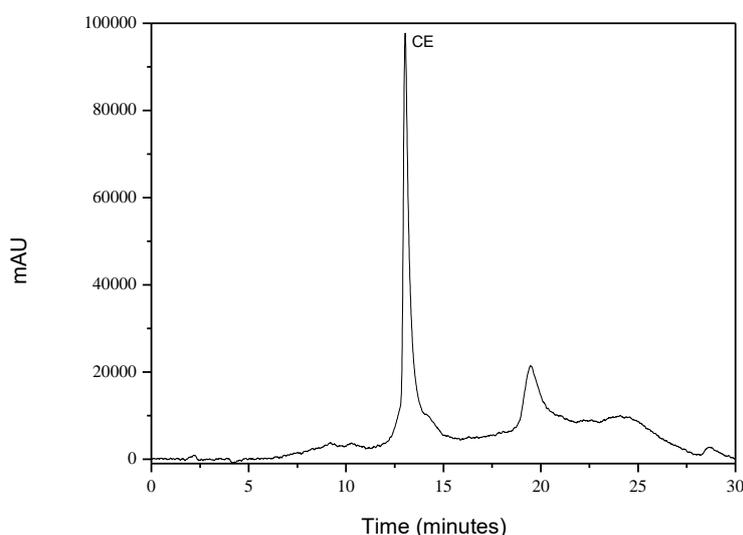
O **extrato seco** é constituído pelos sólidos diluídos na cachaça, que podem ser açúcares, compostos celulósicos extraídos da madeira nos quais a bebida ficou armazenada e foram incorporados a ela, ou mesmo impurezas. Análises como a de extrato seco são úteis para avaliar teores de sólidos solúveis e também como indicativo de eventual necessidade de determinação de açúcares redutores totais.

Quando a aguardente apresenta teor de sólidos solúveis acima de 6 g L<sup>-1</sup> e até 30 g L<sup>-1</sup>, deve ser acrescida da denominação “adoçada” no rótulo (BRASIL, 2005). Todas as amostras avaliadas possuíram quantidades de extrato seco inferiores a 6 g L<sup>-1</sup> (Tabela 2), e em uma quantidade mínima, o que era esperado, uma vez que as amostras não passaram por nenhuma etapa de envelhecimento ou foi acrescida de açúcares ou qualquer outro ingrediente.

O **carbamato de etila** é um composto considerado potencialmente carcinogênico. Em 1985, o Canadá foi o primeiro país que estabeleceu uma legislação específica sobre o assunto, com um limite máximo de 150 µ g L<sup>-1</sup> para bebidas destiladas, e tornou-se um referencial para os Estados Unidos e para a Comunidade Europeia. A obrigatoriedade da detecção e controle do

carbamato de etila nas cachaças e aguardentes torna-se de grande importância, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, sua presença em concentrações elevadas constitui uma barreira nas exportações para Europa e América do Norte (ANDRADE-SOBRINHO, 2002). A Figura 9 representa o cromatograma obtido do padrão de carbamato de etila após a injeção de 20 µL com detecção de fluorescência.

Figura 9 - Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: 100,0 µg L<sup>-1</sup>.



De acordo com a Figura 9, o tempo de retenção médio obtido para o CE foi de 13,026 ± 0,193 minutos, valor próximo àquele encontrado por Anjos et al. (2011b), Zacaroni et al. (2011), Machado et al. (2013); Santiago et al. (2014) e Zacaroni et al. (2015). A quantificação do CE nas amostras de cachaça foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ( $y = 11914,69x - 47197,63$ ), sendo o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido de 0,99996. Portanto, esse valor demonstra a forte correlação linear entre a concentração de CE e a área do pico obtida, e que, de acordo com a literatura, valores acima de 0,99 são aceitáveis (SNYDER et al. 1997; HARRIS, 2008).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas:  $LD = 3DP/m$  e  $LQ = 10DP/m$  (em que DP = estimativa do desvio-padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração). Para esses limites, foram encontrados os valores de 1,86 (LD) e 6,23 (LQ) µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Sendo esses valores

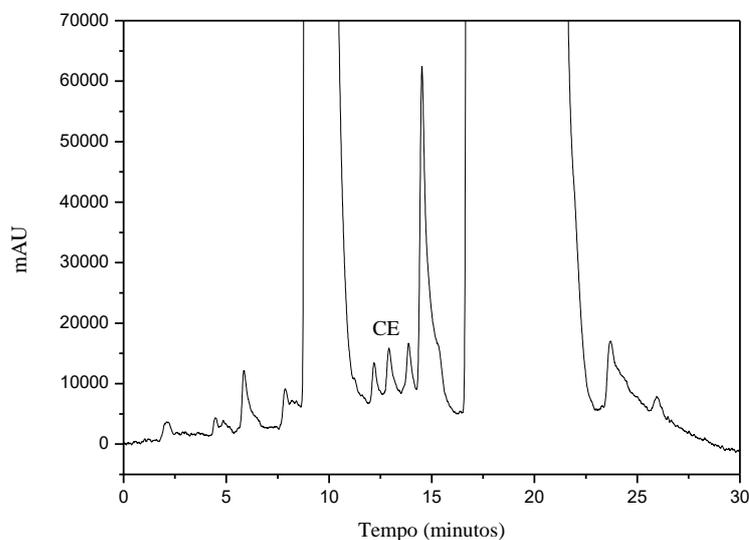
de LD e LQ inferiores aos encontrados por Anjos et al. (2011b) ( $3,93 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $13,09 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Machado et al. (2013) ( $6,39 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $21,32 \mu\text{g L}^{-1}$ ); Santiago et al. (2014) ( $3,24 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $10,83 \mu\text{g L}^{-1}$ ); Zacaroni et al. (2015) ( $3,81 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $11,53 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Outro parâmetro avaliado foi a exatidão, que foi feita por ensaios de recuperação. A recuperação é a mais utilizada entre os processos de avaliar a exatidão, sendo definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material-teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al. 2004; HARRIS, 2008). A concentração do CE foi calculada pelo aumento das áreas dos picos, obtida após a adição de uma quantidade conhecida dos padrões (3 níveis de concentração) às 3 amostras escolhidas aleatoriamente. Os valores de recuperação encontrados neste estudo foram de 91% a 102%, sendo aceitáveis para esse tipo de análise (RIBANI et al. 2004).

