



RAFAELLA HILDA ZANITI SOUZA

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CACHAÇAS
ENVASADAS S EM GARRAFAS DE POLI-TEREFTALATO
DE ETILENO.**

LAVRAS-MG

2019

RAFAELLA HILDA ZANITI SOUZA

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CACHAÇAS
ENVASADAS EM GARRAFAS DE POLI-TEREFTALATO DE
ETILENO.**

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

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientadores

Dra. Ana Maria de Resende Machado

Dr. Márcio Bozzobon Pedroso

Dr. Wilder Douglas Santiago

LAVRAS - MG

2019

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

Souza, Rafaella Hilda Zaniti.

Análises físico-químicas, identificação e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em cachaças envasadas s em garrafas de poli tereftalato de etileno. / Rafaella Hilda Zaniti Souza. - 2019.

77 p.: il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Ana Maria de Resende Machado, Márcio Bozzobon Pedroso, Wilder Douglas Santiago.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Cachaça. 2. Embalagens PET. 3. HPA's. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

RAFAELLA HILDA ZANITI SOUZA

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CACHAÇAS
ENVASADAS EM GARRAFAS DE POLI-TEREFTALATO DE
ETILENO.**

**PHYSICAL-CHEMICAL ANALYSIS, IDENTIFICATION AND
QUANTIFICATION OF AROMATIC POLYCYCLIC
HYDROCARBONS IN CACHAÇAS PACKAGED IN
POLYETHYLENETEREPHTHALATE BOTTLES**

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

APROVADA em 26 de abril de 2019.

Dra. Ana Maria de Resende Machado Cefet-MG

Dra. Hélia Alves de Mendonça UFLA

Dr. Whasley Ferreira Duarte UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora:

Coorientadores
Dra. Ana Maria de Resende Machado
Dr. Márcio Bozzobon Pedroso
Dr. Wilder Douglas Santiago

LAVRAS - MG

2019

A Deus, pelo dom da vida e por sempre me iluminar e proteger;
Aos meus pais, Cássia e Mauro e minha irmã, Raquel, por sempre estarem ao meu
lado e confiarem em mim;
Ao Tales, pelo apoio, amor e motivação;
A Kyara e Neura, pelo carinho e companheirismo de sempre

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e meu anjo da guarda, por estarem sempre comigo, dando-me sabedoria e calma nos momentos de dificuldade.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela infraestrutura oferecida e oportunidade de desenvolver este trabalho, mediante ensino público de qualidade.

Aos órgãos de fomento Capes, CNPq e Fapemig, pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Ciências dos Alimentos pelo acolhimento e incentivo.

Ao Departamento de Química, pela infraestrutura e oportunidade.

À minha professora e orientadora, Maria das Graças Cardoso, por ter me acolhido com carinho, ter confiado em meu potencial e por todos os ensinamentos.

Aos pós-doutor Wilder, pela dedicação, pelos ensinamentos, amizade e contribuição.

Aos professores Márcio Pozzobon Pedroso, Ana Maria Machado e Felipe Cimino Duarte, por todas as orientações e conhecimentos compartilhados.

Aos meus queridos e amados pais, por todo o carinho, companheirismo e confiança.

A minha irmã, Raquel, por todo o empenho em me alegrar, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu amor Tales, por todo o carinho, compreensão e cumplicidade, apoiando-me incondicionalmente.

Aos meus amigos, por sempre me apoiarem e pelas palavras de carinho.

As técnicas e amigas Lidiany Mendonça Zacaroni Lima e Franciane P. Cardoso Campos, por todo o apoio, preocupação e ensinamentos.

Aos amigos da pós-graduação em Ciências dos Alimentos por todo o carinho e cumplicidade.

À Andressa e Letícia, por todo o carinho, amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos queridos amigos e companheiros de trabalho Renan, Richard, Nathália, Gustavo, Felipe, Shayene, Gabriela, Stephano e Gabriel. Em especial à querida “mãe de todos”, Cleusa, por todo o carinho e dedicação em ensinar.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais: Rafaela, Danúbia, Vanuzia, Luana, Jéssica, Máisa, Allan, Alex, Bia, Shennia e Gislaine, pelo carinho e apoio em todos os momentos, inclusive os mais difíceis.

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

RESUMO

A cachaça é uma bebida de grande importância econômica e cultural para o Brasil. Além dos compostos principais, dióxido de carbono e o etanol, são produzidos os compostos secundários responsáveis pelo buquê da bebida. Paralelamente, outras substâncias tóxicas podem ser produzidas, prejudicando a comercialização e exportação de um produto de qualidade. Dentre os contaminantes, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) compostos com dois ou mais anéis aromáticos, comumente encontrados em bebidas e alimentos, vem sendo pesquisados por apresentarem toxicidade referente às propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Em cachaças, os HPA's, podem ser produzidos da decomposição química de carboidratos e podem se originar em diferentes etapas do processo de produção e armazenamento da bebida. Devido a diversas características convenientes, as embalagens PET tem sido amplamente utilizadas para armazenamento de bebidas, inclusive a cachaça. Porém, existem várias preocupações relacionadas ao uso dessas embalagens nestas bebidas, como a possível migração de seus constituintes, favorecendo a interação embalagem/produto, e a comprovação de que embalagens plásticas podem ser fontes de contaminação por HPA's. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade físico química e cromatográfica de cinco marcas de cachaças do Estado de Minas Gerais, bem como estudar e correlacionar a formação e quantificação dos HPA's dessas amostras após oito meses de armazenamento em garrafas PET. As análises físico-químicas foram realizadas segundo a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A partir delas, pôde-se perceber que as embalagens influenciaram a concentração dos compostos em pelo menos uma marca de cachaça para todos os parâmetros analisados, sendo que os parâmetros que apresentaram maior discrepância foram teor alcóolico, acidez e furfural. E o carbamato de etila não foi detectado em nenhuma das amostras. Na quantificação de HPA's por HPLC, os tipos de embalagens interferiram na quantificação desses contaminantes, de modo que as amostras envasadas por maior tempo em embalagens PET apresentaram maiores concentrações desses contaminantes em todas as marcas de cachaça. O tempo de condicionamento nessas embalagens favoreceu o aumento de tais contaminantes, mostrando que quanto maior o tempo em que as cachaças ficaram envasadas em embalagens PET, maior a concentração de HPA's, inferindo-se que esse tipo de embalagem nem sempre é ideal para o armazenamento de cachaça.

Palavras chave: Cachaça. PET. HPA's.

SUMMARY

Cachaça is a beverage of great economic and cultural importance for Brazil. In addition to the main compounds, carbon dioxide and ethanol, the secondary compounds responsible for the beverage bouquet are produced. In parallel, other toxic substances can be produced, and these compounds interfere with the commercialization and exportation of a quality product. Among the contaminants, Aromatic Polycyclic Hydrocarbons (APH's) with two or more aromatic rings, commonly found in beverages and foods, have been investigated for their mutagenic and carcinogenic properties. APH's can be produced in cachaças from the chemical decomposition of carbohydrates, and they can originate in different stages of the process of production and storage of the drink. Because of several convenient features, PET packaging has been widely used for storing beverages, including cachaça. However, there are several concerns related to the use of these packages for these beverages, such as the possible migration of constituents into the contents, favoring the interaction of packaging with the product, and the proof that plastic packaging can be sources of contamination by APH's. Thus, the objective of this work was to evaluate the physical and chemical quality of five brands of cachaças from the State of Minas Gerais, as well as to study and correlate the formation and quantification of APH's of these samples after eight months of storage in PET bottles. The physicochemical analyses were performed according to the methods recommended by the Ministry of Livestock and Supply (MAPA). The packages influenced the concentration of the compounds in at least one brand of cachaça for all the parameters analyzed, and the parameters that presented the greatest discrepancies were alcohol content, acidity and furfural. Ethyl carbamate was not detected in any of the samples. In the quantification of APH's by HPLC, the types of packages interfered in the quantification of these contaminants, so that the samples packed for a longer time in PET packaging contained higher concentrations of these contaminants in all the brands of cachaça. The concentrations of these contaminants were proportional to the duration of conditioning in these packages. This observation indicates that this type of packaging is not always ideal for the storage of cachaça.

Keywords: Cachaça. PET. APH's.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma de produção de cachaça de alambique.....	14
Figura 2 Equação resumida da fermentação alcoólica.....	17
Figura 3 Rotas de Contaminação por HPA's em alimentos e bebidas.....	26
Figura 4 Esquema resumido do metabolismo de HPA's.....	30
Figura 5 Etapa de pré-polimerização por esterificação.....	33
Figura 6 Etapa de policondensação na produção de embalagens PET.....	34
Figura 7 Cromatograma da solução de padrões de furfural e 5 hidroximetilfurfural por detecção de arranjos diodos (DAD).....	52
Figura 8 Cromatograma da amostra MAZ sem armazenamento em embalagem de plástico.....	53
Figura 9 Cromatograma da amostra MAZ armazenada em três marcas de embalagem PET.....	53
Figura 10 Cromatograma da solução padrão de HPA's com concentração de 500 mg L ⁻¹ por detecção DAD.....	55
Figura 11 Cromatograma obtido da amostra JAC3.....	55
Figura 12 Gráfico bidimensional PC1x PC2 dos <i>scores</i> das embalagens t0 (embalagem de vidro), embalagem de plástico tempo de armazenamento t4 (4 meses)e t8(8 meses) para quantificação de HPA's nas amostras.....	68
Figura13 Dendograma da análise de agrupamentos hierárquicos para quantificação de HPA's das amostras em relação às embalagens utilizadas e o tempo de armazenamento.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Separação das amostras por embalagens para análise físico-química.....	35
Tabela 2 Separação das amostras por embalagens para identificação e quantificação de HPA's..	36
Tabela 3 Resultados das análises físico-químicas.....	44
Tabela 4 Parâmetro de seleção dos HPA's.....	56
Tabela 5 Curvas analíticas e coeficientes de correlação (r^2) usados para quantificação e coeficientes de variação para identificação e quantificação de HPA's.....	57
Tabela 6 Limites de detecção e quantificação dos HPA's.....	58
Tabela 7 Resultados das médias dos ensaios de recuperação realizados nas amostras de cachaça fortificadas com padrões de HPA's.....	59
Tabela 8 Quantificação de HPA's.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Teores máximo e mínimo para os componentes secundários e contaminantes presentes na aguardente de cana e cachaça.....	21
Quadro 2: Fórmulas estruturais dos HPA's estudados	27
Quadro 3: Propriedades físico-químicas dos HPA's encontrados em alimentos	29

LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B(a)P	
B(k)F	Benzo(K)Fluoranteno
° Brix	Concentração de Sólidos Solúveis
CE	Carbamato de Etila
C(h)R	Criseno
CMD	Concentração Média Determinada
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
CV	Coefficiente de variação
DAD	Arranjos diodos
DFL	Detector de Fluorescência
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DMT	Dimetil Tereftalato
EFSA	<i>Euro Food Safety Authority</i>
ET	Etileno glicol
FID	Detector por Ionização de Chama
GC	Cromatografia Gasosa
HCA	Análise de Componentes Hierárquicos
HPA's	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Iupac	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LLE	Extração Líquido-líquido
log Kow	Coefficiente de partição Octanol água
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Espectrometria de Massas
PCA	Análise de Componentes Principais
PET	Poli Tereftalato de Etileno
PIQ's	Padrões de Qualidade e Identidade
R	Ensaio de Recuperação
s	Desvio Padrão
SPE	Extração em Fase Sólida
TPA	Ácido Tereftalítico
UV	Ultravioleta
%v/v	volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 A origem da aguardente.....	11
2.2 A cachaça e sua importância no Brasil.....	12
2.3 Produção de cachaça	13
2.3.1 Matéria-prima.....	15
2.3.2 Moagem	15
2.3.3 Filtração e decantação.....	16
2.3.4 Ajuste do °Brix.....	16
2.3.5 Fermentação.....	16
2.3.6 Destilação.....	17
2.3.7 Armazenamento.....	19
2.3.8 Envelhecimento	19
2.3.9 Envase	20
2.4 Padrões de identidade e qualidade de cachaça	20
2.4.1 Compostos secundários	22
2.4.2 Contaminantes	23
2.5 HPA's	24
2.6 Embalagens	31
2.6.1 Embalagens poliméricas e suas interações	31
2.6.2 Poli Tereftalato de Etileno	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Obtenção das amostras	35
3.2 Separação das amostras e armazenamento.....	35
3.3 Análises físico-químicas	36

3.3.1 Exame organoléptico	37
3.3.2 Grau alcoólico	37
3.3.3 Extrato Seco	37
3.3.3 Acidez volátil	37
3.3.4 Aldeídos	37
3.3.5 Ésteres.....	37
3.3.6 Cobre	38
3.3.8 Análises Cromatográficas	38
3.3.8.1 Furfural e Hidroximetilfurfural.....	38
3.3.8.2 Metanol e Álcoois superiores	39
3.3.8.3 Carbamato de Etila	39
3.4 HPA's em cachaças	40
4. Análise Estatística.....	42
4.1 Análise de Variância.....	42
4.2 Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquico.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Análises físico-químico	43
5.2 Validação de furfural e hidroximetilfurfural por HPLC	52
5.3 Validação cromatográfica da quantificação de HPA's	54
5.3.1 Extração das amostras	54
5.4 Identificação e quantificação de HPA's.....	60
5.6 Análise multivariada para a identificação e quantificação de HPA's	67
5.6.1 Análise de Componentes Principais e Agrupamento Hierárquico	67
6. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida fermento/destilada, genuinamente brasileira, produzida pela fermentação do caldo da cana-de-açúcar e possui grande importância cultural e econômica. Por ser produzida em praticamente todas as Regiões do país, possui características peculiares das regiões e de toda cadeia produtiva. Os atributos sensoriais característicos dessa bebida são provenientes principalmente dos processos de fermentação, destilação e envelhecimento. Por agradar diversos paladares e cativar vários admiradores, tornou-se o destilado mais consumido no país.

Durante a produção de cachaça, principalmente durante a etapa de fermentação, são produzidos os compostos majoritários (etanol e gás carbônico) e, em menor proporção, os compostos secundários que, em concentrações equilibradas, ajudam a compor um "buquê" agradável proveniente de uma bebida de qualidade. Além desses compostos, inúmeras substâncias de natureza tóxica podem fazer parte da sua composição, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), que podem ser encontrados nas cachaças e outros alimentos, que são formados em processos naturais e artificiais por meio da combustão incompleta da matéria orgânica, os quais se caracterizam por possuir dois ou mais anéis aromáticos condensados. Geralmente, a principal forma de exposição a esses contaminantes, em especial para os nãofumantes ocorre via ingestão alimentar, que devido à elevada massa molar e característica lipofílica, o que provoca a bioacumulação no corpo humano após o consumo de alimentos contaminados. Normalmente, a presença desses compostos em alimentos está associada ao ambiente de produção, como o caso de alimentos crus (frutas, vegetais) e frutos do mar. Esses contaminantes podem estar presentes no ar, solo e água ou em etapas de processamento, como secagem, torra, cozimento, grelha, fritura, forneamento, defumação. Favorecendo o contato direto entre os produtos de combustão e os alimentos (CACHO et al., 2016; BASAL; KIM,2015).

Apesar do amplo e frequente índice de exposição da população a esses compostos e toxicidade referente às propriedades mutagênicas e carcinogênicas, ainda não existe legislação brasileira específica para o limite desses contaminantes. Porém, alguns países têm adotado limites próprios, como a Alemanha, Suíça, Escócia e Polônia. Devido a assiduidade de relatos da presença de HPA's em diferentes categorias de alimentos, eles têm sido amplamente estudados, pois a exposição a esses compostos requer atenção especial, uma vez que representam risco à saúde humana. Em cachaças, algumas situações podem favorecer a presença desses compostos, como localização da plantação, contaminações na etapa de

processamento, tais como adição de caramelo à bebida, maturação em tonéis de madeira tratados termicamente e armazenamento em recipientes inadequados, como bombonas de polietileno (MACHADO et al., 2014).

As embalagens são primordiais na indústria de alimentos e bebidas e exercem quatro funções básicas, como proteção, contenção, comunicação e conveniência, podendo ser produzidas por diversos materiais de acordo com as especificidades de cada produto. O Poli Tereftalato de Etileno (PET) são polímeros de cadeia heterogênea, aromática e possuem um grupo éster constituinte (WIEBECK; HARADA, 2005). Devido às características de baixa permeabilidade aos gases e elevada relação leveza/resistência, possuem vasta aplicação em embalagens de bebidas, inclusive cachaças. Entretanto, as preocupações associadas à utilização dessas embalagens são a possível migração de seus compostos constituintes, favorecendo a interação embalagem/produto; a utilização desses recipientes de plástico para acondicionamento da cachaça são fontes de contaminação por HPA's. Visando a contribuir para a melhoria da qualidade da cachaça e conseqüentemente a saúde de seus consumidores, o presente trabalho objetivou-se avaliar a qualidade físico-química e cromatográfica de cinco amostras de cachaças obtidas do Estado de Minas Gerais, bem como estudar e correlacionar a formação e quantificação dos HPA's dessas amostras após oito meses de armazenamento em garrafas PET.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A origem da aguardente

Utilizada na cura de moléstias, atribui-se aos egípcios os primeiros indícios da bebida no mundo. Na Grécia, foram detectados registros da produção de aguardente, no Tratado da Ciência, escrito por Plínio, o Velho (23 a 79 D. C.), em que se descrevia a coleta de vapor da resina de cedro, do bico de uma chaleira, com um pedaço de lã, dando origem ao *al kuhu*. Posteriormente, os alquimistas passaram a estudar e analisar a aguardente, atribuindo-lhe propriedades místico-medicinais. Assim, surgiu a água da vida – *eau de vie* –, que era receitada como elixir da longevidade (SEBRAE,2012).

Com a expansão do Império Romano, a aguardente chega ao Oriente Médio, e os árabes desenvolvem os primeiros equipamentos para destilação similares aos utilizados atualmente. O destilado produzido, então, muda de nome passando de (*al kuhu*) para *al raga*, dando origem ao *arak*, (bebida resultante de uma mistura de licores de anis). Assim, os fundamentos sobre destilação propagaram-se pelo mundo, incentivando a produção de vários tipos de destilados

diferentes, por exemplo kirsch (Alemanha), sakê (China e Japão), whisky (Escócia) e vodca (Rússia) (SEBRAE,2012).

Contudo, acredita-se que a aguardente tenha surgido a partir de uma bebida de origem portuguesa, produzida a partir do bagaço da uva, a bagaceira, e da Descoberta do Brasil, com a implantação da cultura de cana-de açúcar no país pelos portugueses (SEBRAE,2012).

No Brasil, a história da aguardente de cana, ou cachaça, confundem-se com a história do país e de sua população, uma vez que a cultura e os costumes estão interligados com a produção dessa bebida. O primeiro engenho que se tem notícia estabeleceu na capitania de São Vicente em 1532; porém, acredita-se que o engenho de São Jorge dos Erasmos foi o primeiro a entrar em operação. Inicialmente, a cachaça era um produto secundário da indústria açucareira sem grande visibilidade, que posteriormente, ganhou importante relevância econômica e social no período colonial (ALCARDE,2017).

2.2 A cachaça e sua importância no Brasil

As condições climáticas favoráveis ao plantio da cana-de-açúcar no litoral brasileiro proporcionaram o rápido desenvolvimento da cultura, evidenciando o início da atividade que se tornaria grande fonte de riqueza. Paralela à produção de açúcar, a destilação acidental ou intencional do vinho da cana ou do caldo azedo residual originou um líquido incolor, brilhante e ardente, que devido à similaridade com a água, foi denominado aguardente. No início, a aguardente era apenas um produto secundário da indústria açucareira, que, com o passar do tempo, foi ganhando importância econômica e social no período colonial brasileiro. Por ter sido uma das principais moedas de troca da época, foi considerado um dos fatores que contribuiu para a união do povo pela reivindicação da Independência do Brasil (ALCARDE, 2017). De acordo com a legislação brasileira, **aguardente de cana** é a bebida obtida do destilado alcoólico simples ou pela destilação do mosto fermentado da cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de até 6 gramas/litro de açúcares e graduação alcoólica de 38% a 54%, em volume a 20°C. Já a **cachaça** é a denominação exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo também ser adicionada de até 6 gramas/litro de açúcares expressos em sacarose, com graduação alcoólica de 38% a 48%, em volume a 20°C (BRASIL,2009).

