



LIDIANY MENDONÇA ZACARONI LIMA

**INFLUÊNCIA DA LUZ NA COMPOSIÇÃO
FENÓLICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
CONCENTRAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA
EM AGUARDENTES DE CANA/ CACHAÇAS
ENVELHECIDAS EM DIFERENTES MADEIRAS**

**LAVRAS – MG
2012**

LIDIANY MENDONÇA ZACARONI LIMA

**INFLUÊNCIA DA LUZ NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, NA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NA CONCENTRAÇÃO DE
CARBAMATO DE ETILA DE CACHAÇAS ENVELHECIDAS EM
DIFERENTES MADEIRAS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para a obtenção do título de
Doutor.

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS – MG
2012**

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

Lima, Lidianny Mendonça Zacaroni.

Influência da luz na composição fenólica, atividade antioxidante e concentração de carbamato de etila em aguardentes/cachaças envelhecidas em diferentes madeiras / Lidianny Mendonça Zacaroni Lima. – Lavras : UFLA, 2012.

216p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Bebida alcoólica. 2. Contaminante. 3. Luminosidade. 4. Vidro. 5. Armazenamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.53

LIDIANY MENDONÇA ZACARONI LIMA

**INFLUÊNCIA DA LUZ NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, NA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NA CONCENTRAÇÃO DE
CARBAMATO DE ETILA DE CACHAÇAS ENVELHECIDAS EM
DIFERENTES MADEIRAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de novembro de 2012.

Dra. Marcia Justino Rossini Mutton	UNESP
Dr. José Masson	CEFET/Cuiabá
Dra. Ana Maria de Resende Machado	CEFET/MG
Dra. Adelir Aparecida Saczk	UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

**LAVRAS – MG
2012**

À minha família, pelo incentivo, amor e exemplo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ser minha proteção e meu guia em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Silvano e Eliane, que são o alicerce de tudo que sou, por todo amor, confiança e dedicação.

Ao meu marido Deyvid e a minha amada filha Letícia, por estarem sempre ao meu lado e pela imensa alegria que me proporcionam.

Às minhas irmãs, pelo apoio e companherismo nessa longa caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças, pela amizade, pelos ensinamentos, apoio e confiança que sempre depositou em meu trabalho.

Aos amigos do laboratório de óleos essenciais, pela convivência harmoniosa durante esses anos, em especial ao Marcos, pela ajuda nas análises estatísticas. Agradeço também, de forma muito especial, ao grupo da cachaça, Wilder, João, Felipe, Leonardo, e aos amigos que por aqui passaram nesse período (Ana, Jeancarlo e Masson), pela imensa ajuda na execução dos experimentos, pela convivência e amizade.

Aos professores e colegas de trabalho do Departamento de Química, pela cooperação e amizade.

Aos produtores de cachaça, que sempre nos recebem com muito carinho, agradeço pelas amostras de cachaças concedidas para a realização desses experimentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, que me permitiram realizar este trabalho.

Enfim, a todos que, de forma direta ou indireta, também fazem parte desta conquista.

RESUMO GERAL

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da luz na composição fenólica, na atividade antioxidante e na concentração de carbamato de etila (CE) de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras. As amostras foram analisadas físico-quimicamente e armazenadas em garrafas transparentes e em garrafas cobertas com folha de alumínio, sob temperatura ambiente e luz natural, constituindo-se os tratamentos do experimento. Para a execução das análises de CE, composição fenólica e atividade antioxidante, foram retiradas alíquotas, em intervalos regulares de 2 meses, durante um período de 6 meses. Os compostos fenólicos e o CE foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a atividade antioxidante, pelo método de DPPH. Físico-quimicamente, 70% das amostras analisadas inicialmente apresentaram-se fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira, quanto aos teores de álcool, acidez volátil, furfural e cobre. O ácido gálico (amostras A, C, D, F e I), siringaldeído (amostras B, G e J), catequina (amostras H) e cumarina (amostra E) foram os compostos majoritários das amostras analisadas, tendo a luz influenciado significativamente na concentração deles. Não se observou influência significativa da luz na atividade antioxidante, exceto para a amostra H. A maior atividade antioxidante foi observada nas amostras G (49,40%) e A (45,42%) seguidas da amostra F (33,56%), cujo composto majoritário foi o siringaldeído (G) e o ácido gálico (A e F). Todas as amostras analisadas apresentaram concentração abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira ($150,00 \mu\text{g L}^{-1}$) para o CE, sendo a maior concentração encontrada de $79,70 \mu\text{g L}^{-1}$. Das amostras analisadas, 70% sofreram influência da luminosidade e do período de armazenamento.