As concentrações de carbamato de etila encontradas em todas as amostras de cachaças selecionadas estão dentro do limite estabelecido pela legislação vigente no país, isto é, abaixo de  $210 \mu\text{g L}^{-1}$ , com valores variando de  $2,32$  a  $49,98 \mu\text{g L}^{-1}$ , tendo como média geral  $19,7 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Duas amostras se destacaram das demais, apresentando valores mais altos: a amostra F2, com  $32,45 \mu\text{g L}^{-1}$  e a amostra F4, com  $49,98 \mu\text{g L}^{-1}$ . Ambas as amostras não apresentam características similares quanto ao processo produtivo, pois foram feitas com variedade de cana-de-açúcar, processo fermentativo e tipo de destilação diferentes. A Figura 10 representa o cromatograma obtido para a amostra F4.

Figura 10 - Cromatograma do teor de carbamato de etila (CE) encontrado na amostra F4, com detecção de fluorescência.



Zacaroni et al. (2011) analisaram alguns contaminantes em amostras de cachaças e observaram que todas as amostras continham concentrações da CE abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira. A maior concentração encontrada foi  $119 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Machado et al. (2013) analisaram o CE em cachaças de alambique de cobre obtidas de cana-de-açúcar cultivada com concentrações diferentes de ureia e nitrato de amônio. Os autores observaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos, uma vez que todas as amostras apresentaram concentrações de CE abaixo do limite estabelecido por lei, com uma média de  $29,01 \mu\text{g L}^{-1}$ . Apesar de ter analisado apenas uma variedade de cana, o SP791011, os resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, no qual não foram encontradas concentrações de CE acima do limite estabelecido pela legislação.

d'Ávila et al. (2016) avaliaram o teor de carbamato de etila em cachaças produzidas com 13 diferentes variedades de canas-de-açúcar e sistemas de produção. Os autores observaram uma média de  $24,35 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que todas as amostras estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação.

Santiago et al. (2014) avaliaram valores para carbamato de etila em diferentes etapas do processo de produção de cachaça: no caldo de cana, no mosto fermentado e nas frações do destilado. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, as canas utilizadas para produção da cachaça, assim como o processo de obtenção do caldo, não interferiram para a formação de

carbamato de etila, pois não se detectou valores de CE para o caldo de cana e valores abaixo do limite de quantificação no mosto fermentado e nas frações do destilado.

Mendonça et al. (2016) analisaram a concentração de carbamato de etila presente em cachaças fermentadas com leveduras selecionadas e com fermento espontâneo. Como resultado, os autores constataram uma diferença significativa quanto ao teor de CE e o fermento utilizado. Cachaças contendo arroz branco como fonte de nutriente do fermento apresentaram valores de CE maiores antes e depois do armazenamento se comparados a produção com levedura selecionada. Os autores atribuíram esse fato à decorrência de o arroz conter compostos nitrogenados.

Baffa-Júnior et al. (2011) quantificaram a formação do CE no processo de fermentação do caldo de cana (mosto fermentado), nas frações do destilado e na vinhaça. Os resultados médios encontrados pelos autores foram de 122 mg L<sup>-1</sup> no mosto fermentado; 59,7 mg L<sup>-1</sup> na fração cabeça; 52 µg L<sup>-1</sup> na fração coração; 1,57 mg L<sup>-1</sup> na fração cauda e 53,1 mg L<sup>-1</sup> na vinhaça. Os resultados encontrados por esses autores indicaram que o CE foi formado principalmente durante a fermentação e sua concentração é aumentada durante a destilação.

Esses resultados podem auxiliar no entendimento dos dados encontrados neste trabalho, uma vez que as amostras que apresentaram maiores níveis de valores de CE foram a F2 e a F4. A amostra F2 foi produzida por fermentação espontânea e destilada em alambique de cobre, apresentando um valor elevado de grau alcóolico (43,81 °GL), se comparado com as demais cachaças destiladas em alambique de cobre. Esses fatos apontam como possibilidade uma má separação das frações cabeça e coração, fazendo com que aumentasse o teor de CE e o grau alcóolico. Já a amostra F4 foi produzida com leveduras selecionadas e destilada em coluna de aço inox; seu teor alcóolico (49,87 °GL) foi o mais alto, se comparado a todas as amostras. Pode-se então atribuir esses valores ao fato de que na destilação em colunas de aço inox, não se tem a separação das frações, e conseqüentemente a não separação da primeira fração dos voláteis onde, na maioria das vezes, apresenta maior quantidade de CE. De acordo com Aresta et al. (2001), entre os vários fatores de produção que afetam o nível de carbamato de etila, o processo de destilação tem notável importância. Entretanto, a amostra F5, produzida nas mesmas condições que a F4, porém com diferente variedade de cana, apresentou um valor relativamente baixo para CE (9,26 µg L<sup>-1</sup>).

Masson et al. (2012) estudaram 63 amostras de cachaça produzidas em pequenos e médios alambiques de cobre nas regiões norte e sul de Minas Gerais. Os valores encontrados para a concentração de CE foram de 22,6 a 980 µg L<sup>-1</sup>. Neste estudo, o autor informou que o

conteúdo da CE encontrado nas amostras não estava correlacionado com o teor de álcool, acidez ou concentração de cobre nas amostras.

Para alguns autores, o cobre proveniente do alambique pode contribuir para a formação do CE, já que há a possibilidade de esse metal atuar como catalisador nas reações de formação desse contaminante (ARESTA et al. 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al. 2002; BAFFA-JÚNIOR et al. 2011). Baffa-Júnior et al. (2011) mostraram correlações existentes entre a concentração desse contaminante e parâmetros envolvidos durante o processo de destilação. Esses dados corroboram com parte dos dados obtidos neste estudo, uma vez que a amostra F2 também apresentou teor de cobre ( $4,64 \mu\text{g L}^{-1}$ ) muito elevado, quando comparado às outras amostras. Zacaroni et al. (2011) e Masson et al. (2014) demonstraram que não há correlação entre as concentrações de cobre e CE em cachaça; entretanto, as condições de processamento foram diferentes às repostadas neste estudo.