A atividade produtiva e industrial da cana-de-açúcar é praticamente um mundo à parte no contexto das demais cadeias do agronegócio brasileiro. Desde o período colonial, o cultivo da cana-de-açúcar vem sendo uma das principais fontes de riqueza para o país, que com o passar dos séculos, ganhou ainda mais evidência e importância, principalmente na balança comercial,

devido a versatilidade nos ganhos da atividade, uma vez que ela pode ser utilizada para a produção de açúcar, etanol, energia e para a produção da cachaça. O destilado produzido no Brasil projeta o país diante de um amplo e concorrido mercado (KIST; SANTOS; BELING, 2016). Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) 2018 mostram que a produção estimada do país que produz a maior quantidade da cultura no planeta, para safra 2018/19, é de 615,84 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, colhida em aproximadamente 8,63 milhões de hectares.

Com relação à produção de cachaça, são 1,5 bilhão de litros/ano, provenientes de aproximadamente 40 mil produtores, levando em consideração tanto o processamento em alambique quanto em coluna, movimentando anualmente R\$ 7 bilhões, para um consumo médio de 11,5 litros por habitante/ano. Ao longo de sua cadeia produtiva, gera aproximadamente 600 mil empregos diretos e indiretos, sendo o 3º destilado mais consumido no mundo. Porém, grande parte da cachaça exportada é de coluna, que, por sua vez, possui menor valor agregado devido ao transporte a granel. Essa bebida, no entanto, é utilizada para a elaboração de drinques, como a apreciada “caipirinha”. Dentre as cachaças de coluna, o Estado de São Paulo é responsável por 54,17% das exportações, equivalendo a US\$ 4,3 milhões de receita. Apesar dos dados apresentados, a exportação de cachaça ainda está aquém em relação ao consumo interno e ao montante produzido. Com isso, diversos órgãos brasileiros vêm trabalhando a imagem do produto em eventos internacionais, para que a exportação seja ampliada, contribuindo, assim, para a regulamentação de várias empresas que ainda se encontram na informalidade (KIST; SANTOS; BELING, 2016; CARVALHO et al., 2018).

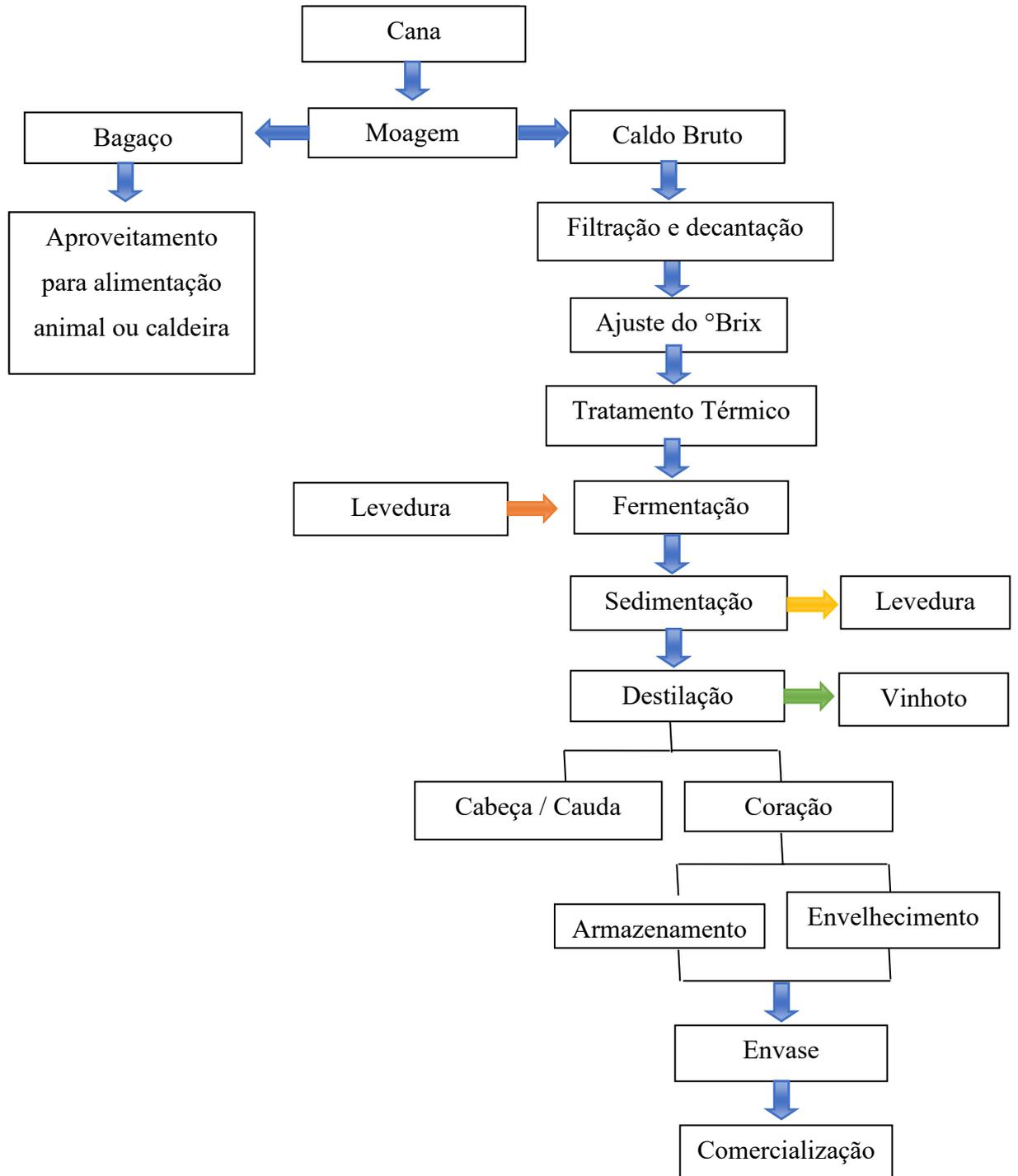
Bastante democrática, atingindo várias faixas etárias e classes sociais, a cachaça faz sucesso desde o seu descobrimento e cada vez mais é apreciada e reconhecida no exterior como o destilado do Brasil.

2.3 Produção de cachaça

Há duas formas de produção de cachaça: aquela que é conhecida como de coluna e aquela produzida em alambique. São Paulo é o Estado especializado em produção de cachaça em coluna, em que são utilizados colunas e tonéis em aço inoxidável. Inicialmente associava-se esse tipo de produção apenas a empresas de grande porte, que detinham grandes áreas de produção de cana-de-açúcar; porém, atualmente, são produzidas grandes quantidades de cachaça também em alambiques de cobre. Minas Gerais é o Estado que mais produz cachaça nesses tipos de equipamentos, e o destilado final é separado em três frações diferentes: cabeça, coração e cauda (SANTIAGO et al., 2015).

O processo de fabricação de cachaça de alambique pode ser resumido em: obtenção do mosto, fermentação, destilação e envelhecimento. Na Figura 1 verifica-se o fluxograma de produção de cachaça de alambique.

Figura 1: Fluxograma de produção da cachaça em alambique



Fonte: Adaptado de Alcarde (2017); Santiago et al. (2013).

2.3.1 Matéria-prima

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é a matéria-prima empregada para a produção de cachaça. A ocorrência de fatores limitantes ao desenvolvimento e manutenção do seu estado fisiológico pós-colheita pode repercutir diretamente na qualidade do produto final e, com isso, impactar o processamento industrial (OLIVEIRA FILHO et al., 2016). Na escolha da variedade de cana para a produção de cachaça, deve-se levar em consideração alguns aspectos, como: alto rendimento de colmos, elevado teor de sacarose, baixo teor de fibras, resistência a pragas e doenças, fácil despalha, resistência ao tombamento, fácil adaptação a diferentes tipos de solos e climas, ausência de florescimento, baixa isoporização, boa brotação de soqueiras, ausência de rachaduras, rápido crescimento inicial e fechamento, ausência de joçal (pelos lignificantes nas bainhas das folhas) e longo período de utilização industrial (ANDRADE, 2013). Se o produtor deseja produzir aguardente por toda a safra, é necessário realizar a plantação de variedades com ciclos de maturação distintos, de modo que consiga obter matéria-prima de qualidade, com bons índices de maturação durante todo o tempo necessário.

Em geral, a cana começa a se deteriorar a partir do momento do corte dos colmos, podendo ser intensificada por diversos fatores ambientais (umidade, temperatura e sistemas de manejo). Por isso, sugere-se que o intervalo entre corte e moagem não ultrapasse 24 horas (MUTTON; MUTTON 2010).

2.3.2 Moagem

O processo de extração por moagem é a etapa em que se divide o colmo da cana em duas frações: o caldo bruto (rico em açúcares, água, etc.) e o bagaço (rico em fibras). Objetiva-se com essa etapa a extração do açúcar dissolvido no caldo, que está armazenado nos tecidos de reserva das células parenquimatosas dos colmos da cana-de-açúcar (VEIGA, 2013; (MUTTON; MUTTON, 2010).

A boa performance na extração, juntamente com demais fatores, como: corte adequado e no tempo certo e qualidade da matéria-prima, retratam o sucesso financeiro da atividade. Para isso, alguns cuidados são de extrema importância para a eficiência do processo, como seguir as boas práticas de fabricação (BPF), realizando a higienização adequada da cana e do moinho após sua utilização; escolher a moenda ideal para utilização (dimensionamento adequado); evitar a contaminação do mosto por óleos ou graxas na área de operação, uma vez que essas contaminações podem facilitar a síntese de HPA's no produto final; realizar assistência e manutenção técnica regularmente nas moendas obter com facilidade a aquisição de peças para

reposição, estrutura funcional e econômica da indústria fornecedora da moenda (BORTOLETTO et al., 2018; VEIGA,2013 ; MUTTON; MUTTON 2010).

Chamado por algumas pessoas de garapa, o caldo obtido da moagem da cana é constituído principalmente de água (65-75%), açúcares (11-18%), pequenas quantidades de substâncias nitrogenadas, ceras, lipídios, pectinas, materiais corantes e sais minerais. Seu pH, levemente ácido (4,8-6,0), pode contribuir para o desenvolvimento de micro-organismos (SANTIAGO et al.,2013).

2.3.3 Filtração e decantação

Após a obtenção do caldo de cana, ele passa por peneiras fixas, rotativas ou vibratórias e decantadores, para a separação das partículas sólidas em suspensão. A presença de areia e terra pode causar desgaste dos equipamentos e tubulações, e os resíduos, como bagaço e folhas, podem ser, além de fonte de contaminação microbiana no mosto, precursores da formação de furfural e metanol durante o processo de produção de aguardente (ALCARDE, 2017).

2.3.4 Ajuste do °Brix

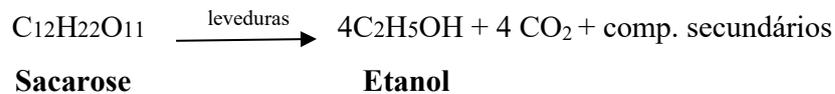
Após a filtração e decantação, é realizado o ajuste da concentração de sólidos solúveis (°Brix). Se a cana for colhida no estágio de maturação adequado, ela apresentará valores acima de 16 °Brix, que é o °Brix ideal para fermentação e, portanto, será necessário diluir o caldo de cana, em água potável declorada, para garantir a estabilidade do fermento ao decorrer do processo fermentativo; se não diluído, pode levar a fermentações lentas, incompletas, ocasionando perda de qualidade no produto final (VEIGA ,2013).

Para o ajuste do °Brix, são necessários tanques específicos para essa finalidade; se a diluição for realizada em dornas onde já se encontra o fermento, pode acarretar perda de produtividade na fermentação e desenvolvimento de compostos secundários (VEIGA ,2013).

2.3.5 Fermentação

A fermentação é o processo no qual a levedura transforma o substrato (o caldo da cana açucarado) em gás carbônico (DIÓXIDO DE CARBONO - CO₂), etanol e uma série de outros compostos secundários. A equação geral é representada na Figura 2, a seguir.

Figura 2: Equação resumida da fermentação alcoólica



Fonte: (Do autor).

As condições de fermentação e as leveduras utilizadas são os fatores essenciais para a qualidade química e sensorial da cachaça. A qualidade sensorial é representada principalmente pelos compostos voláteis presentes na bebida, como álcoois, ésteres, aldeídos e ácidos orgânicos produzidos pelas células de leveduras. Os álcoois e ésteres são de maior importância industrial, devido à sua elevada concentração, quando comparados com os outros metabólitos secundários e com sua contribuição na formação do aroma da bebida (PORTUGAL et al., 2017; VIDAL et al., 2013).

O processo de fermentação alcoólica para a produção de cachaça é realizado pela levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A presença de outros microrganismos durante essa etapa pode levar à produção de diversos produtos, muitas vezes indesejados, como é o caso do metanol. Para acelerar o processo fermentativo, aumentar os níveis dos metabólitos desejados e prevenir a produção de componentes indesejados por contaminantes microbianos, recomenda-se a adição de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* ou uso de culturas de fermento puro, normalmente sob a forma de levedura seca ativa, pois essa prática é uma ferramenta eficaz para a padronização da bebida (CAMPOS et al., 2010 ; OHIMAIN, 2016).

O monitoramento da fermentação pode ser realizado observando-se a diminuição do ° Brix, que geralmente é feito a cada uma ou duas horas. A diminuição desse parâmetro no mosto é a comprovação de que a glicose está sendo transformada em álcool. Os sólidos solúveis totais dissolvidos auxiliam para a gravidade específica, fazendo com que a gravidade decresça quando o açúcar é convertido em álcool e dióxido de carbono (SCHWAN et al., 2013).

2.3.6 Destilação

É o processo em que o vinho (produto da fermentação) é aquecido até a volatilização e posteriormente condensado. Essa etapa objetiva purificação e a formação de novos produtos por meio da decomposição das frações. No caso da produção de cachaça em alambiques de cobre, deve-se considerar ainda os compostos formados a partir das reações que ocorrem dentro do alambique (MUTTON; MUTTON 2010).

O processo de destilação pode ocorrer em colunas de aço inoxidável ou em alambiques de cobre. Uma boa cachaça pode ser obtida por qualquer um desses equipamentos e processo de destilação; porém a composição química da bebida irá variar, considerando as características de cada processo utilizado. Geralmente, os destilados provenientes do processo intermitente (em alambiques) apresentam maior teor de congêneres do que aqueles oriundos da destilação contínua (em colunas) (ALCARDE, 2017; CODÔ, 2013).

Após o processo de destilação em coluna, são obtidas duas frações denominadas flegma e vinhaça. O flegma, produto majoritário do processo, é constituído por uma mistura hidroalcoólica, caracterizada por apresentar composição e graduação alcoólicas, conforme o tipo de aparelho utilizado na destilação e a extração das frações destiladas. A vinhaça, resíduo formado a partir da destilação do mosto fermentado, apresenta teor alcoólico praticamente nulo e é nela que se concentram as substâncias do mosto fermentado (partes fixas e voláteis). Em pequenos engenhos, a vinhaça, juntamente com compostos produzidos a partir do bagaço, cinzas e esterco, são utilizados na plantação de cana-de-açúcar para auxiliar no desenvolvimento da cultura (CODÔ, 2013; ANDRADE, 2013).

Quando a destilação ocorre em alambique de cobre, o flegma é dividido em três frações (cabeça, coração e cauda) e a vinhaça têm o mesmo destino da destilação em coluna. A cabeça é a fração de compostos com menor temperatura de ebulição, representada por compostos mais voláteis e solúveis em álcool (metanol, acetaldeído e acetato de etila são comuns nesse tipo de fração). A cauda é a fração menos volátil, com temperatura de ebulição superior que água e a última a ser recuperada, representada por ácido acético e furfural. Essas frações devem ser separadas, pois concentram compostos que podem depreciar a qualidade da bebida; geralmente são redestiladas e utilizadas como combustível para automóveis. O coração, a fração principal da destilação, é formado por compostos com volatilidade intermediária, em que a temperatura de ebulição se encontra abaixo de 200 °C. Os compostos aqui presentes são solúveis em álcool e completamente ou parcialmente solúveis em água. Os álcoois superiores propan-1-ol (propílico), butan-1-ol (butílico) e butan-2-ol (sec butílico) pertencem a esse grupo. É o destilado desejável, a “cachaça”, representando 80% do volume do destilado. O limite de recolhimento dessa fração ocorre quando o teor alcoólico do destilado, no recipiente de recolhimento, atinge o valor pré-estabelecido para o produto final (CODÔ, 2013; CARDOSO et al.,2013).

2.3.7 Armazenamento

Para o acondicionamento da cachaça que não for realizar a etapa de envelhecimento, devem ser utilizados recipientes produzidos de material inerte, que não influencie negativamente o aroma e o paladar da bebida. Os tanques de aço inoxidável são bastante utilizados, devido às suas características de neutralidade em contato com o álcool e às condições favoráveis de higienização. Apesar de seu custo inicial ser elevado, as vantagens oferecidas por eles compensam o investimento (VEIGA, 2013).

Porém, outros materiais já foram utilizados pelos produtores para armazenamento da bebida, como tanques de alvenaria com cimento queimado e parafinados e bombonas de plásticos, ferro, cerâmica e aço carbono. No entanto, esses materiais atualmente são proibidos pela legislação, uma vez que os tanques de alvenaria são de difícil manutenção e reparo, e com o decorrer do tempo de uso, vão apresentando desgastes, reagindo com o álcool e depreciando a qualidade do produto (VEIGA, 2013). Cientificamente, Machado et al (2014) comprovaram que as bombonas de polietileno proporcionam a formação de HPA's.

2.3.8 Envelhecimento

O envelhecimento da cachaça em barris de madeira é um passo marcante para aumentar o valor agregado ao produto. Nesse processo, ocorrem inúmeras reações químicas que acarretam a incorporação de compostos presentes na madeira na bebida. Porém, essa etapa depende de diversos fatores: espécie de madeira utilizada para o armazenamento da bebida e tempo de duração da bebida dentro dos barris. A qualidade sensorial da cachaça é alterada positivamente, devido às mudanças físicas e químicas resultantes dos compostos fenólicos extraídos das madeiras, deixando seu sabor mais suave, agradável e, conseqüentemente, mais competitiva no mercado (RODRIGUES et al., 2016; SANTIAGO et al., 2013).

De acordo com a legislação, para a que cachaça seja considerada envelhecida, ela deve conter pelo menos 50% de cachaça envelhecida por um período não inferior a 1 ano em um recipiente de madeira apropriado com uma capacidade máxima de 700 L. Os recipientes empregados para o envelhecimento são barris de madeira, pois atuam como uma membrana semipermeável e possibilitam a passagem de álcool e vapor de água de dentro para fora do barril (BRASIL, 2009).

Essa transferência depende da umidade relativa e temperatura no local onde ocorre o envelhecimento. A madeira tradicionalmente utilizada para o envelhecimento de cachaça é o carvalho (*Quercus* sp.). No entanto, várias madeiras nativas também podem ser usadas na fabricação de barris para o envelhecimento da bebida. Entre elas, destacam-se amburana

(*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaea caribouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*) (SANTIAGO et al., 2016).

Na fabricação de barris para o envelhecimento das bebidas, a matéria-prima proveniente do cerne de árvores selecionadas é submetida a um tratamento chamado de secagem natural ou tempero, que consiste em um período de 1 a 3 anos de exposição das estacas de madeira ao ar livre, expostas ao sol, vento e chuva, objetivando reduzir a umidade da madeira de 18% para 12%, promover a evolução química de taninos e celulose e a diminuir de constituintes amargos. Após essa etapa, a madeira é moldada em varas, seguindo para a dobra das aduelas do barril e a tosta do interior da madeira, que é tradicionalmente realizada sob fogo aberto (CHINNICI et al., 2007). Com isso, devido ao armazenamento prolongado das bebidas nesses barris, esses procedimentos, principalmente a torra, podem contribuir substancialmente para a formação de HPA's na cachaça.

2.3.9 Envase

O procedimento mais indicado para envase da cachaça é utilizando enchedoras, capazes de conferir melhor eficiência no processo, pois além de contribuir para o melhor rendimento da operação, conferem condições higiênicas satisfatórias (VEIGA, 2013).

