



PÂMELA APARECIDA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO GLICOSÍDEO CIANOGENICO EM
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR, IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM
CACHAÇAS**

LAVRAS – MG

2022

PÂMELA APARECIDA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO GLICOSÍDEO CIANOGENICO EM VARIEDADES DE
CANA-DE-AÇÚCAR, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMATO
DE ETILA EM CACHAÇAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para obtenção de título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Profa. Dra. Ana Maria de Resende Machado
Dr. Wilder Douglas Santiago
Coorientadores

LAVRAS- MG

2022

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

Santos, Pâmela Aparecida dos.

Caracterização do glicosídeo cianogênico em variedades de
cana-de-açúcar, identificação e quantificação de carbamato de etila
em cachaças / Pâmela Aparecida dos Santos. - 2022.

90 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

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

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Cachaça. 2. Carbamato de Etila. 3. Dhurrin. I. Cardoso,
Maria das Graças. II. Machado, Ana Maria de Resende. III.
Santiago, Wilder Douglas. IV. Título.

PÂMELA APARECIDA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO GLICOSÍDEO CIANOGENICO EM VARIEDADES DE
CANA-DE-AÇÚCAR, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMATO
DE ETILA EM CACHAÇAS**

**CHARACTERIZATION OF CYANOGENIC GLYCOSIDE IN SUGAR CANE
VARIETIES, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF ETHYL
CARBAMATE IN CACHAÇAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para obtenção de título de Mestre.

APROVADA em 23 de agosto de 2022.

Dra. Ana Maria de Resende Machado CEFET

Dr. Manuel Carlos Minez Tábua UP

Dr. David Lee Nelson UFVJM

Dr. Guilherme Vieira Pimentel UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Profa. Dra. Ana Maria de Resende Machado
Dr. Wilder Douglas Santiago
Coorientadores

LAVRAS- MG

2022

À minha mãe, que sempre foi meu maior apoio nos momentos de angústia. Ao meu irmão, com muito amor. Ao meu noivo, pelo companheirismo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me possibilitou o dom da vida e alcançar todos os meus objetivos com determinação, dando-me forças para prosseguir e alcançar meus sonhos;

À Instituição de Ensino Universidade Federal de Lavras (UFLA), por todo o suporte financeiro e laboratorial oferecido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig – Projeto CAG/APQ02424-16), pelo financiamento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes-001) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Bolsa de Produtividade 309733).

À minha orientadora, Professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela ajuda constante, confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao meu pai Manoel Messias dos Santos e, em especial, minha mãe, Sônia Regina dos Anjos, pelo esforço além do possível, para que eu almejasse minha formação acadêmica, dando-me todo suporte e carinho necessário durante essa caminhada.

Ao meu irmão, Saimon, pela amizade e companheirismo, pelas risadas e puxões de orelha. À minha cunhada, Sabrina, e afilhado Guilherme, pelos abraços carinhosos todas as vezes que voltava para casa.

Ao meu noivo, Josemar, por sempre estar comigo incentivando-me, dando apoio, lembrando-me todos os dias o quanto sou capaz.

Aos Professores coorientadores, Dra. Ana Maria de Resende Machado, pelas considerações para melhoria do projeto e, em especial, ao Dr. Wilder Douglas Santiago, pelo auxílio durante as análises cromatográficas.

Aos amigos, Antonia Isadora, Ana Paula, Bianca, Cassia, Carlos Henrique, Cecília, Gabriela Alvarenga, Gilson, Marcus, Maria Augusta, Maria Beatriz, pela amizade de sempre e apoio nos momentos de que mais precisei, fazendo a caminhada mais leve e prazerosa.

Aos colegas de laboratório, Alex, Ana Beatriz, Carolina, Gabriela, Lucas, Mariely e Samuel, pela ajuda durante a execução do trabalho, em especial à amiga Vanuzia, por todo suporte e ajuda para realizar as análises.

À técnica e amiga Maria Luíza, pelas conversas, ensinamentos e conselhos.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A todos os produtores de cachaça, em especial aos que prontamente colaboraram em parceria ao Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente, a quem dedico este trabalho.

RESUMO

A bebida obtida por meio do processo de fermentação, com posterior destilação, tendo como matéria-prima a cana-de-açúcar é denominada de Cachaça ou Aguardente de cana. A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma cultura tropical cianogênica, ou seja, podem estar presentes em sua composição glicosídeos cianogênicos como dhurrin e linamarin, compostos que podem estar associados à formação de carbamato de etila (CE), um contaminante carcinogênico para humanos. É classificado como grupo 2A pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Os objetivos com este trabalho foram identificar e quantificar dhurrin e linamarin em diferentes variedades de cana-de-açúcar e em diferentes partes da cana (pontas e colmos), a fim de correlacionar esses glicosídeos com a formação do carbamato de etila durante o processo produtivo das cachaças. Coletaram-se quinze variedades de cana-de-açúcar (colmos e pontas) e amostras comerciais de cachaças obtidas dessas variedades. Foram elaborados vinte e cinco extratos metanólicos das variedades mais utilizadas para a produção de cachaça. As amostras de cachaça foram submetidas às análises físico-químicas e cromatográficas, para identificação dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) e para a determinação da influência dos glicosídeos cianogênicos na formação de carbamato de etila na bebida. Não foi detectado o glicosídeo linamarin em nenhuma das amostras estudadas. O glicosídeo dhurrin foi encontrado em concentrações, que variaram de não detectado (ND) a 0,0731 mg mL⁻¹ para as pontas e ND a 0,0295 mg mL⁻¹ para os colmos. Em relação aos PIQs, três amostras não se encontraram dentro dos padrões para a graduação alcoólica (37,06; 37,38 e 37,51%), quatro amostras não atenderam à legislação para álcool *sec*-butílico e dez não estavam dentro dos padrões para acroleína. Todas as amostras atenderam à legislação em relação ao CE, com valores variando de 7,10 a 21,81 µg L⁻¹. Apesar de o dhurrin ser encontrado em concentrações muito pequenas nos extratos das pontas e dos colmos de algumas variedades de cana, a sua presença pode levar à formação de carbamato de etila. Assim, recomenda-se aos produtores a escolha de uma variedade de cana certa e o cuidado em todas as etapas da cadeia produtiva para evitar a formação do carbamato de etila na bebida.

Palavras-chave: Contaminantes de Bebidas. Qualidade de Cachaça. Análises Físico-Químicas e Cromatográficas. Carbamato. Linamarin. Dhurrin.

ABSTRACT

The beverage obtained through the fermentation process, followed by distillation, which is called Cachaça or Sugarcane Spirits, is produced from sugar cane. The sugarcane (*Saccharum spp.*) belt is tropical cyanogenic, meaning that it could contain cyanogenic glycosides such as dhurrin and linamarin. These compounds could be associated with the formation of ethyl carbamate (EC), a contaminant that is carcinogenic for humans, classified as a 2A group by the International Agency for Research on Cancer (IARC). The goals of this work were to identify and quantify dhurrin and linamarin in different varieties of sugarcane and in different parts of the plant (points and stems) to correlate the glycosides with the formation of ethyl carbamate during the cachaça production process. Fifteen varieties of sugarcane (points and stems) were collected, and cachaças obtained from those sugarcane varieties were acquired in the local commerce. Twenty-five methanolic extracts were obtained from the sugarcane varieties most widely used for cachaça production. Physical-chemical and chromatographic analyses were performed on the cachaça samples for the identification of the Quality and Identity Standards (PIQ's) and for the determination of the influence of cyanogenic glycosides on the formation of ethyl carbamate in the beverage. The glycoside linamarin was not detected in any of the samples studied. The glycoside dhurrin was identified in concentrations that varied from non-detected (ND) to 0,0731 mg mL⁻¹ for the sugarcane points and ND to 0,0295 mg mL⁻¹ for the sugarcane stems. Three cachaça samples did not meet the standards for alcoholic content (37.06; 37.38 and 37.51%). Four samples were not in accordance with the legislation for *sec*-butyl alcohol and ten were not in accordance with the legal limit for acrolein. All the samples were within the legal limit for EC, with values that varied from 7.10 µg L⁻¹ to 21,81 µg L⁻¹. Dhurrin was found in low concentrations in the extracts of the ends and stems of some sugarcane varieties, and its presence can lead to the formation of ethyl carbamate. It is recommended that producers choose the correct sugarcane variety, and they should be cautious in every step in the production chain to avoid the formation of ethyl carbamate.

Keywords: Beverage Contaminants. Cachaça's Quality. Physical-Chemistry and Chromatography Analyses. Linamarin. Dhurrin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estabelecimentos produtores de cachaça registrados por Estado	18
Figura 2 - Estabelecimentos produtores de aguardente por Estado	19
Figura 3 - Fluxograma da produção de cachaça	20
Figura 4 - Morfologia vegetal das folhas de cana-de-açúcar	23
Figura 5 - Variedades de cana-de-açúcar plantadas na safra 2019/2020 no estado de Minas Gerais	25
Figura 6 - Variedades de cana-de-açúcar cultivadas na safra 2019/2020 no estado de Minas Gerais	25
Figura 7 - Fórmula estrutural do Carbamato de etila	38
Figura 8 - Esquema geral dos precursores envolvidos no ciclo da ureia para formação de CE	42
Figura 9 - Fórmulas estruturais de dois glicosídeos cianogênicos	46
Figura 10 - Biossíntese de Dhurrin no sorgo	47
Figura 11 - Biossíntese de Linamarin em <i>L. japonicus</i>	48
Figura 12 - Seletividade do método proposto para a determinação de Dhurrin	61
Figura 13 - Seletividade do método proposto para determinação de Linamarin.....	62
Figura 14 - Parâmetros de correlação (R^2) da curva analítica, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para determinação de Dhurrin	63
Figura 15 - Parâmetros de correlação (R^2) da curva analítica, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para determinação de Linamarin	63
Figura 16 - Concentração de Dhurrin nas pontas das diferentes variedades de cana-de-açúcar estudadas	65
Figura 17 - Concentração de Dhurrin nas pontas das diferentes variedades de cana-de-açúcar estudadas	66

Figura 18 - Cromatograma de HPLC do padrão de Dhurrin e amostra de extrato bruto.....66

Figura 19 - Pontuações e cargas das análises de componentes principais (PCA) na correlação de matriz construída usando dados para os componentes Dhurrin e CE78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Padrões de Identidade e Qualidade presentes nas aguardentes e cachaças brasileiras.....	32
Quadro 2 - Valores para CE em $\mu\text{g} / \text{L}$ estabelecidos pela legislação de cada país	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variedades de cana-de-açúcar coletadas no CDCT - UFLA.....	52
Tabela 2 - Concentrações utilizadas na construção da curva analítica – Dhurrin	53
Tabela 3 - Concentrações utilizadas na construção da curva analítica – Linamarin.....	54
Tabela 4 - Cachaças analisadas e suas respectivas variedades	57
Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas e cromatográficas das cachaças em estudo	69
Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas e cromatográficas das cachaças em estudo (continuação)	70
Tabela 6 - Resultados das análises de contaminantes das cachaças analisadas	74
Tabela 6 - Resultados das análises de contaminantes das cachaças analisadas (continuação)	75
Tabela 7 - Grupos formados pelo PCA, em relação aos valores de Dhurrin dos colmos e CE	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Cachaça e mercado.....	17
2.2	Cadeia produtiva	19
2.2.1	Matéria-prima	20
2.2.1.1	Variedades de cana-de-açúcar e sua utilização na produção de cachaça	24
2.2.2	Obtenção do caldo.....	27
2.2.3	Fermentação.....	28
2.2.4	Destilação	29
2.2.5	Armazenamento e envelhecimento	30
2.3	Compostos secundários e contaminantes.....	31
2.4	Carbamato de Etila (CE).....	38
2.4.1	Carbamato de Etila e suas vias de formação.....	40
2.5	Glicosídeos cianogênicos e sua relação com a formação de carbamato de etila.....	43
2.6	Métodos de detecção e quantificação de Linamarin e Dhurrin	49
3	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1	Coleta e preparo do material	53
3.2	Obtenção dos extratos e preparo do padrão de Dhurrin	53
3.3	Obtenção dos extratos e preparo do padrão de Linamarin.....	54
3.4	Condições cromatográficas.....	55
3.5	Coleta de amostras de cachaça/aguardente dos produtores	57
3.6	Análises físico-químicas das aguardentes/cachaças	58
3.6.1	Gradação alcoólica	59
3.6.2	Acidez volátil.....	59
3.6.3	Extrato seco	59
3.6.4	Ésteres	59
3.6.5	Aldeídos.....	59
3.6.6	Álcoois superiores e metanol	60
3.6.7	Furfural e Hidroximetilfurfural	60
3.6.8	Cobre	60
3.6.9	Acroleína	61
3.6.10	Carbamato de etila (CE)	61
3.7	Análise estatística.....	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63

4.1	Padronização dos métodos de detecção de Dhurrin e Linamarin.....	63
4.2	Determinação dos glicosídeos cianogênicos nas amostras de cana-de-açúcar	67
4.3	Análises físico-químicas e cromatográficas das amostras de cachaça	70
4.4	Correlação entre o glicosídeo Dhurrin e CE em cachaças	79
5CONCLUSÕES.....		83
REFERÊNCIAS.....		84

1 INTRODUÇÃO

A cachaça e a aguardente de cana são bebidas obtidas por meio da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, com posterior destilação. Segundo a legislação vigente (IN nº13, 29/06/2005), a aguardente de cana-de-açúcar possui graduação alcoólica entre 38% a 54% (v/v) a 20 °C, ao passo que a cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% (v/v) a 20 °C, com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2005).

Aguardente/cachaça são uma das bebidas destiladas mais consumidas no mundo, assim como em todoo território nacional. Sua história foi construída juntamente com a história do país, deixando de ser uma bebida consumida apenas por escravos para se tornar apreciada por diversas classes sociais. Atualmente, a cachaça é conhecida mundialmente, sendo cantada em prosa e verso pelos consumidores, estudiosos e apreciadores da bebida. Com o aumento das exportações e a procura por uma cachaça de qualidade, busca-se constantemente o conhecimento de sua composição química. Sendo assim, a oferta de boas cachaças e aguardentes carece de conhecimento técnico e científico por parte dos produtores (CARDOSO, 2020)

As cachaças/aguardentes são constituídas predominantemente por etanol e água, além de compostos secundários, como os ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e álcoois superiores, que agregam características de aroma e sabor à bebida. Além desses, durante toda a cadeia produtiva, pode ocorrer a formação de substâncias capazes de depreciar a qualidade da bebida final e serem maléficas à saúde do consumidor. Os principais contaminantes encontrados são o metanol, álcoois superiores: butílico (butanol-1) e *sec*-butílico (butanol-2), furfural e hidroximetilfurfural (HMF), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), acroleína, carbamato de etila, e os metais: cobre, arsênio e chumbo (CARDOSO, 2020).

Dentre esses contaminantes, destaca-se o carbamato de etila (CE), pois é classificado como um possível carcinogênico para humanos (Grupo 2A) pela *International Agency for Research on Cancer*(IARC), podendo ser encontrado em diversos alimentos e bebidas fermentadas consumidas diariamente, como queijos, pães, iogurte, vinho, molho de soja, uísque, cachaça, entre outros, carecendo de um rigoroso controle dos seus limites (IARC, 2010).

Acredita-se que esse composto possa ser formado em várias etapas da produção, já que suas vias de formação em cachaças e aguardentes ainda não estão completamente esclarecidas. Os precursores presentes em culturas de cana-de-açúcar têm sido apontados

como uma das vias principais para a presença desse contaminante na cachaça/aguardente. Suspeita-se que o CE possa ser originado pela presença de glicosídeos cianogênicos existentes na matéria-prima, que, dependendo do processo, podem ser convertidos em cianeto, e pela reação com o etanol, é capaz de formar o contaminante.

A cana-de-açúcar, *Saccharum spp.*, matéria-prima para a produção de cachaça, é uma cultura cianogênica, ou seja, pode conter glicosídeos cianogênicos, como o dhurrin e o linamarin em sua composição. Esses compostos podem passar para o mosto, levando à formação de carbamato de etila. Atualmente, existem diversas variedades de cana-de-açúcar disponíveis no Brasil, e sua composição química pode variar (CRAVO *et al.* 2019).

A escolha da variedade ideal para a produção de cachaça/aguardente é de extrema importância, pois suas características irão influenciar diretamente no produto final. Assim, um estudo minucioso para identificar as variedades que apresentam esses glicosídeos e verificar a influência deles na formação do contaminante também é essencial, visto que a contaminação de bebidas por CE pode ser um empecilho para a comercialização dos destilados.

Os objetivos com este trabalho foram identificar e quantificar glicosídeos cianogênicos, dhurrin e linamarin, presentes em diferentes variedades de cana-de-açúcar, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), bem como verificar a sua presença nas diferentes partes das canas, como pontas e colmos e correlacioná-los com a formação do carbamato de etila durante a produção de cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cachaça e mercado

Estima-se que a cachaça tenha se originado em algum dos engenhos situados entre São Paulo e Pernambuco, datada entre 1516 e 1532, sendo a bebida destilada mais antiga da América Latina. Segundo o Instituto Brasileiro de Cachaça (IBRAC), a cachaça serviu como moeda de troca para a compra de escravos e metais preciosos (IBRAC,2022a).

Com origem histórica, a cachaça sofreu momentos de proibição de venda e produção, além de cobrança de altos impostos; porém, superou esses obstáculos e acompanha o brasileiro desde sua descoberta. A bebida deixou de ser um produto de baixa classe para se tornar uma das bebidas mais consumidas da atualidade, apreciada por diferentes classes e utilizada para compor *drinks* mais sofisticados e com alto valor comercial (ANDRADE *et al.*, 2018).

Segundo a legislação, aguardente de cana é a bebida obtida do destilado simples da cana-de-açúcar, com graduação alcoólica de 38% a 54%, em volume a 20 °C, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹, expressos em sacarose. Já cachaça é a denominação exclusiva da aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20°C. Visando ao maior reconhecimento da bebida, é imprescindível que ela atenda a todas as normas legais, que somente podem ser outorgadas se forem produzidas conforme os padrões de qualidade descritos nas Instruções Normativas números 13, de 29 de junho de 2005 e 28 de agosto de 2014 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Mapa (BRASIL, 2005, 2014).

Dados do IBRAC (2022b) apontam que a primeira Indicação Geográfica do Brasil foi a Cachaça, instituída pelo decreto nº 4.062/2001, que possibilitou a proteção do destilado em países como Chile, México, Estados Unidos e Colômbia. Inicialmente, a Colômbia reconheceu a cachaça como produto distinto brasileiro em 2012, abrindo portas para o reconhecimento nos Estados Unidos em 2013, México em 2016 e Chile em 2018. Tal reconhecimento possibilitou a comercialização do produto como cachaça, além de ser uma exclusividade o uso dessa denominação pelos produtores brasileiros.

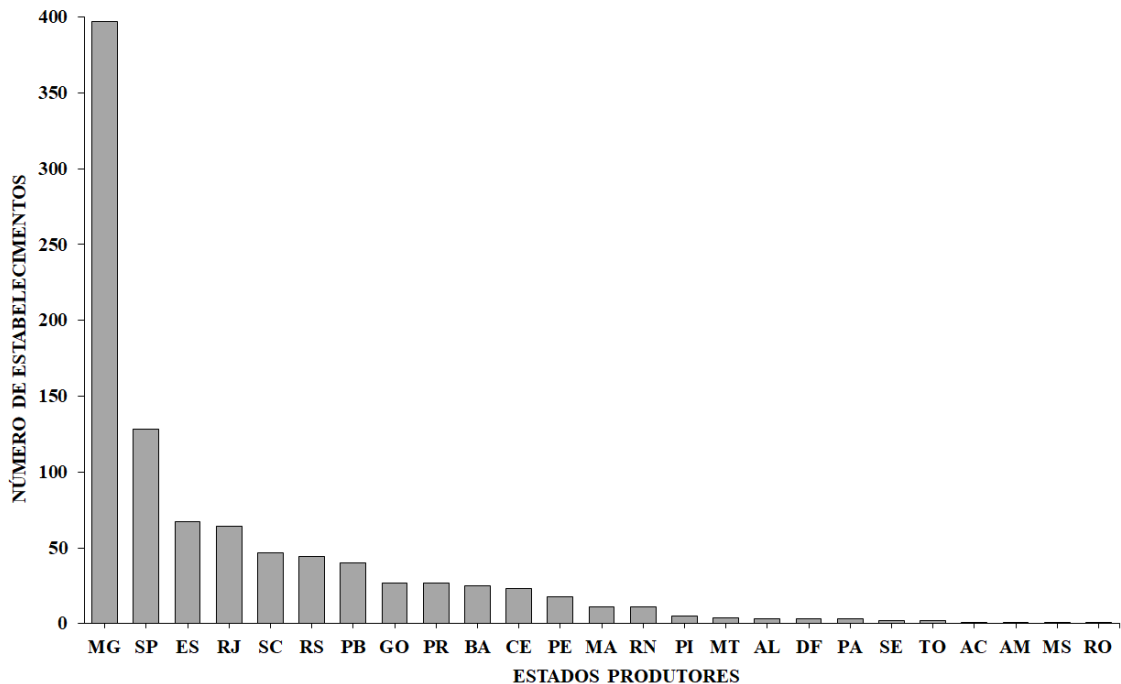
Acredita-se que o Brasil possua uma capacidade de produção de cachaça de 1,2 bilhão de litros por ano; porém, somente 800 milhões de litros são produzidos no país. Dos principais estados produtores do destilado, destacam-se São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas

Gerais e Paraíba, ao passo que os maiores consumidores são São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia e Minas Gerais (BRASIL, 2021).

Em 2021, o destilado foi exportado para 67 países, gerando uma receita de US\$ 13,17 milhões, equivalentes a 7,22 milhões de litros, o que rendeu crescimento de 38,39% em valor, quando comparado a 2020. Os estados brasileiros mais exportadores em termos de valores foram: São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (IBRAC, 2022b).

Pelos dados citados por Brasil (2021), observou-se que a Região Sudeste do país ainda é a maior em produção de cachaça, com 656 estabelecimentos registrados, em que Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro juntos concentram 70% dos registros nacionais. Em 2020, os números de registros por Estados aumentaram; somente Amapá e Roraima não registraram estabelecimentos produtores de cachaça. Os dados compilados pelo Mapa (BRASIL, 2021), referentes aos 955 estabelecimentos registrados no país em 2020 estão apresentados na Figura 1. Destaque para Minas Gerais, onde se encontra o maior número de estabelecimentos registrados. Vale ressaltar que o estado é pioneiro na aprovação da lei Estadual 13.949/2001, que dispõe a regulamentação e proteção à produção de cachaça (BRASIL, 2001).

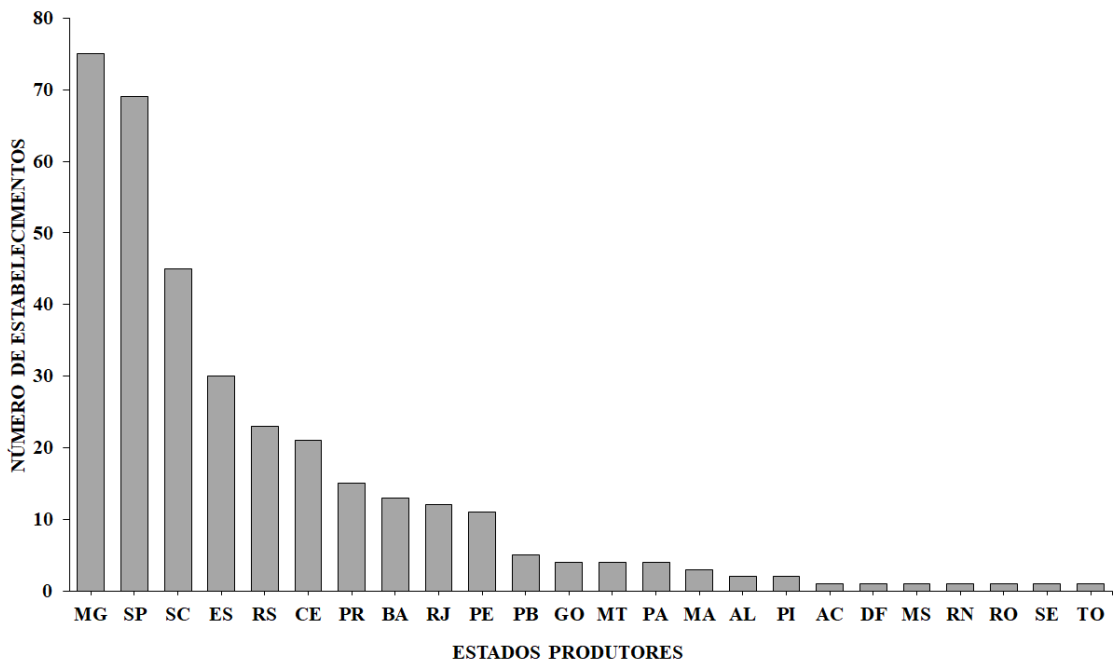
Figura 1 - Estabelecimentos produtores de cachaça registrados por Estado.



Fonte: BRASIL (2021).