As amostras estudadas não passaram pela etapa de armazenamento; porém, sabe-se também que, dependendo das condições de armazenamento da bebida, o teor de CE pode aumentar. Anjos et al. (2011a) avaliaram a concentração de CE durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. Os autores observaram uma diferença significativa na concentração de CE para ambos os procedimentos, percebendo um aumento mais expressivo na concentração desse composto para a cachaça armazenada em recipiente de vidro. Santiago et al. (2014) avaliaram CE em cachaças armazenadas em tonéis de amburana e carvalho por um período de 12 meses. Os autores constataram que a concentração de CE se manteve estabilizada e menor que o limite máximo permitido pela legislação desde o primeiro mês de envelhecimento. Zacaroni et al. (2015) estudaram a influência da luz natural na concentração de CE em cachaças envelhecidas em barris de madeira e armazenadas em garrafas de vidro por um período de 6 meses. Todas as amostras apresentaram uma concentração CE abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira. A maior concentração encontrada foi de  $79,70 \mu\text{g L}^{-1}$  e 70% das amostras exibiram uma influência da presença ou ausência de luz na análise desse composto. Com isso, inferiram que a luz pode influenciar na formação desse composto.

Para Anjos et al. (2011a), a formação do carbamato de etila na produção de cachaça pode ocorrer antes, durante e depois do processo de destilação, incluindo o armazenamento da bebida, podendo haver um aumento potencial tanto na bebida que foi armazenada em tonéis de madeira, quanto da armazenada em recipientes de vidros. Para Nagato et al. (2003), a formação

do CE em etapas posteriores à destilação é dependente do pH da bebida, da incidência de luz e tempo de armazenamento.

## 4.2 Extratos e Cromatografia

A Tabela 4 apresenta os  $R_f$  calculados para as primeiras corridas cromatográficas.

Tabela 4 - Valores médios de  $R_f$  encontrados para cada mancha e seu respectivo extrato.

<b>Variedade da cana-de-açúcar</b>	<b>Extrato em álcool metílico</b>	<b>Extrato em acetato de etila</b>	<b>Extrato em hexano (mancha 1)</b>	<b>Extrato em hexano (mancha 2)</b>
<b>F1</b>	0,7	0,8	0,78	0,45
<b>F2</b>	0,58	0,85	0,75	0,42
<b>F3</b>	0,61	0,78	0,74	0,48
<b>F4</b>	0,66	0,8	0,79	0,51
<b>F5</b>	0,6	0,78	0,75	0,46

Na corrida cromatográfica para a purificação das manchas, apenas o extrato em hexano apresentou duas manchas para todas as variedades de cana. Os demais extratos apresentaram apenas uma mancha para todas as variedades.

Entre as misturas utilizadas propostas por Nahrstedt et al. (1964) e Towers et al. (1964), utilizadas, a que apresentou melhor separação e manchas em maiores detalhes, foi a mistura de álcool metílico e acetato de etila, na proporção 7:3 respectivamente. Para Prates et al. (1996), a presença de dhurrin foi observada nas frações coletadas durante a eluição com a mistura álcool metílico e clorofórmio 10%. As Figuras 11, 12, 13, 14 e 15 apresentam as placas cromatográficas após a revelação em vapores de iodo.

Figura 11 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar **RB 86-7515 (F1)**, após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2.

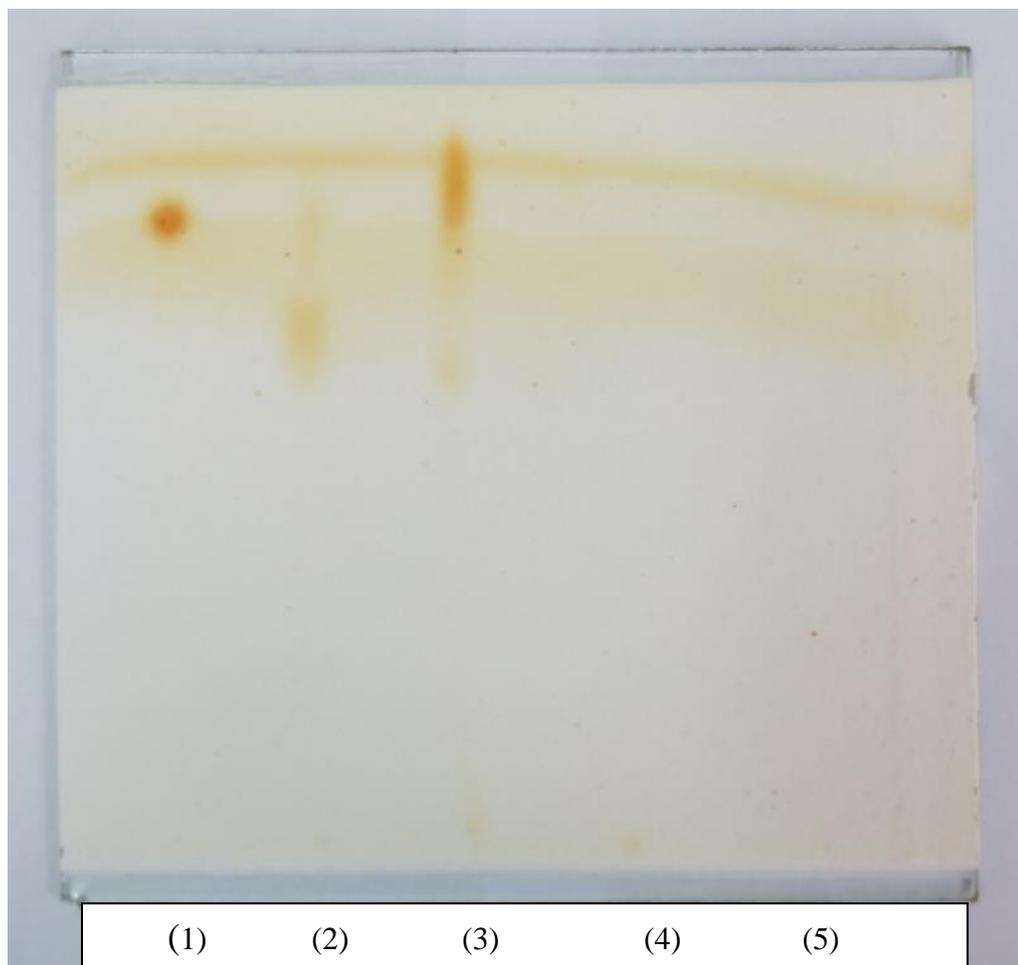


Figura 12 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar **SP 83-2847 (F2)**, após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2.