2.4 Padrões de identidade e qualidade de cachaça

Os padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) preconizados pelo MAPA são responsáveis pela qualidade e padronização da bebida, uma vez que estipulam limites para vários compostos presentes na cachaça. Após as etapas de processamento, o principal componente formado é o etanol; porém, vários outros compostos são formados durante essas etapas. Os componentes secundários são responsáveis pela formação do sabor e aroma característico da bebida. No Quadro 1, apresentam-se os PIQ's para aguardente de cana e cachaça.

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

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	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Álcoois superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360,0
Álcool sec-butílico (butanol-2)	mg/100 mL de álcool anidro	-	10,0
Álcool butílico (butanol-1)	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	μgL^{-1}	-	210,0
Cobre	mgL^{-1}	-	5,0
Arsênio	μgL^{-1}	-	100,0
Chumbo	μgL^{-1}	-	200,0

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico. **Congêneres: acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores.

Os padrões de identidade com seus respectivos limites estabelecidos têm o objetivo de minimizar a influência de cada um desses componentes na proteção à saúde pública e no padrão de qualidade da bebida, não significando que a aguardente que se enquadre nesses padrões possa ser considerada produto com qualidade sensorial superior (MIRANDA et al., 2007).

2.4.1 Compostos secundários

Esses compostos são produzidos em todas as etapas de processamento da cachaça, mas principalmente durante o processo de fermentação, realizado pelas leveduras e, mesmo produzidos em menores proporções, são de grande importância para a composição sensorial da bebida. Especificamente, são ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e álcoois superiores (d'ÁVILA et al., 2016; ALCARDE, 2017).

Dentre os ácidos carboxílicos, o majoritário é o ácido acético formado pela oxidação do acetaldeído. Mas são formados também os ácidos láctico, butírico, propiônico, entre outros. A formação desses compostos pode ser proveniente da fermentação, sendo a aeração do mosto um fator estimulante para a formação de ácido acético ou a presença de bactérias oriundas de contaminação na estocagem da cana ou do caldo (CARDOSO et al., 2013; ALCARDE, 2017).

Além do processo de fermentação, os ésteres podem ser formados nos processos de destilação e envelhecimento. Em concentrações adequadas, esses compostos são desejáveis para a formação do “*flavour*” da bebida. Cada éster formado tem um aroma específico, sendo o acetato de etila o éster predominante. Causas, como tipo e quantidade de fermento, temperatura, agitação, aeração na fermentação e qualidade do mosto, tem influência direta na formação desses compostos (CARDOSO et al., 2013).

A maior parte dos aldeídos formados na cachaça são indesejáveis em relação à toxicologia, pois são compostos altamente voláteis, de odor intenso, que prejudicam o aroma das bebidas alcóolicas. Como são intermediários na formação dos álcoois, podem ser formados pela descarboxilação de oxoácidos ou pela oxidação dos álcoois, como é o caso do furfural e hidroximetil furfural. O principal aldeído formado é o etanal (acetaldeído), por ser altamente reativo e ser formado pela oxidação do etanol; sua síntese ocorre principalmente no início da fermentação, reduzindo sua produção posteriormente em condições de anaerobiose. Outros aldeídos podem ser formados, como metanal (ácido fórmico), butanal (aldeído butílico), 3-metil propanal (aldeído isobutílico), pentanal, hexanal, furfural, hidroximetilfural e acroleína, sendo concentrações relacionadas principalmente com a eficiência no corte da fração da cabeça durante a destilação (CARDOSO et al., 2013).

Pertencentes ao grupo de compostos voláteis com maior concentração em bebidas destiladas, os álcoois superiores são responsáveis diretos pela formação do odor dessas bebidas. Formados pela reação de degradação de aminoácidos durante o processo de fermentação, são eles o isoamílico, propílico, isobutílico, butílico, hexílico e 2-feniletanol, sendo o álcool isoamílico um dos compostos majoritários. Com aroma parecido com o aroma de flores, seu excesso diminui substancialmente a qualidade e o valor comercial das bebidas, além de serem

prejudiciais ao sistema nervoso central. Em uma cachaça de qualidade, normalmente o teor de álcoois superiores deve acompanhar proporcionalmente os ésteres (VILELA et al., 2007; CARDOSO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016).

2.4.2 Contaminantes

Na maior parte dos casos, os contaminantes orgânicos são formados por reações de β -eliminação, catalisadas por ácidos ou bases, sendo a desidratação e degradação térmica dos açúcares reações de grande relevância em alimentos e bebidas. Essas são comuns em produtos provenientes de fermentados de cereais sacarificados por processo ácido, mostos extremamente turvos, ricos em carboidratos e destilação em fogo direto. As pentoses são responsáveis pela formação principal do furfural como produto de degradação e as hexoses, pelo hidroximetilfurfural (HMF), 2-hidroxiacetilfurano e isomaltol (MASSON et al.,2007). O furfural pode ser formado em diversas etapas do processamento de produção da cachaça, como pela pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques ou durante o envelhecimento da bebida, mediante a ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), as quais podem estar presentes nos recipientes de madeira usados no armazenamento da bebida (ZACARONI et al.,2011).

O metanol é um álcool indesejável e considerado um contaminante importante em cachaça. Sua síntese ocorre pela degradação da pectina encontrada nas fibras da cana, quando o bagacilho está presente no caldo em fermentações sob condições ácidas. No organismo, as consequências podem ser graves, pois sua ingestão, mesmo em pequenas concentrações por longos períodos de tempo, pode causar cegueira e até mesmo levar à morte (CARDOSO et al., 2013; ALCARDE,2017).

O 2-propenal, também conhecido como acroleína, é uma substância extremamente tóxica por todas as vias de administração, além de demonstrar características mutagênicas e carcinogênicas. É proveniente do processo de fermentação, podendo ser formada pela desidratação do glicerol ou por contaminação bacteriana (ZACARONI et al.,2011; CARDOSO et al.,2013).

O carbamato de etila (CE) é um éster de ácido carbâmico, normalmente presente em bebidas destiladas e alimentos fermentados, que possui características potencialmente carcinogênicas. Sua origem de formação ainda não é bem elucidada porém, acredita-se que os precursores de sua formação em cachaças sejam ureia, citrulina, N-carbamil fosfatos e cianeto.

O cobre é um metal de profunda importância para o metabolismo humano, pois atua como cofator para várias enzimas celulares. No entanto, em altas concentrações, pode reagir

com grupos SH de proteínas e enzimas e está associado a doenças como epilepsia, melanoma e artrite reumatoide, bem como à perda do paladar. Na produção de cachaças, esse metal é responsável por reações de catalisação, contribuindo para a qualidade sensorial da bebida. Porém, é necessária a higienização adequada dos alambiques para que, durante o processo de destilação, esse contaminante não seja arrastado pelo destilado, aumentando sua concentração no produto final. Outros metais como chumbo e arsênio também podem contaminar a bebida, por fazerem parte da construção de soldas dos equipamentos pelo solo ou água (ZACARONI et al., 2015; ALCARDE, 2017).

2.5 HPA's

Desde 1931, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) vêm sendo estudados, quando o benzo(a)pireno B(a)P foi isolado do carvão e, posteriormente, sintetizado. Em 1952, esse contaminante foi detectado no meio ambiente e, em 1970, esse e outros HPA's foram considerados prejudiciais à saúde (GARCIA et al., 2014). SINGH et al. (2016) descrevem que a ingestão média estimada de HPA's no mundo variou de 0,02 a 3,6µg/pessoa/dia

Esses compostos representam uma família de moléculas diversificadas de mais de 100 compostos orgânicos já identificados, sendo amplamente distribuídos na natureza (ar, solo, plantas, água e alimentos) (CARUSO; ALABURDA, 2008; BASAL; KIM, 2015). Para Purcaro et al. (2016), esses compostos podem ser formados a partir de uma variedade de processos de combustão e pirólise, sendo a temperatura ideal de formação linear entre 500 e 750 °C, que se inicia pelo craqueamento parcial dos compostos orgânicos a moléculas menores, instáveis a elevadas temperaturas (pirólise), principalmente radicais, que se recombina para dar origem a HPA's mais estáveis (pirossíntese).

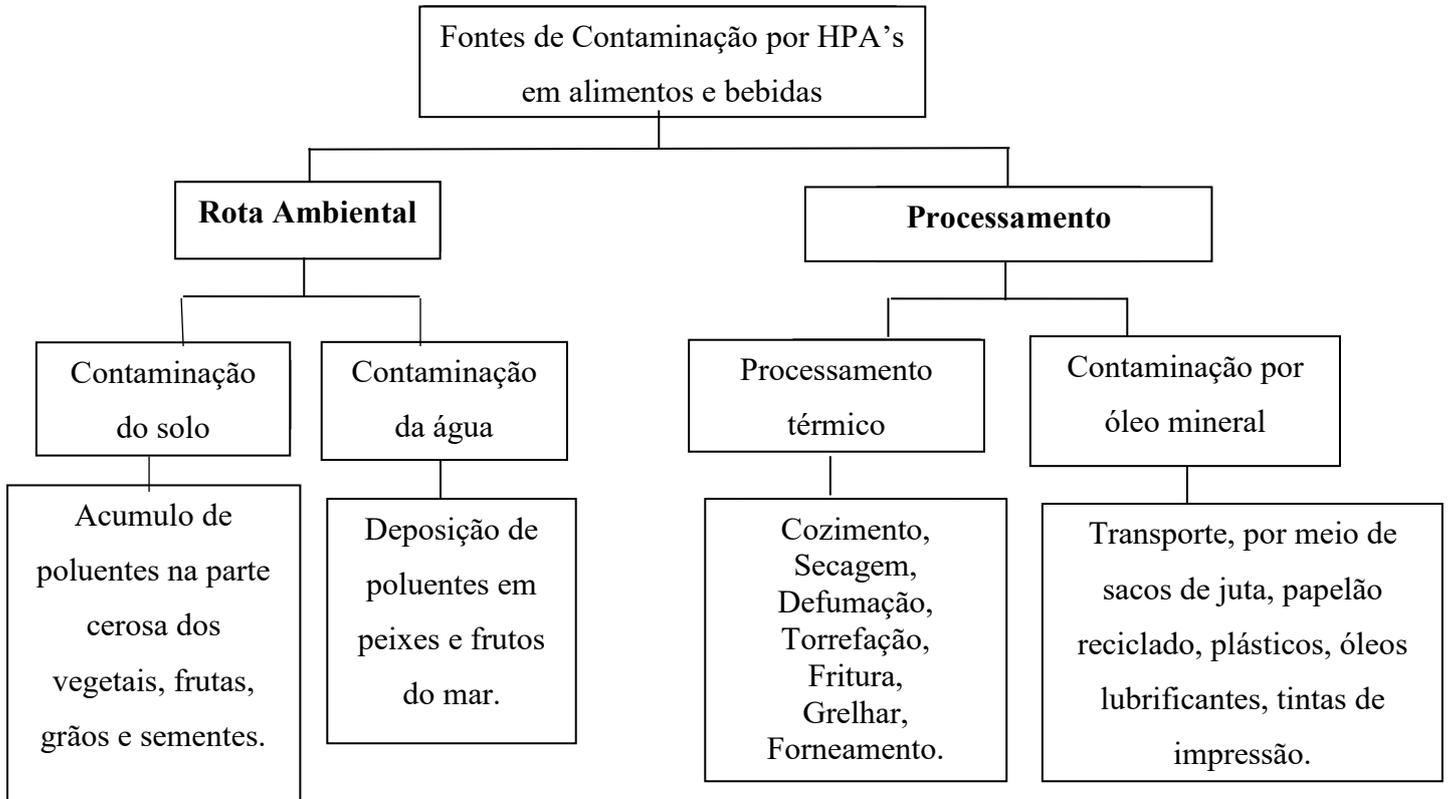
Os alimentos e bebidas são uma das maiores fontes de exposição humana aos HPA's. Para pessoas não fumantes, esses compostos são considerados uma das principais causas de câncer de pulmão. A ocorrência desses contaminantes nos alimentos é influenciada pelas mesmas características físico-químicas que determinam sua absorção e distribuição em humanos (CARUSO; ALABURDA, 2008; BASAL; KIM, 2015).

A contaminação dos alimentos por HPA's pode ser realizada por duas vias principais: a poluição ambiental e a ausência de boas práticas de fabricação durante a produção de alimentos. Na primeira, os HPA's são provenientes de incêndios florestais, vulcões, processos hidrotérmicos, infiltração de petróleo e carbonização. Ou influenciadas por fontes antropogênicas, como escape de veículos motorizados, combustão doméstica de madeira, petróleo, gás e carvão, combustão de biomassa industrial, queima aberta de detritos agrícolas,

fumo do tabaco, colocação de alcatrão, forno de coque, estradas de asfalto, entre outros (PURCARO et al., 2016). Quando liberados no ambiente, esses compostos podem ser levados para locais distantes de sua fonte de emissão, onde sua remoção da atmosfera pode ocorrer por deposição úmida e seca no solo, água e vegetação. No ar os HPA's passam por reações com gases oxidantes (NO_2 , O_3 e SO_3) e são foto-oxidados. Vários contaminantes, como o BaP, podem ser destruídos rapidamente pela luz UV. Após a deposição, esses compostos podem ter diferentes destinos. No solo, podem ser volatilizados ou passar por degradação biótica ou abiótica, fotólise, oxidação ou podem penetrar em águas subterrâneas e serem transportados dentro de aquíferos. Em águas de superfície, podem ser volatilizados, fotolisados, biodegradados, ligarem-se a sedimentos suspensos ou depositarem-se em organismos aquáticos (PURCARO et al., 2016).

Já a segunda, considerada a mais comum, é aquela que os alimentos passam por processamento térmico durante sua preparação, devido ao contato direto com os gases de combustão. Ou ainda, podem ocorrer contaminação desses compostos em alimentos crus (frutas e vegetais) através da via ambiental, pois a presença de HPA's no solo e no ar pode ser significativa, principalmente quando os vegetais estão crescendo ao lado de fontes industriais ou áreas com tráfego intenso. Da mesma forma, a contaminação de HPA's pela água também têm contribuição para ingestão humana pela ingestão de organismos aquáticos (contaminação direta) ou pela absorção de água por alimentos que foram higienizados com águas poluídas (contaminação indireta). Além dessas, existe ainda contaminação por óleo mineral, que são bastante utilizados na indústria alimentícia como agentes lubrificantes, podendo contaminar acidentalmente ou não os produtos alimentícios, assim como outras rotas de ingestão desses contaminantes, pois existem inúmeras fontes alimentares que fazem parte desse grupo, como alimentos defumados, doces, chocolates, condimentos, bebidas entre outros (BASAL; KIM, 2015; PURCARO et al., 2016). Na Figura são apresentadas algumas rotas de contaminação por HPA's em alimentos e bebidas.

Figura 3: Rotas de contaminação por HPA's em alimentos e bebidas



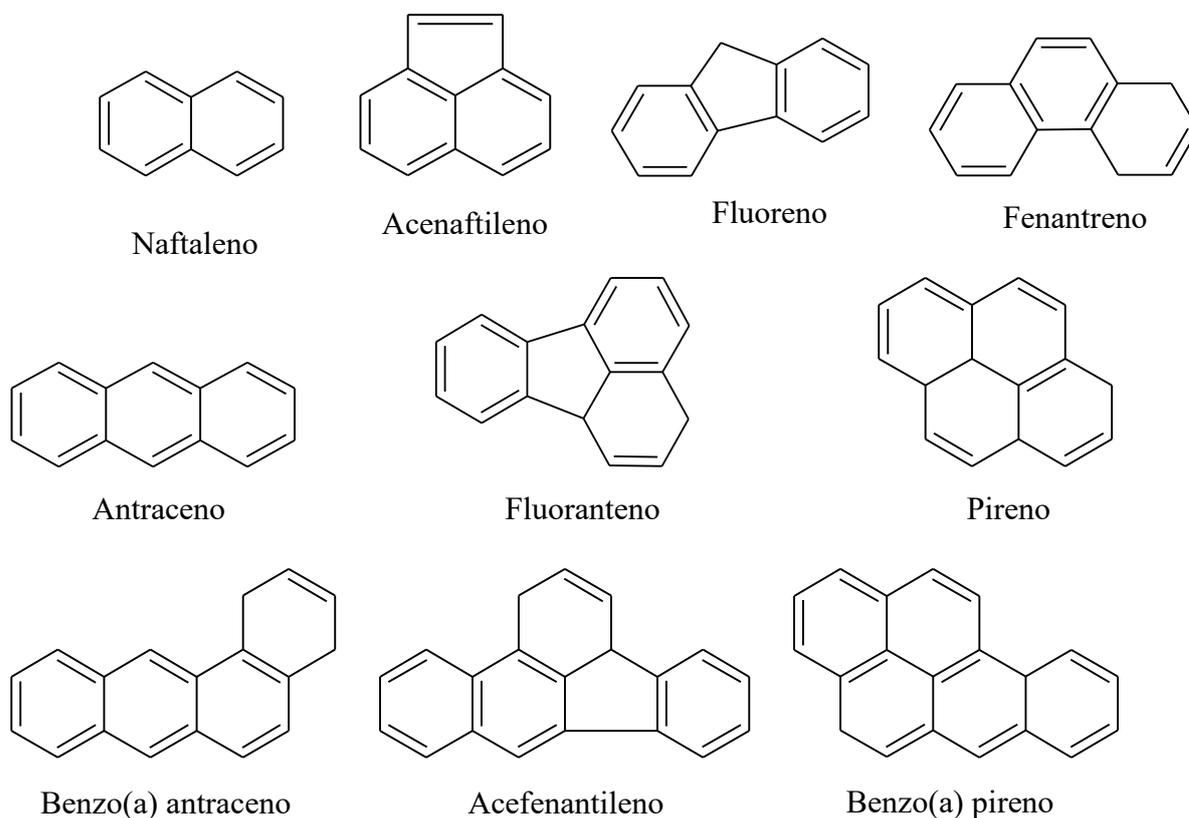
Fonte: Adaptado Basal; Kim (2015); Purcaro et al. (2016); Singh et al. (2016).

Entre as bebidas alcoólicas, as destiladas apresentam teor mais elevado para HPA's de alta massa molar (fluoranteno, benzo(a)antraceno, benzo pireno, entre outros). Dentre os dezesseis HPA's que já foram encontrados em cachaças, o naftaleno, fenantreno, acenaftileno, criseno e fluoranteno são os mais encontrados. A existência desses compostos pode ser proveniente da localização da cultura, contaminações na etapa de processamento, tais como o uso de lubrificantes nos equipamentos, como moendas, tanques revestidos com resinas asfálticas, pelo caramelo adicionado à bebida para corrigir a cor das bebidas envelhecidas, durante a maturação em tonéis de madeira tratados termicamente e recipientes inadequados de armazenamento, como bombonas de polietileno (BASAL; KIM, 2015 ; BETTIN ; FRANCO, 2005; CARUSO et al.,2010; MACHADO,2014; PURCARO et al.,2016 ; ALCARDE, 2017).

Os HPA's são formados somente por átomos de carbono e hidrogênio, contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados. Esses compostos são produzidos por atividades antropogênicas, principalmente pela queima incompleta de matéria orgânica (madeira,

combustíveis fósseis, óleo e gás) (DRESH et al., 2011; GARCIA et al., 2014). O Quadro 2 representa as fórmulas estruturais dos HPA's estudados.

Quadro 2: Fórmulas estruturais dos HPA's estudados



Fonte: Do autor

Sólidos em temperatura ambiente, os HPA's são os menos voláteis dos hidrocarbonetos, fatores como temperatura e pressão influenciam diretamente na concentração formada desses contaminantes. Além de altamente tóxicos, esses compostos são de natureza semi-não-volátil, não biodegradáveis, ambientalmente persistentes, estruturados e apresentam elevada atividade mutagênica e carcinogênica (DRESH et al., 2011; GARCIA et al., 2014; PURCARO et al., 2016). Esses efeitos crescem sincronicamente com o aumento do número de anéis aromáticos condensados. Os HPA's de baixa massa molar (dois, três, ou quatro anéis aromáticos) apresentam significativa toxicidade e estão presentes no ambiente em forma de vapor, enquanto os hidrocarbonetos de elevada massa molar (cinco, seis anéis), além de serem tóxicos e mutagênicos, geralmente são adsorvidos em pequenas partículas orgânicas. A elevada massa molar e a ausência de grupos substituintes polares fazem com que esses compostos

apresentem maior insolubilidade em água; porém, a participação de detergentes e matéria orgânica propiciam a formação de emulsões. Ao serem inseridos no corpo humano, por inalação, ingestão ou através da pele, proliferam-se pelo organismo por meio de qualquer rota e são encontrados em praticamente todos os órgãos internos, principalmente naqueles ricos em lipídeos, ocorrendo a metabolização e, posteriormente a excreção pela urina (CARDOSO et al., 2013).