Quando se trata dos dados de registro de aguardente, os estados com maiores registros de produção em 2020 são os de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Ceará, Paraná, Bahia, Rio de Janeiro e Pernambuco. A produção de aguardente ocorre efetivamente em 345 estabelecimentos, o que caracteriza 3,48% de registros no país (BRASIL, 2021). Os dados compilados pelo Mapa (BRASIL, 2021), referentes aos estabelecimentos produtores de aguardente registrados no país em 2020, estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Estabelecimentos produtores de aguardente registrados por Estado.



Fonte: BRASIL (2021).

Segundo IBRAC (2022b), um novo projeto aprovado no final de 2020 prevê investimentos de R\$ 3 milhões para convênio de cooperação técnica e financeira firmado com a APEX-Brasil, que proporcionará ajuda em todas as etapas do processo de internacionalização da cachaça, tendo como meta a participação de micro, pequenas, médias e grandes empresas. Tal projeto firma a parceria de mercado prioritário a nove países: Alemanha, França, México, Reino Unido, Suíça, Itália, Chile, Estados Unidos e Bélgica.

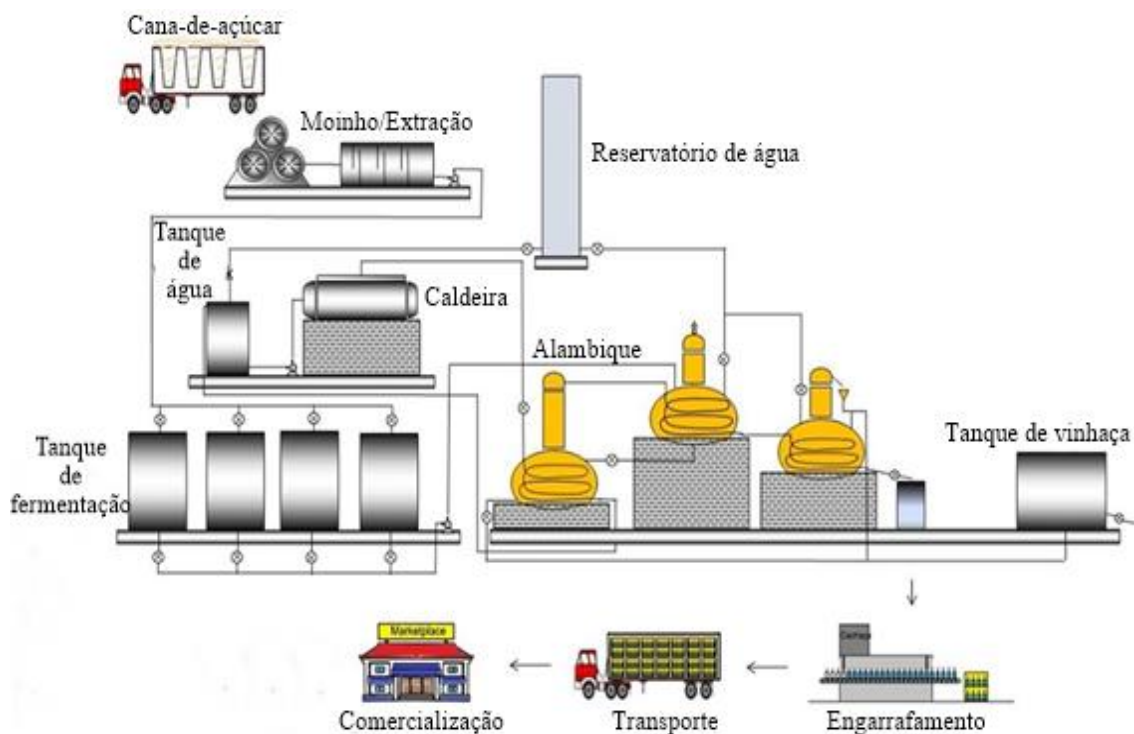
2.2 Cadeia produtiva

Com relação à cadeia produtiva, a legislação não estabelece distinção entre cachaças de alambique e industriais; porém, podem ser observadas diferenças na prática de produção. A

cachaça de alambique é destilada em alambique de cobre, o que confere aroma e *flavour* à bebida final, ao passo que as cachaças de coluna são destiladas em colunas de aço inox (CARDOSO, 2020).

A produção de cachaça de alambique é realizada exclusivamente do caldo de cana, sem adição de quaisquer substâncias; porém, cada cachaça tem sua característica própria, que carrega a identidade do seu produtor (SANTIAGO *et al*, 2017). A produção de cachaça envolve basicamente quatro etapas: moagem para se obter o caldo; fermentação; destilação e envelhecimento. Essas etapas devem ser seguidas rigorosamente para que se obtenha um produto final com qualidade superior. O processo de produção da cachaça está apresentado em um fluxograma na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma da produção de cachaça.



Fonte: Adaptado de NASCIMENTO E SILVA; VERRUMA-BERNARDI e OLIVEIRA (2020a).

2.2.1 Matéria-prima

Na classificação botânica, a cana-de-açúcar é descrita no reino vegetal como: Reino, Plantae; Divisão, Magnoliophita; Classe, Liliopsida; Ordem, Cyperales (Poales); Família, Poaceae; Tribo, Andropogonae; Subtribo, *Saccharininae*; Gênero, *Saccharum*. São

consideradas como principais espécies: *Saccharum officinarum* (*S. officinarum*), *Saccharum spontaneum* (*S. spontaneum*), *Saccharum robustum* (*S. robustum*), *Saccharum barbieri* (*S. barbieri*), *Saccharum sinense* (*S. sinense*) e *Saccharum edule* (*S. edule*) (CRONQUIST, 1981).

A cana-de-açúcar foi inserida na economia brasileira ainda no período colonial, transformando-se em uma das culturas com maior importância para o país. Atualmente, possui área de cerca de 8,3 milhões de hectares plantados, sendo utilizada pela indústria para a produção de açúcar, melado, cachaça e forragem, além da produção de combustível (etanol) (PIMENTEL; ANDRADE, 2020; CONAB, 2022). Pimentel e Andrade (2020) ressaltam que as mesmas variedades utilizadas para a produção de etanol e açúcar são adequadas para a produção de cachaça, sendo um fator primordial a escolha da variedade para o plantio.

Pelo fato de a utilização da cana ser muito ampla, a expansão de área cultivada tem aumentado no Brasil, assim como o aumento no avanço tecnológico da produção e processamento da matéria-prima para a indústria. Porém, o setor de produção de cachaça ainda se mantém bastante rústico, isso se deve a fatores técnicos, econômicos, sociais e até mesmo culturais. Para implementar um canavial destinado à produção de cachaça, o produtor deve observar alguns fatores inter-relacionados, como potencial genético da planta e sua adaptabilidade ao solo; condições físicas, químicas e biológicas do solo; condições climáticas locais; manejo do solo e cultivo; e qualidade da matéria-prima (SOUZA *et al.*, 2013).

O corte da cana também pode influenciar na qualidade da cachaça, visto que a colheita mecanizada, de acordo com as circunstâncias tal qual é praticada, pode acarretar em quantidades excessivas de terra, causando contaminações microbianas e problemas de corrosão nos equipamentos. Quase que a totalidade dos produtores de cachaça são adeptos de colheita e carregamento manuais, porém, ainda assim, devem-se observar as condições de higiene durante o corte e a condução das canas para a moagem (PIMENTEL, ANDRADE, 2020).

Além disso, a prática de queima da cana também pode afetar o processamento da cachaça, visto que alguns inconvenientes, como perda de açúcar por exsudação, aumento de impurezas minerais e condições de alta temperatura e umidade, podem causar contaminações microbianas ao caldo (PIMENTEL, ANDRADE, 2020). De acordo com Masson *et al.* (2007), além de prejuízo ambiental, a queima da cana deve ser evitada, pois com a exsudação do açúcar, podem-se aderir ao colmo resíduos da combustão, partículas sólidas do solo, minerais e outros, causando contaminação do caldo por compostos tóxicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Esses resíduos são transferidos para o caldo durante o

processamento e chegam até o produto final, o que reduz a qualidade da cachaça. Por isso, é evidente que essa prática não deve ser realizada, pois há uma modificação considerável na fisiologia e morfologia dos colmos.

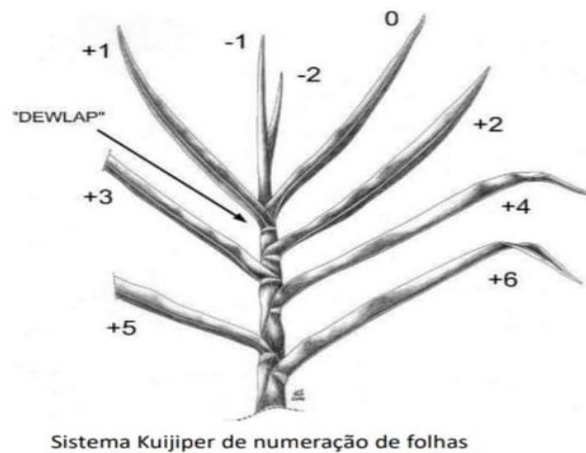
Para o processamento, a cana-de-açúcar deve estar madura, limpa e com menos de 24 horas de corte, a fim de evitar alterações que possam prejudicar a qualidade final do produto. Uma variedade ideal de cana para a produção de caldo deve conter de baixos a médios teores de fibras, isso para facilitar a moagem, deixando menores quantidades de resíduos nas moendas. Não deve apresentar doenças e deve possuir boa produtividade e maturação, com índice de açúcares satisfatórios (SOARES, VERRUMA-BERNARDI, BORGES, 2018).

A cana-de-açúcar é composta por aproximadamente 75% de água, 14% de sacarose, 12,5% de glicose. Os valores de fibra podem variar de 0,2% a 1,0%, sendo também composta por materiais nitrogenados (0,30% - 0,60%). Os aminoácidos, albuminoides, amidas (como asparagina), ácido nítrico, amoníaco e corpos xânticos são responsáveis por esses materiais. Também estão presentes gorduras e ceras (0,15% - 0,25%), substâncias pécticas, gomas e mucilagem (0,15% - 0,25%), ácidos combinados, ácidos livres e materiais corantes (PIMENTEL; ANDRADE, 2020).

Compostos nitrogenados são utilizados como fertilizantes na cultura da cana. Apesar de o nitrogênio ser elemento-chave na formação de moléculas, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, no solo esse elemento se encontra presente na forma gasosa e, assim, não está disponível para a planta; somente o nitrogênio amoniacal e íons de nitrato amônio podem ser assimilados pela cultura (NASCIMENTO E SILVA; VERRUMA-BERNARDI; OLIVEIRA, 2020b).

É importante a utilização da parte basal da cana, a qual é rica em sacarose, assim, deve-se fazer a retirada dos ponteiros, pois são pobres em açúcares e também contêm componentes, como gomas, sais e resinas, que podem prejudicar o processo de fermentação (PIMENTEL, ANDRADE, 2020). Entende-se por colmos a parte mediana e basal das canas, onde ocorre a maior concentração de sacarose. Já as pontas, parte superior do colmo, a qual possui mais açúcares redutores (AR) do que sacarose, é a parte mais vegetativa, ainda em crescimento. Também chamado de palmito, as pontas podem ser compreendidas como a região entre o *Dewlap* da folha mais jovem (Folha +1) até a inserção da quarta folha (Folha +4), como mostra a figura 4 (CASAGRANDE, 1991).

Figura 4: Morfologia vegetal das folhas de cana-de-açúcar.



Fonte: CASAGRANDE (1991).

Várias formas são utilizadas para verificar se a cana está madura: uma delas é a análise do caldo, que pode ser realizado por meio de um refratômetro que mede a porcentagem de Brix (% de sólidos solúveis), que deve ser maior ou igual a 18%. Além disso, também são levados em consideração os valores de Pol (% de sacarose aparente), sendo maior ou igual a 14,4%, medido por um polarímetro; pureza do caldo, sendo maior ou igual a 80%, sendo essa a relação entre Pol/Brix; açúcares redutores (glicose e frutose), que devem estar com valores menores ou iguais a 1,4% (PIMENTEL, ANDRADE, 2020).

Um prolongado tempo de armazenamento antes da extração do caldo favorece a desidratação dos colmos, que, conseqüentemente, acarreta o aumento de sólidos solúveis totais, intensifica a inversão da sacarose em glicose e frutose e reduz a porcentagem de açúcares redutores totais (ART), proporciona o crescimento bacteriano e aumento da acidez total, aumento de álcoois superiores, transformação dos aminoácidos leucina e isoleucina em álcool amílico (CARDOSO, 2020). A microbiota da cana é muito complexa, e nela são encontrados em atividade mais de cinquenta microrganismos que metabolizam os açúcares, formando produtos secundários que podem inibir parcialmente a levedura. Com isso, ocorre perda de rendimento e também a formação de gomas (OLIVEIRA FILHO, BORTOLETTO, ALCARDE, 2016; PIMENTEL, ANDRADE, 2020).

2.2.1.1 Variedades de cana-de-açúcar e sua utilização na produção de cachaça

Um fator importante a ser considerado pelo setor sucroalcooleiro é a produtividade da cana-de-açúcar, que pode ser favorecida pelo melhoramento genético, permitindo que as variedades se adaptem melhor às condições de solo, clima e manejo e sejam menos susceptíveis a pragas e doenças. A utilização de variedades geneticamente melhoradas contribuiu para o aumento da produtividade média dos canaviais brasileiros; porém, a máxima produtividade da cana depende de outros fatores, como um correto planejamento de plantio e um adequado manejo das variedades. Devido ao melhoramento genético, muitas variedades de cana-de-açúcar têm surgido, e embora seja vantajoso, permitindo maior diversidade na lavoura para o produtor rural, exige maior conhecimento acerca das opções para a escolha da variedade a ser plantada (EMBRAPA, 2022).

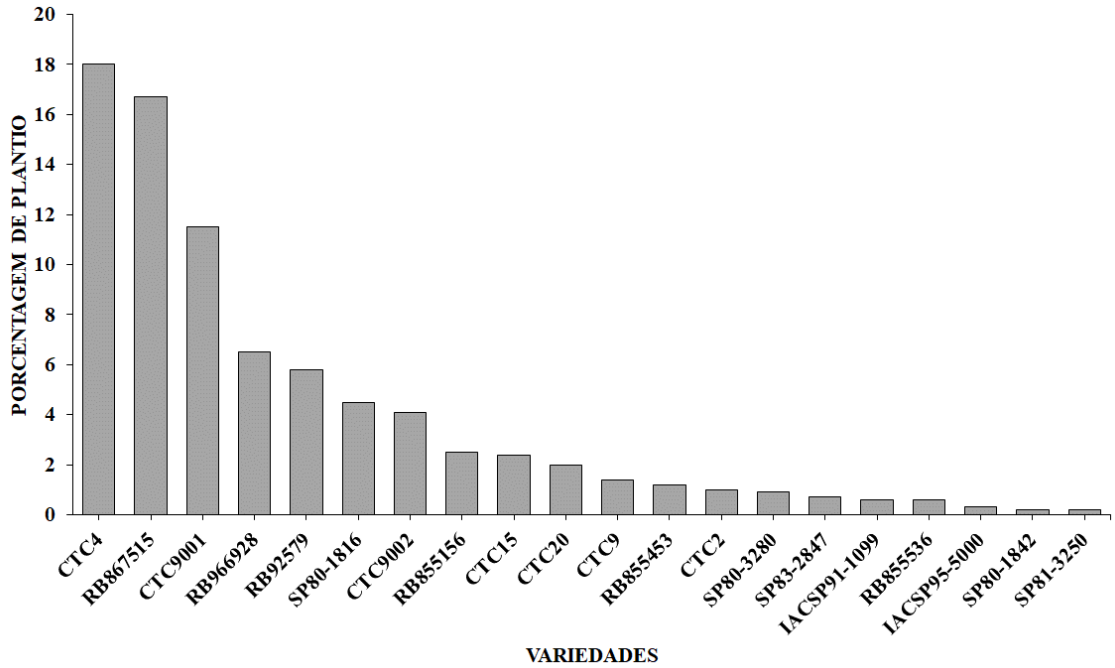
As variedades de cana-de-açúcar hoje cultivadas no Brasil e no mundo são híbridas multiespecíficas provenientes dos programas de melhoramento genético (PIMENTEL, ANDRADE, 2020). Dados da Embrapa (2022) mostram que, no Brasil, as variedades de cana-de-açúcar mais utilizadas estão divididas em três grupos que representam as Instituições de Pesquisa voltadas para o melhoramento da cana-de-açúcar: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA); Cooperativa dos Produtores de cana-de-açúcar e Álcool do Estado de São Paulo – (COOPERSUGAR), incorporado pelo Programa de Melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC); e, por último, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Instituto Agrônomo de São Paulo (IAC).

Para uma máxima produtividade, é imprescindível que cada produtor escolha as variedades que melhor se adaptam às condições locais de sua propriedade, levando-se em consideração características de porte da cana e fechamento da entrelinha, maturação e volume de matéria-prima (EMBRAPA, 2022).

Dados descritos no senso varietal do Instituto Agrônomo de São Paulo – IAC (2021) mostram que as principais variedades de cana plantadas na região Centro-Sul do Brasil em 2019/2020 são a RB867515, a RB966928, a CTC 4 e a RB92579.

A Figura 5 apresenta os dados do censo varietal de cana-de-açúcar plantada na safra 2019/2020, para o estado de Minas Gerais.

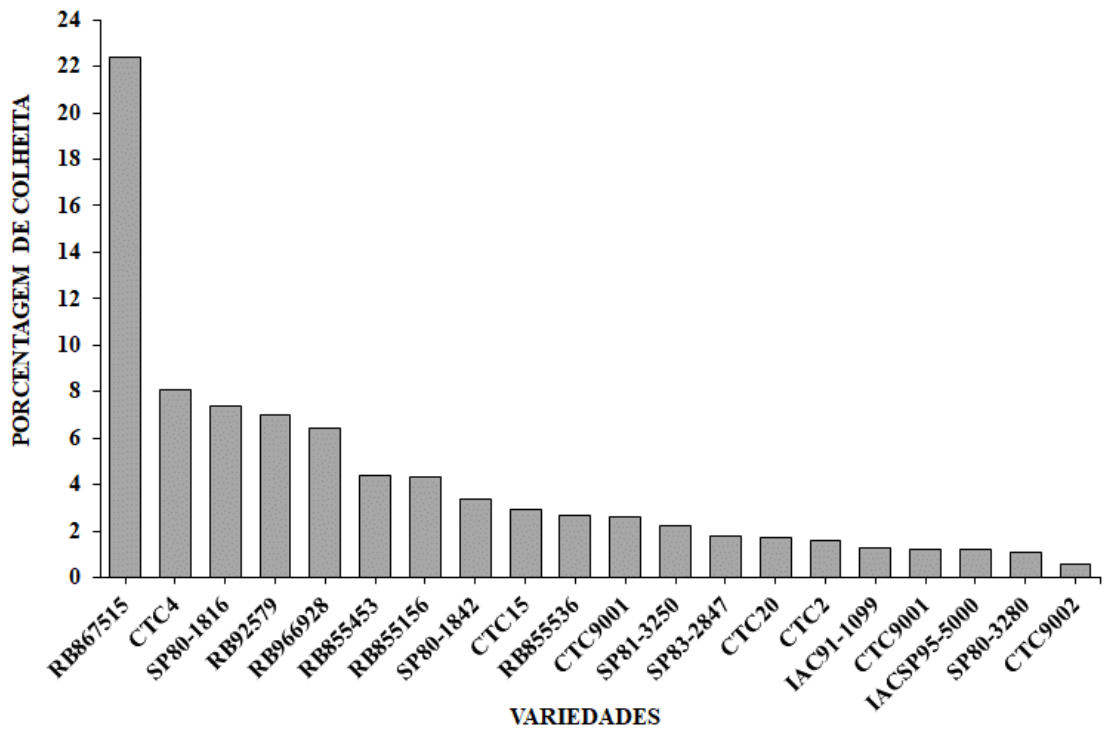
Figura 5 - Variedades de cana-de-açúcar plantadas na safra 2019/2020 no estado de Minas Gerais.



Fonte: Adaptado de IAC (2021).

A Figura 6 apresenta os dados do censo varietal de cana-de-açúcar cultivada na safra 2019/2020, para o estado de Minas Gerais.

Figura 6 - Variedades de cana-de-açúcar cultivadas na safra 2019/2020 no estado de Minas Gerais.



Fonte: Adaptado de IAC (2021).

As variedades mais plantadas na safra 2019/2020 no estado de Minas Gerais, empregadas para a produção de cachaça de alambique, são: RB867515, seguida por SP80-1816, RB855536 e SP80-1842 (PIMENTEL, ANDRADE, 2020). As características de algumas variedades estão descritas a seguir:

- RB867515: Variedade lançada oficialmente pela Ridesa, em parceria com a Universidade Federal de Viçosa em 1997. É uma variedade com maturação média/tardia, possui alto teor de sacarose, baixa exigência em solos, boa brotação de soqueiras, médio perfilhamento, tombamento raro, fácil despalha, florescimento médio. Apesar de ser tolerante às principais doenças, são susceptíveis à estria-vermelha (RIDESA, 2015; PIMENTEL, ANDRADE, 2020).

- RB855536: Essa variedade apresenta hábito de crescimento de touceira decumbente e média capacidade de perfilhamento e sua colheita é precoce. Possui folhas largas, com fácil despalha e adapta-se a solos férteis (RIDESA, 2015).

- SP80-1816: Variedade que possui maturação média, com alto teor de sacarose, possui média exigência de solos, além de boa brotação de soqueiras. É uma planta com fácil despalha e tombamento raso. Apesar de ser tolerante às principais doenças podem sofrer incidência do complexo broca/podridão (PIMENTEL, ANDRADE, 2020).

- RB928064: Possui bom teor de sacarose, alta produtividade, excelente brotação em cana-planta e em soqueiras. Ainda possui hábito de crescimento ereto e diâmetro de colmos médio (RIDESA, 2015).

- SP79-1011: Variedade com ótima brotação de soqueiras, exigente a solos férteis e com maturação média a tardia. É susceptível à ferrugem e à broca; além disso, pode ocorrer quebra de ponteiros com ventos fortes (UDOP, 2004).

- CTC4: Variedade com elevada produtividade e perfilhamento. Possui alta adaptabilidade à colheita mecanizada (CTC, 2022).

- CTC9001: Variedade com alto teor de fibras, apta à colheita mecanizada e alto índice de açúcar. Responsiva a maturadores, além de possuir despalha fácil e boa brotação de soqueiras (CTC, 2022).

- SP80-3280: Variedade desenvolvida pela Coopersucar é exigente a solos férteis, apta à colheita mecanizada, excelente brotação de soqueira. Possui bom fechamento de entrelinhas e elevado teor de sacarose (UDOP, 2004).

- IACSP95-5000: Variedade com porte ereto, com ótima performance no plantio e na colheita mecanizada. Possui ótima brotação de soqueiras e é indicada para ambientes médios

e favoráveis solos; além disso, possui perfil responsivo e ótimo desempenho no plantio de inverno (IAC, 2018).

- RB92579: Variedade com ótimo perfilhamento e brotação de soqueiras, alta produtividade agrícola, possui alto teor de ATR (RIDESA, 2015).

- RB966928: Variedade que apresenta excelente germinação em cana-planta, ótima brotação de soqueiras, além de alta produção agrícola e maturação precoce. Possui médio teor de sacarose e elevada sanidade às principais doenças (RIDESA, 2015).

- CTC2: Variedade com perfilhamento elevado, apta ao plantio e colheita mecanizada, maior número de gemas por hectare e alta produtividade (CTC, 2022).

- SP80-1842: É uma variedade com maturação precoce que possui altos teores de sacarose, além de possuir pouco florescimento e chochamento. Possui ótima brotação de soqueira e bom perfilhamento, assim como é resistente ao carvão, ferrugem e escaldadura (PIMENTEL, ANDRADE, 2020).

2.2.2 Obtenção do caldo

Após a colheita, em adequado ponto de maturação, estando fresca e limpa, a cana segue para moagem. Esse processo separa o caldo do resíduo fibroso, sendo muito comum a passagem do bagaço várias vezes pela moenda para se obter o máximo de extração do caldo. A partir disso, o caldo passa por um processo de limpeza, em que se utilizam sistemas de filtragem e decantação. O tratamento do caldo (limpeza) é de extrema importância, pois possibilita a redução de impurezas formadoras de compostos depreciadores que afetam a qualidade sensorial da bebida (RIBEIRO *et al.*, 2017; CARDOSO, 2020). Como relatado por Oliveira Filho, Bortoletto e Alcarde (2016), a qualidade química do caldo e a inserção de diferentes microrganismos podem afetar o processo de fermentação e a composição da cachaça.