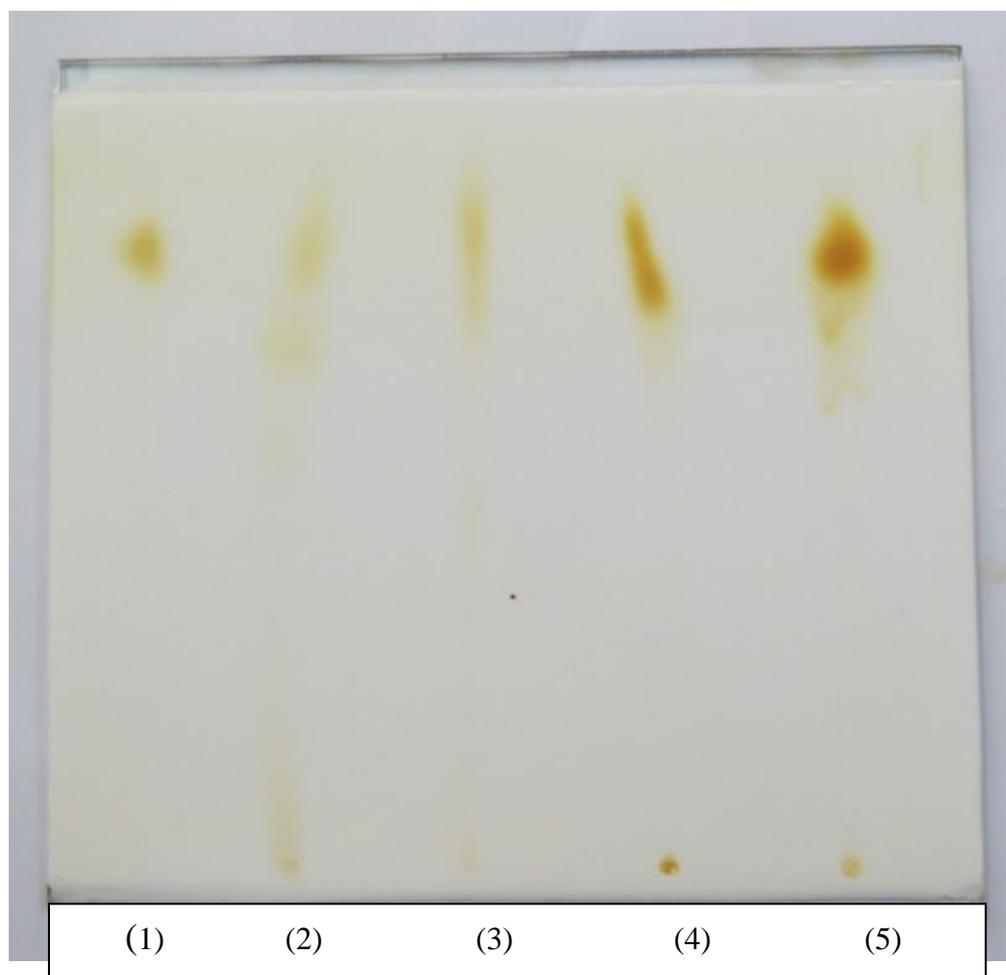


Figura 13 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar **IAC 86-2480 (F3)**, após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2.



Figura 14 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar **SP 80-3280 (F4)**, após revelação em atmosfera de iodo , em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2.