A baixa solubilidade relativa em água e solventes orgânicos, representada pelo Coeficiente de partição Octanol água ($\log K_{ow}$), interfere diretamente no deslocamento e distribuição de HPA's entre o ambiente e aderência nos organismos vivos (PURCARO et al., 2016). No Quadro 3 apresentam-se os HPA's utilizados como marcadores em alimentos e suas propriedades físico-químicas.

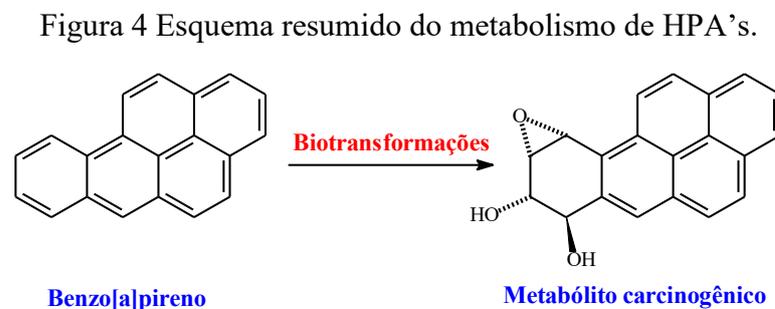
Quadro 3- Propriedades físico-químicas dos HPA's encontrados em alimentos.

HPA's ^a	Siglas	MM (g/mol) ^b	Solubilidade em água	
			a 25 °C ($\mu\text{g/L}$) ^c	Log K _{ow}
Pireno	P	202	133	4,88
Acenafteno	Acte	154	-	3,98
Acenaftileno	Acti	152	3420	4,07
Antraceno	Ant	178	59	4,5
Fluoreno	Flu	166	800	4,18
Naftaleno	Naf	128	12500-34000	3,37
Fenantreno	Fen	178	435	4,46
Fluoranteno	Flut	202	260	4,90
Benzo(a)antraceno*,c	BaA	228	11	5,63
Benzo(b)fluoranteno*,c	BbFlu	252	2,4	6,04
Benzo(j)fluoranteno*	BjFlu	252	2,4	6,21
Benzo(k)fluoranteno*	BkFlu	252	0,8	6,11
Benzo(ghi)perileno	BgPe	276	0,3	6,78
Benzo(a)pireno *,c	BaP	252	3,8	6,06
Criseno*,c	Cri	228	1,9	5,63
Ciclopenta(c,d)pireno	CPP	226	33,52	5,70
Dibenzo(a,h)antraceno*	DahA	278	-	-
Dibenzo(a,e)pireno*	DaeP	302	0,24	7,71
Dibenzo(a,i)pireno*	DaiP	302	0,5	7,28
Dibenzo(a,l)pireno*	DalP	302	0,24	7,71
Indeno(1,2,3-c,d) pireno*	IcdP	276	-	6,58
5-Metilcriseno*	5MeCri	242	-	-
Benzo(c)fluoreno	BcFlu	216	-	-

^ahidrocarboneto policíclicos aromaticos ^bmassa molar ^cHPA's utilizados como marcadores para analise em alimentos * hidrocarbonetos comprovadamente cancerigenos pelo JECFA. **Fonte:** adaptado de (GARCIA et al., 2014; PURCARO et al., 2016).

O metabolismo desses compostos nos seres vivos é bastante complexo. Frequentemente, são convertidos em epóxidos, os quais, seguidamente, são convertidos em fenóis, diois e triois, podendo ser conjugados com ácido glucorônico ou glutadiona. Apesar de a maior parte do

metabolismo resultar em detoxificação, alguns HPA's são ativados sintetizando espécies de DNA - ligantes, especialmente diolépidos e, posteriormente, compostos poli-hidroxilados que possuem maior solubilidade em água, o que facilita a eliminação pela via urinária. Um dos intermediários formados pode reagir com a guanina do DNA, formar um aduto e forçar a célula a erros na replicação do DNA, começando o processo mutagênico. Os HPA's podem formar tumores em locais de contato, bem como longe dele, e o potencial carcinogênico do composto pode sofrer variação, dependendo da rota de exposição. As deduções de risco associado aos HPA's e suas misturas são feitas com base em estimativas de exposição e em resultados de estudos epidemiológicos (CARDOSO et al., 2013). Na Figura 4, verifica-se o esquema resumido do metabolismo dos HPA's em seres vivos.



Fonte: Adaptado de Barbosa (2004).

Anteriormente, o BaP era utilizado como marcador de contaminação, representando a ocorrência de outros HPA's cancerígenos, além de estabelecer os limites para esse composto em alguns alimentos, já que é um dos compostos mais nocivos à saúde. Recentemente, foi realizada uma nova avaliação pela *European Food Safety Authority* (EFSA, 2008) a respeito do BaP e foi concluído que um somatório de 4 HPA's (BaA, Cri, BaP e BkFlu) seria mais adequado como indicador da presença de HPA's. Essa substituição visa a assegurar a possível detecção de HPAs em amostras nas quais o BaP não consiga ser detectado, aumentando a segurança alimentar. O monitoramento biológico da exposição a esses compostos pode ser realizado por meio da sua avaliação em forma de mistura ou individualmente, pela determinação da concentração de seus metabolitos em fluidos biológicos ou por acompanhamento de um efeito bioquímico resultante de sua presença no organismo. Geralmente, as técnicas cromatográficas são utilizadas para o monitoramento de HPA's e fazem a utilização da detecção por fluorescência e imuno ensaio. Existem alguns países com legislações bastante completas, incluindo diferentes grupos de alimentos e água para um número diversificado de HPA's. Porém, outras legislações não são tão específicas, como o Brasil, contendo apenas portarias e

resoluções normativas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para benzo(a)pireno em alimentos defumados ($0,03 \mu\text{g}/\text{Kg}$), água envasada e gelo ($0,7 \mu\text{g}/\text{L}$) e azeite de oliva ($2,0 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Anvisa, 2003,2005,2007 ; GARCIA et al., 2014).

A gravidade dos efeitos causados no organismo à exposição dos HPA's faz com que sejam desenvolvidas metodologias analíticas capazes de identificar e quantificar esses compostos tóxicos. Em alimentos e bebidas, esses contaminantes podem ser analisados principalmente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ou por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS), e as extrações são comumente realizadas por Extração em fase sólida (SPE) ou Extração líquido-líquido (LLE) (DÓREA et al.,2008; RIACHI et al.,2014).

2.6 Embalagens

As embalagens utilizadas para envase de bebidas devem possuir algumas características básicas, como ser esteticamente agradável, possuir dimensões e formas funcionais, conter o alimento de forma conveniente e sem vazamentos, abrir de forma simples, fechar com segurança, além de proporcionar fácil descarte, reciclagem ou reutilização. Essas embalagens possuem funções de contenção, proteção, comunicação e conveniência (FELLOWS, 2006).

É importante também que o design da embalagem satisfaça às exigências da legislação com relação à rotulagem, visto que embalagens e rótulos são primordiais na escolha do produto durante a compra, pois são o primeiro contato entre o consumidor e o produto (FELLOWS, 2006; CARNEIRO,2007). Além disso, a escolha da embalagem pode afetar a sua qualidade, uma vez que pode alterar suas características. Por isso, a melhor embalagem é aquela que menos interfere nas características sensoriais do produto, dentre as quais, as mais utilizadas para líquidos são as de vidro e as de politereftalato de etileno (PET) (HOLANDA et al.,2015).

Para acondicionamento de cachaças, vários materiais podem ser utilizados. Os recipientes novos conferem boa aparência e uniformidade ao produto; por isso, devem ter prioridade. Além disso, para sua utilização, necessitam apenas de um pré-enxágue com água potável sob pressão e um suporte de escoamento antes do envase, o que não ocorre com as embalagens retornáveis, que exigem um sistema mais trabalhoso, como a implantação de um sistema de lavagem a quente (VEIGA, 2013).

2.6.1 Embalagens poliméricas e suas interações

Certamente, os materiais poliméricos, normalmente chamados plásticos, ocupam lugar de destaque quando se fala em embalagens de alimentos. Existem inúmeras razões para isso,

uma vez que esses recipientes são leves, inquebráveis, podendo ser fabricados em diferentes formatos, cores e espessuras, ou ainda combinados com outros plásticos ou outros materiais, para aprimorar as propriedades que um material exclusivo não possa atingir. Porém, juntamente com esses atraentes atributos, existem outras desvantagens, que tornam a escolha do plástico apropriado para embalagem de alimentos uma decisão crítica (NERIN,2016).

Frequentemente, alimentos armazenados em materiais plásticos estão sujeitos à interação da embalagem com o alimento, e essa interação pode influenciar a vida-útil e favorecer a migração de monômeros, agentes catalisadores, solventes residuais da polimerização, laminação e/ou impressão ou aditivos da composição dos polímeros e/ou ainda impurezas para o alimento durante o armazenamento. Esses materiais não são inertes, pois ocorre contato direto entre embalagem e produto, podendo haver transferência de compostos solúveis ou móveis para alimentos e bebidas, decorrente do gradiente de concentração dessa substância entre o material da embalagem utilizado e o produto armazenado (SARANTÓPOULOS et al., 2001). Substâncias de baixa massa molar apresentam alta mobilidade em materiais plásticos, quando comparados com macromoléculas, e possuem capacidade de migrar da embalagem para o alimento (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

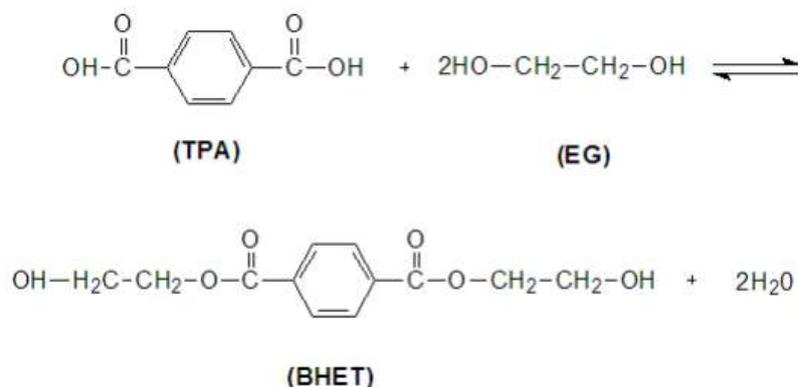
A presença de compostos ativos quimicamente na superfície dos polímeros pode ser prejudicial, caso migrem para os produtos, pois atuam como catalisadores de reações de deterioração. Esses compostos, na maioria das vezes, são adicionados a poliolefina, por serem frequentemente oxidadas a elevadas temperaturas de extrusão (maiores que 300 °C) e/ou tratamento da corona, transformação na superfície do material da embalagem, que permite maior adesão de materiais, como tintas, vernizes e adesivos. Como resultado, tem-se o desenvolvimento de grupos carbonila e outros produtos de oxidação, que podem migrar para os alimentos e/ou nos espaços livres da embalagem, tornando mais rápidas algumas reações no alimento. No entanto, em alguns casos, a migração pode trazer benefícios, como no caso dos antioxidantes adicionados à poliolefina, que migram dos polímeros para os alimentos, dificultando a oxidação (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

De acordo com estudos realizados por Rungchang et al. (2013) e Sarantópulos et al. (2001), a migração de compostos das embalagens PET para bebidas pode ser influenciada por inúmeros fatores, como tempo de armazenamento, temperatura, concentração do migrante no polímero, tipo e natureza do migrante e bebida, e a solubilidade do migrante na mesma. E essa transferência pode introduzir ao risco de toxicidade e/ou formação de *off flavours* (odores e sabores estranhos) à bebida, prejudicando a qualidade do produto.

2.6.2 Poli Tereftalato de Etileno

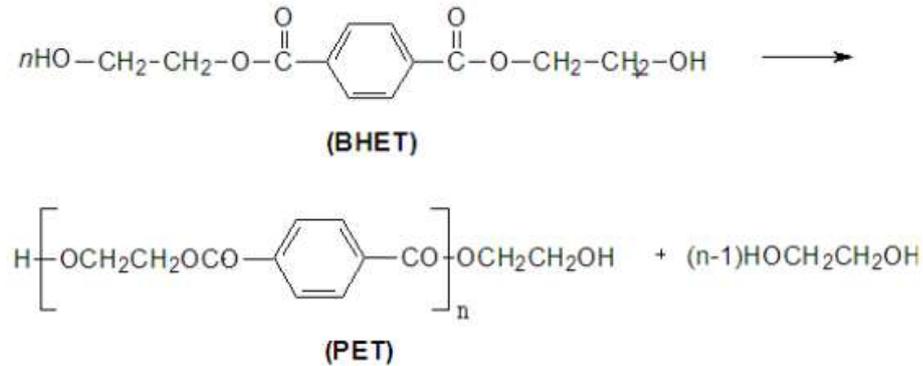
A descoberta do Politereftalato de Etileno (PET), ocorreu em 1928 nos laboratórios de Dupont. O PET é um poliéster saturado formado em três etapas: a pré-polimerização, a policondensação e a polimerização no Estado sólido. A pré polimerização é a etapa em que é formado o precursor do PET, o bis-2-hidroxiethyltereftalato, conhecido por BHET. Essa etapa pode ser realizada por duas vias: por esterificação direta do ácido tereftálico (TPA) e do etileno glicol (EG); ou por transesterificação do dimetil tereftalato (DMT) e do etileno glicol. Na etapa de policondensação é que o PET realmente é sintetizado a partir dos oligômeros obtidos no primeiro estágio, a reação continua a temperaturas mais altas e o EG é removido continuamente sob vácuo crescente, de acordo com o andamento da reação. Para finalizar, os produtos fabricados por injeção-sopro necessitam, como matéria-prima, de uma resina de PET com alta massa molar. Para isso, o polímero obtido na etapa de policondensação é submetido ao processo adicional de policondensação no Estado sólido, em que a massa molar é elevada sob alta temperatura (maior que a temperatura de transição vítrea e menor que a temperatura de fusão por um período entre 10 e 30 h) para que as partículas do polímero se mantenham em um Estado amorfo (WIEBECK; HARADA, 2005; SOARES JÚNIOR,2010). Na figura 5 e 6 retratam-se as etapas de pré-polimerização e policondensação na produção de embalagens PET, respectivamente.

Figura 5 Etapa de pré-polimerização por esterificação



Fonte: Adaptado de Soares Júnior (2010).

Figura 6 Etapa de policondensação na produção de embalagens PET



Fonte: Adaptado de Soares Júnior (2010).

Os polímeros utilizados para moldagem por injeção ou extrusão podem apresentar estrutura amorfa ou cristalina. O polímero que produz peças com estrutura amorfa é, em geral, bastante puro e possui alta massa molar, boa resistência a impactos e transparência, baixa tendência à cristalização, mas não deve ser exposto a temperaturas superiores a 50 °C. O polímero para peças altamente cristalinas contém aditivos, como agentes nucleantes e são materiais que possuem elevada resistência mecânica, dureza superficial, para aplicação em peças injetadas. O PET é um polímero que necessita de processamento posterior para permitir a sua correta transformação, seja por extrusão, seja por injeção ou outros. As principais etapas são: secagem, desumidificação e cristalização (WIEBECK; HARADA, 2005).

Em razão de suas propriedades físico-químicas, principalmente transparência e inflexibilidade em vidro, o PET é amplamente aplicado na indústria de alimentos e bebidas. Porém, para os produtos fabricados a partir das substâncias PET (como: ácido tereftálico, ácido isoftálico, éster dimetílico do ácido isoftálico, etileno (e/ou) dietilenoglicol), compostos podem migrar para os alimentos e causar riscos para a saúde humana. O PET também pode sofrer alterações, como: degradação térmica, resultando na formação de acetaldeído, que pode afetar as características organolépticas dos alimentos embalados, mudando o sabor e aroma dos produtos (WIACEK et al., 2017).

Machado et al. (2014) citam que a migração de compostos nocivos à saúde humana provenientes de recipientes de plástico, inclusive os de polietileno, podem ser fontes de HPA's na cachaça. Porém, ainda não existem dados na literatura específicos sobre a presença desses contaminantes em cachaças armazenadas em embalagens PET.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

As amostras foram obtidas de cinco produtores do Estado de Minas Gerais e encaminhadas ao Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardentes (LAQA), do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) para a realização das análises físico-químicas e cromatográficas. As embalagens PET, com capacidade de 500 mL, foram adquiridas de três fábricas diferentes fornecedoras para cachaçarias do Brasil.

3.2 Separação das amostras e armazenamento

Após a obtenção das amostras, elas foram separadas para as análises físico-químicas (Tabela 1) e para as análises de identificação e quantificação de HPA's (Tabela 2).

Tabela 1 Separação das amostras por embalagens para análise físico química.

Tempo	Embalagens	Amostras dos 5 produtores				
		MAZ	VF	JAC	BP	RC
T₀	SA	SA	SA	SA	SA	SA
T_f	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}
	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}
	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}

*T₀ = Tempo zero de armazenamento; T_f = Tempo final (8 meses em embalagens de plástico). **SA = sem armazenamento; E₁ = embalagem plástica 1; E₂ = embalagem plástica 2; E₃ = embalagem plástica 3.

Fonte: Do autor.

Tabela 2 Separação das amostras por embalagens para identificação e quantificação de HPA's.

Tempo	Embalagens	Amostras dos 5 produtores				
		MAZ	VF	JAC	BP	RC
T₀	SA	SA	SA	SA	SA	SA
T_i	E ₁	E ₁	E ₁	E ₁	E ₁	E ₁
	E ₂	E ₂	E ₂	E ₂	E ₂	E ₂
	E ₃	E ₃	E ₃	E ₃	E ₃	E ₃
T_f	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}	E _{1.1}
	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}	E _{2.1}
	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}	E _{3.1}

T₀ = Tempo zero de armazenamento; T_i = Tempo inicial (4 meses em embalagens de plástico); T_f = Tempo final (8 meses em embalagens de plástico). SA = sem armazenamento; E₁ = embalagem plástica 1; E₂ = embalagem plástica 2; E₃ = embalagem plástica 3.

Fonte: Do autor.

Para a realização das análises, as marcas de cachaça foram separadas de modo que uma alíquota foi destinada às análises iniciais SA (Sem o armazenamento nas embalagens plásticas - PET), e o restante armazenado em 3 diferentes marcas de embalagens PET com capacidade de 500mL (E₁, E₂ e E₃), sendo T_i (4 meses de armazenamento) e T_f (8 meses de armazenamento). As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras SA e no tempo T_f e as análises cromatográficas para identificação e quantificação de HPA's realizadas em SA, T₀, T_i e T_f.

Após o acondicionamento das cachaças nos recipientes PET, elas foram mantidas em um local exposto à luz, assemelhando-se aos locais de exposição e venda de cachaças existentes.

3.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas das amostras foram realizadas conforme as especificações estabelecidas pela Instrução Normativa nº 24, de 8/9/2005 do Mapa (BRASIL, 2005). Inicialmente foi realizado o exame organoléptico e, em seguida, os parâmetros estudados foram grau alcoólico, extrato seco, acidez volátil, aldeídos, ésteres, cobre, furfural, 5-hidroxi metilfurfural, metanol, álcoois superiores e carbamato de etila. As metodologias empregadas para as análises estão especificadas a seguir.

3.3.1 Exame organoléptico

Foi observado o aspecto geral da bebida, como ausência de elementos estranhos que não faziam parte das características do produto, avaliando coloração, limpidez e todos aspectos visuais relevantes para a determinação da qualidade da mesma.

3.3.2 Grau alcoólico

Após destilação, o grau alcoólico foi determinado utilizando um densímetro eletrônico Densi Mat Gibertini, a 20 °C, e os resultados, expressos em porcentagem em volume (%v/v).