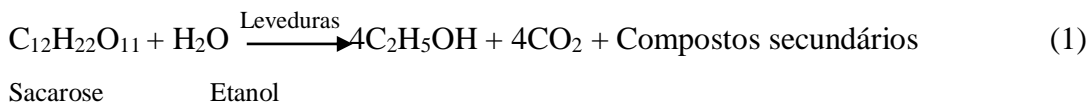
Teixeira *et al.* (2019) avaliaram o efeito do armazenamento dos colmos e da clarificação do caldo sob a qualidade da fermentação e da cachaça obtida, concluindo que o armazenamento dos colmos proporcionou maior contaminação por microrganismos indesejáveis durante a fermentação, além de reduzir a qualidade físico-química da bebida, sendo que o processo de clarificação pode influenciar positivamente, em contrapartida a esses fatores. Mutton *et al.* (2020) relataram que a clarificação do caldo de cana da variedade SP83-2847 e o uso de levedura CA-11 produziu uma cachaça com melhor qualidade química. Eles observaram que o tratamento do caldo resultou em um mosto com melhores características

tecnológicas para o processo fermentativo, com redução no teor de nitrogênio do mosto, o que, consequentemente, pode ter acarretado na diminuição da concentração de carbamato de etila em bebidas oriundas da clarificação do suco.

Anteriormente, Souza *et al.* (2013) ressaltaram que o caldo da cana colhida no ponto ideal de maturação possui um percentual de sólidos solúveis (°Brix) entre 20 e 24 e, por isso, é necessária sua diluição entre 16 a 18 °Brix para ser fermentado. Deve-se tomar um cuidado especial em relação à água utilizada para a diluição do caldo, que deve ser limpa, inodora, incolor, sem microrganismos patogênicos e estar dentro dos critérios de potabilidade. Além disso, a água não deve ser adicionada diretamente ao caldo na dorna de fermentação, pois essa prática causa choque osmótico sobre as leveduras, causando perda de produtividade e rendimento.

2.2.3 Fermentação

O processo de fermentação alcoólica, considerado como a principal etapa da produção de cachaça, é responsável pela transformação dos açúcares e outros compostos do mosto em etanol, gás carbônico e uma grande variedade de compostos secundários, assim como é observado na Equação 1:



Fonte: CARDOSO (2020).

A palavra fermentação deriva do latim *fervere* (ferver), a ação das leveduras sobre o mosto descreve a aparência de fervura do caldo. Esse é um processo de oxidação parcial da glicose na ausência de oxigênio (anaerobiose), considerado como ponto crítico do processamento da cachaça e totalmente dependente da maturação certa da cana, padronização do °Brix, sanidade da cana e composição química do caldo (SOUZA *et al.*, 2013).

Ao iniciar o processo fermentativo, é necessária a adição inicial de leveduras nas dornas de fermentação. Essa população de microrganismos é chamada de pé-de-cuba, pé-de-fermento, lêvedo alcoólico ou mesmo fermento. Para que ocorra um processo satisfatório, o “fermento” deve apresentar cepas resistentes ao álcool produzido, à acidez e temperaturas elevadas, além de estabilidade genética e ser isento de microrganismos competitivos ou antagonistas (SCHWAN; DIAS, 2020).

Schwan e Dias (2020) ressaltam que o fermento utilizado para a produção da cachaça é constituído por leveduras, sendo a principal a *Saccharomyces cerevisiae*. A qualidade da bebida está relacionada principalmente aos tipos de microrganismos e suas populações durante a fermentação e maturação. A escolha do fermento a ser utilizado implica no rendimento de etanol, assim como na formação e proporção dos compostos secundários.

Portugal *et al.* (2017), ao avaliarem a influência das leveduras nativas no perfil químico de cachaças, relatam que o destilado é totalmente influenciado por esses microrganismos. A partir de análise por cromatografia gasosa e análises estatísticas multivariadas, foi possível observar que leveduras de outras espécies não-*Saccharomyces* presente nos fermentos selvagens elevaram a concentração de compostos contaminantes nos destilados. Anteriormente, Mendonça *et al.* (2016) observaram a influência da utilização de leveduras na formação de carbamato de etila. A concentração detectada por HPLC estava abaixo do limite de detecção durante o processo de fermentação; porém, durante a destilação, obteve-se uma concentração acima do limite de quantificação de $8,26 \mu\text{L}^{-1}$, quando foi utilizado farelo de arroz ou uma mistura de fubá de milho e farelo de arroz durante a destilação. Em seu estudo, Ribeiro *et al.* (2017) também relatam que a utilização de fermento selecionado CA-11 resultou em um destilado de melhor qualidade, quando comparado ao fermento natural. Foi possível observar uma menor concentração de compostos, como aldeídos totais, ésteres totais, acidez volátil e álcoois superiores quando o fermento selecionado foi utilizado, além de ser relatada a presença de acroleína nas bebidas provenientes de fermento natural. Mutton *et al.* (2020) ressaltam que a utilização de leveduras CA-11 proporciona menores teores de acidez total e glicerol, apresentando maior eficiência fermentativa.

2.2.4 Destilação

Concluída a fermentação, obtém-se o vinho, o qual possui em sua composição uma mistura de componentes sólidos, líquidos e gasosos. O vinho decantado contém de 89% -94% de água, 7% - 12% de etanol e 2% - 4% de outras substâncias voláteis que são submetidas à separação pelo processo de destilação (SOUZA *et al.*, 2013).

Cada componente do vinho possui um coeficiente de volatilidade e cada um deles destilará seguindo três critérios: temperatura de ebulição, compatibilidade com o álcool ou a água e a variação do teor de álcool no vapor durante o processo. Além disso, a presença de leveduras no mosto fermentado durante a destilação, a velocidade com que é realizada a

destilação e o fato de ocorrer ou não a separação das frações indesejáveis (cabeça e cauda) da fração coração irão afetar a quantidade relativa de compostos voláteis da bebida, influenciando na qualidade final (LÉAUTÉ, 1990).

Para Silva *et al.* (2020a), a composição química das aguardentes pode ser afetada seguindo diferentes métodos de destilação (monodestilação, bidestilação e redestilação). Mediante análises de componentes voláteis e contaminantes, foi possível observar que as aguardentes monodestilada apresentaram maiores concentrações de ácido acético, aldeído acético, acetato de etila, álcoois superiores, furfural e coeficiente de congêneres, além de compostos contaminantes como metanol, álcool *sec*-butílico, cobre e carbamato de etila.

A destilação pode ser realizada em sistemas descontínuos ou intermitentes (destilação simples) e em sistemas contínuos (destilação sistemática). A destilação contínua é utilizada para grandes produções, sendo realizadas em colunas de aço inox. Já a destilação simples é realizada em alambiques de cobre de um a três corpos. São muito utilizados em produções de pequena escala, sendo essencial a separação das frações para melhor controle e distribuição dos componentes (DIAS; MACHADO, 2020).

Da destilação do mosto fermentado nos alambiques são resultantes três frações: cabeça, coração e cauda. A primeira e a última fração (cabeça e cauda) são ricas em substâncias indesejáveis; portanto deve-se eliminá-las da cadeia produtiva por serem prejudiciais à saúde do consumidor, e comprometer o sabor da cachaça. Deve-se utilizar somente o coração (que corresponde a 80% do v/v total) para garantir a pureza e o sabor de uma cachaça de qualidade (DIAS; MACHADO, 2020).

2.2.5 Armazenamento e envelhecimento

As bebidas recém-destiladas possuem gosto ardente e agressivo, buquê irregular e sabor pungente, sendo necessária a alteração parcial da composição química do destilado. Por isso, é recomendado que ocorra um “descanso” da bebida, o que se refere à permanência da cachaça em um recipiente inerte por, no mínimo, seis meses, com o objetivo de promover a eliminação de compostos químicos responsáveis por sabor e aromas desagradáveis à cachaça branca (MUTTON, MUTTON, 2010; SOUZA *et al.*, 2013).

O envelhecimento é o conjunto de reações químicas que ocorrem ao longo do tempo: Alteram a cor, melhoram o aroma e sabor da bebida, além de agregarem valor, devem ser realizados em recipiente de madeira. A prática realizada em recipientes de plástico, vidro ou barro não caracterizam envelhecimento, pois eles não possibilitam as reações e interações

necessárias à bebida. O envelhecimento de cachaças é primordial para a melhoria da qualidade do produto (MUTTON; MUTTON, 2010; CARDOSO, 2020; CARVALHO et al., 2020; BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2021).

O processo de envelhecimento visa à estabilização dos compostos da cachaça, principalmente os compostos voláteis, além de possibilitar a extração de compostos da madeira responsáveis por caracterizar bebidas envelhecidas (SOUZA *et al.*, 2013). O envelhecimento da cachaça brasileira é considerado uma etapa opcional (BRASIL, 2005).

Diferentes madeiras podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção de barris, como: carvalho, amburana, amendoim, jatobá, ipê, bálsamo e peroba. Cada uma destas promove efeitos sensoriais e físico-químicos diferentes, pois as substâncias provenientes das madeiras são incorporadas à bebida por meio de interações durante o processo de envelhecimento (SANTIAGO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2019).

2.3 Compostos secundários e contaminantes

Com o aumento do consumo e possibilidade de exportação da bebida, tem-se buscado práticas criteriosas para a elaboração de um produto padronizado e que atenda às exigências físico-químicas e sensoriais, sendo de grande importância monitorar os parâmetros que avaliam os padrões de qualidade e identidade (CARDOSO, 2020). Uma cachaça de qualidade deve obedecer aos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's), apresentados pela Legislação Brasileira, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 - Padrões de identidade e qualidade presentes nas aguardentes e cachaças brasileiras.

Componente	Unidade	Limite (Mínimo e Máximo)	
Graduação alcoólica (aguardente)	% v.v ⁻¹ . de álcool etílico a 20°C	38,0	54,0
Graduação alcoólica (cachaça)	% v.v ⁻¹ . de álcool etílico a 20°C	38,0	48,0
Sacarose (açúcar refinado, invertido ou glicose)	g .L ⁻¹	6,0	30,0
Acidez volátil (ácido acético)	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	150,0
Aldeídos (aldeído acético)	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	30
Ésteres (acetato de etila)	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	200,0
Furfural	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	5,0
Álcoois superiores *	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	360,0
Álcool Metílico	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	20,0
Álcool sec-butílico	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	10,0
Álcool butílico	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	3,0
Congêneres **	mg. 100 mL a a ⁻¹	200,0	650,0
Acroleína	mg. 100 mL a a ⁻¹	-	5,0
Cobre	mg .L ⁻¹	-	5,0
Chumbo	µg .L ⁻¹	-	200,0
Arsênio	µg .L ⁻¹	-	100,0
Carbamato de etila ***	µg .L ⁻¹	-	210,0
Extrato seco	g .L ⁻¹	-	6,0

*Álcoois superiores = isobutílico + isoamílico + propílico.

**Congêneres = acidez volátil + ésteres totais +aldeídos totais + furfural + álcoois superiores.

*** Limite revogado para 210 µg na Instrução Normativa nº 28, publicada no Diário oficial da União (DOU), dia 11 de agosto de 2014.

aa= álcool anidro.

Fonte: BRASIL (2005; 2014).

Os compostos secundários presentes nas cachaças/aguardentes constituem espécies orgânicas e inorgânicas, sendo em sua maioria, compostos voláteis ou semivoláteis, que são os acetais, álcoois, compostos carbonílicos, ácidos carboxílicos, ácidos graxos, ésteres, furanos, norisoprenoides, compostos de enxofre e terpenos. Esses compostos podem ser originados durante a fermentação, destilação, armazenamento e envelhecimento ou podem ser provenientes da matéria-prima (CARDOSO, 2020).

De acordo com Alcarde (2017), todas as etapas de produção da cachaça vão influenciar na composição volátil da bebida, seja qualitativamente ou quantitativamente. Apesar de serem componentes principais, o etanol e a água não influenciam no sabor e no aroma do destilado, sendo os compostos secundários os responsáveis pela percepção sensorial da bebida. Os ácidos, ésteres e álcoois são os grupos que mais contribuem para essa percepção, seguidos dos aldeídos, cetonas, acetais, compostos sulfurados e fenólicos.

Caetano e colaboradores (2021), estudando a composição química de cachaças, identificaram quarenta e sete compostos químicos em amostras de cachaça de alambique não envelhecida. As principais classes de compostos encontrados foram álcoois, ésteres, cetonas e ácidos orgânicos.

Oliveira *et al.* (2020) analisaram cachaças não envelhecidas produzidas no estado da Paraíba quanto aos indicadores de qualidade descritos pela legislação. Os autores observaram, que, dentre as amostras estudadas, o maior número se apresentava fora dos limites exigidos para grau alcoólico. Quanto aos contaminantes, apenas valores de cobre foram observados fora dos parâmetros exigidos, demonstrando que, provavelmente, os produtores estavam errando na hora de fazer os cortes, ou destilando o mosto antes de concluir todo o processo fermentativo.

Santiago *et al.* (2020), ao investigarem a padronização e qualidade de cachaças brasileiras por meio de análise de agrupamento multivariada, observaram que, apesar de a maioria das amostras analisadas estarem adequadas aos padrões exigidos pela legislação, a concentração de contaminantes, como cobre, butan-1-ol e butan-2-ol, furfural e metanol, em algumas amostras, excedeu o limite máximo estabelecido. Concluíram que, apesar de os produtores buscarem melhorias para a qualidade das cachaças, como o emprego de boas práticas de fabricação, vários fatores na cadeia de produção ainda podem ser melhorados.

Os ácidos voláteis, além de conferir corpo aos destilados, agregam aroma, pois são fixadores de compostos aromáticos; entretanto, quando presentes em quantidades excessivamente altas (superior a 150 mg de ácido acético 100 mL de álcool anidro⁻¹), são

indesejáveis, pois podem ser sentidos pelo consumidor por meio do odor e do sabor, induzindo à rejeição (LÉAUTÉ, 1990; BRASIL, 2005).

Altos teores de acidez podem ser atribuídos a compostos formados durante a estocagem da cana e à contaminação do mosto por bactérias acéticas durante o descanso entre a fermentação e a destilação, causando perda de rendimento da produção de etanol e elevada acidez. O ácido acético formado durante a fermentação é a principal fração ácida das cachaças (CARDOSO, 2020).

Os ésteres são desejáveis nas aguardentes até o limite máximo de 200 mg de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005). Em quantidades e proporções diferentes, influenciam negativamente no sabor e aroma do destilado. Associados aos álcoois superiores, aldeídos e ácidos conferem *bouquet* desejado à bebida. Fatores como tipo e quantidade de fermento, temperatura, qualidade do caldo, aeração e agitação na fermentação influenciam na proporção e quantidade de diferentes ésteres, influenciando também na percepção de aromas e sabores da bebida (CARDOSO, 2020).

Santiago *et al.* (2014) relatam que, durante o processo de envelhecimento de cachaças, ocorre esterificação de álcoois e de ácidos, o que garante maiores concentrações de ésteres, conferindo odor agradável às bebidas envelhecidas.

Os álcoois com três, quatro ou cinco carbonos são denominados álcoois superiores, sendo frequentemente encontrados em bebidas destiladas e são o maior grupo de substâncias voláteis nessas bebidas. São também conhecidos como óleo fúsel. O álcool etílico, não classificado como álcool superior, é o principal composto formado durante a fermentação; porém, outros compostos também são encontrados, como: álcoois isoamílico (3-metilbutan-1-ol), amílico (pentan-1-ol), isobutílico (2-metilpropan-1-ol) e propílico (propano-1-ol) (VILELA *et al.* 2007).

Alcarde (2017) cita que os álcoois superiores estão relacionados às condições de fermentação e com as leveduras utilizadas. Temperaturas acima de 35 °C, o pH abaixo de 4,0 e a presença de oxigênio contribuem para a produção de álcoois superiores, embora a degradação parcial de aminoácidos também produza esses compostos.

A Instrução Normativa nº 13/2005 inclui nos Padrões de Identidade e Qualidade de aguardentes de cana e cachaça para os valores estimados pelo somatório dos teores de álcool n-propílico (propan-1-ol), álcool *sec*-butílico (2-metilbutan-1-ol), álcool isopentílico (3-metil-1-butan-1-ol) e álcool isobutílico (2-metilpropano-1-ol) (BRASIL, 2005).

De acordo com Cardoso (2020), os aldeídos são formados no início da fermentação pela ação de leveduras, tendo o acetaldeído como principal substância, representando cerca de

90%. Esse composto possui alta reatividade e tem muita influência na maturação da cachaça, sendo que sua concentração diminui conforme a tempo de descanso dado à bebida. É proveniente da oxidação do etanol e ocorre em condições de anaerobiose, principalmente nas primeiras horas da fermentação. Sua formação está relacionada ao processo fermentativo das leveduras já que pela ação da enzima piruvato descarboxilase, o ácido pirúvico é descaboxilado. Altas concentrações de aldeídos podem gerar intoxicações, levando a sérios problemas no sistema nervoso central dos consumidores (CARDOSO, 2020). A legislação limita sua presença em no máximo de 30 mg de aldeído acético por 100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005).

A legislação não estabelece limites para cetonas presentes nas cachaças, porém essas também são responsáveis por conferir sabor aos destilados. As principais cetonas encontradas são a 2,3-butanodiona (diacetil) e a acetona. As cetonas são originadas por fermentação secundária e contaminação. Já os acetais são formados pela reação entre os aldeídos e os álcoois, o que resulta em menor concentração de aldeídos e diminuição de odor pungente (CARDOSO, 2020). Pode-se encontrar também a 2,3-butadiona. Rodrigues *et al.* (2020) avaliaram quarenta e quatro amostras de aguardente/cachaça de várias regiões de Minas Gerais e São Paulo entre 2014 e 2015, observaram maiores concentrações do composto 2-3-butadiona em bebidas provenientes do processo de destilação em coluna em relação a bebidas destiladas em alambique de cobre.

Os compostos fenólicos presentes nas cachaças são provenientes do processo de envelhecimento. Apesar de ser considerado opcional, o envelhecimento traz grandes benefícios para a cachaça, agregando valor ao produto (BRASIL, 2005). Rodrigues *et al.* (2016) avaliaram o perfil de compostos fenólicos presentes em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras (carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá), bem como a atividade antioxidante e propriedade antifúngica dos extratos secos destas bebidas. Esses pesquisadores observaram que as bebidas envelhecidas em barris de carvalho e jequitibá continham predomínio dos compostos fenólicos seringaldeído e ácido gálico. Em amburana, continham maiores quantidades de ácido vanílico e cumarina, ao passo que as bebidas envelhecidas em bálsamo continham ácido vanílico e ácido gálico. Os extratos obtidos das bebidas ainda apresentaram atividade antioxidante para os métodos de inibição do radical DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoleico, ABTS, poder redutor e ácido tiobarbitúrico (TBARS), além de atividade biológica sobre os fungos *P. commune* e *P. cladosporoides*.

Castro *et al.* (2020) relatam que, a partir da degradação da lignina durante o envelhecimento das cachaças em barris de carvalho, foram encontrados compostos de baixa

massa molar com características fenólicas (ácidos vanílicos e seringicos), podendo ser considerados como marcadores de envelhecimento nas bebidas. Santiago *et al.* (2014) avaliaram, por meio de teste de correlação linear, a composição de extrato seco total, composição fenólica total e intensidade de cor em cachaças envelhecidas em barris de carvalho e amburana durante doze meses, observando um aumento progressivo em todos os parâmetros ao longo do período de envelhecimento.

Silva *et al.* (2020b) também avaliaram a evolução de compostos fenólicos e atividade antioxidante em cachaças orgânicas envelhecidas em barris de jatobá, sassafrás e ipê. Observaram que as maiores concentrações de compostos fenólicos foram provenientes de cachaças envelhecidas em jatobá. Conseqüentemente, os perfis antioxidantes das bebidas envelhecidas em jatobá também se apresentaram com maior potencial, visto que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante.

As principais substâncias indesejáveis na cachaça estabelecidas pela legislação oferecem risco à saúde do consumidor, além de depreciar sensorialmente a bebida. São elas: álcool metílico (metanol), álcool butílico (butanol), álcool *sec*-butílico (butan-2-ol), furfural, HPAs, acroleína (2-propenal), cobre, arsênio, chumbo e carbamato de etila.

Para Cardoso (2020), o metanol, um álcool contaminante da cachaça, é originado da degradação da pectina das fibras da cana, quando o bagacilho está presente no mosto em fermentação sob condições ácidas. A pectina é formada pela associação de várias moléculas de ácido galacturônico, em que estão presentes fragmentos de metanol que são liberados durante a fermentação.

Por ser indesejável em cachaças e aguardentes, deve-se evitar a formação desse composto, sendo assim, não é aconselhável conduzir a fermentação na presença de polpas ou suco de frutas ricas em pectina, já que sua presença acentua a formação de metanol (CARDOSO, 2020). Ainda segundo o mesmo autor, no organismo humano o metanol é absorvido e metabolizado; porém, uma menor velocidade de oxidação faz com que sua excreção do corpo humano perdure por vários dias, podendo causar cefaleia, vertigem, vômitos, dor abdominal e nas costas, além de agitação motora e visão embaçada.

O furfural e o hidroximetilfurfural são os principais produtos da degradação de açúcares (pentoses e hexoses) durante o processo de produção do destilado. Não são bem-vindos por serem considerados nocivos à saúde. Esses contaminantes podem ser formados durante a prática de queima da cana-de-açúcar e também pela pirogenação de açúcares residuais da fermentação durante a destilação do vinho (CARDOSO, 2020). Masson *et al.* (2007) comprovaram os efeitos da queima da cana na formação desses compostos por meio de

comparação entre cachaças produzidas por cana-de-açúcar com e sem queima prévia, obtidas pelo mesmo processo de produção. Conforme os autores, a queima do palhico da cana influenciou significativamente na concentração de furfural, sendo que a concentração dos demais componentes (álcoois superiores, ésteres, aldeídos, cobre, acidez volátil e metanol) não sofreram influência da prática de queima.

O 2-propenal, também denominado de acroleína, é um líquido que pode variar entre incolor a amarelo, possui odor desagradável que irrita as narinas e pode vir a se formar durante a destilação por contaminação bacteriana (CARDOSO, 2020). Segundo Alcarde (2017), o glicerol é produzido na etapa de fermentação. Quando desidratado, leva à formação desse composto. Zacaroni *et al.* (2011) caracterizaram e quantificaram contaminantes orgânicos, como a acroleína, em aguardentes de cana da região sul de Minas Gerais e encontraram um valor acima do limite estabelecido pela legislação (5 mg. 100 mL⁻¹ álcool anidro) em uma das doze amostras analisadas.

Os compostos butan-1-ol (álcool butílico) e butan-2-ol (álcool *sec*-butílico) são formados durante a fermentação devido a contaminação pela bactéria *Clostridium acetobutylicum*. São altamente tóxicos em relação ao etanol (CARDOSO, 2020).

O cobre é o principal metal constituinte dos alambiques, apesar de ser considerado um contaminante quando em excesso. Durante a etapa de destilação, esse metal tem grande importância na eliminação de odores desagradáveis provenientes de compostos sulfurados. Porém, elevados teores de cobre em alambiques indicam falta de higiene. Quando ocorre a destilação e nos intervalos de parada, não se faz uma boa higienização, ocorre a formação de “azinhavre” (carbonato básico de cobre) nas paredes internas do destilador (CARDOSO, 2020).

A Legislação brasileira permite a presença de cobre em até 5 mg L⁻¹ (BRASIL, 2005). Lima *et al.* (2006, 2009) empregaram substâncias como carvão ativado, resina e carvão ativado tratado com óxido de ferro na remoção de cobre e o teor de compostos secundários da cachaça. Observaram que a resina se mostrou mais eficiente por ser mais específica na troca de íons, como o cobre, além de não alterar a composição de congêneres essenciais à cachaça, conservando a permanência dos compostos por dois anos. Vilela *et al.* (2021), ao avaliarem a qualidade sensorial e físico-química de cachaças produzidas no estado da Paraíba, observaram que 15% das amostras analisadas estavam em não conformidade com a legislação quanto aos parâmetros estabelecidos para cobre, implicando que vários produtos necessitam de mais conhecimentos sobre as Boas Práticas de Fabricação de cachaça em alambiques de cobre.

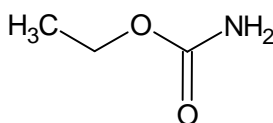
Ferreira *et al.* (2020) propuseram um método usando voltametria e calibração multivariada para determinação simultânea de metais presentes em cachaças de alambique. O método proposto foi eficiente na determinação de cobre, zinco, cádmio e chumbo em cachaças analisadas, sendo observado que cerca de 25% das amostras analisadas excediam as concentrações de cobre estabelecidas pela Legislação brasileira.

O chumbo e o arsênio são outros metais que podem ser encontrados nas cachaças e aguardentes que são oriundos principalmente de algumas embalagens e de ligas metálicas endurecidas constituintes dos destiladores. Também podem ser encontrados na matéria-prima provenientes de produtos agroquímicos como inseticidas, herbicidas e fungicidas (CARDOSO, 2020).