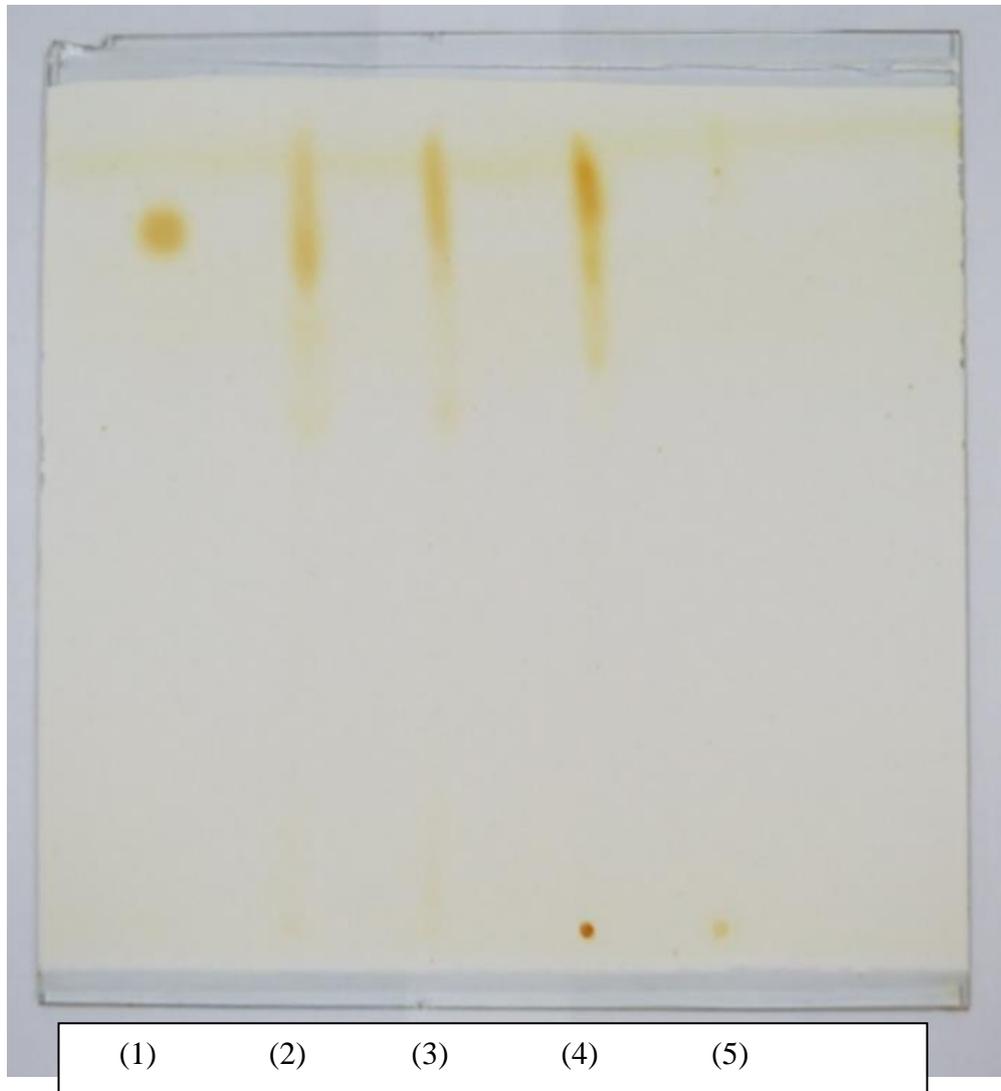
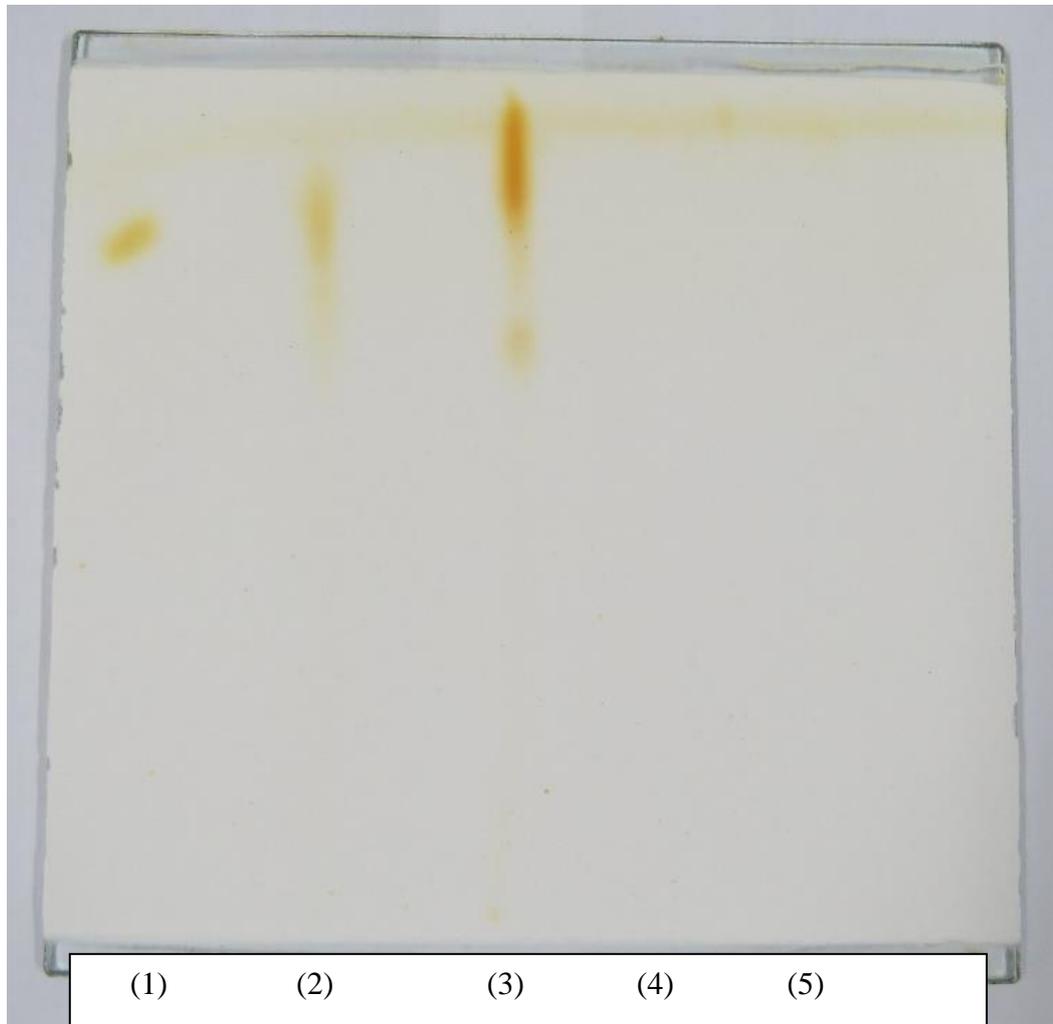


Figura 15 - Cromatografia em camada delgada do padrão de dhurrin e dos extratos obtidos da variedade de cana-de-açúcar **CTC 11 (F5)**, após revelação em atmosfera de iodo, em que (1) é a mancha do padrão dhurrin, (2) extrato em álcool metílico, (3) extrato em acetato de etila, (4) extrato em hexano - mancha 1 e (5) extrato em hexano - mancha 2.



A Tabela 5 apresenta os valores dos  $R_f$  para todas as manchas observadas na segunda corrida cromatográfica, juntamente com o padrão de dhurrin.

Tabela 5 - Valores médios de  $R_f$  encontrados para cada mancha e seu respectivo extrato.

Variedade da cana-de-açúcar	Padrão de dhurrin	Extrato em álcool metílico	Extrato em acetato de etila	Extrato em hexano (mancha 1)	Extrato em hexano (mancha 2)
F1	0,80	0,65	0,63 e 0,86	MD	MD
F2	<b>0,80</b>	0,68 e 0,81	0,82	0,82	<b>0,80</b>
F3	0,81	0,69 e 0,85	0,89	MD	MD
F4	0,82	0,81	0,85	0,89	MD
F5	0,82	0,83	0,70 e 0,93	MD	MD

Onde MD = mancha dispersa

Pelos valores descritos na Tabela 5, pode-se observar que as variedades de cana RB 86-7515 (F1) e IAC 86-2480 (F3) foram as amostras que apresentaram valores de  $R_f$ 's mais divergentes ao valor encontrado para o padrão de dhurrin. Já as demais amostras apresentaram valores de  $R_f$  similares ou iguais ao  $R_f$  do padrão para alguns extratos.