Palavras-chave: Cachaça. Luminosidade. Envelhecimento. Antioxidante. Contaminante.

GENERAL ABSTRACT

This work was conducted with the objective of evaluating the influence of light on the phenolic composition, the antioxidant activity and the ethyl carbamate concentration (EC) in sugarcane spirits aged in different wood. The samples were analyzed physicochemically and stored in transparent bottles and in bottles covered with aluminum foil, under room temperature and natural light, making up the treatments of the experiment. For the execution of the EC analyses, phenolic composition and antioxidant activity, aliquots were removed at regular 2 month intervals, during a period of 6 months. The phenolic composition and EC were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the antioxidant activity, by the DPPH method. Physicochemically, 70% of the analyzed samples initially presented within the standards required by the Brazilian legislation, regarding alcohol content, volatile acidity, furfural and copper. Gallic acid (samples A, C, D, F and I), syringaldehyde (samples B, G and J), catechin (samples H) and coumarin (sample E) were the majority compounds of the analyzed samples, light having significantly influenced their concentration. Significant influence of the light was not observed in the antioxidant activity, except for the sample H. The highest antioxidant activity was observed in the samples G (49.40%) and A (45.42%) followed by the sample F (33.56%), whose majority compound was the syringaldehyde (G) and the gallic acid (A and F). All of the analyzed samples presented an EC concentration below the limit established by the Brazilian legislation ($150.00 \mu\text{g L}^{-1}$), the highest concentration found being $79.70 \mu\text{g L}^{-1}$. Of the analyzed samples, 70% underwent the influence of light and the storage period.

Keywords: Cachaça. Luminosity. Aging. Antioxidant. Contaminant.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura química do carbamato de etila.....	33
Figura 2	Esquema geral dos precursores envolvidos no ciclo da ureia.....	37
Figura 3	Exemplos de glicosídeos cianogênicos.....	38
Figura 4	Estrutura do complexo cianeto-cobre.....	43
Figura 5	Formação dos EROs durante o metabolismo (SOD – Superóxido dismutase, Cat–catálise, GSH – Glutathiona)...	57
Figura 6	Principais doenças relacionadas à ação dos radicais livres.....	58
Figura 7	Formação de taninos hidrolisáveis.....	62
Figura 8	Monômero básico para a formação dos taninos condensados (flavan-3-ol).....	63
Figura 9	Estrutura química básica dos flavonóides.....	64

CAPÍTULO 2

Figura 1	Reação colorimétrica dos álcoois superiores com o p-dimetilaminobenzaldeído para quantificação espectrofotométrica (Fonte: Machado, 2010).....	90
Figura 2	Reações envolvidas na titulação direta com iodo para quantificação de aldeídos (Fonte: Machado, 2010).....	91
Figura 3	Reação colorimétrica do furfural com a anilina para quantificação espectrofotométrica (Fonte: Machado, 2010).....	92
Figura 4	Reação de substituição nucleofílica para a quantificação dos ésteres por titulação do excesso de ácido sulfúrico (Fonte:	

	Machado, 2010).....	93
Figura 5	Reações de oxidação do metanol a formaldeído e reação deste com ácido cromotrópico para a formação do complexo com propriedades colorimétricas (Fonte: Machado, 2010).....	94
Figura 6	Reações de redução do cobre e formação do complexo para quantificação colorimétrica (Fonte: Machado, 2010).....	95
Figura 7	Concentração de álcool, ácidos voláteis, furfural e cobre nas 10 amostras de cachaças analisadas envelhecidas em diferentes barris de madeira.....	99
CAPÍTULO 3		
Figura 1	Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica. Concentração de cada padrão: $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	116
Figura 2	Sobreposição dos cromatogramas da amostra A, no mês 0 e no mês 6, armazenada sob a presença (a) e sob a ausência de luz (b).....	118
Figura 3	Influência da luz na concentração de ácido gálico em amostras de cachaça armazenadas em vidro na ausência e presença de luz, por um período de seis meses.....	143
Figura 4	Reação de hidrólise dos taninos, liberando para o destilado ácido gálico e elágico durante o armazenamento.....	144
Figura 5	Influência da luz na concentração de siringaldeído em amostras de cachaça armazenadas em vidro na ausência e presença de luz, por um período de seis meses.....	146
Figura 6	Oxidação do siringaldeído a ácido siríngico.....	147