2.4 Carbamato de Etila (CE)

O carbamato de etila (CE) apresenta fórmula molecular $C_2H_5COONH_2$. É um éster etílico do ácido carbâmico, com temperatura de fusão de 49 °C, temperatura de ebulição variando entre 182 a 184 °C e pressão de vapor de 0,262 mmHg a 25 °C. É um composto considerado potencial agente cancerígeno para humanos, sendo introduzido no corpo por meio de alimentos fermentados, como pães, iogurte, molho de soja e bebidas alcoólicas, como cervejas, vinhos, conhaques, cachaças e aguardentes. É solúvel em água, etanol e outros solventes orgânicos. A utilização de fertilizantes nitrogenados nas culturas pode contribuir para o aumento dos precursores de carbamato de etila. Pode ser formado por várias substâncias, incluindo ureia, citrulina, N-carbamil(carbamil-fosfato) e cianeto, sendo o cianeto provavelmente o precursor final na maioria dos casos devido à sua reação com etanol (MERCK, 2001; FAO, 2011; PELEGRIN *et al.*, 2020; NASCIMENTO E SILVA *et al.*, 2022). Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 7.

Figura 7 - Fórmula estrutural do Carbamato de etila.



Carbamato de etila

Fonte: DO AUTOR (2022).

O CE pode ser encontrado em baixas concentrações em várias bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados. Também conhecido por uretana ou etiluretana, é muito solúvel em água ($4,80 \times 10^5 \text{ mg L}^{-1}$), álcoois, ésteres, cetonas, éteres e solventes clorados, sendo a cachaça um meio ideal para a presença desse composto (CARDOSO, 2020). A legislação estabelece valor de $210 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para CE (BRASIL, 2014).

Uma maior atenção vem sendo direcionada ao CE, por ser um composto supostamente cancerígeno presente em alimentos fermentados e bebidas destiladas. É um contaminante considerado genotóxico e, por isso, está incluído no grupo 2 (provável carcinógeno humano) da *International Agency for Research on Cancer* – IARC (2010). Liu *et al.* (2017) observaram que a exposição a 100 mM de CE por um tempo de quatro a doze horas em células HepG2 humanas causou sérios danos. O tratamento com CE afetou várias vias metabólicas da célula, induzindo ao estresse oxidativo, reduzindo a capacidade de desintoxicação da célula, esgotando sua energia, além de reduzir o poder redutor, interrompendo a integridade da membrana, danificando o DNA e as proteínas, levando à morte da célula.

Rodrigues *et al.* (2020) estudaram cachaças e aguardentes de Minas Gerais e São Paulo visando caracterizar e quantificar carbamato de etila, 2,3-butadiona, furfural e 5-hidroxiacetilfurfural nas bebidas destiladas em colunas e alambiques de cobre. Foi observado que bebidas produzidas em colunas obtiveram maiores valores ($235,53$ e $245,31 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para CE, em relação às bebidas destiladas em alambique de cobre, que obtiveram concentrações variando de $< \text{LQ}$ a $76,21 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. O mesmo foi relatado para o composto 2,3-butadiona. Viana *et al.* (2020), ao avaliarem vinte e sete amostras de cachaças envelhecidas, produzidas e comercializadas no estado da Bahia, observaram que algumas amostras se encontravam fora dos padrões quanto a cobre e furfural. Vinte das amostras estudadas apresentavam concentrações de carbamato de etila acima do limite máximo estabelecido pela legislação.

Baffa Júnior *et al.* (2011) relataram que a correta separação das frações cabeça, coração e cauda durante a destilação, contribui para a redução da contaminação do destilado por carbamato de etila. Machado *et al.* (2013) padronizaram um método analítico para determinação de carbamato de etila em cachaças produzidas em alambiques de cobre. Foram realizadas separações por meio de HPLC/FLD, após ocorrer uma reação de substituição nucleofílica específica para amidas que se comportam como um nucleófilo. O método foi considerado sensível e linear, apresentando limites de detecção, quantificação e precisão excelentes para determinar quantitativamente CE em cachaças.

Bueno *et al.* (2020) demonstram que um eficiente controle de qualidade nas indústrias produtoras de cachaça/aguardentes foi eficaz para a diminuição na concentração de carbamato

de etila. O impacto da utilização de leveduras ativas, a qualidade pós-colheita, a seleção das variedades e a redução da temperatura durante a destilação foram os pontos mais críticos no processo de obtenção dos destilados descritos pelos autores.

Esse composto vem despertando grande interesse entre estudiosos, visto que sua presença nas cachaças e aguardentes pode travar o processo de internacionalização das bebidas, pois alguns países estabelecem valores mínimos para sua presença (GALINARO, FRANCO, 2011; MENDONÇA *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2017; CRAVO *et al.*, 2019; NASCIMENTO e SILVA, VERRUMA-BERNARDI, OLIVEIRA; 2020a).

Em países como Canadá, EUA, França, República Tcheca, Alemanha e Suíça, já existe um controle da presença do contaminante em bebidas alcoólicas, e no Brasil, a Instrução normativa nº 28/2014 estabelece novo valor para o contaminante em bebidas alcoólicas no país. (EFSA, 2007; BRASIL, 2014). Neste último, o valor estabelecido para aguardentes e cachaças (destilados) está bem acima dos limites estabelecidos em outros países, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Valores para CE em $\mu\text{g L}^{-1}$ estabelecidos pela legislação de cada país.

País	Concentração de carbamato de etila $\mu\text{g / L}$ na legislação				
	Vinho	Vinho Fortificado	Destilados	Saque	Conhaque
Canadá	30	100	150	200	400
EUA	15	60	-	-	-
República Tcheca	30	100	150	200	400
França	-	-	150	-	1000
Alemanha	-	-	-	-	800
Brasil	-	-	210	-	-

Fonte: EFSA (2007); BRASIL (2014).

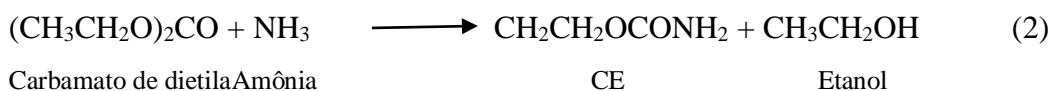
2.4.1 Carbamato de Etila e suas vias de formação

Segundo Cardoso (2020), várias vias de formação para o carbamato de etila já foram estabelecidas; porém, até o momento, não há uma via de formação provável devido à complexidade da cadeia de produção das bebidas. São levantadas várias hipóteses sobre a origem do contaminante desde a matéria-prima, fermentação (fermento, temperatura e pH),

destilação (material, geometria do equipamento, corte das frações, forma de aquecimento) até envelhecimento e armazenamento do destilado.

Alguns autores sugerem que o contaminante pode ser formado por meio da matéria-prima e também da composição do mosto de fermentação (BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2015; GALINARO *et al.*, 2015; D'AVILA *et al.*, 2016; CRAVO *et al.*, 2019), por meio do metabolismo dos microrganismos durante a fermentação, dependendo do substrato, tipo de microrganismos empregado e condições do processo (BORGES *et al.*, 2014; GOWD *et al.*, 2018). Outro modo de formação seria durante a destilação, dependendo da forma como é realizado o processo (contínua ou descontínua), do material do destilador, da separação das frações e da taxa de refluxo durante o processo (BAFFA JÚNIOR *et al.*, 2011; BORGES *et al.*, 2014; BORTOLETTO; SILVELLO; ALCARDE, 2015; BORTOLETTO; ALCARDE, 2016; CARDOSO, 2020). Alguns autores citam que o CE pode ser formado durante o envelhecimento, dependendo do material utilizado, das condições e do tempo de armazenamento (ANJOS *et al.*, 2011; SANTIAGO *et al.*, 2017).

O início dos estudos sobre CE ocorreu na década de 70 em vinhos; acreditava-se que um aditivo alimentar utilizado para controle microbiano reagia com amônia para formar o CE, como é observado na Equação 2 (LOFROTH; GEJVALL, 1971).



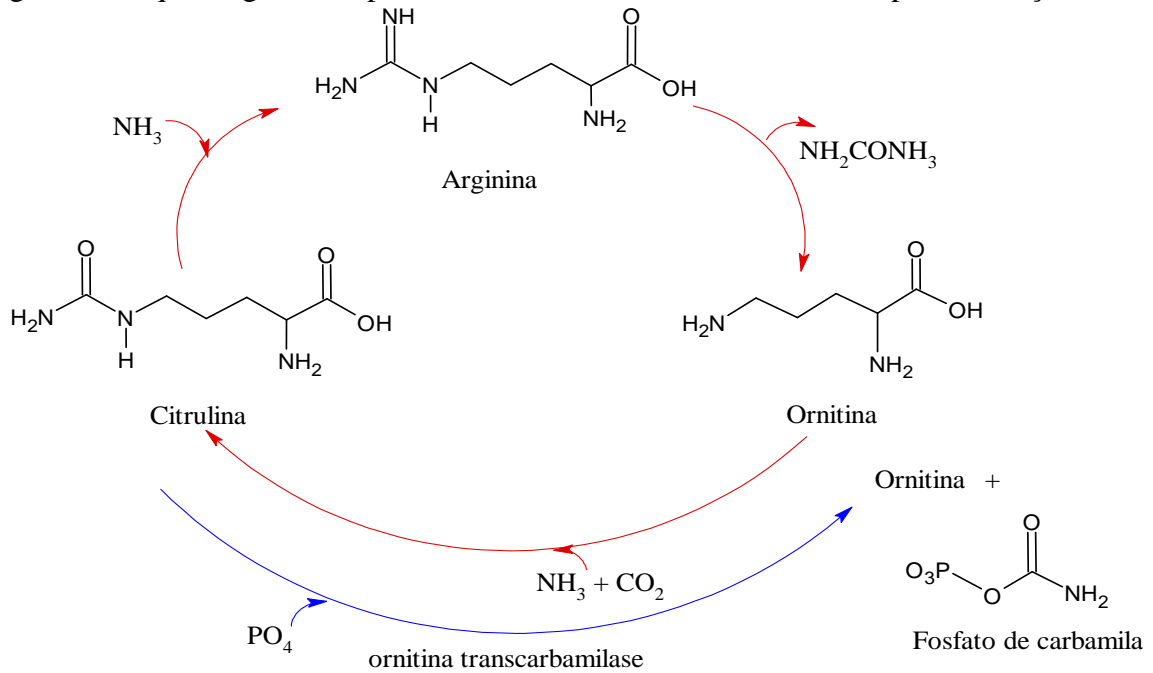
Porém, foi observado que a concentração de CE não estava relacionada com carbamato de dietila, mas, sim, com a ureia encontrada no vinho resultante da hidrólise do aminoácido arginina (ARESTA *et al.*, 2001).

A ureia pode ser encontrada no caldo da cana ou estar indevidamente presente no mosto que, durante a fermentação, reage com o etanol formando uretana, conhecido como carbamato de etila. A ureia também pode ser formada pela degradação de arginina por leveduras, levando à formação do contaminante (ALCARDE, 2017).

Alguns autores relatam que a formação de CE é gradativa durante o período de armazenamento de aguardentes e cachaças. Isso ocorre devido à reação entre produtos nitrogenados decorrentes da degradação da ureia como os aminoácidos arginina, ornitina e citrulina e sua reação com o etanol do meio, além de outros compostos de nitrogênio, como fosfato de carbamila e íon cianeto estudados como potenciais precursores formados antes e após o processo de destilação (ANJOS *et al.*, 2011; ZACARONI *et al.*, 2011).

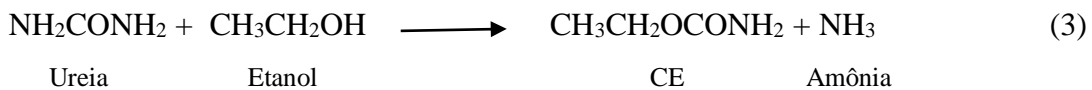
A Figura 8 apresenta o mecanismo principal de formação de CE por meio do metabolismo das leveduras durante a fermentação em que ocorre a formação de compostos nitrogenados, como ureia, citrulina, ornitina e fosfato de carbamila, pela degradação enzimática do aminoácido arginina (POLASTRO *et al.*, 2001; BRUNO *et al.*, 2007).

Figura 8 - Esquema geral dos precursores envolvidos no ciclo da ureia para formação de CE.



Fonte: ANJOS *et al.* (2011).

Estudo de Aresta *et al.* (2001) mostram que, industrialmente, o CE é obtido seguindo a reação entre ureia e etanol, como mostrado na Equação 3.



Outra forma de obtenção industrial de CE é a partir de um gás altamente tóxico chamado de fosfogênio. Esse processo é iniciado entre o monóxido de carbono e o cloro, como mostrado nas Equações 4,5 e 6 (GALINARO *et al.*, 2015).





Fosfogênio Etanol



Amônia

CE

A partir da ureia, ainda é possível a formação de CE por decomposição térmica (60 a 100°C), formando cianato e isocianato, os quais reagem com o etanol do meio, levando à formação do contaminante, o que pode ser observado na Equação 7 (BRUNO *et al.*, 2007).



Ureia

Cianato

Isocianato

Schaber *et al.* (2004) relatam que outra via possível para a formação de CE é decomposição térmica da ureia, formando amônia e ácido ciânico, que também reagem com o etanol para formação do contaminante, como se observa nas Equações 8 e 9.



Ureia

Amônia

Ácido Ciânico



Ácido Ciânico

Etanol

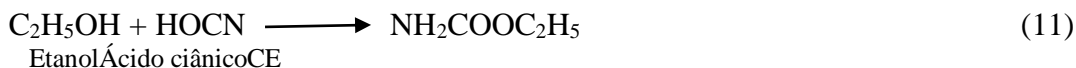
CE

2.5 Glicosídeos cianogênicos e sua relação com a formação de carbamato de etila

Os glicosídeos cianogênicos pertencem ao metabolismo secundário de várias plantas. São derivados de aminoácidos e estão presentes em mais de 2500 espécies de plantas, como cevada, arroz, maçã, manga, malte, mandioca e cana-de-açúcar. Por meio da degradação enzimática, geram cianidrina que se decompõe em íons cianeto. A oxidação dos íons cianeto levam à formação de isocianato, os quais reagem com o etanol para formar CE, como demonstrado nas Equações 10 e 11 (VETTER, 2000; SANTIAGO *et al.*, 2017; CRESSEY, REEVE, 2019).



Íon Cianeto Íon Cianato



Mendonça *et al.* (2016), ao estudarem cachaças produzidas a partir de leveduras selecionadas e fermentação espontânea, observaram que a adição de nutrientes ao processo de fermentação aumentou as concentrações de carbamato de etila, ao utilizarem farelo de arroz ou uma mistura de farinha de milho e farelo de arroz.

Os glicosídeos cianogênicos presentes na cana-de-açúcar podem levar à formação do íon cianeto por degradação enzimática. O cianeto, por sua vez, pode ser oxidado a cianato, que, na presença de íons de cobre, reage com o etanol e formam carbamato de etila (MACHADO *et al.*, 2013). O carbamato de etila pode ser formado a partir dos glicosídeos cianogênicos em vários estágios de fermentação e destilação. Existem diversas matérias-primas fontes de glicosídeos cianogênicos, como a mandioca, arroz, sorgo, aveia, trigo, maçã, manga e a cana-de-açúcar. Assim, a degradação enzimática e clivagem térmica dos glicosídeos cianogênicos originará o cianeto (CN⁻), que é oxidado ainda mais para formar cianato (GOWD *et al.*, 2018).

Segundo Vetter (2000) e Cuny *et al.* (2019), as plantas cianogênicas contêm em sua composição o ácido cianídrico (HCN). Esse ácido encontra-se ligado a açúcares e, por isso, recebem o nome de glicosídeos cianogênicos, que são liberados desses açúcares a partir de hidrólise, processo chamado de cianogênese. Muitas espécies de plantas têm em sua constituição os glicosídeos cianogênicos, como as Rosaceae, Leguminosae, Gramíneae, Araceae, Passifloraceae, Euforbiceae e Poaceae (cana-de-açúcar). A concentração e o tipo de glicosídeos cianogênicos é variável entre as espécies, cultivares e variedades assim como para as diferentes partes das plantas.

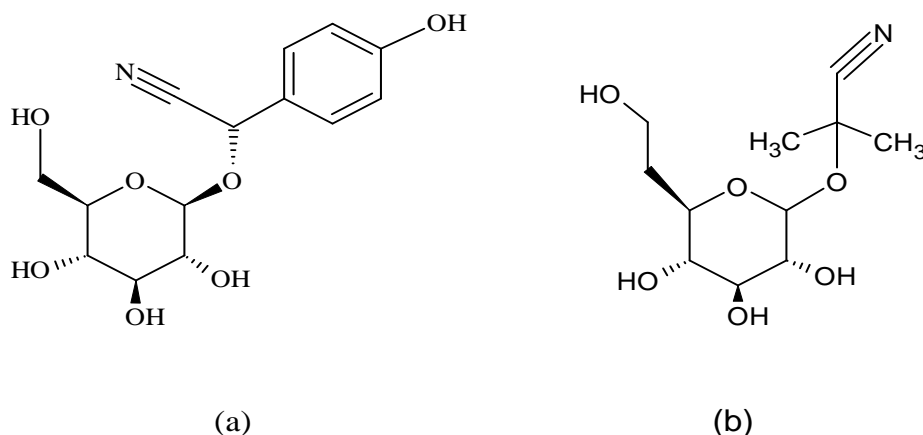
Beattie e Polyblank (1995) relataram dois prováveis mecanismos para a formação de CE a partir do cianeto. O primeiro deles é baseado na complexação do cianeto com cobre (CuII), posterior oxidação a cianogênio e desproporcionamento a cianato, como mostram as Equações 12, 13, 14 e 15 (CRAVO *et al.*, 2019).



crescimento rápido, maior será o seu teor em glicosídeos cianogênicos (SHLICHTA; GLAUSER; BENREY, 2014; CUNY *et al.*, 2019).

A Figura 9 mostra as fórmulas estruturais de dois glicosídeos cianogênicos encontrados em algumas espécies.

Figura 9 - Fórmulas estruturais de dois glicosídeos cianogênicos.



(a) Dhurrin (centeio e trigo)

(b) Linamarin (mandioca, aveia e cereais)

Fonte: GALINARO *et al.* (2015).

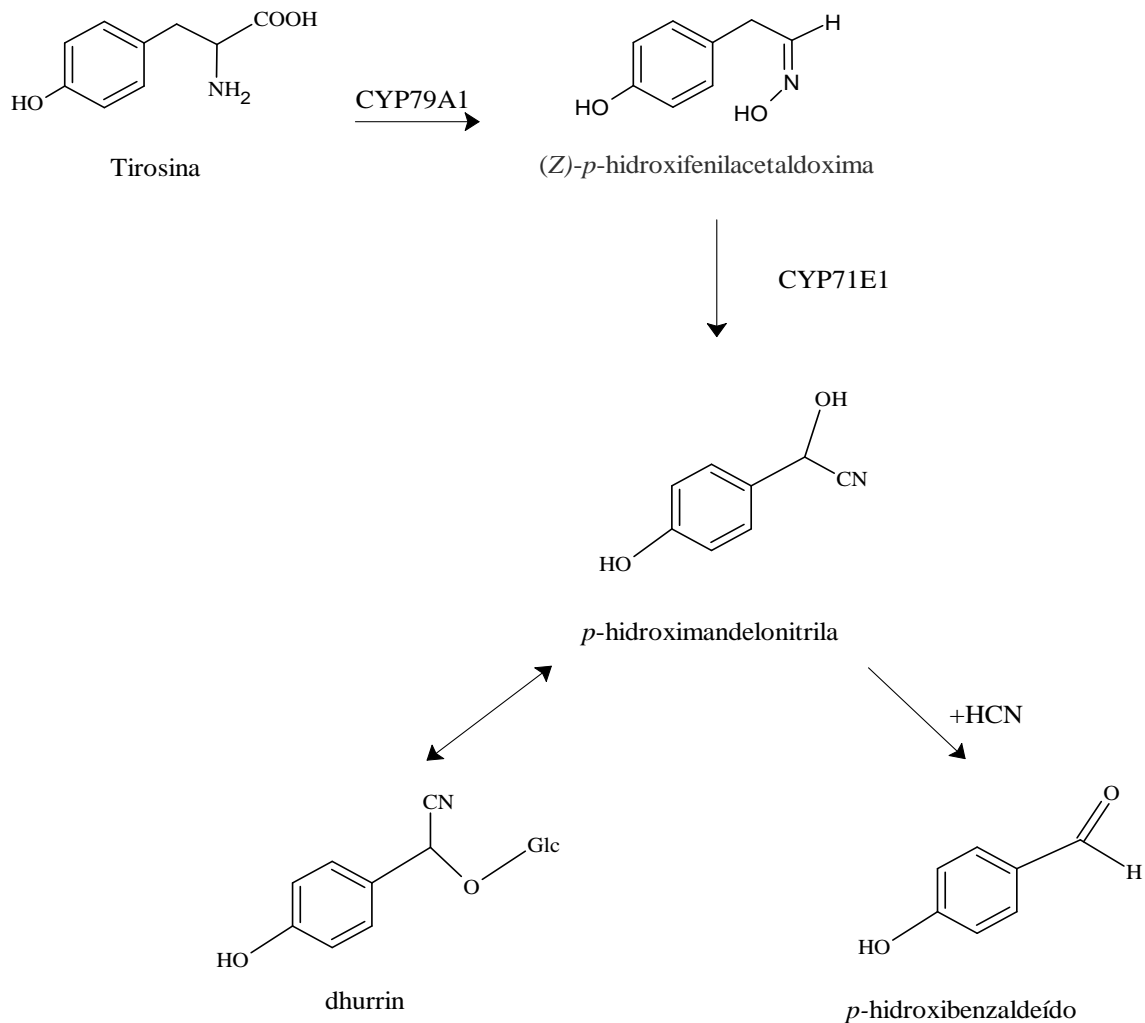
O dhurrin é uma toxina natural produzida principalmente pelo sorgo, possui fórmula molecular $C_{14}H_{17}NO_7$, massa molar de $311,29 \text{ g mol}^{-1}$, densidade de $1,56 \text{ g mL}^{-1}$, temperatura de fusão de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura de ebulição de $586,7 \text{ }^\circ\text{C}$ a 760 mmHg , seu índice refrativo é de $1,65$. Durante a cianogênese, esse composto é degradado, formando ácido cianídrico (HCN). O dhurrin constitui 30% do peso seco das pontas do sorgo, mas está ausente nas sementes e raízes. A distribuição de dhurrin e seu sistema de síntese na parte superior do sorgo mostra que tanto a produção quanto o seu armazenamento estão localizados no mesmo local dentro das mesmas células. Acredita-se que, assim como no sorgo, ele encontra-se presente na maioria das plantas cianogênicas da família Poaceae (HALKIER; SCHELLER; MOLLER, 1988; JOHANSEN *et al.*, 2007; TOKPOHOZIN; FISCHER; BECKER, 2018; GUIDECEM, 2021).

Cravo *et al.* (2019), visando caracterizar o glicosídeo cianogênico dhurrin em cinco variedades de cana-de-açúcar, correlacionaram a existência desse composto com a formação de CE em cachaças obtidas de diferentes processos de produção. Foi possível observar, por

meio de cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando uma fase móvel (metanol/acetato de etila) na proporção 7:3, que a variedade SP83-2847 apresentou R_f (fator de retenção) igual ao do padrão dhurrin para o extrato hexânico, ao passo que as variedades SP80-3280 e CTC11 apresentaram valores similares ao padrão para o extrato metanólico. As outras variedades em estudo, RB868515 e IAC86-2480, apresentaram valores divergentes para o padrão de dhurrin. Ainda foi observado pelos autores que o fator primordial para a concentração de CE nas amostras de duas cachaças (F_2 – SP83-2847 e F_4 – SP80-3280) foi a variedade utilizada, já que as duas amostras eram produzidas por diferentes processos.

Tokpohozin *et al.* (2016) descreveram que, no sorgo, a biossíntese do dhurrin ocorre na presença de um sistema enzimático específico (enzimas do citocromo-P450 e UDP-glicosiltransferase), em que a enzima CYP79A1 faz a conversão da tirosina para (*Z*)-*p*-hidroxifenilacetaldoxima. Posteriormente, a enzima CYP71E1 converte esse composto em *p*-hidroximandelonitrila, já que uma UDP-glicosiltransferase o converte em dhurrin, como apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Biossíntese de Dhurrin no sorgo.



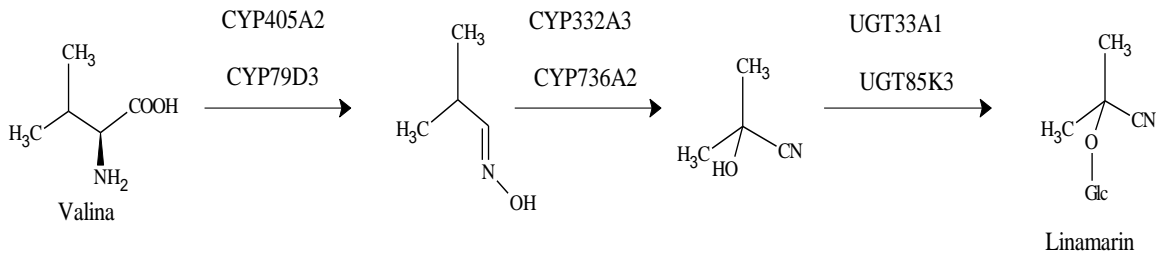
Fonte: TOKPOHOZIN *et al.* (2016).