A variedade de cana SP 80-3280 (F4) apresentou valor de  $R_f$  similar ao do padrão para o extrato em álcool metílico. Também para o mesmo tipo de extrato, a variedade CTC 11 (F5) apresentou  $R_f$  similar ao do padrão. Prates et al. (1996) identificaram moléculas de dhurrin isoladas no sorgo no extrato em álcool metílico, dados que corroboram com aqueles encontrados neste trabalho. Os autores, entretanto, não pesquisaram outros tipos de extrato para a mesma amostra.

Já a variedade de cana SP 83-2847 (F2) apresentou  $R_f$  igual ao do padrão para o extrato de hexano (mancha 2). Observando a estrutura química do dhurrin, infere-se que, na extração com álcool metílico, provavelmente o composto estaria com os grupos hidroxilas livres, e quando ocorreu a extração em hexano, este poderia estar ligado a outros grupos apolares. Sabe-se que a afinidade de cada solvente com as substâncias extraídas é baseada na estrutura química do composto e na sua polaridade.

A Tabela 6 apresenta a relação das similaridades das manchas e os valores encontrados para análise de carbamato de etila

Tabela 6 - Similaridade entre os R<sub>f</sub>'s encontrados e a concentração de CE.

Variedade da cana-de-açúcar	Padrão de dhurrin	R <sub>f</sub> e extrato	Concentração de CE (μg L <sup>-1</sup> )
F1	0,80	<i>Não houve similaridade</i>	4,47
F2	<b>0,80</b>	0,81 - álcool metílico <b>0,80</b> - hexano (mancha 2)	32,45
F3	0,81	<i>Não houve similaridade</i>	2,32
F4	0,82	0,81 - álcool metílico	49,98
F5	0,82	0,83 – álcool metílico	9,26

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, pode-se observar que as variedades F2 e F4, que apresentaram maiores concentrações de CE pela análise no HPLC, apresentaram valores de R<sub>f</sub>'s iguais ou similares ao valor de R<sub>f</sub> encontrado para o padrão. Entretanto, essas duas variedades não apresentam similaridade quanto ao processo produtivo, enquanto a variedade F2 foi fermentada com fermento selvagem e destilada em alambique de cobre, a variedade F4 foi fermentada com levedura selecionada e destilada em coluna de aço inox. Diante desses dados, infere-se que as etapas de fermentação com diferentes tipos de fermento (selvagem e selecionado) e os diferentes tipos de destilação (alambique cobre e coluna de aço inox) não interferiram na concentração final do CE.

Entretanto, a amostra F5 também apresentou valores de R<sub>f</sub>'s similares; porém, a concentração de carbamato de etila foi baixa, se comparada com as demais, evidenciando mais uma vez que o processo produtivo não influenciou a concentração final do CE uma vez que as duas variedades apresentam o mesmo processo produtivo. Com esses dados, verifica-se que a variedade da cana-de-açúcar é um fator primordial na contribuição para a formação do CE.

## 5 CONCLUSÃO

Todos os parâmetros físico-químicos das cachaças analisadas apresentaram-se dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, constatando-se que elas estão adequadas para o consumo. Os extratos das cinco variedades de cana-de-açúcar apresentaram bom comportamento para o método de extração utilizado, com cor, odor e textura característica. Na Cromatografia em Camada Delgada, a fase móvel que mais se adaptou aos extratos foi a mistura de álcool metílico e acetato de etila na proporção 7:3, respectivamente. A variedade de cana-de-açúcar SP 83-2847 (F2) apresentou  $R_f$  igual ao do padrão dhurrin para o extrato hexânico. As variedades SP 80-3280 (F4) e CTC 11 (F5) apresentaram valores de  $R_f$  similares ao do padrão para o extrato metanólico. E as demais, RB 86-7515 (F1) e IAC 86-2480 (F3), foram as amostras que apresentaram valores de  $R_f$ 's divergentes do valor encontrado para o padrão de dhurrin. O fator relevante para as concentrações finais de carbamato de etila neste estudo foram as diferentes variedades de cana-de-açúcar, uma vez que as diferentes etapas nos processos de produção não influenciaram a concentração final desse contaminante.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. Produção de aguardente de cana. 3 ed. Lavras: Editora da UFLA, p. 25- 55., 2013.
- ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). *Química Nova*, v. 25, n. 6b, p. 1074-1077, nov./dez. 2002.
- 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, 2001.
- ANJOS, J. P. et al. Identification of ethyl carbamate during the aging of cachaca in an oak barrel (*Quercus* sp) and a glass vessel. *Quimica Nova*, v.34, n. 5 p. 874-878, 2011a.
- ANJOS, J. P. et al. Evolution of the concentration of phenolic compounds in cachaça during aging in an oak (*Quercus* sp.) Barrel. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 22, p. 1307-1314, 2011b.
- AQUARONE, E. et al. *Biotechnologia industrial: na produção de alimentos*. São Paulo: Editora Blucher, 2005. v. 4, 525 p.
- ARESTA, M. et al. Cooper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, 2001.
- ARESTA, M.; QUARANTA, E. Carbon dioxide: a substitute for phosgene. *Chemtech*, 27 (3), 32, 1997.
- BADOLATO, E. S. G.; DURAN, M. C. Risco de intoxicação por metanol pela ingestão de bebidas alcoólicas. *Revista de Psiquiatria Clínica*, Santiago, v. 27, n. 2, p. 90-92, mar./abr. 2000.
- BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography – mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. *Food Chemistry*, London, v. 129, n. 4, p. 1383- 1387, Dec. 2011.
- BEATTIE, J. K.; POLYBLANK, G. A. Copper-catalysed oxidation of cyanide by peroxide in alkaline aqueous solution. *Aust. J. Chem.*, 48, 861-868, 1995.
- BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento. 2015. Disponível em [https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS%2040%20O%20setor%20de%20bebidas%20no%20Brasil\\_P.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS%2040%20O%20setor%20de%20bebidas%20no%20Brasil_P.pdf) >. Acesso em maio de 2016.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005. BRASIL, Diário Oficial da União, Seção I, p. 3-3, de 30/06/2005.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa nº 28, de 11/08/2014. BRASIL, Diário Oficial da União, Seção I, p. 3-3, de 12/08/2014.
- BUSK, P.K., MOLLER, B. L. Dhurrin Synthesis in Sorghum Is Regulated at the Transcriptional Level and Induced by Nitrogen Fertilization in Older Plants. *Plant Physiology*, July 2002, Vol. 129, pp. 1222–1231, 2002.