3.3.3 Extrato Seco

A análise de extrato seco foi realizada por meio de métodos gravimétricos, transferindo uma alíquota 25 mL da amostra para a cápsula e, posteriormente, passando por evaporação em banho-maria por 3 horas, sendo a primeira hora a 90 °C e o tempo restante a 95 °C. Após esse período, a amostra foi levada à estufa a 100°C, por 30 minutos e, em seguida, foi resfriada em um dessecador. O resíduo sólido restante foi pesado em balança analítica (Marte/ AM - 220).

3.3.3 Acidez volátil

A acidez volátil foi determinada por extração dos ácidos voláteis, utilizando o aparelho Destillatore Elettronico Enochimico Gibertini, que se fundamenta na técnica de arraste a vapor de água. O extrato obtido passou por destilação e, posteriormente, por titulação por meio de métodos ordinários com hidróxido de sódio 0,1 mol/L⁻¹ na presença de fenolftaleína 1%. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de ácido acético por 100 mL de álcool anidro.

3.3.4 Aldeídos

A determinação da concentração de aldeídos foi efetuada por meio de métodos iodométricos, titulando-se o SO₂ 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.

3.3.5 Ésteres

A determinação dos ésteres foi realizada por titulação dos ácidos carboxílicos obtidos pela transesterificação dos ésteres presentes nas amostras. A quantificação foi realizada com base na hidrólise alcalina deles e posteriormente, a titulação dos ácidos liberados com a solução

padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol/L⁻¹. Os valores encontrados foram expressos em miligramas de acetato de etila a cada 100 mL de álcool anidro.

3.3.6 Cobre

Para a quantificação do cobre, foram realizadas medidas espectrofotométricas a 546 nm na região visível do espectro, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. As quantidades de cobre foram determinadas por meio de comparação das absorbâncias observadas nas amostras de cachaça com os valores de absorbância obtidos de uma curva analítica previamente construída, utilizando-se como padrão primário sulfato de cobre.

3.3.8 Análises Cromatográficas

3.3.8.1 Furfural e Hidroximetilfurfural

O furfural e hidroximetilfurfural foram identificados e quantificados por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector arranjos de diodos (DAD), seguindo a metodologia de Souza et al., (2009) e Santiago et al., (2017) com pequenas modificações.

Os compostos referentes à fase móvel foram de grau analítico para cromatografia metanol (Merck), ácido acético glacial (J.T.Baker) e água obtida de um sistema Milli-Q.

A identificação desses compostos foi realizada por comparações de seus respectivos tempos de retenção, com os tempos de retenção obtidos utilizando os padrões puros desses compostos. A quantificação foi realizada utilizando o método de padronização externa, por comparações das áreas dos picos obtidos nas amostras de cachaça com os valores de áreas referentes à curva analítica previamente construída a partir da diluição da solução-estoque anteriormente preparada, alcançando concentrações de 0,1 a 25 mg L⁻¹.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo da marca Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-6AD, degaseificador modelo DGU-20A3, interface modelo CBM-20A e injetor automático com amostrador modelo SIL-10AF. A coluna utilizada para as separações foi Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDBC18 (4,6 x 12,5 mm, 5µm) e o detector utilizado foi o de arranjo de diodos (DAD). Os solventes utilizados como fase móvel foram: solução de ácido acético 2% em água (Solvente A) e metanol:água:ácido acético (70:28:2% v/v/v) (Solvente B). As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente de 0 a 25 min (00-40% B); 25 a 40 min (40 a 55% B); 40 a 43 min (55-60% B); 43 a 50 min (60-100% B); 50 a 55 min (100-00%); 55 a 60 min (00-00%B). O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

As amostras e padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45 μm (Millipore) e, posteriormente, injetados diretamente no sistema cromatográfico. As injeções foram realizadas em triplicata, tanto das amostras quanto dos padrões.

3.3.8.2 Metanol e Álcoois superiores

A identificação e quantificação de metanol e álcoois superiores foram realizados em um cromatógrafo gasoso Perkin Elmer (Clarus 580), autoamostrador com detector de ionização de chama e coluna DB-WAX (30 mm x 0,25 mm x 0,25 μm), seguindo a metodologia proposta por Vilela et al. (2007), com modificações.

Os padrões utilizados foram da marca Merck e de grau analítico para cromatografia. A partir de uma solução com concentração de 4 gL^{-1} em etanol 40%, a curva analítica foi preparada. Anteriormente à injeção das amostras, elas passaram por destilação simples. No decorrer da análise, a temperatura da coluna iniciou em 35°C, aumentando-se até 140°C, por um minuto, o injetor com temperatura de 150°C e o detector 170°C. Durante a análise, o fluxo foi de 1,4 mL por minuto no modo Split 1:10.

3.3.8.3 Carbamato de Etila

Utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a determinação de carbamato de etila (CE), de acordo com a metodologia proposta por Anjos et. al (2011), Machado et. al. (2013) e Santiago et.al. (2017). Os reagentes utilizados para as análises foram padrão de carbamato de etila (Acros Organics), etanol, álcool propílico, ácido clorídrico (HCl), acetato de etila, acetato de sódio, acetonitrila grau cromatográfico (Merck), água obtida de um sistema Milli-Q e 9-xantidrol (Acros Organics).

O cromatógrafo utilizado foi o mesmo das especificações mencionadas anteriormente, com detector de fluorescência (DFL), modelo RF-10AXL. As separações ocorreram em uma coluna Agilent – Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna Agilent – Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 12,5 mm, 5 μm). A padronização externa foi realizada para quantificação do contaminante. A solução-estoque de 10,0 mg L^{-1} de concentração foi preparada a partir do carbamato de N-xantil de etila (CNXE) em acetato de etila. Essa solução foi armazenada sob refrigeração, em frasco âmbar e envolvido em papel-alumínio, para evitar degradação pela luz. A solução-estoque foi utilizada na preparação das soluções de trabalho, que foram obtidas por diluição em álcool 50%. Na construção da curva analítica, foram utilizados oito pontos na faixa de 15,0 – 160,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os comprimentos de onda de excitação e emissão empregues foram 233 e 600 nm, respectivamente.

Antes de proceder à injeção das amostras, foi necessário realizar o processo de derivação delas, adicionando-se 4 mL de amostra de aguardente em frasco âmbar, seguido por adição de 0,8 mL de solução propanólica de 9-xantidrol 0,02 mol L⁻¹. Após suave agitação, adicionou-se 0,4 mL de ácido clorídrico 1,5 mol L⁻¹ e agitou-se por um minuto. Após essa etapa, a mistura reacional foi mantida em repouso por 60 minutos e, em seguida, foi filtrada em membranas de polietileno 0,45 µm (Millipore).

3.4 HPA's em cachaças

Os HPA's, foram identificados e quantificados por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector arranjos de diodos (DAD), seguindo a metodologia de Bettin; Franco (2005) e Machado et al (2014) com modificações propostas neste trabalho. A identificação desses compostos foi realizada por comparações de seus respectivos tempos de retenção, com os tempos de retenção obtidos utilizando os padrões puros desses compostos. A quantificação foi realizada utilizando o método de padronização externa, por comparações das áreas dos picos obtidos nas amostras de cachaça, com os valores de áreas referentes à curva analítica previamente construída com a utilização do padrão, para cada composto analisado, nas concentrações de 10 a 500 µg L⁻¹.

Foram realizados procedimentos para validação dos métodos para garantir a qualidade analítica dos resultados obtidos.

As análises dos 10 HPA's estudados foram realizadas em cromatógrafo com as mesmas especificações mencionadas anteriormente. Para as separações, foi utilizada coluna Agilent HX891706 (4,6 x 250 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent HX891706 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm), por detecção de arranjo de diodos (DAD). Os solventes utilizados como fase móvel foram: água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B). As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente de 0 a 3 min (50-50%); 3 a 10 min (50 a 100%); 10 a 35 min (100-100%); 35 a 40 min (100 a 50%). O comprimento de onda utilizado foi de 254 nm, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

Inicialmente, os padrões de HPA's de pureza analítica (Merck e Sigma-Aldrich) naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a) antraceno, acefenantileno e benzo(a) pireno utilizados foram pesados e uma solução-estoque contendo 10 HPA's com 1000 µg L⁻¹ de concentração foi preparada. Em seguida, foram realizadas diluições em acetato de etila, com variações de 10, 20, 25, 50, 75, 100, 250 e 500 µg L⁻¹, para construção da curva analítica.

O processo de extração nas amostras foi realizado empregando a técnica de Extração em fase sólida (SPE), utilizando um Manifold coletor Sampli Q12 Agilent, em que amostras passaram por cartuchos 500 mg/ 6mL (ODS-5 Octadecyl; 18% EC - Whatman).

Cada cartucho foi ativado com 5,0 mL de diclorometano, 5,0 mL de metanol e 5,0 mL de água Milli-Q, respectivamente. Após o condicionamento, alíquotas de uma solução de 50,0mL da amostra e 10 mL de acetonitrila passaram através deles. Em seguida, o acetato de etila foi utilizado para a eluição dos analitos. Ao final, o extrato obtido foi concentrado em rotavapor Buchi R-114 a 50 °C, e o volume final ressuspendido em 1,0 mL com acetato de etila (MACHADO et al.,2014).

Para assegurar que um novo método analítico ou que a adaptação ou implementação de um método conhecido gere informações confiáveis, interpretáveis e apropriados ao uso pretendido, ele deve passar pelo processo de avaliação denominado validação. A validação é formada por uma série de procedimentos que se inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o desenvolvimento e transferência, de forma documentada e mediante critérios objetivos (BRITO et al., 2003; RIBANI,2004; LANAGRO,2014; ANVISA,2017).

Neste trabalho, está sendo proposta a validação da extração e quantificação de HPA's presentes nas amostras avaliadas, por extração em fase sólida (SPE) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), mediante procedimentos de validação propostos pela Anvisa, RDC n°166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA,2017), em que os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade de se obter respostas analíticas proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Dessa forma, é realizada uma relação matemática expressa em uma equação da reta, denominada curva analítica entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse, determinada a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Para a realização da curva, devem ser preparadas soluções com pelo menos cinco concentrações diferentes do composto de interesse, preparadas em triplicata, em que são calculados os coeficientes de regressão a e b, coeficiente de correlação r (acima de 0,990) e de determinação r^2 (significativamente diferente de zero) (RIBANI,2004; ANVISA,2017).

A precisão demonstra a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, podendo ser expressa em três diferentes níveis:repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade (RIBANI,2004; ANVISA,2017).

Neste trabalho, a precisão foi expressa em repetitividade, no qual ele é demonstrado calculando o coeficiente de variação das medições realizadas, conforme a fórmula: $CV (\%) = (s/x) * 100$, em que, s é o desvio padrão e x é a concentração média determinada. Na qual, normalmente métodos que quantificam compostos em macroquantidades requerem CV de 1 a 2% e métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI,2004).

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade de um analito possível de ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado (LANAGRO,2014; ANVISA,2017). A determinação do LD foi baseada na curva analítica, conforme a equação: $LD = 3,3 * (s/S)$, em que, s é a estimativa do desvio padrão da resposta e S, o valor do coeficiente angular da curva analítica (RIBANI,2004).

Expressos em concentração, o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito analisado passível de ser quantificada utilizando determinado procedimento experimental. (RIBANI,2004; ANVISA,2017). A determinação do LQ foi baseada na curva analítica, conforme a equação: $LQ = 10 * (s/S)$, sendo s é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão e S, é valor do coeficiente angular da curva analítica (RIBANI,2004).

O parâmetro de exatidão é obtido por intermédio da concordância entre os resultados específicos do método utilizado em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA,2017).

Neste estudo, foi utilizado para determinar a exatidão os ensaios de recuperação (R), que é estabelecida pela quantidade de substância de interesse passível de ser quantificada, existente ou adicionada na porção analítica do material teste (RIBANI,2004).

A determinação dos ensaios de recuperação pode ser calculada conforme a equação, **Recuperação = [(Concentração média experimental) / (Concentração teórica)] * 100**. Para análises de resíduos, os intervalos de recuperação aceitáveis estão entre 70 e 120%, com precisão de $\pm 20\%$. Porém, de acordo com a complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50% a 120%, com precisão de $\pm 15\%$ (RIBANI,2004).

4. Análise Estatística

4.1 Análise de Variância

Empregou-se o 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 Schott Knott, ao nível de 95% de confiança, usando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

4.2 Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquico

A análise das componentes principais (PCA) foi utilizada para averiguar e compreender a similaridade entre as amostras e a análise de agrupamento hierárquico (HCA) para interligar as amostras por suas associações quanto aos parâmetros embalagem e tempo de armazenamento. Os resultados foram centrados em médias, para posterior análise, utilizando o programa CHEMOFACE (NUNES et al., 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químico

Os resultados das análises físico-químicas das cachaças armazenadas em recipientes de vidro e em três tipos de embalagens PET estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados das análises físico químicas

AMOSTRAS		PARÂMETROS													
		Extrato (g)	Grau (%v/v)	Acidez (mg em 100mL)	Cobre (mgL ⁻¹)	Aldeído (mg em 100mL)	Éster (mg em 100mL)	Furf (mg em 100mL)	Furf+ Hmf	Metanol (mg em 100mL)	Álcoois superiores (mg em 100mL)	Álcool butílico (mg em 100mL)	Álcool sec-butílico (mg em 100mL)	Carbamato de Etila (µgL ⁻¹)	
M A Z	T ₀	SA	0,38b	49,05c	29,52a	0,19b	12,72c	10,95c	7,00a	7,84a	6,54a	160,76a	0,96c	ND	ND
		E _{1.1}	0,38b	49,36b	24,72b	0,23 ^a	15,69a	18,31a	6,67b	7,53b	2,04b	140,30b	1,02a	0,26a	ND
	T _f	E _{2.1}	0,38b	49,54a	26,17b	0,22 ^a	15,63a	9,12c	6,52b	7,37b	2,03b	140,28b	1,02a	0,26a	ND
		E _{3.1}	0,40a	49,56a	26,16b	0,23 ^a	15,06b	14,21b	6,42b	7,24b	2,03b	139,83b	1,00b	0,26a	ND
V F	T ₀	SA	0,05a	43,19c	56,98a	1,84 ^a	16,51c	49,92a	0,64a	0,64a	6,48a	165,23a	0,90a	ND	ND
		E _{1.1}	0,05a	43,58b	51,63b	1,86 ^a	17,38b	14,51b	0,61a	0,61a	3,91b	151,00b	0,89a	0,30a	ND
	T _f	E _{2.1}	0,04a	43,85a	51,31b	1,12b	19,31a	8,24c	0,57b	0,57b	3,85b	150,77b	0,89a	0,30a	ND
		E _{3.1}	0,06a	43,60b	51,60b	1,10b	15,97c	8,29c	0,59b	0,59b	3,80b	151,23b	0,88a	0,30a	ND
J A C	T ₀	SA	0,17a	40,23b	120,54a	0,66b	11,91b	137,67a	1,14a	1,14a	6,98a	156,65a	0,30b	ND	ND
		E _{1.1}	0,08b	40,22b	113,79b	0,75 ^a	12,88a	93,85b	1,21a	1,21a	2,51b	148,97c	0,41a	0,32a	ND
	T _f	E _{2.1}	0,09b	40,12c	115,95b	0,65b	12,23b	42,80c	1,16a	1,16a	2,51b	152,59b	0,40a	0,32a	ND
		E _{3.1}	0,11b	40,45 ^a	118,78a	0,71 ^a	13,08a	22,33d	1,09a	1,09a	2,49b	151,64b	0,40a	0,32a	ND
B P	T ₀	SA	0,054a	44,63b	21,09b	0,89b	8,49d	20,18a	1,44a	1,44a	9,73a	214,43a	0,53b	ND	ND
		E _{1.1}	0,055a	44,69 ^a	23,89a	0,68c	9,72b	20,22a	1,41a	1,41a	3,05b	195,66c	0,59a	0,29a	ND
	T _f	E _{2.1}	0,02b	44,56c	23,96a	0,94 ^a	9,13c	10,86c	1,39a	1,39a	3,12b	195,37c	0,59a	0,29a	ND
		E _{3.1}	0,006b	44,75 ^a	23,86a	0,86b	14,69a	16,16b	1,41a	1,41a	3,19b	199,61b	0,59a	0,29a	ND
R C	T ₀	SA	0,084c	42,90 ^a	94,49c	0,89 ^a	11,95a	88,71a	1,36a	1,36a	10,93a	147,20b	0,40c	1,32c	ND
		E _{1.1}	0,26a	40,43b	146,48b	0,87 ^a	13,09a	68,32b	1,34a	1,34a	2,49b	149,67b	0,44b	6,94b	ND
	T _f	E _{2.1}	0,17b	40,23d	163,05a	0,83 ^a	12,60a	33,68c	1,29a	1,29a	2,51b	156,87a	0,47a	8,38a	ND
		E _{3.1}	0,16b	40,33c	162,65a	0,88 ^a	12,98a	7,84d	1,32a	1,32a	2,50b	153,95a	0,45b	8,13a	ND

SA= Garrafa de vidro; E₁: embalagem PET da marca 1; E₂: embalagem PET da marca 2; E₃: embalagem PET da marca 3; FUR = Resultado apenas de furfural por HPLC; FURF + HMF: Furfural + 5 hidroximetilfurfural.

Pelos dados descritos na Tabela 3, observa-se que houve diferença significativa para extrato seco entre as marcas analisadas, exceto para a amostra VF. Entre as marcas que obtiveram diferença significativa, a amostra RC foi a que teve maior diferença entre as embalagens, sendo a embalagem de vidro diferente das embalagens PET's. Nas embalagens PET's, a amostra E₁ foi diferente das demais e com maior discrepância entre as concentrações. O teor de extrato seco não possui padrão na legislação; entretanto, são os extratos que ajudam na mudança da cor das bebidas destiladas envelhecidas, sendo que o ideal é que haja o mínimo de transferência possível de extratos para a bebida durante esse processo (VIANA; CALIARI; JUNIOR,2016). Isso explica por que a amostra MAZ apresentou a maior concentração para esse parâmetro, uma vez que ela foi a única amostra que passou por armazenamento em barris de carvalho recém-confeccionados, deixando-a com uma coloração levemente acentuada. A análise desse parâmetro muitas vezes é utilizada para avaliar teores de sólidos solúveis e como indicativo eventual da necessidade de determinação de açúcares redutores totais em bebidas (MIRANDA et al,2007). Em contra partida, as concentrações encontradas para a marca VF foram iguais às encontradas por Viana; Caliari e Júnior (2008), para amostras de aguardentes de cana recém-destiladas de $0,05 \pm 0,02$. Os valores de extrato seco para as amostras JAC E RC armazenadas em recipientes de vidro foram próximas daquelas encontradas pelos mesmos autores para aguardentes envelhecidas em galões de polipropileno durante 12 meses, de $0,22 \pm 0,01$ e $0,09 \pm 0,05$, respectivamente. Essas diferenças nas concentrações de extrato seco encontradas nas embalagens utilizadas podem estar relacionadas à composição das marcas de cachaças e às relações químicas entre esses compostos e os componentes das embalagens, principalmente as embalagens poliméricas. Sabendo-se que essas embalagens são compostas por aditivos, monômeros residuais, outros compostos químicos resultantes de degradação de polímeros e aditivos formados durante o processo de transformação, alguns produtos de decomposição de polímeros, que entraram em contato direto com a bebida, podem ser transferidos e eles se alterarem as concentrações de extrato seco (MACHADO,2010).