Sornyotha, Kyu e Ratanakhanokchai (2007) citaram que o linamarin é encontrado principalmente na mandioca. Esse composto pode ser encontrado em todas as partes de várias plantas; porém, não são encontradas em sementes. Pode ser detectado quando os tecidos são danificados, quando a enzima linamarinase entra em contato com o linamarin, hidrolisando-o e liberando cianeto. Esse composto possui fórmula molecular ($C_{10}H_{17}NO_6$), massa molar ($247,24 \text{ g mol}^{-1}$), temperatura de fusão (143°C) e temperatura de ebulição (473°C) (CHEMSPIDER, 2021).

Zagrobelny *et al.* (2018) propuseram uma rota biossintética para o linamarin em *Lotus japonicus*, uma leguminosa selvagem que pertence à família Fabaceae. A via de biossíntese desse composto também é dependente de enzimas específicas para a conversão do aminoácido (valina) no glicosídeo cianogênico. A primeira enzima responsável pela catálise de duas N-hidroxilações sequenciais é uma enzima do citocromo-P450 (CYP), ocorrendo, posteriormente, uma desidratação e uma reação de descarboxilação, produzindo E-aldoxima.

Esse composto, por sua vez, é isomerizado à Z-aldoxima e convertida em α -hidroxinitrila por meio de uma reação de desidratação dependente de NADPH e C-hidroxilação catalisada por uma segunda enzima do citocromo-P450. Finalmente, ocorre uma glicosilação da fração de cianoidrina, catalisada por uma glicosiltransferase dependente de UDPG (UGT). A Figura 11 apresentaresumidamente a via biossintética para o linamarin.

Figura 11 - Biossíntese de Linamarin em *L. japonicus*.



Fonte: ZAGROBELNY *et al.* (2018).

2.6 Métodos de detecção e quantificação de Linamarin e Dhurrin

Várias técnicas cromatográficas são utilizadas para a detecção e quantificação de glicosídeos cianogênicos em diferentes plantas. São métodos físico-químicos de separação que se fundamentam na migração diferencial de componentes de uma mistura por diferentes interações entre as fases móvel e estacionária, em que os compostos são seletivamente retidos pela fase estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; AMORIN, 2019).

Uma técnica bastante utilizada para o isolamento e purificação de produtos naturais e reações químicas é a cromatografia em coluna, que é fundamentada na polaridade relativa das moléculas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/ HPLC) é um tipo de cromatografia em coluna que utiliza suportes com partículas muito pequenas, que são responsáveis pela alta eficiência do sistema e necessitam de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel. A diversidade de fases móveis que podem ser aplicadas garante a versatilidade dessa técnica; assim, esse é um método quantitativamente capaz de realizar a separação de uma variedade de compostos presentes em uma gama de amostras em poucos minutos, com alta resolução, sensibilidade e eficiência (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; AMORIN, 2019).

O HPLC necessita basicamente que a amostra seja solúvel na fase móvel, sendo um método ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e

produtos naturais facilmente carregadas, bem como uma grande variedade de compostos de massa molar alta ou baixa estabilidade térmica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Métodos científicos para a determinação e quantificação de compostos devem passar por validação analítica. A validação analítica nada mais é que a comprovação experimental de que o método utilizado conferiu resultados tecnicamente confiáveis em relação à concentração da espécie da amostra, quando empregado dentro de seu escopo de aplicação. Vários fatores, como a natureza e a complexibilidade da amostra, a natureza química do analito e as condições de operação do equipamento podem influenciar no desempenho do método, comprometendo os resultados. Por isso, antes da sua utilização, os métodos devem passar pelo processo de validação, a fim de estabelecer as condições cromatográficas e de procedimento em que a técnica conferirá maior desempenho e resultados significativos na determinação dos analitos (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Consequentemente, para garantir a qualidade analítica dos resultados, são realizados procedimentos de validação dos métodos avaliados por meio dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

O primeiro parâmetro avaliado no desenvolvimento de validação de um método é a seletividade. Ele consiste em um método instrumental de separação e sua capacidade de avaliar a presença de componentes que podem, de alguma forma, interferir na identificação e determinação devido à complexibilidade da amostra. A seletividade é um fator de extrema importância, tendo em vista que avalia o grau de interferências que podem afetar o pico de resposta de um determinado composto, afetando a linearidade, a exatidão e a precisão de uma técnica (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017).

A seletividade pode ser avaliada por diferentes maneiras, dependendo do objetivo da análise. Para uma análise quantitativa, a seletividade pode ser confirmada pela comparação de uma amostra isenta do analito de interesse e uma amostra fortificada com o analito, ou ainda, pelo método de calibração por meio de adição de padrão (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Já a linearidade é a capacidade do método em fornecer uma relação diretamente proporcional (linear) entre a área ou altura do pico do analito em relação à concentração ou à massa da espécie a ser quantificada, dentro de uma determinada faixa de concentração específica, chamada faixa de trabalho. A linearidade pode ser obtida por meio de padronização externa ou interna por uma expressão matemática (equação da regressão linear) utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Outro parâmetro a ser observado é a precisão, que consiste na concordância entre os resultados obtidos para a concentração do analito repetidas vezes de uma mesma amostra, utilizando o mesmo método e efetuada sob as mesmas condições de medição. Pode ser avaliada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

A repetitividade expressa a concordância entre os resultados obtidos para a concentração do analito em ensaios realizados com as mesmas condições de repetibilidade de medição, ou seja, o mesmo procedimento de medição, mesmo analista, os mesmos instrumentos de medição, as mesmas condições de operação, em num mesmo laboratório, sendo repetidas na mesma amostra em curto espaço de tempo (ANVISA, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

A exatidão de um método expressa a capacidade do método em produzir resultados o mais próximo do valor real. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, ou seja, sempre aparece associada a valores de precisão; dependendo dos níveis de concentração do analito, esses limites podem ser estreitos ou mais amplos (RIBANI *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Os parâmetros mais utilizados para a avaliação da exatidão de um método são os materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição de padrão. Os ensaios de recuperação ou fortificação são os mais utilizados para avaliar a exatidão de um método. Podem ser utilizados para a validação de um método, analisando-se uma porção da amostra em seu estado original e outra porção adicionada de uma quantidade conhecida do analito em questão, processo denominado de fortificação (RIBANI *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2018). Segundo Collins, Braga e Bonato (2006), a cromatografia líquida de alta eficiência possui detecção contínua e com grande repetitividade, o que proporciona análises quantitativas com alto nível de exatidão e precisão, podendo ser superiores a $\pm 0,5\%$.

O limite de detecção (LD) está diretamente relacionado com a sensibilidade do método e, por isso, deve ser expresso pela menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada, estando diretamente relacionado com a precisão e a exatidão do método descrito, sendo que esses parâmetros devem ser testados nas concentrações correspondentes ao limite de quantificação. Os parâmetros de LD e LQ podem ser determinados por três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-

ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (ANVISA, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Stochmal e Oleszek (1994) propuseram um método usando um cromatógrafo líquido de alta eficiência para determinação de glicosídeos cianogênicos em sementes de trevo-branco seco (*Trifolium repens* L.). Para a aferição do método, os glicosídeos linamarin e lotaustralin foram usados como padrão. O equipamento empregava um detector de índice de refração, coluna de 25 cm x 4 mm, e i.d. de tamanho de partícula de 5µm, usando água, metanol e ácido fosfórico na proporção (85:15:0,05) como fase móvel. O sistema foi operado isocriticamente a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A utilização de 15% de metanol na fase móvel proposta no estudo possibilitou menor tempo de separação dos compostos, além de melhorar o formato dos picos e reprodutibilidade da técnica empregada.

Nicola *et al.* (2011) pesquisaram extratos de sorgo e sudangrass, a fim de determinar a concentração de dhurrin. As amostras de tecido vegetal foram adicionadas com 10 mL de metanol em tubos de ensaio, levadas ao ultrassom e filtradas. Um mililitro da solução diluída da amostra foi transferido e analisado por fase reversa em HPLC, utilizando um detector de diodo e gradiente de água e acetonitrila. O método proposto foi avaliado, confirmando que sua utilização é prática, barata, simples, adequada para análises com grande número de amostras diferentes e analitos muito específicos.

Posteriormente, Zhong *et al.* (2020) estabeleceram um método de HPLC para quantificação simultânea de oito glicosídeos cianogênicos em agroalimentos, entre eles linamarin e dhurrin. As amostras foram extraídas utilizando água e metanol e condicionadas em cartucho SPE. O resíduo foi submetido à análise LC-MS/MS. A análise cromatográfica foi realizada utilizando coluna UHPLC C18 e fase móvel A (H₂O/ácido fórmico 1%) e B (acetonitrila), acoplada à análise de espectrometria de massas *tandem*. O método desenvolvido apresentou boa sensibilidade, precisão e exatidão para a quantificação direta dos oito glicosídeos cianogênicos em diferentes amostras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparo do material

As variedades de cana-de-açúcar foram coletadas no painel de variedades do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária da UFLA (CDCT) – Fazenda Muquém, localizado na cidade de Lavras, Minas Gerais. As diferentes variedades foram colhidas no primeiro corte (cana-planta), com idade de nove meses. Foram coletados três colmos para cada variedade estudada. Foram analisadas quinze variedades, sendo em algumas delas colhidas as pontas e os colmos (Tabela 1). Após aquisição, elas foram encaminhadas ao Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardente, Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais.

Tabela 1 -Variedades de cana-de-açúcar coletadas no CDCT- UFLA

SP79-1011 (colmo e ponta)	RB855536 (colmo)	IACSP95-5000 (colmo e ponta)
RB867515 (colmo e ponta)	CTC4 (colmo)	SP80-1816 (colmo e ponta)
CTC9001 (colmo e ponta)	RB928064 (colmo)	RB72454 (colmo e ponta)
CB47355 (colmo e ponta)	SP80-3280 (colmo)	RB92579 (colmo e ponta)
SP80-1842 (colmo e ponta)	CTC2 (colmo)	RB966928 (colmo e ponta)

Fonte: Do autor (2022).

Todas as variedades coletadas são utilizadas para produção de aguardente/cachaça. As amostras de cana-de-açúcar foram secas em estufa ventilada a 38 °C, até completa remoção da água. Em seguida, as amostras foram trituradas em moinho triturador e peneiradas em 200 Mesh.

3.2 Obtenção dos extratos e preparo do padrão de Dhurrin

Os extratos brutos foram obtidos segundo Cravo *et al.* (2019) com algumas adaptações. Foram pesadas 40 g de cada amostra triturada e transferidas para um balão de fundo redondo, acoplado a um condensador, utilizando 500 mL de metanol, e deixadas em refluxo lento por 6 horas. Após a extração, as amostras foram filtradas em um funil de Büchner, descartando a torta e evaporando-se o solvente em um evaporador rotatório Büchi modelo B-480, obtendo, assim, o extrato bruto.

O método utilizado para a determinação de dhurrin nas amostras de extrato bruto de cana-de-açúcar em HPLC foi realizada de acordo com o método proposto por Nicola *et al.* (2011), com modificações. Foi utilizado um padrão de dhurrin da marca Sigma-Aldrich, preparando uma solução estoque na concentração de 1 mg mL^{-1} , solubilizado em água ultrapura e metanol (1:1), marca Merck, grau HPLC. Para a construção da curva analítica, foram realizadas diluições da solução padrão em concentrações que variaram de 1 a $0,00003 \text{ mg mL}^{-1}$. (Tabela 2).

Para a injeção dos extratos em HPLC, um grama de cada extrato bruto foi pesado em frascos pequenos utilizando uma balança analítica marca Shimadzu, modelo AY220. Em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de metanol:água (1:1) em cada vidro, agitando até total homogeneização. A mistura foi então filtrada em membrana de polietileno de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) e injetada diretamente no sistema cromatográfico.

Tabela 2–Concentrações do padrão utilizadas na construção da curva analítica-Dhurrin

Pontos	[] mg mL^{-1}	Volume
P1 (estoque)	1	-
P2	0,1	100 μL de estoque
P3	0,05	50 μL de estoque
P4	0,01	10 μL de estoque
P5	0,005	100 μL de P3
P6	0,001	20 μL de P3
P7	0,0005	10 μL de P3
P8	0,0001	100 μL de P4
P9	0,00005	10 μL de P5
P10	0,00003	30 μL de P6

Fonte: Do autor (2022).

3.3 Obtenção dos extratos e preparo do padrão de Linamarin

A metodologia utilizada para o preparo dos extratos e determinação de linamarinas amostras de cana-de-açúcar foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Stochmal e Oleszek (1994), com modificações. Inicialmente, as canas passaram por uma nova moagem em moinho de Ika para reduzir a granulometria e obter melhor extração. Em seguida,

foi pesada em grama de cada variedade estudada e extraída com 10 mL de metanol 70%. As amostras foram homogeneizadas e levadas ao ultrassom da marca Eco-sonics, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de papel e, posteriormente, filtrados em membrana de polietileno de 0,45 μm (Millipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico.

Foi utilizado um padrão de linamarin da marca Sigma-Aldrich, preparando uma solução estoque na concentração de 10 mg mL⁻¹, solubilizado em água ultrapura. Para a construção da curva analítica, foram realizadas diluições da solução padrão em concentrações que variaram de 0,00012 a 0,0068 mg mL⁻¹, como observado na Tabela 3.

Tabela 3—Concentrações do padrão utilizadas na construção da curva analítica - Linamarin

Pontos	[] g/mL	V (estoque)
P1	0,00012	10 μL
P2	0,0003	30 μL
P3	0,0006	60 μL
P4	0,0012	120 μL
P5	0,0025	240 μL
P6	0,0036	350 μL
P7	0,0051	500 μL
P8	0,0068	670 μL
P9	0,0072	700 μL
P10 (estoque)	0,0102	-

Fonte: Do autor (2022).

3.4 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café – INCT-café (UFLA) utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão, modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e forno CTO-20A. A coluna utilizada para as separações foi a Agilent – Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna Agilent – Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x

12,5 mm, 5 μ m) e o detector utilizado para a determinação de dhurrin foi o UV-vis SPD-20A, ao passo que foi utilizado um detector de índice de refração (RID-20A) para a detecção de linamarin.

Para a determinação de dhurrin, utilizaram-se gradientes de água (solvente A) e acetonitrila (Merck grau HPLC) (solvente B) como fase móvel, sendo utilizado: 0,01-7 minutos – 10% - 30% de B; 7 – 9 minutos – 10% de B e 9 – 60 minutos – 10% de B. O comprimento de onda utilizado foi de 232 nm, fluxo de 1mL por minuto e forno a 35°C. Para a determinação de linamarin, a fase móvel utilizada foi uma solução de H₂O: MeOH: H₃PO₄ na proporção de 85:15:0,05% e fluxo de 1mL por minuto.

Os padrões de dhurrin e linamarin foram injetados no sistema cromatográfico em triplicata, ao passo que todas as amostras foram injetadas em duplicata. A identidade dos analitos foi confirmada pelo tempo de retenção e o perfil dos picos das amostras comparados aos dos padrões.

3.4.1 Validação analítica:

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos de validação dos métodos avaliados por meio dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Para a quantificação de dhurrin, a seletividade do método foi realizada por meio de calibração por adição de padrão. Foi feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Comparou-se as duas curvas analíticas e, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse; portanto, o método é seletivo. Já a seletividade do método proposto para a quantificação de linamarin foi realizada comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com essa substância (padrão).

As linearidades foram obtidas por padronização interna realizadas por meio de curvas analíticas, sendo determinados os coeficientes de determinação (R^2), expressos pela equação da reta. Para a determinação de LD e LQ, foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando as relações matemáticas a seguir:

$$LD = 3 \times (s/S)$$

$$LQ = 10 \times (s/S)$$

Em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI *et al*, 2004).

Neste estudo, utilizou-se a precisão intermediária expressa na repetibilidade. Para isso, foi realizada a análise, em 5 dias diferentes, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentrações de dhurrin (0,00001; 0,0005 e 0,005 mg mL⁻¹) e linamarin (0,0003; 0,0025 e 0,0072 mg mL⁻¹), sendo estimados os coeficientes de variação (CV), ao final das sucessivas repetições. Nas estimativas da precisão do método, foram determinados os coeficientes de variação (CV) de uma série de medidas por meio da utilização da seguinte equação matemática:

$$CV (\%) = (s/CMD) \times 100$$

Em que s = estimativa do desvio-padrão; CMD = concentração média determinada.

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando três amostras, escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com padrões dos analitos em três níveis de concentração: dhurrin (0,00005; 0,0005 e 0,005 mg mL⁻¹) e linamarin (0,0006; 0,0036 e 0,0072 mg mL⁻¹). A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática:

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

3.5 Coleta de amostras de cachaça/aguardente dos produtores

Posterior à identificação dos glicosídeos cianogênicos, foram identificados produtores de cachaças comercializadas. As cachaças analisadas não foram obtidas das mesmas canas coletadas, como apresentado na Tabela 4. As amostras das bebidas foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardente, Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais. Essas amostras foram utilizadas para a caracterização físico-química e cromatográfica, a fim de identificação e quantificação do carbamato de etila.

As amostras de cachaça utilizadas neste estudo foram adquiridas em parceria com produtores e estabelecimentos de venda de destilados provenientes de várias regiões do país. Foram identificadas por meio de números romanos (I a XV). As obtidas por meio de envelhecimento em diferentes madeiras receberam suas denominações seguidas de letras (a – Carvalho; b – Amburana; c – Bálsamo e d – Carvalho e jequitibá).

Tabela 4 - Cachaças analisadas e suas respectivas variedades.

Amostras	Variedades
I	RB867515
II	RB867515
III / IIIa / IV	SP80-1842 SP79-1011 RB867515
V / Va	SP80-3280
VI / VIa / VIb / VIc	CB47355 RB855536
VII	RB867515
VIII	RB867515
IX / IXd	SP80-3280
Xa	RB867515
XIb	RB867515
XII / XIIa	RB867515
XIII	CTC9001 RB867515
XIVa	SP79-1011 SP80-1842
XVa	RB867515

Fonte: Do Autor (2022).

3.6 Análises físico-químicas das aguardentes/cachaças

As análises das amostras foram realizadas conforme especificações estabelecidas pela Instrução Normativa nº 24 de 08/09/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Mapa (BRASIL, 2005). Os parâmetros analisados foram os seguintes: grau alcoólico, acidez volátil, extrato seco, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural, metanol, cobre, acroleína e carbamato de etila.

3.6.1 Graduação alcoólica

A graduação alcoólica foi determinada destilando-se 250 mL das amostras e, posteriormente, o grau alcoólico medido utilizando-se um densímetro eletrônico da marca Gibertini (DensiMat) a 20°C.

3.6.2 Acidez volátil

A acidez volátil foi determinada por meio de extração dos ácidos voláteis utilizando-se a técnica de arraste a vapor de água em destilador eletrônico da marca Gibertini. Os destilados foram titulados com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, em presença de fenolftaleína 1%. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido acético por 100 mL de álcool anidro.

3.6.3 Extrato seco

Os extratos secos das amostras foram determinados utilizando métodos gravimétricos. Em uma cápsula de alumínio previamente pesada em balança analítica, foi adicionada uma alíquota de 25 mL da amostra sem redestilar. Posteriormente, ocorreu a evaporação em banho-maria a 95°C, durante 3 horas. Após esse período, foram levadas à estufa a 100°C por 30 minutos. O material foi resfriado em dessecador e o resíduo sólido remanescente foi pesado em balança analítica. Os resultados foram expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra.

3.6.4 Ésteres

A determinação dos ésteres foi realizada por meio da titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas amostras. A quantificação dos ésteres é realizada com base em sua hidrólise alcalina, seguida da titulação dos ácidos liberados, com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. Os resultados obtidos são expressos em miligramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro.

3.6.5 Aldeídos

Os aldeídos foram determinados por meio de métodos iodométricos, titulando-se o SO₂ produzido durante a análise. A quantidade de aldeídos presentes nas amostras foi

expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro.

3.6.6 Álcoois superiores e metanol

Os álcoois superiores e o metanol foram determinados por meio de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama segundo Vilela *et al.* (2007). As características do cromatógrafo gasoso foram os seguintes: marca 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). Os reagentes e os padrões utilizados foram todos de grau analítico para cromatografia. A curva analítica foi preparada de uma solução de 4 g L⁻¹ em etanol 40%. No cromatógrafo a gás, a coluna foi iniciada a uma temperatura de 35°C, elevando-a até atingir 140°C, a temperatura do injetor estava a 150°C e o detector a 170°C, com um fluxo de análise de 1,4 mL por minuto, no modo Splitless 1:10.

3.6.7 Furfural e Hidroximetilfurfural

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

3.6.8 Cobre

O cobre foi quantificado por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro (Shimadzu UV-1601 PC) a 546 nm, comparando a valores de absorbância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando sulfato de cobre como padrão primário. A análise de cobre ocorre após redução do Cu²⁺ presente na bebida a Cu⁺, formando, posteriormente, um complexo colorido com a solução de 2,2-diquinolilo em álcool isoamílico.

3.6.9 Acroleína

A quantificação de acroleína foi realizada segundo Nascimento *et al.* (1997) e Zacaroni *et al.* (2011). As amostras de cachaça foram derivatizadas, formando 2,4-dinitrofenilhidrazina, e injetadas em sistema HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3 e interface modelo CBM-20A. A coluna utilizada foi a mesma descrita anteriormente com o injetor automático modelo SIL-10AF e o detector de arranjos de diodos (DAD) a 365 nm, em fluxo de 0,9 mL min⁻¹. A fase móvel utilizada era composta por solução de água com ácido acético (98:2% v/v) como solvente A e metanol (solvente B). O sistema de eluição foi um gradiente de 0 a 3 min (70 -85% B); 10 a 12 min (80 -70% B); 12 a 15 min (70 -70% B).

3.6.10 Carbamato de etila (CE)

A análise de CE foi realizada de acordo com o método proposto por Anjos *et al.* (2011) e Machado *et al.* (2013), utilizando o mesmo sistema HPLC descrito anteriormente. A análise consistiu na derivação prévia da amostra, com uma solução de xantidrol 0,02 mol L⁻¹. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5µm), acoplada a um detector de fluorescência (FLD) modelo RF-10AXL. Os comprimentos de onda de excitação e emissão empregados foram 233 e 600 nm, respectivamente. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,75 mL min⁻¹, e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema do tipo gradiente: 0 a 5 min (40-60% B); 5 a 10 min (60-70% B); 10 a 18 min (70-80% B); 18 a 19,5 min (80-90% B); 19,5 a 25 min (90-40% B); 25 a 30 min (40% B). A fase móvel foi composta por solução de acetato de sódio 20 mM (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B).

3.7 Análise estatística

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em esquema de parcelas subdivididas no espaço. Vinte e cinco tratamentos foram analisados, dentre estes, quinze variedades de colmos e dez pontas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. Para as amostras de cachaça coletadas, vinte e dois tratamentos foram submetidos a análise estatística, sendo analisados os diferentes parâmetros para avaliação dos Padrões de Identidade e

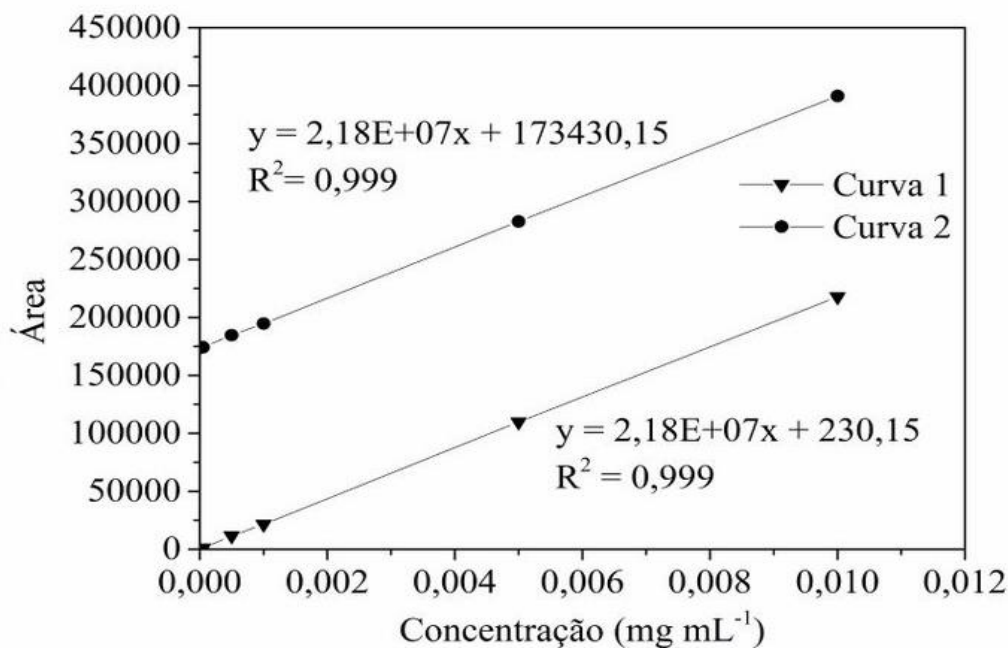
Qualidade (PIQs). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2003). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para observar a inter-relação entre o glicosídeo cianogênico e a formação de carbamato de etila nas bebidas. A análise foi realizada com o auxílio do software Statistica (2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização dos métodos de detecção de Dhurrin e Linamarin

A seletividade do método proposto para a detecção de dhurrin foi confirmada pelo método de calibração por adição de padrão. Avaliando comparativamente as curvas analíticas do gráfico obtido, em que uma delas (curva 1) foi adicionada do padrão e outra (curva 2) sem a adição do padrão, sendo elas paralelas, pode-se inferir que não houve interferência da matriz na determinação da substância de interesse; portanto, o método pode ser considerado seletivo, assim como é apresentado na Figura 12.