CALDAS, N. M. et al. 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, C. R. et al. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. *Journal of applied microbiology*, v. 108, n. 6, p. 1871-9, jun. 2010.

CARDOSO, M. das G. *Produção de aguardente de cana*. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 444 p.

CARDOSO, M. G. et al. *Cachaça de Minas Gerais/Brasil: produção e qualidade*. Ciência e investigação. Agrotec. Portugal, set de 2012.

CBRC – Centro brasileiro de referencia da cachaça. Números da cachaça. 2012. Disponível em < <http://www.expocachaca.com.br/numeros-da-cachaca.php> >. Acesso em maio de 2017.

COELHO, N. R. A. *Noções de higienização na indústria de alimentos*. 2014. Processamento de Frutas e Hortaliças. Universidade Católica de Goiás. Disponível em: < <http://wp.ufpel.edu.br/mlaura/files/2014/02/Higieneiza%C3%A7%C3%A3o-na-ind%C3%BAstria-de-alimentos.pdf> >. Acesso em maio de 2017.

COLLINS, L. G. et al. *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 1997.

COPLANA – Cooperativa Agroindustrial. *Características das variedades CTC*. 2006 Disponível em < [http://www.coplana.com/gxpfiles/ws001/design/Download/VariedadesCana/Variedade\\_CTC\\_115.pdf](http://www.coplana.com/gxpfiles/ws001/design/Download/VariedadesCana/Variedade_CTC_115.pdf) >. Acesso em maio de 2017.

CRONQUIST, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York, 1981.

d'ÁVILA, G. B. et al. Quantification of ethyl carbamate in cachaça produced in different agro-industrial production systems. *Journal Institute of Brewing & Distilling*. 122: 299–303; 2016.

DUARTE, F. C.; et al. Remoção de cobre em cachaça usando argilas. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v.38, n.4, p.382-389, jul./ago., 2014.

EGEKEZE, J. O.; OEHME, F. W. Cyanides and their toxicity: A literature review. *The Veterinary Quarterly The Haque*, v. 2, p. 104-14. 1980

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária. *Corte da cana-de-açúcar*. 2017a. Disponível em < [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_98\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_98_22122006154841.html) >. Acesso em junho de 2017.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa agropocuária. *Cana-de-açúcar*. 2017b. Disponível em < [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_42\\_1110200717570.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html) >. Acesso em maio de 2017.

FERNANDES, O. W. B. Avaliação da composição físico-química de cachaça de alambique de cinco cultivares de cana-de-açúcar colhidas em três épocas de maturação. 2013. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2003.

GALINARO, C. A. et al. Cyanate as an Active Precursor of Ethyl Carbamate Formation in Sugar Cane Spirit. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 7415–7420, 2015.

GANJEWALA D. et al. Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analyses in plants: A review. *Biologica Szegediensi* v. 54, p.1-14, 2010.

GUERAIN, J.; LEBLOND, N. Formation du carbamate d'ethyle et elimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits a` noyaux. In *Elaboration et Connaissance des Spiritueux*; Cantagrel, R., Ed.; Tec&Doc: Paris, France; pp 330-338, 1992.

HALKIER B. A., SCHELLER H. V., MOLLER B. L. Cyanogenic glucosides: the biosynthetic pathway and the enzyme system involved. In D Evered, S Harnett, eds, *Cyanide Compounds in Biology*, Ciba Foundation Symposium No. 140. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp 49-66, 1988.

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

IARC - International Agency for Research on Cancer. (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. 2010. Disponível em <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>>. Acesso em maio de 2017.

IBRAC - Instituto Brasileiro de Cachaça, São Paulo, 2012. Disponível em <<http://www.ibraccachacas.org/>>. Acesso em maio de 2017.

IBRAC – Instituto Brasileiro de Cachaça. Mercado externo, 2017a. Disponível em <<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-externo>>. Acesso em maio de 2017.

IBRAC – Instituto Brasileiro de Cachaça. Mercado interno, 2017b. Disponível em <<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-interno>>. Acesso em março de 2017.

JONES P.R., ANDERSEN M.D., et al. The biosynthesis, degradation, transport and possible function of cyanogenic glucosides. In JT Romeo, R Ibrahim, L Varin, V DeLuca, eds, *Evolution of Metabolic Pathways. Recent Advances in Phytochemistry*, Vol 34. Pergamon, Amsterdam, pp 191–247, 2000.

JONES, D. A. Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry*, 47 (2), 155-162, 1998.

KAHN ET AL., R.A., FAHRENDORF, T. Substrate specificity of the cytochrome P450 enzymes CYP79A1 and CYP71E1 involved in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch Biochem Biophys* 363: 9–18, 1999.

LACHENMEIER, D. W., LIMA, M. C. P., et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. *BMC Cancer*, 10, 266, 2010.

LANDELL, M. G. et al. Características da variedade de cana forrageira (IAC 86-2480) e o seu uso na alimentação animal. 2016. Disponível em: < <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/sistemas-de-producao/caracteristicas-da-variedade-de-cana-forrageira-iac-862480-e-o-seu-uso-na-alimentacao-animal-27118n.aspx> >. Acesso em maio de 2017.

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

LIMA, A. J. B.; et al. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 4, 845-848, 2009.

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

LIMA, L. L. de A., FILHO, A.B. de M. *Tecnologia de bebidas*. Recife: EDUFRPE, 2011.