Analisando os valores de grau alcoólico das amostras, constata-se que apenas a marca, MAZ é considerada aguardente, devido à sua graduação alcóolica se apresentar acima de 48% v/v de álcool etílico a 20 °C (BRASIL,2009). Ao analisar os resultados do teste de médias, pode-se perceber que para todas as marcas houve interferência da embalagem no parâmetro analisado, sendo que para algumas marcas o teor alcoólico teve um leve aumento quando se compararam embalagens de vidro e PET, e outras diminuíram, como a amostra RC. Assim, percebe-se que esse aumento aparente do teor alcoólico observado em algumas aguardentes acondicionadas em embalagens PET provavelmente está relacionado à concentração aparente

da fração etanol, em consequência das perdas de água beneficiadas por características relativas de difusão/volatilização através da estrutura das embalagens (FORLIN, 2005). Pires et al (2012) descrevem que as perdas podem estar relacionadas com as trocas gasosas por evaporação, oxidação ou com os materiais das embalagens que permitiam que a bebida entrasse em contato com o oxigênio. Os dados corroboram com os encontrados por Correa (2001), em que foi observado um aumento no teor alcoólico em cachaças armazenadas em embalagens PET. Posteriormente, Lima e Taham (2011) observaram uma redução nesse parâmetro para amostras armazenadas nessas embalagens, que de acordo com Machado (2010) esclareceu que essa diminuição do teor alcoólico pode estar relacionada com possíveis reações de esterificação que são normais na bebida. Essas variações encontradas no comportamento de difusão e trocas de compostos de bebidas acondicionadas podem ser justificadas por diversos fatores, como a estrutura dos materiais poliméricos utilizados, a natureza da resina e estrutura molecular dos monômeros, a quantidade de camadas existentes nas embalagens PET utilizadas, a afinidade química dos compostos da bebida com os polímeros, a permeabilidade intrínseca das embalagens, bem como a temperatura e diferencial de pressão interna e externa aos recipientes (FORLIN, 2005). O teor alcoólico pode estar relacionado ao processo de fermentação, uso de leveduras adequadas no processo, controle de temperatura (≤ 32 °C) e pH ($\geq 4,0$) durante essa etapa; atenção na realização dos cortes, (cabeça, cauda e coração) durante a destilação e por recipiente utilizado para armazenamento da bebida (BORTOLETTO et al., 2018; SANTIAGO et al., 2015). Para Alcarde (2017), ainda que sua concentração seja elevada em cachaças, esse parâmetro tem pouca influência na composição sensorial da bebida devido ao seu elevado limiar de odor e suas características aromáticas pouco pronunciadas. Porém, esses compostos possuem importância devido à ação solvente sobre outras substâncias aromáticas presentes em bebidas destiladas, interferindo em seu grau de volatilidade e, conseqüentemente, em seus limiares (MISHINA et al., 2016).

Os dados obtidos para acidez volátil mostram que todas as marcas foram influenciadas pelas embalagens utilizadas, sendo que para as amostras MAZ e VF a acidez diminuiu, com a utilização de embalagens PET, corroborando com os dados de Lima e Taham (2011), que também perceberam um decréscimo na acidez volátil quando analisaram cachaças armazenadas em embalagens de plástico. No entanto, para as marcas BP e RC, esse parâmetro aumentou, conciliando os resultados do teor alcoólico e acidez volátil para a marca RC. Nesse caso, provavelmente a amostra passou por um processo de oxidação do álcool. O processo de oxidação pode ter acontecido devido à permeabilidade ao oxigênio das garrafas PET, pois apesar de esse tipo de embalagem apresentar características favoráveis à permeação de gases e

compostos de sabor, devido à orientação biaxial de suas moléculas, estudos realizados com armazenamento de vinhos em embalagens PET demonstram que essas embalagens acrescidas de multicamadas foram mais eficientes em relação a essas características, sendo comparadas a embalagens de vidro, quando armazenados por 10 meses (MENTANA et al.,2009), revelando uma inocuidade em relação às embalagens poliméricas sem adição de multicamadas com relação à permeabilidade ao oxigênio, podendo justificar a marca 5 armazenada em embalagens PET, que apresentar ou concentrações significativamente mais elevadas. Outra justificativa seria ao fato de a amostra ter perdido alguns compostos mais voláteis durante a retirada de alíquotas da mesma para a realização das análises, uma vez que foram retiradas das mesmas embalagens, podendo concentrar outros componentes presentes na bebida. As embalagens E₂ e E₃ apresentaram valores acima do permitido pela legislação, que é de 150 mg expressos em ácido acético em 100 mL de álcool anidro (BRASIL,2005). Teores elevados desse parâmetro estão relacionados à deficiência de boas práticas de fabricação durante a fermentação, pois concentrações elevadas de ácido acético são consequências da contaminação bacteriana durante essa etapa, uma vez que esses micro-organismos comuns na produção de cachaça fermentam o vinho aumentando sua acidez. Ressalta-se, porém, que esse não foi o caso, pois quando a amostra foi colocada nas embalagens PET, ela se apresentava dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Mapa. A acidez é umas das principais causas de rejeição sensorial de cachaças pelos consumidores, devido ao ácido acético estar relacionado a um odor penetrante e irritante, normalmente descrito como de “vinagre”. Assim como esse ácido, outros ácidos presentes em concentrações inferiores também apresentam odores bastante singulares, prejudicando a sua composição sensorial (ALCARDE,2017).

A prevenção desse tipo de contaminação durante ou após essa etapa de produção pode ser realizada pela implementação de um sistema eficiente de higienização e sanitização dos equipamentos e bombas antes e após o uso, como Clean in Place (CIP), além do controle do corte da “caudas” durante o processo de destilação, ou até mesmo a dupla destilação, pode ser uma possibilidade para remoção do ácido acético do produto (BORTOLETTO et al.,2018).

Observou-se que apenas a marca RC não apresentou diferença significativa nas concentrações de cobre quanto às embalagens utilizadas, corroborando com resultados de Machado (2010), em que o teor de cobre na cachaça acondicionada por 6 meses em embalagens de vidro e de plástico não foi influenciado significativamente pela natureza dos recipientes de armazenamento. Já para as outras marcas, a concentração desse contaminante apresentou diferença significativa quando comparadas às embalagens de vidro e PET's; porém, mesmo apresentando diferença significativa, as concentrações apresentadas foram próximas, não

havendo diferença discrepante nas concentrações do contaminante analisado. A marca VF foi a que apresentou maior concentração desse contaminante. Todas as amostras apresentaram concentrações desse metal abaixo do limite estabelecido pela legislação, que é de 5 mg L⁻¹ (BRASIL,2005). Apesar de o uso de alambiques de cobre contribuir substancialmente para o aroma da bebida, colaborando com a eliminação de determinados odores desagradáveis relacionados à presença de compostos sulfurados presentes na cachaça, sabe-se que a presença desse metal em grandes concentrações pode trazer prejuízos à saúde humana. Na produção de cachaça de alambique esse excesso está relacionado à falta de higienização adequada dos alambiques, após sua utilização, acumulando o azinhavre no equipamento que, quando utilizado novamente, o novo destilado arrasta o contaminante durante o processo, sobrecarregando a bebida com o metal (CARDOSO et al.,2013), podendo sua concentração ser influenciada pela alta concentração de acidez volátil, uma vez que o sal de cobre [CuCO₃ Cu (OH) ₂] é mais solúvel em meio ácido, dependendo do tipo de processo de formação (ALMEIDA et al.,2017).

Para evitar esse tipo de situação, é recomendado que seja realizada a lavagem do equipamento com água quente acidificada, usar abrasivos, enxaguar em abundância e realizar a primeira destilação com água para assegurar a eficiência do processo ou por meio de uma limpeza cuidadosa dos alambiques durante as destilações, usando água e limão na primeira destilação. O cobre também pode ser removido pelo uso de adsorventes, como filtros de carvão ativado e resinas de permuta iônica (CARDOSO et al.,2013).

Na quantificação dos aldeídos, apenas a marca RC não apresentou diferença significativa em sua concentração, ao comparar as embalagens utilizadas. Analisando a amostra BP, notou-se que em todas as amostras a concentração de aldeídos foi diferente significativamente entre as embalagens utilizadas, sendo a amostra armazenada em embalagem de vidro a que apresentou menor concentração desse composto, assim como a marca MAZ. Esses dados corroboram em parte com os resultados encontrados por Forlin (2005), uma vez que houve redução e manutenção da concentração em níveis adequados de aldeídos em aguardente armazenada em garrafas PET. Essa redução é positiva porque é inerente ao processo de maturação da bebida. Os aldeídos são precursores na formação de ácidos, redução do pH e na estruturação do aroma e sabor. O excesso desse composto está relacionado a atributos sensoriais negativos de pungência ao aroma e efeitos fisiológicos de ressaca nos consumidores. A amostra VF foi a que apresentou maior concentração desse composto; porém, todas as amostras estão dentro do limite máximo permitido pela legislação, que é de 30 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL,2005). Para evitar concentrações indesejáveis desse composto no produto, são necessárias algumas medidas preventivas como dar preferência à utilização de

leveduras selecionadas, evitar excesso de reciclagem múltipla de leveduras e aeração do mosto, como ação corretiva e controlar o corte de “cabeça” na etapa de destilação (BORTOLETTO et al.,2018).

Em relação à concentração de ésteres, as amostras das marcas JAC e RC apresentaram o mesmo perfil de diferença entre as embalagens estudadas, sendo todas as amostras diferentes entre si quanto à concentração de ésteres. Observou-se que as amostras armazenadas em recipiente de vidro foram as amostras que apresentam maior concentração desse composto, diminuído a concentração em relação às embalagens PET utilizadas. Assim, como a maioria das marcas, exceto a amostra MAZ, as concentrações de ésteres diminuíram ou se mantiveram constantes quando comparadas embalagens de vidro e PET. Esse comportamento chama a atenção para a influência não muito positiva das propriedades estruturais das embalagens de PET utilizadas no armazenamento da aguardente de cana para o desenvolvimento desses compostos. Parazzi et al. (2008), avaliando a composição química de aguardentes de cana armazenadas por 36 meses em tonéis de carvalho e recipientes de vidro, observaram um aumento crescente na concentração de ésteres em relação às épocas de amostragem e ao tipo de recipientes, sendo de 26,26 a 62,65 em recipientes de madeira e de 26,26 a 37,27 em recipientes de vidro. Nesse trabalho, os valores encontrados para os ésteres foram expressos em acetato de etila. Apesar de a marca JAC apresentar os maiores valores de concentração para esse composto, todas as marcas se apresentaram dentro do limite de 200,0 mg/100mL álcool anidro (BRASIL,2005), estabelecido pela legislação brasileira. Esses compostos podem ser produzidos pela levedura durante o processo de fermentação ou originados da esterificação do etanol em ácido acético, sendo a concentração produzida dependente da abundância relativa dos álcoois correspondentes e dos radicais acil- coA relacionados ao metabolismo da levedura,ou durante o processo de envelhecimento, devido à esterificação de ácidos graxo com o etanol. A quantidade de agitação, aeração, temperatura na fermentação e qualidade do mosto são fatores interferentes importantes na síntese desses compostos (BORTOLETTO et al.,2018; CARDOSO et al.,2013)

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o furfural foi o composto que se apresentou em elevadas concentrações, sendo o 5 hidroximetilfurfural não detectado pelo equipamento. As amostras JAC, BP e RC não apresentaram diferença na concentração de furfural, quando comparadas as embalagens, corroborando com os resultados de Machado (2010), quando amostras procedentes de cana adubada com ureia e acondicionadas em recipientes diferentes não apresentaram diferenças significativas para esse contaminante. E dentre as outras marcas avaliadas, MAZ apresentou pequena diferença significativa entre as

amostras e vidro e as embalagens PET, e VF apresentou diferença menor ainda entre as embalagens de vidro e E₁ com relação ao restante das embalagens poliméricas E₂ e E₃.

A síntese do furfural e 5-hmf pode estar associado à pirogênese da matéria orgânica durante o processo de destilação em alambiques, corte errado da cauda no processo de destilação, reação de Maillard e caramelização durante o processo de tostagem nas tanoarias. Assim, processos intensos de torra promovem a formação desses compostos e podem afetar a qualidade do destilado. Para evitar a formação desses compostos, é importante realizar, a colheita da cana manualmente, zerar a fermentação (0 °Brix) para depois proceder a destilação, fazer o corte adequado no processo de destilação e proceder a boas práticas de fabricação para obtenção de barris, para que eles passem por um processo de torra padronizado não muito intenso e que seja lavado antes do uso (BORTOLETTO et al.,2018).

Para quantificação do metanol, todas as marcas apresentaram diferença significativa entre as concentrações desse contaminante, quando comparada às embalagens estudadas, tendo as amostras armazenadas em embalagem de vidro apresentado concentrações muito mais elevadas do que as amostras armazenadas nas embalagens PET. A marca que apresentou maior concentração desse contaminante foi a amostra RC, porém, nenhuma das marcas se apresentou fora do limite máximo estabelecido de 20 mg/100mL de álcool anidro (BRASIL,2005) para esse contaminante. Oposto ao que aconteceu com estudo de Parrazzi et al. (2008) onde os autores não perceberam diferença da concentração desse contaminante quando compararam o armazenamento de cachaça em tonéis de madeira e embalagens de vidro até 36 meses, apresentando variações médias de 0,14 e 0,42 mg.100 mL⁻¹, respectivamente, para recipientes de vidro e madeira. A presença desse contaminante é de profunda importância para a qualidade do destilado devido à sua elevada toxicidade. Sua síntese pode ocorrer durante a fermentação pela atuação de enzimas pécticas da levedura no ácido gulacturônico de partículas do bagaço no caldo da cana. Para evitar essa contaminação, pode-se realizar a clarificação do caldo, por meio da filtração, para eliminação de partículas sólidas; aplicar tratamentos térmicos para melhorar a qualidade do caldo para a fermentação. Outra maneira também é controlar a parte da “cabeça” na destilação ou realizar dupla destilação (BORTOLETTO et al.,2018).

Na análise dos álcoois superiores, observa-se que as amostras apresentaram interferência na concentração do composto analisado. Entre as embalagens utilizadas, as amostras MAZ e VF apresentaram diferença apenas entre embalagens de vidro e PET. As amostras armazenadas em vidro apresentaram maior concentração. Nas marcas JAC e BP as embalagens de vidro também apresentaram maior concentração desses compostos, diferentemente de RC. Esses resultados diferem daqueles encontrados por Machado (2010), em

que a pesquisadora mostra que o material das embalagens não interferiu na concentração desses compostos. Esses compostos são responsáveis pela formação dos odores característicos e marcantes do destilado; porém, em grandes concentrações, esses odores podem modificar suas características consideradas prazerosas para extremamente desagradáveis. Uma vez formados, os álcoois superiores não conseguem ser removidos; no entanto, alguns artifícios podem ser realizados para controlar a formação desses compostos, como utilizar uma levedura própria, controlar a temperatura de fermentação (de 28 a 32 °C), controlar o pH do mosto ($\geq 4,0$), evitar oxigenação exagerada no tanque de fermentação, controlar o tempo final da fermentação para destilação (BORTOLETTO et al.,2018 ; ALCARDE,2017).

Analisando a concentração de butan-1-ol (álcool butílico), apenas a amostra VF não apresentou diferença significativa entre as embalagens de vidro e PET. As amostras JAC e BP apresentaram o mesmo perfil de diferença entre as embalagens, em que ocorre a diferença aconteceu somente entre embalagens de vidro e PET, tendo as amostras armazenadas em embalagens de plástico apresentado maiores concentrações do que as de vidro, assim como as marcas 3 e 5; porém, nessas marcas houve diferença significativa também entre as embalagens PET utilizadas.

Para butan-2-ol (álcool sec-butílico), somente a marca RC apresentou diferença significativa entre as concentrações desse composto com relação às embalagens.

A formação desses dois compostos é proveniente da contaminação pela bactéria "*Clostridium acetobutylicum*", relacionada principalmente ao tempo excessivo de intervalo entre o processo de fermentação e destilação e ausência de boas práticas de fabricação. Devido à sua toxicidade relativamente alta, mesmo essas substâncias fazendo parte dos álcoois superiores, os álcoois butílico e sec-butílico são quantificados separadamente e possuem limites específicos para cada um (CARDOSO et al.,2013), que é 3 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para álcool butílico e 10 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para álcool sec-butílico (BRASIL,2005).

Na análise do carbamato de etila, não foi possível comparar embalagens nem amostras porque as concentrações encontradas do contaminante foram mais baixas do que a concentração detectada pelo aparelho utilizado. Considerado um composto carcinogênico para humanos, o controle de formação desse contaminante é evitar a formação de seus precursores, como ureia, citrulina e N-carbamil fosfato, associado às leveduras e aos subprodutos de seu metabolismo, controlando o processo de fermentação, além de controlar o processo de destilação, evitar a incidência de luz durante o armazenamento e evitar a fertilização excessiva de nitrogênio no solo ou qualquer tipo de suplementação de N no mosto (MACHADO et al.,2013).

5.2 Validação de furfural e hidroximetilfurfural por HPLC

Apesar de o método utilizado já ter sido validado, alguns parâmetros foram avaliados como linearidade, LD e LQ.

Na Figura 7, apresenta-se o cromatograma obtido da análise de quantificação de furfural e do 5- hidroximetil furfural por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); os picos obtidos são dos compostos analisados.

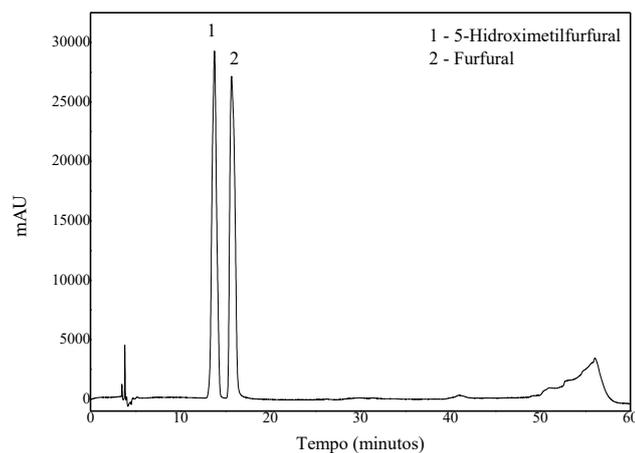


Figura 7 Cromatograma da solução de padrões na concentração de 1 mg L^{-1} de furfural e 5 hidroximetilfurfural por detecção de arranjos diodos (DAD).

A quantificação do furfural e 5 hidroximetilfurfural foi realizada mediante padronização externa, e os tempos de retenção foram monitorados para a seleção de cada um dos compostos, sendo para o furfural $15,567 \pm 0,12$ minutos e para o 5-hidroximetilfurfural $13,658 \pm 0,14$ minutos.

Na Figura 8, está apresentado o cromatograma da amostra MAZ adquirida do produtor, sem armazenamento na embalagem de plástico. A marca MAZ foi a única amostra que apresentou concentração acima do limite máximo estabelecido pelo Mapa.

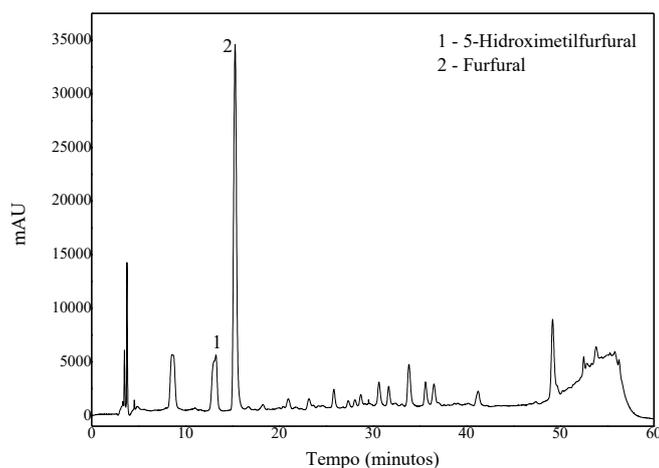


Figura 8 Cromatograma da amostra MAZ sem armazenamento em embalagem de plástico.

E na Figura 9 é representada a sobreposição dos cromatogramas das amostras MAZ armazenadas nas três marcas de embalagem PET utilizadas.

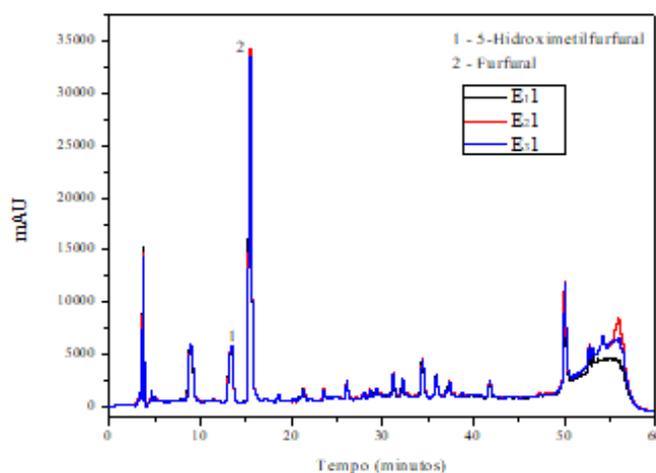


Figura 9 Cromatograma da amostra MAZ armazenada em três marcas de garrafa PET.