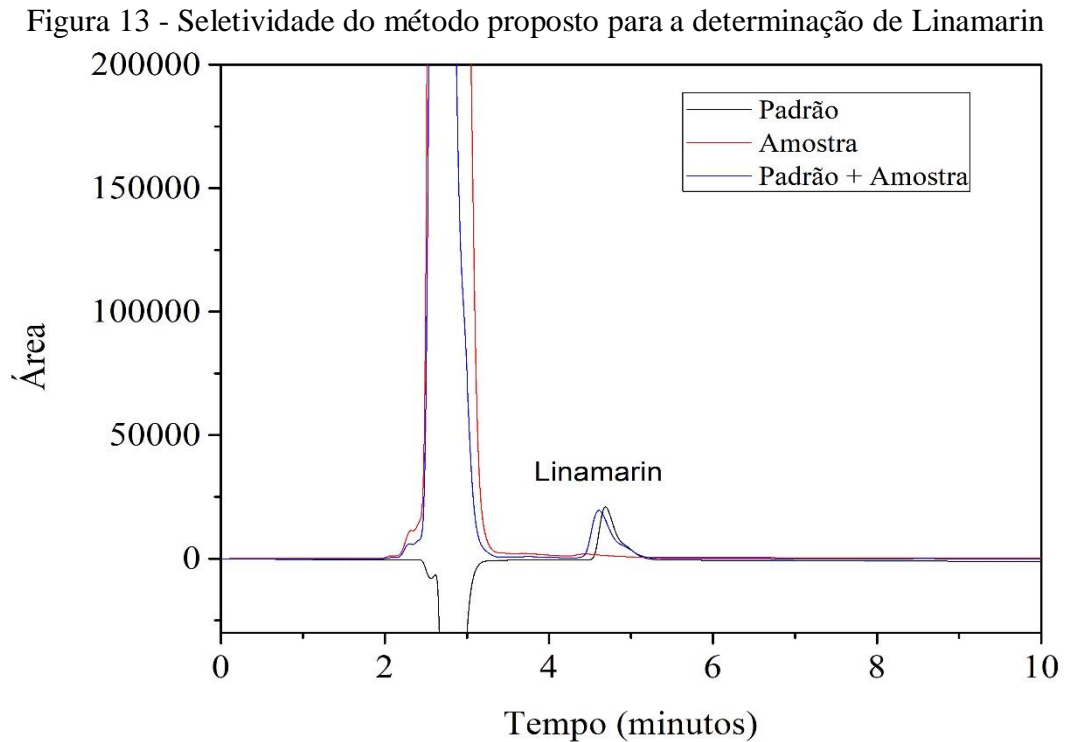
Figura 12 - Seletividade do método proposto para a determinação de Dhurrin



Fonte: Do autor (2022).

Já para a determinação de linamarin, o método proposto para a quantificação desse composto foi realizado por meio da adição de padrão, em que 200 μ L de uma amostra de extrato foi preparada e injetada para confirmar a presença do composto. Posteriormente, a mesma amostra foi fortificada pela adição de 200 μ L de padrão para a confirmação do pico analítico no mesmo tempo de retenção, confirmando, assim, a seletividade do método. Pode-se observar no cromatograma (Figura 13) que as amostras de extratos de cana-de-açúcar não apresentam o glicosídeo cianogênico linamarin, podendo-se observar que somente quando é adicionado o padrão do composto à amostra (linha azul), é obtido um pico no mesmo tempo

de retenção do padrão isolado (linha preta) assim como pode ser observado em destaque na Figura.

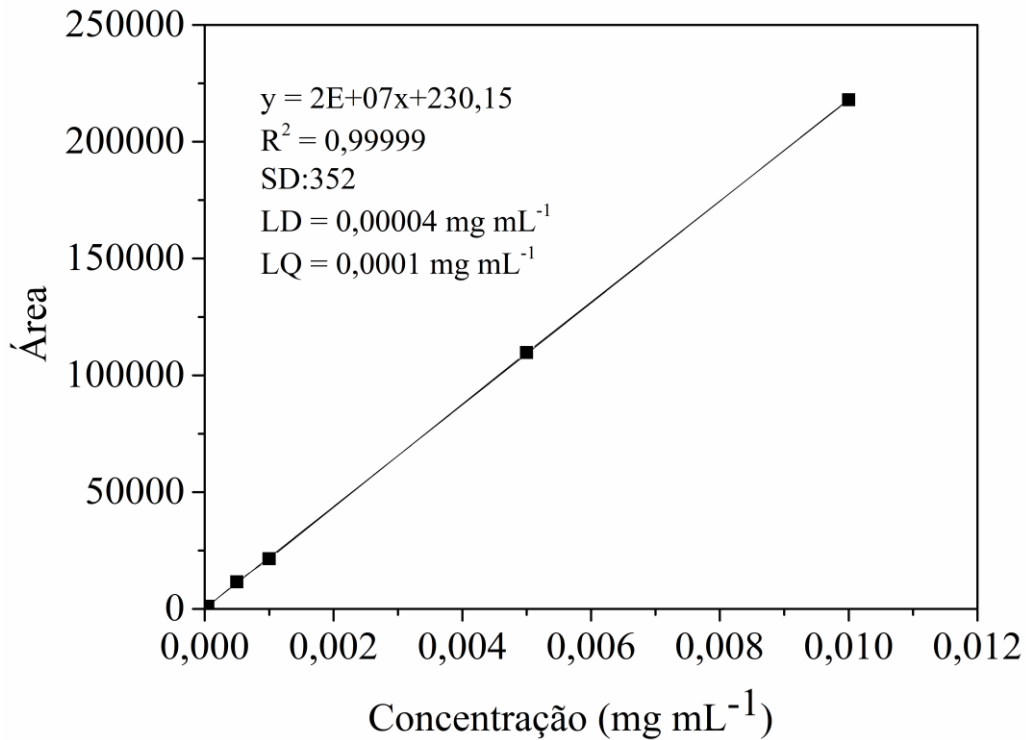


Fonte: Do autor (2022).

Foram obtidos coeficientes de determinação (R^2) de 0,9999 para ambos compostos analisados, o que indica uma forte correlação linear entre a concentração do composto e as áreas dos picos analisados, comprovando a linearidade dos métodos. Para Nascimento *et al.* (2018), quanto mais próximo de 1 for o valor do coeficiente de determinação, mais adequado é a estimativa da concentração do analito. Os coeficientes de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para os métodos analíticos empregados estão apresentados nas Figuras 14 e 15.

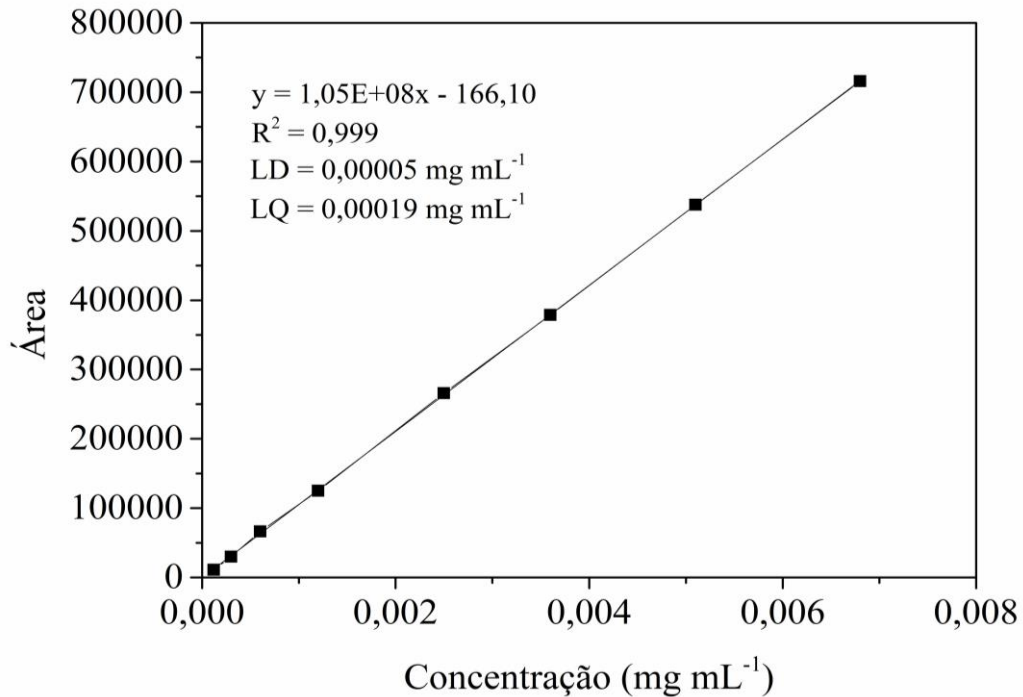
Nicola *et al.* (2011) obtiveram valores de regressão linear ($R^2 = 0,9999$), utilizando uma curva de calibração de cinco pontos na faixa de 5 a 100 mg L⁻¹ para determinação de dhurrin. Stochmal e Oleszek (1994) também encontraram valores de regressão linear de 0,99 para a determinação de linamarin em amostras de trevo-branco.

Figura 14 - Parâmetros de correlação (R^2) da curva analítica, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para determinação de Dhurrin.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 15 - Parâmetros de correlação (R^2) da curva analítica, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para determinação de Linamarin.



Fonte: Do autor (2022).

Os limites de detecção e quantificação encontrados para os compostos variaram de 0,00004 a 0,0001 mg mL⁻¹ para dhurrin e 0,00005 a 0,00019 mg mL⁻¹ para linamarin. Portanto, pode-se observar, com os resultados encontrados, uma boa seletividade para os métodos de determinação de dhurrin e linamarin em extratos de cana-de-açúcar.

As precisões dos métodos utilizados foram avaliadas por meio da repetibilidade de três pontos para determinação de dhurrin e linamarin, repetidas por quatro vezes em diferentes dias. Os valores obtidos variaram de 0,99 a 3,26% e de 1,95 a 3,64%, respectivamente. Os valores de CV encontrados estão dentro do limite de 5%. Infere-se, portanto, que o método apresenta precisão para identificação e quantificação dos compostos analisados.

Os valores de repetibilidade deste estudo estão próximos aos valores encontrados por Stochmal e Oleszek (1994), que obtiveram valores de repetibilidade de 4,9% para a determinação de linamarin em trevo-branco. Posteriormente, Nicola *et al.* (2011), estudando a presença do glicosídeo cianogênico dhurrin em sorgo, encontraram valores variando entre 0,4 a 1,9%. Madrera e Valles (2021), ao padronizarem um método para a detecção de dois compostos cianogênicos derivados de mandelonitrila (amigdalina e R-prunasina) em famílias de *Rosaceae* e *Sambucus*, obtiveram valores de repetibilidade variando entre 0,4% a 4,1%.

Para a exatidão dos métodos analisados neste estudo, foram encontrados resultados referentes às porcentagens de recuperação para a determinação de dhurrin e linamarin nas amostras de extrato de cana-de-açúcar, valores variando de 96,7% a 116,2% e de 92,5 a 98,6%, respectivamente.

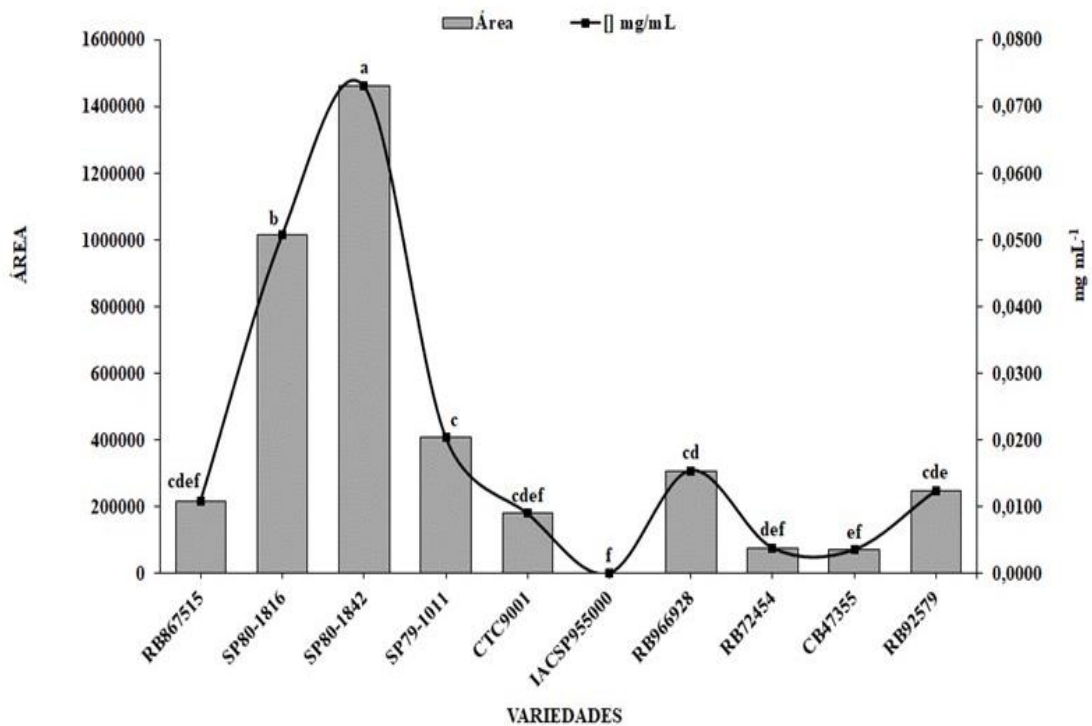
Nicola e colaboradores (2011) encontraram valores que variaram de 87% a 98% de recuperação para o método de determinação de dhurrin em variedades de sorgo. Enquanto Stochmal e Oleszek (1994) verificaram o procedimento de eficiência de recuperação para a determinação de linamarin em trevo branco usando um padrão de linamarin enriquecida, obtendo valores de recuperação variando entre 90% a 94%.

Ribani *et al.* (2004) citam que os intervalos aceitáveis de recuperação para algumas análises estão compreendidos entre 70% e 120%, com precisão de $\pm 20\%$, sendo que, em amostras muito complexas, essa faixa pode variar de 50% a 120%, com precisão de $\pm 15\%$. Baseando-se nessa afirmativa, com os resultados obtidos para ambos os compostos apresentados nesta pesquisa, constata-se que o método aplicado apresentou boa recuperação, sendo, portanto, adequado. Sendo assim, ambos os métodos são adequados para a determinação dos dois glicosídeos cianogênicos avaliados neste estudo.

4.2 Determinação dos glicosídeos cianogênicos nas amostras de cana-de-açúcar

Dos dois glicosídeos cianogênicos estudados, somente o dhurrin foi encontrado nas diferentes variedades de cana-de-açúcar (Figuras 16 e 17). Dhurrin é uma toxina natural produzida principalmente pelo sorgo. Constitui 30% do peso seco dessas plantas, porém está ausente nas sementes e raízes. A distribuição de dhurrin no sorgo mostra que tanto a produção quanto o seu armazenamento estão localizados no mesmo local dentro das mesmas células. Assim como no sorgo, ele encontra-se presente na maioria das plantas cianogênicas da família Poaceae, incluindo a cana-de-açúcar (HALKIER; SCHELLER; MOLLER, 1988; JOHANSEN *et al.*, 2007; TOKPOHOZIN; FISCHER; BECKER, 2018).

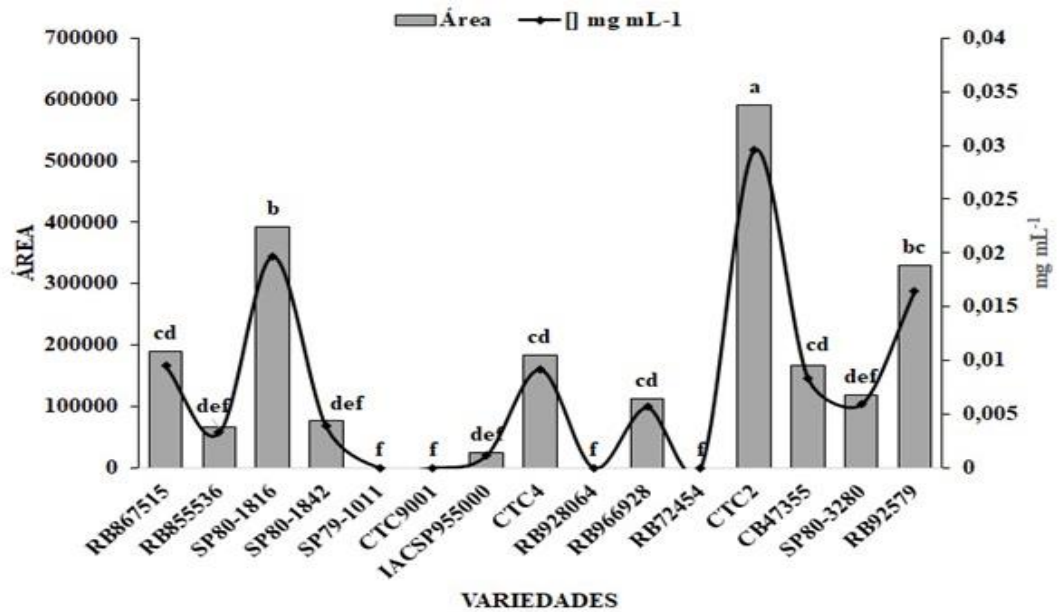
Figura 16 - Concentração de Dhurrin nas pontas das diferentes variedades de cana-de-açúcar estudadas.



As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 17 - Concentração de Dhurrin nos colmos das diferentes variedades de cana-de-açúcar estudadas.

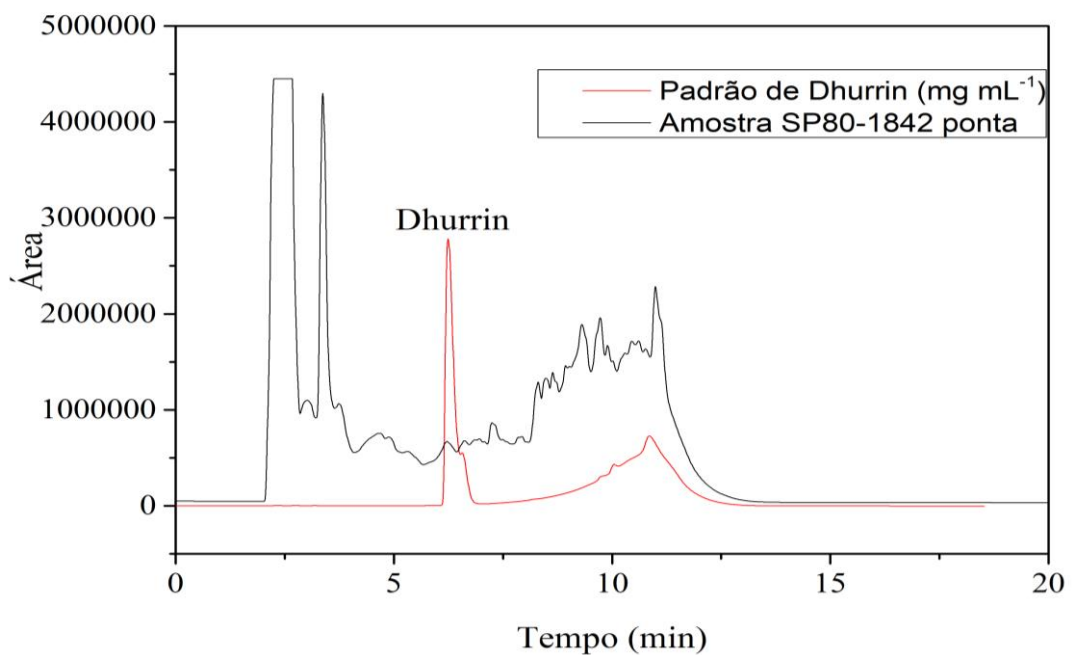


As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

A figura 18 apresenta o cromatograma de HPLC do padrão de dhurrin e da ponta da amostra SP80-1842.

Figura 18 – Cromatograma de HPLC do padrão de Dhurrin e amostra de extrato bruto.



Fonte: Do autor (2022).

Pode-se observar, nos gráficos acima, que as amostras de ponta das canas das variedades SP80-1842 ($0,0731 \pm 0,003 \text{ mg mL}^{-1}$) e SP80-1816 ($0,0508 \pm 0,0004 \text{ mg mL}^{-1}$) contêm as maiores concentrações do glicosídeo dhurrin, diferindo-se estatisticamente entre si e das demais amostras de ponta em estudo. Quanto à parte do colmo, a variedade CTC2 ($0,0295 \pm 0,001 \text{ mg mL}^{-1}$) foi a que apresentou o maior valor, diferindo-se estatisticamente da amostra SP80-1816 ($0,019644 \pm 0,004 \text{ mg mL}^{-1}$) e das demais amostras de colmo analisadas. Estudos de Cravo *et al.* (2019) corroboram com a presença do glicosídeo dhurrin em variedades de cana-de-açúcar. Por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), foi possível observar a presença do composto em diferentes variedades de cana-de-açúcar, assim como nesse estudo foi constatada a presença de dhurrin na variedade SP80-3280.

Os resultados encontrados neste estudo inferem que o teor de dhurrin é variável entre as diferentes variedades de cana estudadas, assim como sua localização também pode variar nas diferentes partes da cana-de-açúcar. Tokpohozin, Fischer e Becher (2018) relataram que o teor de dhurrin nos grãos de sorgo também variou conforme as variedades estudadas. Anteriormente, Miller e Tuck (2013), ao estudarem os glicosídeos cianogênicos em folhagens de uma espécie arbórea tropical (*Polyscias australiana*), encontraram altos níveis de dhurrin nas pontas das folhas mais jovens, em especial nas folhas emergentes da planta. Os autores relataram que esses altos níveis podem conferir proteção a pragas e fornecimento de uma fonte de nitrogênio durante a expansão foliar das plantas. Rosa Júnior (2005) relata a presença de dhurrin em extratos foliares de cana-de-açúcar na concentração de 4,3 mg por grama de massa fresca de folha. Segundo o autor, genes que codificam as enzimas UDP-glicosiltransferase e dhurrinase são induzidos pelo ataque de pragas na planta.

Heraud *et al.* (2018) citaram que é possível visualizar a localização dos glicosídeos cianogênicos em plantas de sorgo por meio de imagem hiperespectral Raman. Os autores mostraram que o dhurrin é principalmente encontrado ao redor do tecido cortical das folhas e em camadas mais externas das células, o que condiz com seu papel de defesa contra a herbivoria. Nessa mesma época, trabalhos de Sun *et al.* (2018) inferiram que o potencial cianogênico nas plantas de sorgo pode aumentar conforme as condições de estresse hídrico, sal, geada, luz, fertilização com nitrogênio e ataque de herbívoros e insetos, variando de acordo com o histórico genético da cultura e seu desenvolvimento.

Castada *et al.* (2020), ao avaliarem a concentração de dhurrin em flores, folhas, cascas e nozes de macadâmia, observaram grandes variações entre os diferentes tratamentos obtidos. A maior quantidade de dhurrin ($424,4 \text{ mg L}^{-1}$) foi encontrada na flor de macadâmia

fresca, enquanto valores que variaram entre 0,43 a 11,1 mg L⁻¹ foram encontrados nas nozes frescas e nas cascas.

4.3 Análises físico-químicas e cromatográficas das amostras de cachaça

Na Tabela 4, são apresentados os resultados das análises físico-químicas e cromatográficas realizadas segundo a IN nº 13, revogada para a IN nº 24 de 08/09/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Mapa (BRASIL, 2005; 2014).

Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas e cromatográficas das cachaças em estudo (continua).