LITCHEV, V. Influence of oxidation process on the development of the taste and flavor of wine distillates. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.40, n.1, p.31- 35, 1989.

LOFROTH, G.; GEJVALL, T. Diethyl pyrocarbonate: Formation of urethane in treated beverages. *Science*, 174, 1248-1250, 1971.

MACHADO, A. M. R. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC. *Food Chemistry*, London, v. 138, n. 2-3, p. 1233-1238, June 2013.

MACHADO, A. M. R. et al. Experimental design methodology to optimize the solid phase microextraction procedure prior to GC/MS Determination of Ethyl Carbamate in Samples of Homemade Cachaça. *Analytical Letters*, v. 45, n. 10, p. 1143-1155, 2012.

MACKENZIE, W. M. et al. S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II. The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch whisky. *J. Inst. Brew.*, 96, 223-232, 1990.

MARIN, F. R. Cana-de-açúcar. 2007. Disponível em < [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_42\\_1110200717570.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html) > Acesso em maio de 2017.

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

MASSOM, J. et al. Determination of acrolein, ethanol, volatile acidity, and copper in different samples of sugarcane spirits. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 32(3): 568-572, jul.-set. 2012.

MASSON, J. et al. GC-MS analysis of ethyl carbamate in distilled sugar cane spirits from the northern and southern regions of Minas Gerais. *Journal of the Institute of Brewing*; 120: 516–520, 2014.

- MENDONÇA, J. G.; et al., Determination of ethyl carbamate in cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 2016.
- MERCK INDEX. Propriedades físico-químicas do carbamato de etila. 13. ed. Rahway: Merck, 2001.
- MIRANDA, M. B. et al. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 4, p. 897901, out./dez. 2007.
- MIRANDA, M. B. et al. Perfil físico-químico de aguardente durante o envelhecimento em tonéis de carvalho. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, SP. v. 28, p.84-89, dez. 2008.
- NAGATO, L. A. F. et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 37, n. 1, p. 40-47, jan./jun. 2003.
- NAHRSTEDT, A. J et al. *Cromatography*. 1964. In: LINSKENS, H. F.; JACKSON, J. F. *Plant Toxin Analysis*. New Series Volume 13. New York, 1992.
- NOVA CANA. Produtividade dos canaviais em 2015 atinge melhor resultado desde 2009. 2016. Disponível em: < <https://www.novacana.com/n/cana/safra/produktividade-canaviais-2015-melhor-resultado-2009-ctc-270416/> >. Acesso em junho de 2017.
- OUGH, C. S., CROWELL, E. A., MOONEY, L. A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice fermentation. I. Addition of amino acids, urea and ammonia: Effects of fortification on intracellular and extra cellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39 (3), 243-249, 1988.
- OUGH, C. S.; STEVENS, D.; ALMY, J. Preliminary comments on effects of grape vineyard nitrogen fertilization on the subsequent ethyl carbamate formation in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40 (3), 219-220, 1989.
- OWUAMANAM, C. I.; IWOUNO, J. O.; IHEDIOHANMA N. C.; BARBER L. I. Cyanide Reduction, Functional and Sensory Quality of Gari as Affected by pH, temperature and fermentation time. *Journal of Nutrition*, v. 9; p. 980-986, Nigéria, 2010.
- PARAZZI, C. et al. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 1, p. 193-199, 2008.
- PATARO, C. et al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.
- 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. et al. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 5, p. 10681075, 2003.

PRATES, H. T. et al. Extração, isolamento e caracterização de dhurrin em sorgo sem tanino resistente a pássaro. Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 21., Londrina: IAPAR, p. 261, 1996.

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

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba, 136 p. il. 1, 2010.

SAKAI, R. H. Cachaça. 2013. Disponível em < <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html> >. Acesso em maio de 2017.

SANTIAGO, W. D et al.. Comparação do perfil físico-químico de cachaças Envelhecidas em tonéis de carvalho (*quercus* sp) e Amburana (*amburana cearensis*). E-xacta, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 17-29. 2013.

SANTIAGO, W. D. et al. Ethyl carbamate in the production and aging of cachaça in oak (*Quercus* sp.) and amburana (*Amburana cearensis*) barrels. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 120, p. 507-511, Aug. 2014.

SCHWAN, R. F. et al. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. Produção de aguardente de cana. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. p. 101-135.

SICOBÉ - Sistema de Controle da Produção de Bebidas, São Paulo, 2014. Disponível em: < [http://www.receita.fazenda.gov.br/PessoaJuridica/Bebidas/ProdOutrasBebidasMens\\_al.htm](http://www.receita.fazenda.gov.br/PessoaJuridica/Bebidas/ProdOutrasBebidasMens_al.htm) >. Acesso em junho de 2017.

SILVA, P. H. A. et al. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 1, p. 100-106, jan./mar. 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC method development. 2. ed. New York: J. Wiley, 1997. p. 542

STELLA, F. M. Efeito da filtração com resinas iônicas sobre a qualidade da cachaça. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2010.

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 Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 76-82, jan./mar. 2007.

TOWERS, G. H. N. In Biochemistry of Phenolic Compound8, p. 249. Ed. by Harborne, J. B. New York: Academic Press Inc. 1964.

UDOP – União dos Produtores de Bioenergia. Características Agronômicas mais Marcantes das Principais Variedades de Cana da Região Centro-Sul. IDEA News - Ano 5, Número 41, 2004. Disponível em < <http://www.udop.com.br/index.php?item=caracteristicas> >; Acesso em maio de 2017.

UTHURRY, C. A.; Lepe, J. A. S.; Lombardero, J.; Del Hierro, J. R.; Food Chem. 2006, 94, 262.

VENTURINI FILHO, V. Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia. São Paulo: Blucher, 2010. 461p.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. Toxicon, v. 38, p. 11-36, 2000.

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

ZACARONI, L. M. et al. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. Química Nova, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 320-324, 2011.

ZACARONI, L. M. et al. Effect of light on the concentration of ethyl carbamate in cachaça stored in glass bottles. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 121, n. 2, p. 238-243, Mar. 2015.