Pela construção das curvas analíticas, foi possível avaliar a linearidade do método por estimativa dos coeficientes de determinação referentes às equações das curvas, obtidas por regressão linear. Para o furfural, foi calculado o coeficiente de regressão linear de 0,9999 e para o 5-hidroximetilfurfural 0,9999. Segundo a Anvisa (2017), o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. Dessa forma, a metodologia desse trabalho atinge as expectativas para esse parâmetro de validação.

Os limites de detecção encontrados para o furfural variaram de LD= 0,087 mg/L a 0,017 mg/100 de álcool anidro, e os limites de quantificação variaram de LQ= 0,291 mg/L a 0,058 mg/100 de álcool anidro. Para o composto 5-hidroximetilfurfural, os limites de detecção variaram de 0,058 mg/L a 0,011 mg/100 de álcool anidro e os limites de quantificação variaram de 0,193 mg/L a 0,039 mg/100 de álcool anidro, respectivamente, corroborando com os resultados encontrados por Rodrigues (2016).

É possível perceber nos cromatogramas que as concentrações 5-hidroximetilfurfural foram muito inferiores às concentrações encontradas para furfural, sendo esse último o principal produto da degradação de pentoses. O perfil dos cromatogramas é bem parecido, tanto para a amostra armazenada em vidro quanto para embalagens PET; porém, houve diferença significativa entre as embalagens dentro de cada amostra, de modo que as concentrações mais elevadas de furfural foram encontradas nas embalagens de vidro.

A presença desses contaminantes está associada à presença de açúcares residuais e de bagacilhos. A temperatura elevada associada ao baixo pH do mosto gera desidratação dos açúcares e hidrólise de polissacarídeos dos bagacilhos (celulose, hemicelulose, pectina e outros) formando esses contaminantes (SOUZA et al.,2009).

As concentrações de furfural encontradas nesse trabalho somente para a amostra MAZ foram acima do limite máximo permitido na legislação furfural + hidroximetilfurfural, que é de 5 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL,2005); porém, inferiores aos encontrados por Souza et al. (2009), que variaram de 1,1 a 9,5 mg em 100 mL⁻¹ de álcool etílico anidro, Masson et al. (2007) obtiveram concentração máxima de 8,80 mg em 100 mL⁻¹ de álcool etílico anidro em aguardente de cana não queimada de produtor de cachaça de alambique e Aquino et al. (2016) encontraram concentração máxima de 9,6 mg em 100 mL⁻¹ de álcool etílico anidro.

5.3 Validação cromatográfica da quantificação de HPA's

5.3.1 Extração das amostras

Na Figura 14 apresenta-se o Cromatograma obtido da análise de quantificação dos HPA's por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; os picos obtidos são de uma solução de 10 padrões de HPA's estudados, observando uma boa separação atingida.

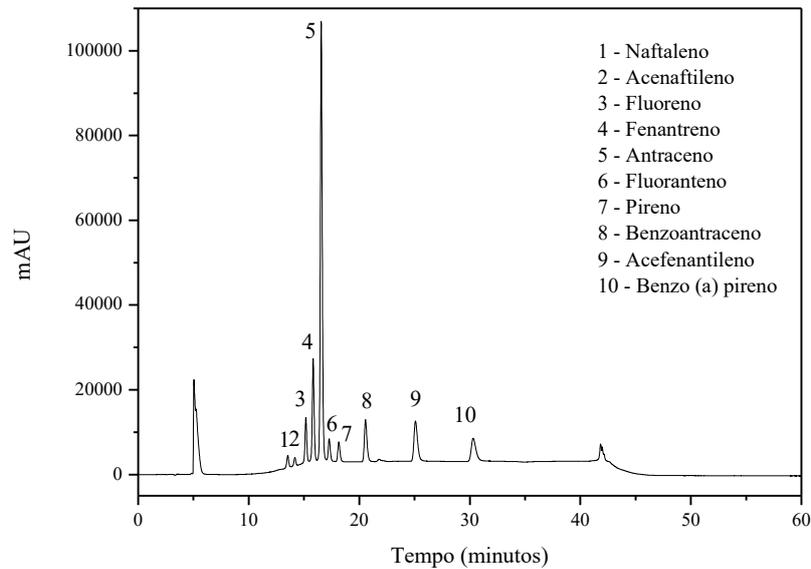


Figura 10 – Cromatograma da solução padrão com concentração 500 mg L^{-1} de HPA's por detecção DAD.

Na Figura 11 apresenta-se o cromatograma obtido da amostra de cachaça JAC 3 (embalagem polimérica 3 com 8 meses de armazenamento).

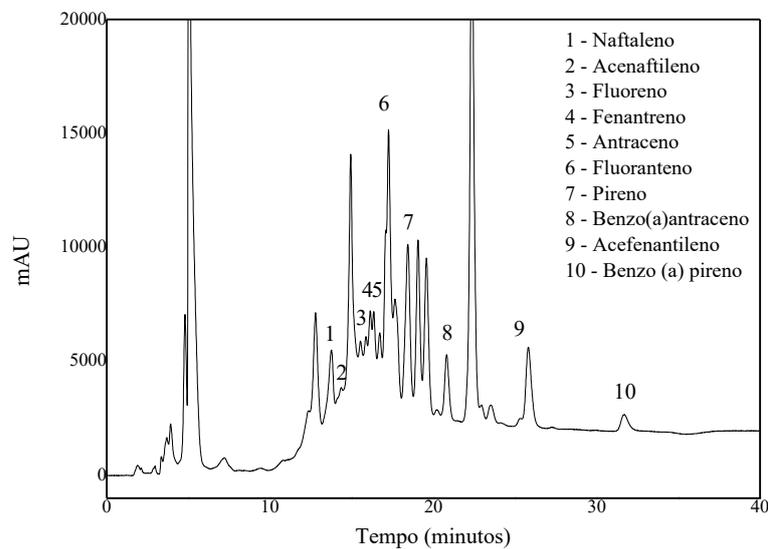


Figura 11 – Cromatograma obtido da amostra JAC 3

Verifica-se que a metodologia conduz a uma boa separação para todos os 10 HPA's estudados, com o tempo total de análise de 60 min.

A quantificação dos HPA's foi realizada por meio da padronização externa, e os tempos de retenção foram monitorados para a seleção de cada um dos compostos, como verifica-se na Tabela 4.

Tabela 4 Parâmetro de seleção dos HPA's.

Pico	Compostos	Abreviação	t _R (min)
1	Naftaleno	Naf	13,61±0,09
2	Acenaftileno	Acti	14,22±0,04
3	Fluoreno	Flu	15,17±0,04
4	Fenantreno	Fen	15,82±0,05
5	Antraceno	Ant	16,56±0,08
6	Fluoranteno	Flut	17,29±0,10
7	Pireno	P	18,17±0,13
8	Benzo (a) antraceno	BaA	20,65±0,25
9	Acefenantileno	Acf	25,31±0,47
10	Benzo(a)pireno	BaP	31,00±0,76

*t_R= tempo de retenção.

Na validação do método cromatográfico, os parâmetros utilizados para avaliar o desempenho analítico foram linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

A determinação da linearidade foi realizada a partir de uma relação matemática expressa como equação da reta entre o sinal e a concentração da espécie de interesse intitulada de curva analítica. Os dados referentes às curvas analíticas dos HPA's em acetato de etila e a precisão do método utilizado expressam-se por meio da repetitividade, sendo verificados por 9 determinações de 3 concentrações diferentes da curva e expressos em termos de coeficiente de variação CV também estão representados em médias na Tabela 5.

Tabela 5 Curvas analíticas, coeficientes de correlação (r^2) usadas na quantificação e coeficientes de variação para identificação e quantificação de HPA's.

Compostos	Coeficiente de Correlação (r^2)	Equação da reta	Coeficiente de Variação (%)
Naftaleno	0,9997	$y = 61,296x + 32,117$	2,351
Acenaftileno	0,9994	$y = 41,566x + 540,25$	3,075
Fluoreno	0,9991	$y = 218,73x + 2904,9$	2,627
Fenantreno	0,9997	$y = 537,34x + 4432,9$	0,768
Antraceno	0,999	$y = 2452x + 13818$	0,279
Fluoranteno	0,9997	$y = 122,12x + 1313,7$	1,333
Pireno	0,9993	$y = 120,97x + 1941,4$	1,661
Benzo(a)antraceno	0,9999	$y = 317,61x + 3768,3$	1,621
Acefenantileno	1,0	$y = 419,09x + 3049,1$	1,982
Benzo(a)pireno	0,9998	$y = 309,48x + 2817,4$	1,373

É possível observar que a maioria dos coeficientes de correlação foi acima de 0,999, o que é considerada uma evidência de ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI,2004); porém, a Anvisa mediante a resolução RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017, estabelece valores de no mínimo 0,99 para os coeficientes de correlação (BRASIL, 2017).

Dórea et al. (2008), ao quantificarem fluoreno, antraceno e benzo(a)pireno em amostras de cachaça, obtiveram coeficientes de correlação 0,9999; 0,9987; 0,9936, valores menores que os encontrados neste trabalho, exceto para fluoreno. Já Machado et al. (2014), ao quantificarem HPA's em cachaças, obtiveram resultados que variaram de 0,9946 a 0,9998, sendo o primeiro bem abaixo dos resultados deste trabalho.

Como a quantificação de HPA's em cachaças (amostras complexas) não configuram quantificação em macroquantidades, e sim, em métodos de análises de impurezas, são aceitos CV de até 20%. Porém, os CV's encontrados foram bem inferiores a essa porcentagem, sendo o mais alto de 3,075 % para o composto acefenantileno e o mais baixo, 0,2799% para o antraceno porcentagens maiores que as encontradas de desvio padrão relativo (DPR) por Bettin e Franco (2005) de 0,0002% para fenantreno e 0,44% para o criseno.

Os limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 6. Os valores para LD variaram de 0,061 a 0,186 μgL^{-1} e para LQ de 0,206 a 0,622 μgL^{-1} , valores diferentes daqueles encontrados por Bettin e Franco (2005), que foram de 0,001 a 0,10 μgL^{-1} para LD e

0,01 a 1,0 μgL^{-1} , e inferiores aos resultados de Dórea et al. (2008) para fluoreno, antraceno e benzo(a)pireno de LD (3,0; 8 e 4240 μgL^{-1}) e LQ (3,0; 8 e 4240 μgL^{-1}).

Tabela 6 Limites de detecção e quantificação dos HPA's.

Compostos	Limite de detecção (μgL^{-1})	Limite de quantificação (μgL^{-1})
Naftaleno	0,061	0,206
Acenaftileno	0,081	0,272
Fluoreno	0,186	0,622
Fenantreno	0,108	0,362
Antraceno	0,162	0,540
Fluoranteno	0,072	0,242
Pireno	0,082	0,266
Benzo(a)antraceno	0,134	0,448
Acefenantileno	0,086	0,288
Benzo(a)pireno	0,170	0,568

A exatidão foi determinada pela reação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra, em que 3 concentrações de solução padrão foram adicionadas a 3 amostras. Os resultados dos ensaios de recuperação estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 Resultados das médias dos ensaios de recuperação realizados nas amostras de cachaça fortificadas com padrões de HPA's.

Compostos	Recuperação (%)
Naftaleno	83,666
Acenaftileno	84,333
Fluoreno	91,666
Fenantreno	92
Antraceno	120,666
Fluoranteno	73,333
Pireno	91
Benzo(a)antraceno	105,666
Acefenantileno	101
Benzo(a)pireno	99,333

Os intervalos de recuperação admissíveis para amostras complexas, como a cachaça, são de 50% a 120%, com precisão de $\pm 15\%$ (RIBANI,2004), sendo a menor porcentagem para fluoranteno (73,333%), e a maior, para antraceno (120,666%). Esses valores estão acima daqueles encontrados por Dórea et al. (2008), de 105,4 %, para antraceno e benzo(a)pireno, de 76,4%, e menor que o encontrado para fluoreno, 99,7%. Assim, os resultados obtidos neste trabalho estão dentro das especificações vigentes.

Uma vez realizado o processo de validação, pode-se garantir que o método proposto neste trabalho é interpretável, fundamentado e passível de ser repetido.

5.4 Identificação e quantificação de HPA's

Os resultados da identificação e quantificação de HPA's nas cachaças armazenadas em recipiente de vidro e três marcas de embalagens PET nos tempos inicial (4 meses) e final (8 meses) estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 Quantificação de HPA's. (Continua).

AMOSTRAS			HPA's									
			Naf	Aceti	Flu	Fen	Ant	Flut	P	BaA	Acf	BaP
M	T₀	SA	0,227c	ND	ND	ND	ND	0,331c	ND	ND	ND	ND
		E₁	0,329c	ND	9,612a	ND	ND	1,367b	0,138c	ND	ND	<LD
	T_i	E₂	0,573b	ND	11,569a	ND	ND	1,243b	0,165c	ND	<LD	ND
		E₃	0,762a	ND	ND	<LD	ND	0,321c	0,171c	<LD	ND	<LD
	T_f	E_{1.1}	0,959a	ND	12,638a	<LD	ND	3,657a	0,387b	<LD	0,275a	<LD
		E_{2.1}	1,143a	ND	11,376a	<LD	ND	3,491a	0,290b	ND	0,108b	<LD
		E_{3.1}	0,908a	ND	11,990a	0,482a	ND	1,691b	0,851a	0,251a	<LD	<LD
V	T₀	SA	0,286b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		E₁	0,668b	ND	1,350c	<LD	ND	0,111e	0,200b	<LD	ND	ND
	T_i	E₂	0,885a	ND	1,580b	<LD	ND	0,758c	ND	ND	ND	ND
		E₃	0,955a	0,308c	1,366c	<LD	ND	0,444d	ND	ND	ND	ND
	T_f	E_{1.1}	1,345a	1,669a	1,956a	<LD	ND	1,629b	1,072a	0,842a	0,209a	ND
		E_{2.1}	1,109a	1,645a	1,606b	0,142a	ND	1,474b	0,551a	ND	ND	ND
		E_{3.1}	0,965a	0,837b	1,666b	<LD	ND	2,696a	0,804a	ND	ND	ND

*Naf= naftaleno; Aceti= acenaftileno; Flu= fluoreno; Fen- fenantreno; Ant = antraceno; Flut= fluoranteno; P= pireno; BaA= bezo(a)antraceno; Acf= acefenantileno; BaP= Benzo(a)pireno. **SE= Garrafa de vidro. Ti = Tempo inicial de armazenamento (4 meses em garrafas PET); T_f= Tempo final de armazenamento (8 meses em garrafas PET).

Tabela 8 Quantificação de HPA's. (Continua).

AMOSTRAS		HPA's										
		Na	Aceti	Flu	Fen	Ant	Flut	P	BaA	Acf	BaP	
J A C	T₀	SA	0,513c	ND	ND	ND	ND	0,456c	0,999c	<LD	ND	ND
		E₁	0,708c	1,593b	0,806c	ND	ND	0,289c	1,399a	<LD	ND	ND
	T_i	E₂	1,225b	<LD	1,133b	ND	ND	0,864b	1,131c	0,142c	ND	ND
		E₃	0,612c	0,942c	<LD	ND	ND	1,199a	1,288b	<LD	ND	ND
		E_{1.1}	1,894a	2,035a	1,756a	<LD	ND	0,781b	1,502a	0,191c	0,138b	<LD
	T_f	E_{2.1}	1,733a	0,496c	1,965a	<LD	ND	0,886b	1,823a	0,533b	0,142b	ND
		E_{3.1}	1,385b	1,389b	0,272d	0,151a	<LD	1,447a	1,458a	1,059a	0,799a	0,447a
B P	T₀	SA	ND	0,151e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		E₁	ND	0,697d	ND	ND	ND	1,344b	0,163c	ND	ND	ND
	T_i	E₂	1,017b	0,226e	ND	0,128a	ND	0,078e	ND	ND	ND	ND
		E₃	0,645c	1,736b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LD	ND
		E_{1.1}	0,815c	1,307c	1,405a	0,141a	ND	1,293b	1,183a	ND	ND	ND
	T_f	E_{2.1}	1,229a	1,747b	1,171b	0,135a	ND	0,849c	0,444b	<LD	0,154a	ND
		E_{3.1}	0,666c	2,298a	1,247b	<LD	ND	0,521d	1,200a	0,374a	0,200a	ND

*Naf= naftaleno; Aceti= acenaftileno; Flu= fluoreno; Fen- fenantreno; Ant = antraceno; Flut= fluoranteno; P= pireno; BaA= bezo(a)antraceno; Acf= acefenantileno; BaP= Benzo(a)pireno. **SE= Garrafa de vidro. ***TI = Tempo inicial de armazenamento (4 meses em garrafas PET); TF= Tempo final de armazenamento (8 meses em garrafas PET).

Tabela 8 Quantificação de HPA's. (Final).

AMOSTRAS		HPA's											
		Naf	Aceti	Flu	Fen	Ant	Flut	P	BaA	Acf	BaP		
R C	T ₀	SA	0,473c	ND	0,762c	ND	ND	ND	0,278d	ND	ND	ND	
		E ₁	0,722b	ND	0,980c	ND	ND	ND	0,709c	ND	ND	ND	
		T _i	E ₂	0,220d	<LD	0,733c	ND	ND	0,399b	1,073b	<LD	ND	ND
			E ₃	0,163d	1,225c	1,215c	<LD	ND	0,533b	1,102b	ND	ND	ND
			E _{1.1}	1,114a	1,704c	1,546b	0,692a	ND	0,525b	1,446a	0,196b	ND	ND
		T _f	E _{2.1}	0,979a	2,462b	2,223a	0,127b	ND	4,096a	1,664a	0,324a	ND	ND
			E _{3.1}	0,705b	4,089a	1,662b	<LD	ND	1,101b	1,262b	<LD	ND	ND

*Naf= naftaleno; Aceti= acenaftileno; Flu= fluoreno; Fen- fenantreno; Ant = antraceno; Flut= fluoranteno; P= pireno; BaA= bezo(a)antraceno; Acf= acefenantileno; BaP= Benzo(a)pireno. **SE= Garrafa de vidro. ***TI = Tempo inicial de armazenamento (4 meses em garrafas PET); TF= Tempo final de armazenamento (8 meses em garrafas PET).

Analisando os resultados da marca MAZ em recipientes de vidro, observa-se que apenas dois dos dez HPA's estudados, naftaleno e fluoranteno, foram detectados, mesmo assim, em baixas concentrações, sendo que para alguns dos HPA's (Naf, Flut, P e Acf), a concentração deles sofreram alterações quando comparados aos recipientes de armazenamento. O acenaftileno, antraceno e benzo(a)pireno não foram detectados ou ficaram abaixo do limite de detecção em todas amostras dessa marca. Os contaminantes naftaleno, fluoreno e fluoranteno apresentaram concentrações acima do limite estabelecido pela legislação escocesa em alimentos, sendo $1\mu\text{g L}^{-1}$ para naftaleno e fluoreno e $2\ 1\mu\text{g L}^{-1}$ para fluoranteno (BETTIN; FRANCO,2005). Dentre esses, as concentrações encontradas para fluoreno foram as mais elevadas, maiores do que aqueles encontradas por Bettin; Franco (2005) de 8,52; 3,10; 4,42; e $3,94\ \mu\text{gL}^{-1}$ quando analisaram aguardentes obtidas de cana queimada. A mesma amostra apresentou valores acima do permitido também para furfural, o que se leva a associar os fatores comuns à formação desses dois contaminantes, como o armazenamento em barris tratados termicamente, já que a prática da queima para colheita da cana já não é mais permitida. Além disso, nota-se um aumento significativo na concentração de todos os HPA's estudados em relação ao maior tempo de armazenamento (CARUSO; NAGATO; ALABURDA,2010).