AMOSTRAS	ANÁLISES					
	Grau Alcoólico (%v/v a 20°C)	Acidez Volátil*	Ésteres*	Aldeídos*	Extrato seco a 100°C (g L ⁻¹)	Álcoois Superiores (Propanol, Isobutílico e Isoamílico)*
I	43,55(±0,72) ^b	122,53 (±0,04) ^{ab}	88,8 (±0,03) ^a	8,1(±0,00) ^{cdef}	0,06 (±0,00) ^j	151,16 ^f
II	38,66 (±0,10) ^{jk}	105,92 (±0,27) ^c	66,92 (±3,21) ^{bc}	5,75 (±2,97) ^{defgh}	0,04 (±0,00) ^j	152,92 ^f
III	39,94 (±0,06) ⁱ	59,15 (±0,08) ^g	32,39 (±0,05) ^{defgh}	12,89 (±1,80) ^b	0,5 (±0,00) ^f	212,72 ^{bcdef}
IIIa	41,62 (±0,05) ^{ef}	64,34 (±0,08) ^{fg}	39,96 (±3,09) ^{def}	8,73 (±0,70) ^{bcdef}	0,31 (±0,00) ^g	228,82 ^{bcde}
IV	41,16 (±0,06) ^{fg}	30,62 (±0,05) ^j	19,08 (±1,56) ^h	10,05 (±0,36) ^{bcde}	0,04 (±0,00) ^j	226,07 ^{bcde}
V	38,46(±0,08) ^k	69,37(±0,16) ^{ef}	43,09 (±0,09) ^{de}	18,62 (±0,34) ^a	0,55 (±0,00) ^e	229,38 ^{bc}
Va	39,94 (±0,00) ⁱ	106,10 (±0,00) ^c	76,08 (±0,00) ^{ab}	19,75 (±0,00) ^a	0,56 (±0,00) ^e	267,55 ^{ab}
VI	39,24 (±0,06) ^j	32,11 (±0,05) ^{ij}	20,02 (±1,69) ^{gh}	2,57 (±0,00) ^{gh}	0,04 (±0,00) ^j	213,28 ^{bcdef}
VIa	41,96 (±0,05) ^{de}	73,20 (±2,57) ^e	38,54 (±1,51) ^{defg}	7,46 (±0,35) ^{def}	1,62 (±0,00) ^b	242,24 ^{abcd}
VIb	40,01 (±0,03) ⁱ	51,17 (±0,04) ^h	30,02 (±0,02) ^{defgh}	7,82 (±1,06) ^{cdef}	0,74 (±0,00) ^d	223,78 ^{bcde}
VIc	38,96 (±0,06) ^{jk}	60,64 (±0,09) ^g	26,09 (±0,04) ^{efgh}	5,18 (±0,01) ^{fgh}	0,92 (±0,00) ^c	265,13 ^{ab}

*mg 100 mL⁻¹ de Álcool Anidro. ND = não detectado. (a = envelhecidas em carvalho; b = envelhecidas em amburana; c = envelhecida em bálsamo; d = envelhecida em carvalho e jequitibá).

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas das cachaças em estudo (conclusão)

AMOSTRAS	ANÁLISES					
	Grau Alcoólico (%v/v a 20°C)	Acidez Volátil*	Ésteres*	Aldeídos*	Extrato Seco a 100°C (g L ⁻¹)	Álcoois Superiores (Propanol, Isobutílico e Isoamílico)*
VII	38,88 (±0,02) ^{jk}	20,26 (±0,01) ^k	20,20 (±1,67) ^{gh}	5,45 (±1,10) ^{efgh}	5,7 (±0,00) ^a	186,48 ^{def}
VIII	44,86 (±0,18) ^a	61,45 (±2,73) ^g	41,20 (±0,17) ^{de}	12,37 (±0,37) ^{bc}	0,06 (±0,00) ^j	228,37 ^{bcde}
IX	44,73 (±0,03) ^a	28,17 (±0,02) ^j	19,63 (±4,39) ^{gh}	1,80 (±0,00) ^h	0,03 (±0,00) ^j	195,97 ^{cdef}
IXd	40,94 (±0,09) ^h	117,35 (±2,98) ^b	76,77 (±19,33) ^{ab}	20,71 (±1,35) ^a	0,56 (±0,00) ^e	213,43 ^{bcdef}
Xa	40,43 (±0,04) ^{hi}	103,25 (±2,85) ^c	68,57 (±0,06) ^b	6,99 (±0,01) ^{defg}	0,23 (±0,00) ^h	300,16 ^a
XIb	42,43 (±0,03) ^{cd}	92,80 (±0,06) ^d	49,00 (±1,57) ^{cd}	5,47 (±1,01) ^{efgh}	0,37 (±0,00) ^g	255,27 ^{abc}
XII	42,65 (±0,06) ^c	48,01 (±0,06) ^h	18,41 (±1,51) ^h	8,52 (±0,66) ^{bcdef}	0,03 (±0,00) ^j	191,9 ^{cdef}
XIIa	37,38 (±0,04) ^l	126,42 (±0,12) ^a	67,99 (±1,68) ^{bc}	10,26 (±1,54) ^{bcd}	0,58 (±0,00) ^e	202,44 ^{bcdef}
XIII	37,51 (±0,04) ^l	39,89 (±3,01) ⁱ	20,94 (±1,77) ^{fgh}	7,53 (±0,77) ^{def}	0,06 (±0,00) ^j	201,38 ^{bcdef}
XIVa	38,34 (±0,01) ^k	98,59 (±5,77) ^{cd}	63,87 (±1,68) ^{bc}	8,95 (±2,24) ^{bcdef}	0,76 (±0,00) ^d	164,17 ^{ef}
XVa	37,06 (±0,00) ^l	93,17 (0,00) ^d	37,27 (±0,00) ^{defgh}	12,60 (±0,39) ^{bc}	0,14 (±0,00) ⁱ	216,73 ^{bcdef}

*mg 100mL⁻¹ de Álcool Anidro. ND = não detectado. (a = envelhecidas em carvalho; b = envelhecidas em amburana; c = envelhecida em bálsamo; d = envelhecida em carvalho e jequitibá).

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A partir dos resultados obtidos quanto aos Parâmetros de Qualidade e Identidade (PIQs) das cachaças, foi possível notar que, das amostras estudadas, três apresentaram graduação alcoólica inferior ao padrão estabelecido pela Legislação brasileira (37,06; 37,38 e 37,51%), sendo o limite mínimo de 38 e máximo de 48% v/v a 20°C (BRASIL, 2005). Corroborando com os resultados encontrados nesse estudo, Caetano *et al.* (2021), ao avaliarem a composição química de aguardentes de cana-de-açúcar não envelhecidas, encontraram valores de teor alcoólico variando de 37,8 a 48,0% (v/v). Anteriormente, Viana *et al.* (2020) também encontraram valores inferiores ao especificado pela legislação para graduação alcoólica para duas amostras (37,26 e 37,8 % v/v) das vinte e sete estudadas. Oliveira *et al.* (2020) encontraram valores ainda menores (34,12% v/v) em cachaças produzidas no estado da Paraíba, Brasil.

Problemas relacionados à graduação alcoólica podem estar relacionados a falhas durante o processo de destilação e padronização da bebida. Essas duas amostras que apresentaram grau abaixo do limite foram envelhecidas em madeira de carvalho, o que pode ser resultado da evaporação do etanol devido às condições de temperatura, umidade relativa do ar e atmosfera local, pois, devido à alta volatilidade do álcool etílico, ele pode ser absorvido com maior facilidade pela madeira (CARDOSO, 2020).

Analisando os resultados de acidez volátil, observa-se que os valores obtidos variaram de 20,26 a 126,42 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, estando, portanto, dentro dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor, que é de 150 mg de ácido acético por 100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005). Viana *et al.* (2020), estudando os PIQs de cachaças, obtiveram valores de acidez variando de 19,97 a 191,73 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, sendo que, dentre as amostras estudadas pelos autores, somente duas não apresentaram conformidade com a legislação vigente. Posteriormente, Vilela *et al.* (2021), ao avaliarem a qualidade sensorial e físico-química para certificação de unidades produtoras de cachaças no estado da Paraíba, observaram que 10% das amostras não atendiam aos padrões de acidez.

Altos teores de acidez podem ser atribuídos a compostos formados durante a estocagem da cana e a contaminação do mosto por bactérias acéticas durante o descanso entre a fermentação e a destilação. Outro fator é a aeração do mosto, que deve ser evitada, pois o aumento de oxigênio no meio pode induzir o metabolismo celular, oxidando os carboidratos durante a respiração das leveduras. Ocorre o aumento de ácido acético em vez de etanol e, conseqüentemente, diminui o rendimento do produto e aumenta a acidez (CARDOSO, 2020; SCHWAN; DIAS, 2020). Essa afirmação corrobora com o valor de acidez e graduação alcoólica encontrado para a amostra XIIa nesse estudo, que apresentou grau alcoólico abaixo

do valor estabelecido e o maior teor de acidez volátil encontrado. Viana *et al.* (2020) relatam que amostras envelhecidas podem sofrer um aumento significativo de acidez devido a alguns compostos ácidos da madeira, como os orgânicos não voláteis, além dos metabólitos secundários taninos e fenólicos.

Todas as amostras analisadas estão dentro dos padrões estabelecidos para ésteres, aldeídos e álcoois superiores, estipulados em até 200 mg, 30 mg e 360 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, respectivamente (BRASIL, 2005). Os ésteres estão relacionados ao *bouquet* desejado das cachaças quando associados aos álcoois superiores, aldeídos e ácidos. São a maior classe de compostos aromáticos em bebidas alcoólicas, e sua quantidade e proporção vão influenciar a percepção de aromas e sabores, dependendo do tipo de fermento utilizado, da temperatura, aeração e agitação durante a fermentação e qualidade do caldo. São também formados durante a destilação e envelhecimento por meio de reações de esterificações e interconversão dos compostos fenólicos, o que explica a grande variação de concentração para esses compostos (CARDOSO, 2020; ALCARDE, 2017). Nascimento e Silva, Verruma-Bernardi e Oliveira(2020b), pesquisando compostos voláteis presentes em cachaças, afirmam que eles podem ser derivados da matéria-prima utilizada e dependentes do manejo e variedades das canas. Observaram que a concentração de ésteres, álcoois superiores e coeficiente de congêneres presentes nas bebidas são totalmente dependentes da procedência e linhagem das variedades utilizadas, podendo modificar o perfil químico das bebidas.

Quanto aos aldeídos, os valores obtidos nesse estudo variaram de 2,57 a 20,71 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Segundo Cardoso (2020), a maioria dos aldeídos encontrados nas cachaças são indesejáveis do ponto de vista tecnológico, pois são compostos muito voláteis, com odor forte que afetam o aroma das bebidas, além de causarem dores de cabeça e ressaca do dia seguinte nos consumidores.

Considerando os álcoois superiores (propanol, isobutílico e isoamílico) que foram obtidos neste trabalho, os valores variaram de 151,16 a 300,16 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Para Cardoso (2020), os fatores que podem contribuir com o aumento da concentração desses compostos são a alta temperatura durante a fermentação e pH muito ácido.

A legislação não estabelece um padrão quanto a extrato seco em amostras de cachaça, porém os valores encontrados nesse estudo foram baixos, variando de 0,03 a 5,70 g L⁻¹. A amostra de maior valor é descrita como adoçada, ou seja, contém de 6 a 30g de açúcares expressos em sacarose segundo a legislação (BRASIL, 2005). Maiores teores de extratos-seco também podem ser observados em amostras envelhecidas. Durante o envelhecimento, os

taninos e compostos fenólicos predominantes na bebida, provenientes da lignina, chegam a representar 40% desse aumento (CARDOSO, 2020).

Os resultados encontrados para a presença de contaminantes na cachaça estão apresentados na Tabela 5. Todas as amostras apresentaram-se dentro do limite estabelecido pela legislação de até 5 mg L⁻¹ para cobre. Foram observados valores variando de 0,15 a 3,56 mg L⁻¹ nesse estudo. A presença desse metal na cachaça em níveis inadequados pode ser decorrente da constituição do material utilizado na fabricação dos alambiques. Entretanto, esse metal contribui para a eliminação de odores desagradáveis provenientes de compostos sulfurados. Quando os valores de cobre estão acima dos limites estabelecidos, eles indicam falta de higiene, ocorrendo a formação de “azinhavre” (carbonato básico de cobre) nas paredes internas do destilador (BRASIL, 2005; CARDOSO, 2020).

Viana *et al.* (2020), estudando compostos tóxicos e os parâmetros de qualidade em aguardentes de cana envelhecidas, observaram valores de quatro amostras (5,10; 5,50; 6,40 e 6,70 mg L⁻¹) acima do limite estabelecido pela Legislação brasileira para cobre. Esses dados evidenciam que melhorias durante o processo devem ser feitas, a fim de melhorar a qualidade da bebida envelhecida brasileira. Oliveira *et al.* (2020), analisando amostras de cachaça da Paraíba, encontraram uma concentração de cobre de 18,36 mg L⁻¹, três vezes maior que o limite estabelecido pela legislação.

Alguns autores propõem alternativas para redução ou eliminação do cobre em cachaças e aguardentes após a destilação, como o uso de filtros de carvão ativado, argilas e adsorventes baseados em biopolímeros. Esses trabalhos têm dado bons resultados, diminuindo a concentração de cobre e mantendo os limites dos compostos secundários desejáveis (LIMA, *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2012; ZACARONI, *et al.*, 2015; DUARTE, *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2022). Atualmente, estudos de Barbosa *et al.* (2022) avaliaram o efeito cinético, termodinâmico e físico-químico da remoção de cobre de cachaças utilizando fibras de coco. Observaram maior seletividade para os íons cobre, o que possibilitou menor interação de outros compostos com a fibra, mantendo a qualidade físico-química da bebida.

Tabela 6 - Resultados das análises de contaminantes das cachaças estudadas (continua).

AMOSTRAS	ANÁLISES						
	Cobre (mg L ⁻¹)	Furfural*	Metanol*	Álcool Butílico*	Álcool <i>sec</i> -Butílico*	Acroleína*	Carbamato de Etila (µg L ⁻¹)
I	0,89 (±0,00) ^{fghi}	0,57 (±0,00) ^{ghijk}	ND	1,03 (±0,51) ^{bcd}	0,24 (±0,01) ^d	0,81 (±0,00) ^c	12,93 (±0,09) ^{fg}
II	1,72 (±0,01) ^{efgh}	0,58 (±0,02) ^{ghijk}	ND	0,67 (±0,08) ^{abcd}	3,74 (±0,09) ^d	23,60 (±23,86) ^{ab}	9,22 (±0,36) ^{ij}
III	3,56 (±0,04) ^a	0,37 (±0,06) ^{hijkl}	ND	0,37 (±0,03) ^d	0,53 (±0,27) ^d	5,53 (±0,26) ^{bc}	9,58 (±0,03) ^{hij}
IIIa	1,35 (±0,01) ^{defg}	0,55 (±0,10) ^{ghijk}	ND	0,67 (±0,01) ^{abcd}	3,26 (±0,03) ^d	8,35 (±0,74) ^{bc}	11,52 (±0,03) ^{gh}
IV	2,61 (±0,21) ^b	0,25 (±0,02) ^{kl}	ND	0,47 (±0,00) ^{bcd}	ND ^d	1,57 (±0,08) ^c	9,61 (±0,29) ^{hij}
V	0,55 (±0,01) ^{hij}	0,31 (±0,00) ^{ijkl}	ND	0,41 (±0,04) ^d	28,65 (±2,51) ^b	9,69 (±0,29) ^{bc}	8,32 (±0,12) ^{jk}
Va	0,67 (±0,01) ^{ghij}	0,47 (±0,01) ^{hijkl}	ND	0,51 (±0,12) ^{bcd}	54,34 (±6,72) ^a	13,33 (±0,15) ^{bc}	8,75 (±0,03) ^{jk}
VI	0,86 (±0,00) ^{fghi}	1,30 (±0,01) ^{de}	ND	0,79 (±0,04) ^{abcd}	ND ^d	0,69 (±0,00) ^c	13,79 (±0,01) ^{ef}
VIa	1,17 (±0,03) ^{efgh}	3,84 (±0,19) ^a	ND	0,71 (±0,06) ^{abcd}	ND ^d	8,30 (±0,59) ^{bc}	13,97 (±0,07) ^{def}
VIb	0,46 (±0,01) ^{ij}	1,40 (±0,07) ^{cd}	ND	0,67 (±0,10) ^{abcd}	ND ^d	0,68 (±0,02) ^c	9,75 (±0,52) ^{hij}
VIc	0,82 (±0,00) ^{fghij}	1,65 (±0,02) ^c	ND	0,95 (±0,02) ^{abc}	ND ^d	1,48 (±0,06) ^c	9,17 (±0,13) ^{ij}

*mg 100 mL⁻¹ de Álcool Anidro. ND = não detectado. (a = envelhecidas em carvalho; b = envelhecidas em amburana; c = envelhecida em bálsamo; d = envelhecida em carvalho e jequitibá).

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Resultados das análises de contaminantes das cachaças estudadas (conclusão).

AMOSTRAS	ANÁLISES						
	Cobre (mg L ⁻¹)	Furfural*	Metanol*	Álcool Butílico*	Álcool <i>sec</i> - Butílico*	Acroleína*	Carbamato de Etila (µg L ⁻¹)
VII	0,88 (±0,05) ^{fghi}	0,13 (±0,00) ^l	ND	0,69 (±0,12) ^{abcd}	ND ^d	0,74 (±0,00) ^c	15,84 (±0,32) ^{bcd}
VIII	0,81 (±0,03) ^{fghij}	0,87 (±0,02) ^{fg}	ND	1,00 (±0,00) ^{ab}	ND ^d	0,63 (±0,06) ^c	21,81 (±0,13) ^a
IX	0,15 (±0,08) ^j	0,27 (±0,01) ^{kl}	ND	0,70 (±0,05) ^{abcd}	ND ^d	1,04 (±0,10) ^c	11,10 (±0,69) ^{ghi}
IXd	0,94 (±0,01) ^{efghi}	1,24 (±0,24) ^{de}	ND	0,62 (±0,04) ^{abcd}	5,55 (±0,34) ^d	8,69 (±0,48) ^{bc}	15,27 (±0,78) ^{cde}
Xa	1,48 (±0,02) ^{def}	1,26 (±0,03) ^{de}	ND	0,40 (±0,05) ^d	13,68 (±1,98) ^c	38,14 (±2,16) ^a	16,63 (±0,14) ^{bc}
XIb	1,87 (±0,08) ^{cd}	0,62 (±0,07) ^{fghi}	ND	0,52 (±0,10) ^{bcd}	2,16 (±0,06) ^d	11,58 (±0,86) ^{bc}	16,25 (±0,59) ^{bc}
XII	2,23 (±0,05) ^{bc}	0,60 (±0,03) ^{ghij}	ND	0,34 (±0,03) ^d	ND ^d	0,67 (±0,04) ^c	12,87 (±0,35) ^{fg}
XIIa	1,96 (±0,01) ^{bcd}	2,42 (±0,16) ^b	ND	0,43 (±0,07) ^{bcd}	ND ^d	4,94 (±0,06) ^{bc}	13,76 (±0,58) ^{ef}
XIII	1,57 (±0,04) ^{cde}	0,40 (±0,10) ^{hijkl}	ND	0,17 (±0,25) ^d	ND ^d	0,80 (±0,02) ^c	13,57 (±0,38) ^{ef}
XIVa	0,99 (±0,01) ^{efghi}	0,71 (±0,05) ^{fgh}	ND	0,15 (±0,05) ^{cd}	ND ^d	0,86 (±0,02) ^c	17,42 (±0,08) ^b
XVa	1,22 (±0,01) ^{efgh}	0,96 (±0,05) ^{ef}	ND	1,06 (±0,03) ^a	12,03 (±0,18) ^c	8,69 (±0,25) ^{bc}	7,10 (±0,56) ^k

*mg 100 mL⁻¹ de Álcool Anidro. ND = não detectado. (a = envelhecidas em carvalho; b = envelhecidas em amburana; c = envelhecida em bálsamo; d = envelhecida em carvalho e jequitibá).

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de furfural encontrados nas cachaças estudadas variaram de 0,13 a 3,84 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, estando todos dentro dos limites estabelecidos de até 5 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005). Viana e colaboradores (2020), estudando compostos tóxicos em cachaças, encontraram um valor de 6,24 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para furfural, estando fora dos padrões permitidos pela legislação. Para os pesquisadores, o envelhecimento em condições irregulares pode ter contribuído para o aumento do contaminante na amostra. Rodrigues *et al.* (2020), ao quantificarem os contaminantes presentes em aguardentes de cana e em cachaças produzidas por destilação em coluna e alambique de cobre, observaram que nenhuma amostra de cachaças destiladas em alambiques de cobre, excederam os valores legais para a concentração de furfural, porém três amostras obtidas por destilação em coluna contiveram concentrações acima dos limites estabelecidos pela legislação (5,63; 7,00 e 5,68 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro).

O maior valor de furfural encontrado nesse estudo se refere a uma cachaça envelhecida. Masson *et al.* (2007) e Cardoso (2020) relataram que o envelhecimento aumenta as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, pois esses compostos são derivados de macromoléculas provenientes das madeiras, podendo ser formados durante a prática de queima da cana-de-açúcar e também pela pirogênese de açúcares residuais da fermentação durante a destilação do vinho.

Nesse estudo não foi detectado o álcool metílico, sendo seu valor máximo estabelecido pela legislação de 20 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Santiago e colaboradores (2020) não encontraram concentrações superiores ao limite estabelecido pela legislação em seu estudo, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho.

Quanto ao álcool butílico (butan-1-ol), foram encontradas concentrações variando entre 0,17 a 1,06 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, estando todas as amostras dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, que é de 3,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Para o álcool *sec*-butílico (butan-2-ol), quatro amostras estudadas apresentaram-se fora dos padrões exigidos, que é de 10,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005). Esse fator pode estar relacionado à contaminação bacteriana durante o processo de fermentação para obtenção dessas bebidas ou à variedade de cana utilizada, à estocagem de cana e também à utilização das pontas de canas.

Os álcoois superiores, butan-1-ol (butílico) e o butan-2-ol (*sec*-butílico) podem ser formados na etapa de fermentação devido à contaminação pela bactéria *Clostridium acetobutylicum*. Suas toxicidades são relativamente altas em comparação com o etanol. Uma

forma de redução desses contaminantes é não deixar a matéria-prima próxima de estábulos ou locais de ordenha e não utilizar cana armazenada (CARDOSO, 2020).

Quanto ao contaminante acroleína, dez das vinte e duas amostras estudadas não atenderam aos valores estabelecidos pela legislação para esse composto de até 5 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005). Foram encontrados valores variando de 0,63 a 38,14 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Esse composto pode-se formar por contaminação bacteriana. O glicerol é produzido durante a fermentação e é desidratado para formar o contaminante (ALCARDE, 2017; CARDOSO, 2020).

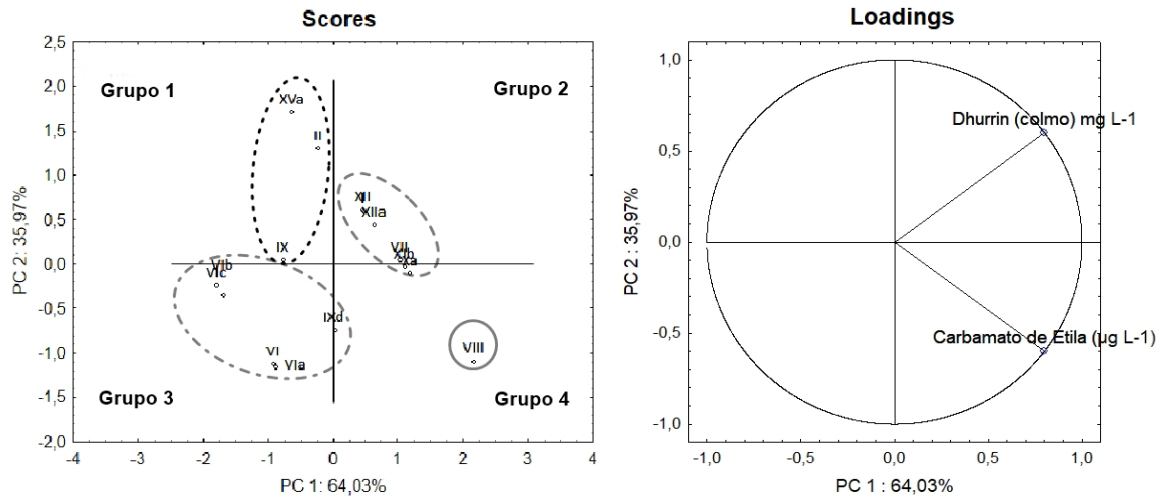
Ribeiro e colaboradores (2017) mostraram que a clarificação do caldo da cana-de-açúcar com hidróxido de sódio e a utilização de fermento selecionado foi eficiente na diminuição de contaminantes na cachaça, visto que somente foi encontrado valor acima do limite estabelecido pela legislação para acroleína em cachaças produzidas sem tratamento prévio e com uso de fermento natural (10,77 e 13,56 mg. 100 mL⁻¹ álcool anidro).

Foram encontrados valores variando entre 7,10 a 21,81 µg L⁻¹ para o contaminante carbamato de etila (CE), estando todas as amostras dentro do padrão estabelecido de até 210 µg L⁻¹ (BRASIL, 2005). Esse composto pode ser formado em várias etapas de produção das cachaças e aguardentes. Porém, devido à atenção voltada para esse contaminante, o controle de qualidade busca medidas de controle e eliminação de CE. Bueno *et al.* (2020) demonstram que um eficiente controle de qualidade nas indústrias produtoras de cachaça/aguardentes é eficaz para a diminuição na concentração de carbamato de etila. O impacto da utilização de leveduras ativas, a qualidade pós-colheita, a seleção das variedades e a redução da temperatura durante a destilação foram os pontos mais críticos no processo de obtenção dos destilados descritos pelos autores.