Apenas o contaminante naftaleno foi detectado na marca de cachaça VF em recipientes de vidro, não sendo possível detectar antraceno e benzo(a)pireno em nenhuma das amostras. O benzo(a)antraceno e o acefenantileno, por sua vez, foram detectados apenas nas embalagens E₁ armazenada por 8 meses. Os contaminantes fluoreno e fluoranteno foram identificados em todas as embalagens poliméricas e por todos os tempos de armazenamento. Ao comparar as embalagens e os tempos de armazenamento, foi possível perceber que as duas variáveis foram de profunda importância na quantificação dos contaminantes analisados, sendo naftaleno, acenaftileno, fluoreno e fluoranteno os que apresentaram concentrações acima do limite estabelecido pela legislação escocesa (BETTIN; FRANCO,2005). Observou-se também que houve maior facilidade de detecção para os HPA's de menor massa molar na amostra como um todo. A concentração mais elevada foi de $2,696\ \mu\text{gL}^{-1}$ para o fluoranteno na amostra E₁ armazenada por 8 meses. Esses valores são superiores aos encontrados por Galinaro; Franco (2009), quando quantificaram HPA's em diversos destilados, obtendo concentrações médias de $0,386\ \mu\text{gL}^{-1}$ em cachaças, $0,042\ \mu\text{gL}^{-1}$ em rum e $0,592\ \mu\text{gL}^{-1}$ em uísque.

Na amostra JAC, os contaminantes acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno, acefenantileno e benzo(a)pireno não foram detectados ou suas concentrações se apresentaram abaixo do limite de detecção nas amostras armazenadas em

recipientes de vidro. Dessas, apenas o acenaftileno e fluoreno obtiveram concentração acima do limite de detecção para embalagens PET com 4 meses de armazenamento. O antraceno foi o único HPA que não foi detectado ou apresentou concentração abaixo dos limites de detecção para todas as amostras. Pode-se observar, que entre os contaminantes detectados, o tipo de embalagem nem sempre influenciou a concentração, porém o tempo de armazenamento foi primordial para o seu aumento nas amostras. Percebe-se que foram quantificadas concentrações acima do limite estabelecido pela legislação escocesa (BETTIN; FRANCO,2005) para os contaminantes naftaleno, acenaftileno e fluoreno, principalmente nas amostras armazenadas por mais tempo em embalagens de PET, sendo a maior concentração encontrada de $2,035 \mu\text{g L}^{-1}$ para acenaftileno armazenado na embalagem PET E₁ por 8 meses. Esses dados são superiores àqueles encontrados por Franco; Bettin (2005) para aguardentes produzidas com cana não queimada, de $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e inferior ao encontrado para aguardentes produzidas com cana queimada, de $9,30 \mu\text{g L}^{-1}$. Com os dados obtidos, é possível correlacionar a presença desses contaminantes com a cana queimada e não queimada, induzindo que a queima e requeima de cana são fatores primordiais para a presença desses contaminantes na bebida e atualmente essa prática é proibida por lei.

Na identificação e quantificação de HPA's em BP, observa-se que entre as amostras armazenadas em recipientes de vidro, apenas o contaminante acenaftileno foi detectado. Os contaminantes antraceno e benzo(a)pireno não foram detectados em nenhuma das amostras, independentemente do material da embalagem. Os compostos fluoreno, benzo(a)antraceno e acefenantileno não foram detectados ou apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção nas amostras armazenadas por 4 meses em embalagens PET. O fenantreno e pireno foram quantificados em apenas uma embalagem (E₂ e E₁ respectivamente) no período de 4 meses. O tempo de armazenamento mostrou-se significativo para a determinação das concentrações desses contaminantes, uma vez que tirando as amostras dos contaminantes que não foram detectados em nenhuma embalagem, apenas 4 amostras não foram detectadas, a E₃ para o contaminante fenantreno, E₁ e E₂ para benzo(a)antraceno, e E₁ para acefenantileno no período de 8 meses de armazenamento. De acordo com a legislação escocesa (BETTIN; FRANCO,2005), os HPA's naftaleno, acenaftileno e fluoreno apresentaram concentrações acima do permitido, sendo a maior concentração para o acenaftileno, de $2,298 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração bastante inferior à média encontrada para naftaleno em cachaças em um estudo realizado por Galinaro; Franco(2009) e menor ainda que as concentrações encontradas para esses contaminantes por Bettin; Franco(2005).

Na marca RC, apenas os HPA's naftaleno, fluoreno e pireno foram quantificados em recipientes de vidro. Os contaminantes antraceno, acefenantileno e benzo(a)pireno não foram detectados em nenhuma das amostras. No armazenamento por 4 meses em embalagem de plástico, foram quantificados naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fluoranteno e pireno. Já para as amostras armazenadas por 8 meses, foi possível quantificar a maioria dos contaminantes, exceto os que não foram possíveis detectar em nenhuma das amostras, fenantreno e benzo(a)pireno na embalagem E₃. Assim como em todas as outras marcas, as amostras armazenadas por mais tempo em recipiente de PET foram as que apresentaram maior concentração dos contaminantes estudados, sendo encontrados para o naftaleno, acenaftileno, fluoreno e fluoranteno limites acima do permitido pela legislação escocesa para tais HPA's (BETTIN; FRANCO,2005). Os contaminantes que apresentaram maior concentração foram o acenaftileno armazenado em E₃ e fluoranteno armazenado em E₂, sendo a concentração do fluoranteno encontrada neste trabalho muito maior que a encontrada por Bettin e Franco (2005) de 2,91 µg L⁻¹ em aguardentes fabricadas com cana queimada.

Entre as marcas de cachaça analisadas, observa-se que nem sempre o tipo de embalagem interferiu na concentração dos HPA's estudados, quando o tempo de armazenamento em embalagens PET foi de 4 meses. Porém, quando se comparam as embalagens de vidro com as amostras armazenadas por 8 meses em embalagem PET, pode-se observar que o tempo de armazenamento aumentou as concentrações desses contaminantes. Quanto às embalagens utilizadas, pode-se perceber que as amostras armazenadas em recipientes de vidro na maioria das vezes não foram detectadas HPA's, e quando detectados apresentaram concentrações muito baixas.

Dentre as marcas de cachaça analisadas, a marca MAZ apresentou maior concentração no somatório de HPA's nas embalagens e tempos analisados, sendo a maior concentração de 17,916 µg L⁻¹ para a embalagem E₁ com 8 meses de armazenamento, apesar de essa concentração se encontrar dentro dos limites sugeridos para teores totais de HPA's pela *German Society for Fat Science* de 25 µg L⁻¹ para alimentos defumados (GALINARO;FRANCO,2009).

A marca JAC armazenada por 8 meses E₃ foi a que apresentou maior variedade de composição desses contaminantes, apresentando 9 dos 10 HPA's estudados. Nas embalagens PET, a embalagem E₂ foi a que apresentou maior quantidade de contaminantes acima do permitido para legislação escocesa (BETTIN; FRANCO,2005).

Dentre os contaminantes estudados, os HPA's de baixa massa molar, até 3 anéis aromáticos, foram os mais encontrados nas amostras analisadas, principalmente naftaleno, acenaftileno e fluoreno, corroborando com a afirmação de Wenzl; Zelinkova (2019) em que os

HPA's de menor massa molar são os mais comuns na contaminação de alimentos. Posteriormente, Li; Ni; Zeng (2017) afirmam que os HPAs de baixa massa molar são mais detectados em materiais de contato com alimentos produzidos em poliestireno. Esses HPA's são mais fáceis de serem encontrados porque o caminho de reação para a sua formação consiste em menos passos, quando comparado com os de alta massa molar. Estes dados são diferentes daqueles encontrados por Machado et al. (2014), que ao compararem embalagens de vidro e bombonas de polietileno de alta densidade (PEAD) para armazenamento de cachaça, encontraram HPA's de baixa massa molar em embalagens de vidro e de alta massa molar nas bombonas. Dentre os HPA's de alta massa molar, o fluoranteno e pireno foram os mais encontrados ao passo que benzo(a)antraceno, acefenantileno e benzo(a)pireno quase não foram detectados nas amostras.

De acordo com os teores totais de HPA's para cachaça, rum e uísque sugeridos pela *German Society for Fat Science*, o somatório desses contaminantes nas amostras ficaram dentro do limite de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Este trabalho corrobora parcialmente com o estudo de Riachi et al, (2014), que dentre os dezesseis HPA's já encontrados em aguardente de cana, os mais encontrados foram naftaleno, fenantreno, acenaftileno, criseno e fluoranteno. Esses contaminantes são genotóxicos, carcinogênicos e representam risco à saúde pública. A contaminação desses compostos na cachaça pode ocorrer devido a vários fatores, como a localização da cultura da cana, contaminação nas etapas de processamento (adição de caramelo para correção das bebidas envelhecidas); uso de lubrificantes nos equipamentos, como moendas, tanques revestidos com resinas asfálticas; durante a maturação em tonéis de madeira tratados termicamente e recipientes inadequados de armazenamento, como bombonas de polietileno (BORTOLETTO et al.,2018 ; ALCARDE,2017; MACHADO et al.,2014; GALINARO; FRANCO,2009).

5.6 Análise multivariada para a identificação e quantificação de HPA's

5.6.1 Análise de Componentes Principais e Agrupamento Hierárquico

Na Figura 12, está apresentado o gráfico de análise de componentes principais (PCA), construído a partir dos resultados das análises cromatográficas de quantificação de HPA's.

6. CONCLUSÃO

A qualidade físico-química das amostras estudadas foi afetada pelos diferentes tipos de embalagens e pelo tempo de armazenamento, mostrando que as embalagens PET nem sempre são ideais para o armazenamento de cachaças.

Na quantificação de Carmato de Etila, os tipos de embalagem e tempo de armazenamento não afetaram sua concentração, visto que em todas as amostras o contaminante não foi detectado.

Na quantificação de HPA's por HPLC, os tipos de embalagens interferiram na quantificação desses contaminantes, de modo que as amostras armazenadas por maior tempo em embalagens PET apresentaram maiores concentrações desses contaminantes em todas as marcas de cachaça analisadas.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R. **Cachaça: ciência, tecnologia e arte**. 2. ed. São Paulo: Ed. Blucher, 2017.
- ANDRADE, L. A. B. **Cultura da cana-de-açúcar**. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3 ed. Lavras: Ed. UFLA, p. 25-55, 2013.
- ANJOS, J. P. et al. **Identification of ethyl carbamate during the aging of cachaça in an oak barrel (*quercus sp*) and a glass vessel**. Química Nova, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 874-878, 2011.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº166, de 25 de julho de 2017**. Validação de métodos analíticos e outras providências. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.P.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 13 de setembro de 2018.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 274, de 22 de janeiro de 2005**. Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_274_2005.pdf/19d98e61-fa3b-41df-9342-67e0167bf550>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 281, de 06 de outubro de 2003**. Regulamento técnico para procedimento de importação para "aceite de orujo de oliva" ou óleo de bagaço e ou caroço de oliva. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/Resolucao_RDC_n_281_de_06_de_outubro_de_2003.pdf/37e5b459-5f82-4a8b-8da7-ba29d4408174/>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.
- AQUINO, F. W. B. et al. **Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças**. Cienc. Tecnol. Aliment, v.26, n. 1, p. 145-149, 2006.
- BARBOSA, L. C. de A. **Introdução a Química Orgânica**. 1 ed. Ed. UFV, 2004.
- BASAL, V.; KIM, K. H. **Review of PAH contamination in food products and their health hazards**. Environment International, v. 84, p. 26-38, 2015.
- BETTIN, S. M.; FRANCO, D.W. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) em aguardentes**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.25, n.2, p. 234-238, 2005.
- BORTOLETTO, A. M. et al. **Good manufacturing practices, hazard analysis and critical control point plan proposal for distilleries of cachaça**. Sci. Agric. v.75, n.5, p.432-443, 2018.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 28, de 08 de agosto de 2014**. Altera o subitem 5.1.2 do Anexo da Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 11 ago. 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6871, de 04 de junho de 2009.** Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução normativa n.24, de 08 de setembro de 2005.** Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 20 set. 2005. Seção I.

BRITO, N. M. et al. **Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão.** Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v.13, 2003.

CACHO, J. I. et al. **Evaluation of the contamination of spirits by polycyclic aromatic hydrocarbons using ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry.** Food Chemistry, v.190, p.324-330, 2016.

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, p. 1871-1879, 2010.

CARDOSO, M. G. et al. **Análises físico-químicas de aguardentes.** In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana.** 3 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2013.

CARNEIRO, J. de D. S. **Estudo dos fatores da embalagem e do rótulo de cachaça no comportamento dos consumidores.** 2007. 109 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.; ALABURDA, J. **Benzo (a) pireno, carbamato de etila e metanol em cachaças.** Quim. Nova, v.33, n.9, p. 1973-1976, 2010.

CARUSO, M. S. F., ALABURDA, J. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – benzo (a) pireno: uma revisão.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.67, n.1, p. 1-27, 2008.

CARVALHO, de C. et al. **Anuário Brasileiro de Cana-de-açúcar.** Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta de Santa Cruz, 2018.

CHINNICI, F. et al. **Presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in woody chips used as adjuvant in wines, vinegars and distillates.** LWT – Food Science and Technology, v. 40, p. 1587-1592, 2007.

CÔDO, S. M. B. **Destilação.** In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana.** 3 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana de Açúcar,** 2018.

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

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

DÓREA, H. S. et al. **Análise de poluentes orgânicos tóxicos em cachaça**. *Revista Fapese*, v.4, n.2, p. 5-18, 2008.

DRESH, M. R. et al. **Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas etapas de fabricação da cerveja**. *Revista Destaques Acadêmicos*, v. 3, n. 4, CETEC/UNIVATES, 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food**, 2008.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**; tradução Florencia Cladera Oliveira... [et al.]. 2. ed. – Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR: A computer statistical analysis system**. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, 1039-1042, 2011.

FORLIN, F. J. **Maturação de aguardente de cana composta com extrato de madeira de carvalho em embalagens de Polietileno tereftalato (PET)**. 2005. 176 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

GALINARO, C. A., FRANCO, D.W. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível**. *Química Nova*, São Carlos, v. 32, n. 6, p. 1447-1451, 2009.

GARCIA, L. P. et al. **Hidrocarbonetos policíclicos aromaticos em alimentos: uma revisão**. *PUBVET*, Londrina, v. 8, n. 19, 2014.

GONÇALVES, R. C. F. **Compostos voláteis em cachaças de alambique produzidas por leveduras selecionadas e por fermentação espontânea**. *Magistra*, Cruz das Almas, v. 28, n.3/4, p. 285-293, 2016.

HOLANDA, V. B. de. et al. **Avaliação da influência das embalagens de vidro e PET na qualidade da aguardente de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.)**. *Revista Agropecuária Técnica (AGROTEC)*, v. 36, n. 1, p. 156-160, 2015.

KIST, B. B.; SANTOS, C.E. dos.; BELING, R.R. **Anuário Brasileiro da Cana de Açúcar**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz do Sul, 2016.

LI, S. Q.; NI, H. G.; ZENG, H. **PAHs in polystyrene food contact materials: An unintended consequence**. *Science of the Total Environment*, v. 609, p. 1126-1131, 2017.

LIMA, M.J.Q. & TAHAM, T. **Influência no Sabor e na Qualidade da Cachaça Artesanal Envasada em Embalagem de Plástico e de Vidro.** Cadernos de Pós-Graduação da FAZU, v. 2, 2011.

MACHADO, A. M de R. et al. **Contamination of cachaça by PAHs from storage container.** Food Chemistry, v.146, p. 65-70, 2014.

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

MACHADO, A. M de R. **Carbamato de etila, acroleína e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: Caracterização e quantificação em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e “bombonas” de PEAD.** 2010. 269 p. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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.

MASHINA, R. A. G. et al. **Análises de substâncias voláteis presentes em cachaças artesanais do estado da Paraíba.** Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade, v. 4, n. 2, 2016.

MENTANA, A. et al. **Chemical changes in Apulia table wines as affected by plastic packages.** Food Science and Technology, v. 42, n. 8, p. 1360-1366, 2009.

MIRANDA, M. B. de. et al. **Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 27, n. 4, p. 897-901, 2007.

MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. Aguardente de cana. In: VENTURINI FILHO, V. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia.** 1 ed. São Paulo: Ed. Blucher, 2010.

NERIN, C. **Plastics and Polymers for Food Packaging Manufacturing.** Elsevier, 2016.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a Novel FreeUser - Friendly Interface for Chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

OHIMAIN, E. I. **Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension.** Springer Plus, v. 5. n. 1607, p. 2-10, 2016.

OLIVEIRA FILHO, J. H. de. et al. **Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça.** Braz. J. Food Technol., Campinas, v. 19, n. 2015069, p. 1-9, 2016.

PAIVA, A. L. et al. **Fluxo das Exportações Brasileiras de Cachaça: traços da influência do Estado no setor.** Rev. Econ. Sociol. Rural. v. 55, n.4, p.733-750, 2017.

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

PIRES, J. A. et al. **Efeito de embalagens de politereftalato de etileno em vinhos tintos suaves submetidos à radiação gama (Co^{60}) para envelhecimento precoce**. Bioenergia em revista: Diálogos, v. 2, n. 1, p. 46-59, 2012.

PORTUGAL, C. B. et al. **How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça**. Food Research International, v.91, p. 18-25, 2017.

PURCARO, G. et al. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. Encyclopedia of Food and Health. Elsevier, 2016.

Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO). **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Divisão de Ensaio Químico Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial DEQ/CGAL,2014.

RIACHI, L.G. at al. **A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits**. Food Chemistry. v.149, p. 159-169, 2014.

RIBANI, M. **Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Quim. Nova, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, L. M. A. et al. **Phenolic extracts of cachaça aged in different woods and quantifying antioxidant activity and antifungal properties**. Jornal Institute of Brewing & Distilling, v. 122, p. 644-652, 2016.

RUNGCHANG, S. et al. **Diffusion coefficient of antimony leaching from polyethylene terephthalate bottles into beverages**. Journal of Food Engineering, v. 115, p. 322-329, 2013.

SANTIAGO, W. D. et al. **Determination of ethyl carbamate in cachaça stored in newly made oak, amburana, jatobá, balsa and peroba vats and in glass containers**. Jornal Institute of Brewing, London. v. 123, p. 572-578, 2017.

SANTIAGO, W. D. et al. **Physicochemical profile and determination of volatile compounds in cachaça stored in new oak (*Quercus sp.*), amburana (*Amburanacearensis*), jatoba (*Hymenaeaecarbouril*), balsam (*Myroxylonperuiferum*) and peroba (*Paratecomaperoba*) casks by SPME-GC-MS**. Journal Institute of Brewing & Distilling, v.122, p. 624-634, 2016.

SANTIAGO, W. D. et al. **Multivariate analysis for the characterization of physico-chemical profiles of cachaça produced in copper stills over a period of six years in Minas Gerais state**. Journal Institute of Brewing & Distilling, v. 121, p. 244-250, 2015.

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

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE. **Cachaça artesanal**. Série estudos mercadológicos - Relatório completo, 2012.

SHWAN, R. F. et al. **Fermentação**. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2013.

SILVA, F. A. et al. **Influence of the number of distillations on the composition of organic sugarcane spirit**. Journal Institute of Brewing & Distilling, v. 119, p. 133-138, 2013.

SINGH, L. et al. **Polycyclic aromatic hidrocarbons formation and occurrence in processed food**. FoodChemistry, v. 199, p. 768-781, 2016.

SOARES JÚNIOR, A. B. **Produção do poli (tereftalato de etileno) modificado com glicerol e derivados**. 2010. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

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

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, 2007.

VEIGA, J. F. **Equipamentos para produção e controle de operação da fábrica de cachaça**. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3 ed. Lavras: Ed. UFLA, p.61, 2013.

VIANA, L. F.; CALIARI, M.; JUNIOR, M. S. S. **Características Físico-Químicas de Aguardente de Cana-de-Açúcar Submetida a Diferentes Condições de Envelhecimento**. Revista Processos Químicos. Goiânia, v.10, n.19, p. 65-82, 2016.

VIDAL, E. E. et al. **Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation**. Food Chemistry, v. 138, p. 701-708, 2013.

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, 2007.

WENZL, T., ZELINKOVA, Z. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food and Feed**. European Commission, Joint Research Centre, Geel, Belgium, 2019.

WIACEK, A. E. et al. **Interfacial properties of PET and PET/starch polymers developed by air plasma processing**. Colloids and Surfaces, v. 532, p. 323-331, 2017.

WIEBACK, H.; HARADA, J. **Plásticos de engenharia: Tecnologia e aplicações**. 1 ed. São Paulo: Ed. Artliber, 2005.

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

ZACARONI, L. M. et al. **Argila natural e carvão ativado comercial: Propriedades e aplicação para a remoção de cobre da cachaça**. *Food Control*, v. 47, p. 533-544, 2015.