4.4 Correlação entre o glicosídeo Dhurrin e CE em cachaças

Pelos dados obtidos, observa-se que os resultados mais precisos foram encontrados quando foram utilizadas as cachaças elaboradas com somente uma variedade, correlacionando-as com os resultados de dhurrin obtidos para os colmos, como é apresentado na Figura 19.

Figura 19 -Pontuações e cargas das análises de componentes principais (PCA) na correlação de matriz construída usando dados para os componentes Dhurrin e CE.



Fonte: Do Autor (2022).

A análise de PCA (escores e cargas) demonstra, de uma maneira geral, a interação entre os tratamentos. O PC1 apresenta os grupos formados em relação às amostras de cachaça com as concentrações de dhurrin e CE, enquanto o PC2 subdivide os quadrantes em relação aos dois componentes principais obtidos (dhurrin e CE). O PC1 apresentou 64,03% da variação, ao passo que, no PC2, houve uma associação de 35,97% da variação. Em relação aos escores, foram observados quatro principais grupos: **1** (tratamentos II, IX e XVa); **2** (tratamentos I, VII, Xa, XIb, XII e XIIa); **3** (tratamentos VI, VIa, VIb, VIc e IXd) e **4** (tratamento VIII), apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Grupos formados pelo PCA, em relação aos valores de Dhurrin dos colmos e CE.

Grupos	Cachaças	Variedades de Cana	Concentração de CE $\mu\text{g L}^{-1}$
Grupo 1	II	RB86-7515	9,22
	IX	SP80-3280	11,10
	XVa	RB86-7515	7,10
Grupo 2	I	RB86-7515	12,93
	VII	RB86-7515	15,84
	Xa	RB86-7515	16,63
	XIb	RB86-7515	16,25
	XII	RB86-7515	12,87
	XIIa	RB86-7515	13,76
Grupo 3	VI	RB85-5536	13,79
	VIa	RB85-5536	13,97
	VIb	RB85-5536	9,75
	VIc	RB85-5536	9,17
	IXd	SP80-3280	15,27
Grupo 4	VIII	RB86-7515	21,81

Fonte: Do Autor (2022).

Os tratamentos II, IX e XVa (grupo 1) apresentaram diferentes concentrações de dhurrin. Porém obteve-se menor produção de CE, com 9,22, 11,1 e 7,10 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, em relação ao grupo 2 (I, VII, Xa, XIb, XII e XIIa).

No grupo 2 (I, VII, Xa, XIb, XII e XIIa), embora tenha apresentado a mesma concentração de *Dhurrin*, houve uma produção inferior de CE em relação ao tratamento VIII (grupo 4), que possui a mesma concentração de dhurrin do grupo 2. Entretanto, apresentou a maior concentração de CE, com 21,81 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O grupo 3 (tratamentos VI, VIa, VIb, VIc e IXd) apresentou o menor teor de dhurrin em relação aos demais grupos 1, 2 e 4, destacando os tratamentos VIb e VIc, aonde as amostras foram envelhecidas em amburana e balsamo, respectivamente. Apresentaram menores concentrações de CE (9,75 e 9,17 $\mu\text{g L}^{-1}$) em relação aos demais tratamentos do grupo. Observou-se também, que um maior valor de CE (13,97 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi encontrado no tratamento VIa (armazenado em carvalho) do que nos tratamentos armazenados em amburana e balsamo.

Em um aspecto geral, 8 das 15 cachaças produzidas com a mesma variedade de cana-de-açúcar apresentaram o mesmo valor de [dhurrin] (0,009475 mg L^{-1}), apresentando em

média geral, os maiores valores para carbamato de etila presente nas cachaças. O grupo 3 apresentou os menores valores de [dhurrin]e menor média geral de concentração CE. Já a cachaça VIII apresentou o maior valor de [dhurrin]e [CE].

Ressalta-se que houve variações nos valores de CE, quando as cachaças foram armazenadas em diferentes recipientes (barris de carvalho, amburana, balsamo e carvalho e jequitibá).Segundo Santiago *et al.* (2017), a formação de CE em cachaças durante o envelhecimento em barril de madeira ocorre de forma gradativa através da reação entre etanol e uréia formada pela degradação de precursores nitrogenados intrínsecos ao processo de produção.

Cravo e colaboradores (2019),pesquisando a correlação da presença do dhurrine a formação do CE, observaramque o fator primordial para a concentração de CE em duas amostras cachaças (F₂ – SP83-2847 e F₄ – SP80- 3280) foi a variedade de cana utilizada, corroborando assim com os resultados encontrados nesta pesquisa. Alguns autores relatam que a fertilização das canas com compostos nitrogenados pode contribuir com a formação de substâncias potencialmente precursoras de CE, como ureia, citrulina, N-carbamil (carbamil-fosfato) e cianeto (PELEGRIN *et al.*, 2020). Para Nascimento e Silva *et al.* (2022), há uma correlação entre a incidência de nitrogênio total encontrado no caldo da cana-de-açúcar com a formação de CE em cachaças analisadas, mesmo que essas ainda estavam adequadas a legislação vigente.

Pesquisas indicam que um eficiente controle de qualidade em indústrias produtoras de bebidas é eficaz para a diminuição na concentração de CE nos destilados (BUENO *et al.*, 2020). Para Baffa Júnior *et al.* (2011) a correta separação das frações cabeça, coração e cauda durante a destilação irá contribuir para a redução da contaminação do destilado por carbamato de etila. Para Pimentel e Andrade (2020), a utilização de pontas das canas para evitar a contaminação do caldo com gomas, resinas e sais, pois estes, além de prejudicar o processo de fermentação, podem levar a formação de contaminantes, como álcool butílico, *sec*-butílico, acroleína e CE. Além disso, as pontas das canas são pobres em açúcares, o que pode dificultar a formação de etanol.

Estudo de Qin e colaboradores (2021) sobre o efeito da fermentação da farinha de mandioca nos teores de CE indicam que,mesmo durante a fermentação, o glicosídeo cianogênico (*linamarin*) não foi totalmente hidrolisado, estando presente no líquido fermentado e na vinhaça. Dados dos autores mostram que grande parte do glicosídeo somente é quebrado durante a fermentação, liberando ácido cianídrico. Porém ainda assim, os autores concluíram que o teor de cianeto na farinha de mandioca diminuiu durante a fermentação.

5 CONCLUSÕES

Foram padronizados dois métodos para a detecção e quantificação dos glicosídeos cianogênicos dhurrin e linamarin, e resultados satisfatórios com parâmetros de validação dentro dos estabelecidos para a comprovação de eficiência foram obtidos.

Os parâmetros físico-químicos e cromatográficos das cachaças analisadas indicaram que todas as amostras atendem a legislação quanto ao carbamato de etila, porém algumas amostras estavam em discordância quanto a graduação alcoólica, ao álcool *sec*-butílico e a acroleína.

O glicosídeo linamarin não foi encontrado nos extratos das diferentes variedades de cana.

A variedade RB86-7515 apresentou a concentração de 0,009475 de dhurrin no colmo e concomitantemente foram aquelas aonde foram encontradas as maiores concentrações de CE.

Apesar das concentrações de dhurrin nas variedades de cana-de-açúcar apresentarem variações, infere-se que a presença deste composto pode levar a formação do contaminante.

Além disso, o processo de produção e o armazenamento também podem influenciar na síntese de CE na cachaça quando se considera o dhurrin, um precursor do carbamato. Assim, recomenda-se aos produtores a escolha de uma variedade certa e o cuidado em todas as etapas da cadeia produtiva para evitar a formação do carbamato de etila na bebida.

REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R. **Cachaça: Ciência, Tecnologia e arte**. 2 ed. Büchner, São Paulo – SP, p. 96, 2017.
- ANDRADE, L. P. *et al.* Cachaça sob uma perspectiva histórica, cultural e simbólica. **Revista Gestão Analítica**, Fortaleza, v. 7, n. 2, p. 184-201, jul./dez. 2018.
- 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**, v. 32, p. 874-878, 2011.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (Publicada no DOU nº141, de 25 de julho de 2017).
- AMORIN, A. F. V. **Métodos Cromatográficos**. 1º ed, Editora UECE, filiada á Associação Brasileira das Editoras Universitárias. Fortaleza- CE, p. 1-86, 2019.
- ARESTA, M. *et al.* Cooper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, 2001.
- BAFFA JÚNIOR, J. C. *et al.* Ethyl-carbamate determination by gas chromatography-mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1383–1387, 2011.
- BARBOSA, R. B. *et al.* Kinetic, thermodynamic and physical-chemical study of the removal of copper from cachaça using coconut fibers. **Food Additives e Contaminants: Part A**, p. 1-12, 2022.
- BEATTIE, J. K.; POLYBLANK, G. A. Copper-catalysed oxidation of cyanide by peroxide in alkaline aqueous solution. **Australian Journal of Chemistry**, v. 48, p. 861-868, 1995.
- BORGES, G. B. V. *et al.* Selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and accurate separation of distillate fractions reduce the ethyl carbamate levels in alembic cachaças. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 380–384, 2014.
- BORTOLETTO, A.; ALCARDE, A. Assessment of Ethyl Carbamate Contamination in Cachaça (Brazilian Sugar Cane Spirit). **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 28, 2016.
- BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Chemical and microbiological quality of sugar cane juice influences the concentration of ethyl carbamate and volatile congeners in cachaça. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 251–256, 2015.
- BORTOLETTO, A. M.; SILVELLO, G.C.; ALCARDE, A.R. Aromatic profiling of flavor active compounds in sugarcane spirits aged in tropical wooden barrels. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. 1-14, 2021.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), **Instrução Normativa nº 13**, de 29 de junho de 2005.
- BRASIL, Assembleia Legislativa de Minas Gerais, **Lei número 13.949 de 11 de julho de 2001**. Regulamento técnico de identidade e as características do processo de elaboração da

cachaça artesanal de Minas. Disponível em:
<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=140123> Acesso em 30 de maio de 2021.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Cachaça no Brasil: Dados de Registro de cachaças e Aguardentes** (2020). 2ª edição. Brasília: MAPA/AECE, p. 27. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014**. Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-28-de-8-de-agosto-de-2014.pdf/view> Acesso em 01 de junho de 2021.

BUENO, R. C. *et al.* Two Years Monitoring of Ethyl Carbamate in Sugar Cane Spirit from Brazilian Distilleries. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 7, p. 1461-1466, 2020.

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

CAETANO, D. *et al.* Chemical Fingerprint of Non-aged Artisanal Sugarcane Spirits Using Kohonen Artificial Neural Network. **Food Analytical Methods**, p. 1-18, 2021.

CARDOSO, M. G. **Produção de Aguardente de cana**. 4 ed. revisada e ampliada. Editora UFLA, Lavras – MG, p. 152-187, 2020.

CASTADA, H. Z. *et al.* Cyanogenesis in Macadamia and Direct Analysis of Hydrogen Cyanide in Macadamia Flowers, Leaves, Husks, and Nuts Using Selected Ion Flow Tube–Mass Spectrometry. **Foods**, v. 9, n. 174, p. 1-15, 2020.

CARVALHO, D. G. *et al.* Determination of the concentration of total phenolic compounds in aged cachaça using two-dimensional fluorescence and mid-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 329, p. 1-8, 2020.

CASTRO, C. M. *et al.* Lignin-derived phenolic compounds in cachaça aged in new barrels made from two oak species. **Heliyon**, v. 6, p. 1-7, 2020.

CASAGRANDE, A. A. 1991. **Tópicos de Morfologia e Fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP. 157p.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – CTC. Variedades CTC. Disponível em:
<https://ctc.com.br/produtos>. Acesso em 21 de fevereiro de 2022.

CHEMSPIDER, Search and share chemistry. Disponível em:
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10657.html>. Acesso em 27 de agosto de 2021.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora UNICAMP, Campinas, SP, p. 273-397, 2006.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Nova estimativa de cana-de-açúcar traz produção de 572,9 milhões de toneladas. Disponível em [https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4725-nova-estimativa-de-cana-de-acucar-traz-producao-de-572-9-milhoes-toneladas#:~:text=Com%20isso%2C%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20deve,Nacional%20de%20Abastecimento%20\(Conab\)](https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4725-nova-estimativa-de-cana-de-acucar-traz-producao-de-572-9-milhoes-toneladas#:~:text=Com%20isso%2C%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20deve,Nacional%20de%20Abastecimento%20(Conab)). Acesso em 16 de setembro de 2022.

- CRAVO, F. D'CARLOS. *et al.* Composition of Cachaças Produced from Five Varieties of Sugarcane and the Correlation of the Presence of Dhurrin in the Cane with That of Ethyl Carbamate in the Product. **American Journal of Plant Sciences**, v. 10, p. 339-350, 2019.
- CRESSEY P.; REEVE, J. Metabolism of cyanogenic glycosides: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 225-232, 2019.
- CUNY, M. A. C. *et al.* Role of cyanogenic glycosides in the seeds of wild lima bean, *Phaseolus lunatus*: defense, plant nutrition or both? **Planta**, v. 250, n. 4, p. 1281–1292, 2019.
- CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia University Press, New York, 1981.
- D'AVILA, G. B. *et al.* Quantification of ethyl carbamate in cachaça produced in different agro-industrial production systems. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 2, p. 299-303, 2016.
- DIAS, S. M. B.; MACHADO, A. M. R. Destilação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de Aguardente de cana**. 4 ed. Lavras: Editora da UFLA, p. 27-60, 2020.
- DUARTE, F. C. *et al.* Physicochemical and sensory changes in aged sugarcane spirit submitted to filtering with activated carbon filter. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 471-477, 2012.
- DUARTE, F. C. *et al.* Removal of copper in cachaças using clays. **Ciência Agrotécnica**, v. 38, n. 4, p. 382-389, 2014.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Variedades de cana-de-açúcar**. Disponível em https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html Acesso em 21 de fevereiro de 2022.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants. **The EFSA Journal**, v. 551, p. 1-44, 2007.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2003.
- FERREIRA, R. J. *et al.* Simultaneous metal determination in artisanal cachaça by using voltammetry and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 314, p. 1-7, 2020.
- FERNANDES, D. D.S. *et al.* Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA. **Food Chemistry**, v. 273, p. 77-84, 2019.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2011. Disponível em <http://www.fao.org/home/search/en/?q=etil%20carbamate> Acesso em 06 de junho de 2021.
- GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Ethyl carbamate formation in recently distilled sugar cane spirits: proposal for its control. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 996-1000, 2011.
- GALINARO, C. A. *et al.* Cyanate as an Active Precursor of Ethyl Carbamate Formation in Sugar Cane Spirit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 7415–7420, 2015.

GOWD, V. *et al.* Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant. **Food Chemistry**, v. 248, n. December 2017, p. 312–321, 2018.

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

GUIDECHEM, Chemical Trading Guide. Disponível em: <https://www.guidechem.com/encyclopedia/dhurrin-dic477936.html>. Acesso em 27 de Agosto de 2021.

HERAUD, P. *et al.* Label-free Raman hyperspectral imaging analysis localizes the cyanogenic glucoside dhurrin to the cytoplasm in sorghum cells. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-9, 2018.

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC (2010). **Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures.** 2010. Disponível em <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf> >. Acesso em maio de 2021.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS – IAC. **IAC apresenta seis variedades de cana na Agrishow 2018.** Disponível em: Instituto Agrônômico (IAC) IAC apresenta seis variedades de cana na Agrishow 2018. Acesso em 25 de agosto de 2022.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS – IAC. **Censo Varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil –Safr 2018/19 e na Região Centro-Sul – Safr 2019/20.** Boletim Técnico IAC, n. 225, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA – IBRAC. **História da cachaça.** Disponível em <https://ibrac.net/cachaca/1/historia-da-cachaca> Acesso em: 21 de fevereiro de 2022a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA – IBRAC. **IG Cachaça.** Disponível em <https://ibrac.net/> Acesso em: 21 de fevereiro de 2022b.

JOHANSEN, H. *et al.* Rate of hydrolysis and degradation of the cyanogenic glycoside – dhurrin - in soil. **Chemosphere**, v. 67, n. 2, p. 259–266, 2007.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alembic. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, p. 90-103, 1990.

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

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

LIU, H. *et al.* Ethyl carbamate induces cell death through its effects on multiple metabolic pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 277, p. 21-32, 2017.

LOFROTH, G.; GEJVALL, T. Diethyl pyrocarbonate: Formation of urethane in treated

beverages. **Science**, v. 174, p. 1248-1250, 1971.

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

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.

MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Analysis of Cyanogenic Compounds Derived from Mandelonitrile by Ultrasound-Assisted Extraction and High-Performance Liquid Chromatography in Rosaceae and Sambucus Families. **Molecules**, v. 26, p. 1-14, 2021.

MENDONÇA, J. G. P. *et al.* Determination of ethyl carbamate in cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. **Journal Institute of Brewing & Distilling**, v. 122, p. 63-68, 2016.

MERCK INDEX. **Propriedades físico-químicas do carbamato de etila**. 13. ed. Rahway: Merck, 2001.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente de cana: In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. 2º Ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher., 2010, cap. 12, p. 461.

MUTTON, M. J. R. *et al.* The clarification of sugarcane juice and the use of CA-11 yeast produces better quality cachaça. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, n. 4, p. 1-8, 2020.

MILLER, R. E.; TUCK, K.L. The rare cyanogen proteacin, and dhurrin, from foliage of *Polyscias australiana*, a tropical Araliaceae. **Photochemistry**, v. 93, p. 210-215, 2013.

NASCIMENTO E SILVA, J. H.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; OLIVEIRA, A. L. Cachaça Production in Brazil and its Main Contaminant (Ethyl Carbamate). **Scientia Agricola**, v. 77, n. 2, p. 1-8, 2020a.

NASCIMENTO E SILVA, J. H. *et al.* Volatile compounds in cachaças obtained from three sugarcane varieties cultivated under the managements: organic, conventional and without fertilization. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1227-1233, 2020b.

NASCIMENTO E SILVA, J. H. *et al.* Total nitrogen content and its influence on the incidence of ethyl carbamate in cachaça. **Science Agrícola**, v. 79, n. 4, p. 1-5, 2022.

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

NASCIMENTO, R. F. *et al.* **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Imprensa Universitária- UFC, Fortaleza, 2018.

NICOLA, G. R. *et al.* A Simple Analytical Method for Dhurrin Content Evaluation in Cyanogenic Plants for Their Utilization in Fodder and Biofumigation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8065-8069, 2011.

NOVACANA. **Intenção de plantio de cana para colheita em 2020/21 traz predominância de variedades jovens** (2021). Disponível em <https://www.novacana.com/n/cana/plantio/intencao-plantio-cana-2020-21-predominancia-variedades-mais-jovens-020620> Acesso em 21 de fevereiro de 2022.

- OLIVEIRA FILHO, J. H. de; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Qualidade pós-colheita de colmos de cana armazenados e seus reflexos na produção de cachaça. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 19, p. 1-9, 2016.
- OLIVEIRA, R. E. S. *et al.* Physicochemical parameters and volatile composition of cachaça produced in the state of Paraíba, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-27, 2020.
- PELEGRIN, C. J.; FLORES, Y.; JIMÉNEZ, A.; GORRIGÓS, M. C. Recent Trends in the Analysis of Chemical Contaminants in Beverages. **Beverages**, v. 6, p. 1-29, 2020.
- PIMENTEL, G. V.; ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. **Produção de Aguardente de cana**. 4 ed. Lavras: Editora da UFLA, p. 27-60, 2020.
- POLASTRO, L. R. *et al.* Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 78-81, 2001.
- 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.
- QIN, Y. *et al.* Effect of Fermentation on Cyanide and Ethyl Carbamate Contents in Cassava Flour and Evaluation of Their Mass Balance during Lab-Scale Continuous Distillation. **Foods**, v. 10, p. 1-15, 2021.
- REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO – RIDESA. **45 anos de variedades RB de cana-de-açúcar**, 1 ed. Editora Graciosa, 159 p., 2015.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, M. L. D. *et al.* Tratamento físico-químico do caldo de cana produz cachaça de qualidade. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 3, p. 458-463, Julho, 2017.
- RODRIGUES, L. M. A. *et al.* Phenolic extracts of cachaça aged in different woods and quantifying antioxidant activity and antifungal properties. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 644-652, 2016.
- RODRIGUES, L. M. A. *et al.* Organic contaminants in distilled sugar cane spirits produced by column and copperalembic distillation. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-22, 2020.
- ROSA JÚNIOR, V. E. **Análise da expressão genética em tecidos foliares de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) submetidos ao metiljasmonato**. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de concentração em Genética Vegetal e Melhoramento. Campinas, SP, 2005.
- SANTIAGO, W. D. *et al.* Correlation among total solids, total phenolic composition and color intensity in cachaça aged in oak (*quercus sp*) and amburana (*amburana cearensis*) barrels in a 12 month period. **E-xacta**, v. 7, n. 2, p. 10-15, 2014.
- SANTIAGO, W. D. *et al.* Physicochemical profile and determination of volatile compounds in cachaça stored in new oak (*Quercus sp.*), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaeae carbouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*) casks by SPMEGC–MS. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 624–634, 2016.

- SANTIAGO, W. D. *et al.* Determination of ethyl carbamate in cachaça stored in freshly manufactured oak barrels, amburana, Jatobá, Balsa and Peroba and in glass containers. **Journal Institute of Brewing & Distilling**, v. 123, p. 572-578, 2017.
- SANTIAGO, W. D. *et al.* Investigation of brazilian cachaças regarding their standardization and quality. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-21, 2020.
- SANTOS, L. N. *et al.* Adsorption of Cu (II) Ions Present in the Distilled Beverage (Sugar Cane Spirit) Using Chitosan Derived from the Shrimp Shell. **Polymers**, v. 14, p. 1-15, 2022.
- SCHABER, P. M. *et al.* Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochemica**. v. 424, n. 1-2, p. 131–142, 2004.
- SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. **Produção deAguardente de cana**. 4 ed. Lavras: Editora da UFLA, p. 27-60, 2020.
- SHLICHTA, J. G.; GLAUSER, G.; BENREY, B. Variation in Cyanogenic Glycosides Across Populations of Wild Lima Beans (*Phaseolus lunatus*) Has No Apparent Effect on Bruchid Beetle Performance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 5, p. 468–475, 2014.
- SILVA, A. P. *et al.* Chemical composition of sugar cane spirit produced from different distillation methods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, p. 1 -10, 2020a.
- SILVA, F. A. *et al.* Evolution of the content of phenolic compounds, antioxidant activity and color in organic sugarcane spirit aged in barrels of different woods. **Research Society and Development**, v. 9, n. 5, p. 1-15, 2020b.
- SOARES, E. A.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; BORGES, M. T. M.R. Características físico-químicas e sensoriais de sumo de cana-de-açúcar. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v.41, n.4, p.261-270, 2018.
- SORNYOTHA, S.; KYU, K. L.; RATANAKHANOKCHAI, K. Purification and detection of linamarin from cassava root cortex by high performance liquid chromatography. **FoodChemistry**, v. 104, n. 4, p. 1750–1754, 2007.
- SOUZA, L. M. *et al.* **Produção de Cachaça de Qualidade**. Piracicaba: ESALQ, 2013. p. 72.
- STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Determination of cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) by high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 5, p. 271-272, 1994.
- STATSOFT, INC. **STATISTICA** (Data Analysis Software System) Verson 10. 2011.
- SUN, Z. *et al.* Biosynthesis and regulation of cyanogenic glycoside production in forage plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 9-16, 2018.
- TEIXEIRA, V. *et al.* Using Moringa oleifera Lamarck seed extract for controlling microbial contamination when producing organic cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, v. 308, p. 108-287, 2019.
- TOKPOHOZIN, S. E.; FISCHER, S.; BECKER, T. Assessment of malting and mash bioacidification on the turnover of sorghum cyanogenic glucoside and protein hydrolysis improvement. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. August 2017, p. 303–309, 2018.

TOKPOHOZIN, S. E. *et al.* β -D-Glucosidase as “key enzyme” for sorghum cyanogenic glucoside (dhurrin) removal and beer bioflavouring. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 217–223, 2016.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA - UDOP. Características Agronômicas mais Marcantes das Principais Variedades de Cana da Região Centro-Sul. IDEA News - Ano 5, Número 41, 2004. Disponível em <<http://www.udop.com.br/index.php?item=caracteristicas>>; Acesso em 21 de fevereiro de 2022.

VIANA, E. J. *et al.* Evaluation of toxic compounds and quality parameters on the aged Brazilian sugarcane spirit. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1-17, 2020.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v. 38, n. 1, p. 11-36, 2000.

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

VILELA, A. F. *et al.* Assessment of sensory and physical-chemical quality, and potential for certification of cachaças from the state of Paraíba, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 1-8, 2021.

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

ZACARONI, L. M. *et al.* Natural clay and commercial activated charcoal: Properties and application for the removal of copper from cachaça. **Food Control**, v. 47, p. 536-544, 2015.

ZAGROBELNY, M. *et al.* Evolution of the Biosynthetic Pathway for Cyanogenic Glucosides in Lepidoptera. **Journal of Molecular Evolution**, v. 86, n. 6, p. 379–394, 2018.

ZHONG, Y. *et al.* Development and validation of eight cyanogenic glucosides via ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in agri-food. **Food Chemistry**, v. 331, p. 1-7, 2020.