CAPÍTULO 4

Figura 1	Reação química entre o radical DPPH e os compostos fenólicos da cachaça.....	165
Figura 2	Capacidade de sequestrar o radical DPPH (% inibição) versus o teor total de fenólicos (mg L^{-1}).....	168
Figura 3	Processos oxidativos (A), de epimerização (B) e polimerização (C) com a molécula de catequina.....	170
Figura 4	Reação entre o siringaldeído e o radical DPPH (R \cdot); entre o eugenol e o radical DPPH (R \cdot).	173
Figura 5	Estrutura química da 1,2-benzopirona (cumarina).....	174
Figura 6	Atividade antioxidante (AA) e fenólicos totais (FT) de cachaças envelhecidas em carvalho, sendo consideradas estatisticamente iguais às médias seguidas de mesma letra, pelo teste de Scott Knott.....	174
Figura 7	Atividade antioxidante (AA) e fenólicos totais (FT) de cachaças envelhecidas em jequitibá, sendo consideradas estatisticamente iguais às médias seguidas de mesma letra pelo teste de Scott Knott.....	177
Figura 8	Influência da luminosidade e do tempo na atividade antioxidante da cachaça envelhecida em jatobá (H).....	178
Figura 9	Reação entre a catequina e o radical DPPH (R \cdot) e estabilização do radical por estruturas ressonantes.....	180

CAPÍTULO 5

Figura 1	Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas (Fonte: Anjos et al., 2011).....	194
Figura 2	Cromatograma de uma solução padrão de CE derivado ($90 \mu\text{g L}^{-1}$).....	198

Figura 3	Sobreposição dos cromatogramas do CE da amostra A sob a presença e ausência de luz, após 6 meses de armazenamento em recipientes de vidro.....	199
Figura 4	Curva analítica construída para a quantificação de carbamato de etila ($5 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$).....	200
Figura 5	Estrutura química do CE constituído por um grupo éster e um grupo amida.....	204
Figura 6	Ordem de reatividade dos derivados dos ácidos carboxílicos (Fonte: Richey Júnior, 1983).....	205
Figura 7	Estruturas de ressonância das amidas (Fonte: Richey Júnior, 1983).....	205
Figura 8	Reações de hidrólise no grupo amida (1) e reações de hidrólise (2), etanólise (3) e amonólise (4) com o grupo éster (Fonte: Richey Júnior, 1983).....	206

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).....	88
Tabela 2	Análises físico-químicas das aguardentes de cana envelhecidas.....	98

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).....	112
Tabela 2	Gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos.....	114
Tabela 3	Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos analisados.....	117
Tabela 4	Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas*.....	119
Tabela 5	Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos analisados.....	120
Tabela 6	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra A (Passa Quatro/ Castanheira/ 700L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	122
Tabela 7	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra B (Passa Quatro/Carvalho/ 200L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	124

Tabela 8	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra C (Passa Quatro/Jequitibá/ 20.000L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	126
Tabela 9	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra D (Barbacena/ Jequitibá/ 10.000L/ 60 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	128
Tabela 10	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra E (Lavras/ Amburana/ 10.000L/ 48 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	130
Tabela 11	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra F (Piranguinho/ Louro-canela/ 50.000L/ 24 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	132
Tabela 12	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra G (Piranguinho/ Carvalho/ 50.000L/ 48 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	134
Tabela 13	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra H (Itajubá/ Jatobá/ 4.000L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	136
Tabela 14	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra I (Itajubá/ Carvalho/ 1.000L/ 24 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	138

Tabela 15	Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos quantificados na amostra J (Perdões/ Carvalho/ 200L/ 12 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.....	140
-----------	--	-----

Tabela 16	Fenólicos totais obtidos pela somatória dos compostos quantificados por CLAE.....	150
-----------	---	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).....	163
----------	---	-----

Tabela 2	Atividade antioxidante das cachaças envelhecidas em diferentes condições, comparadas à sua composição fenólica total.....	168
----------	---	-----

Tabela 3	Concentração média de siringaldeído e ácido gálico nas amostras envelhecidas em carvalho.....	175
----------	---	-----

Tabela 4	Influência da luminosidade e do tempo na atividade antioxidante da cachaça envelhecida em jatobá (H).....	178
----------	---	-----

Tabela 5	Influência da luminosidade e do tempo na concentração de catequina da cachaça envelhecida em jatobá (H).....	179
----------	--	-----

CAPÍTULO 5

Tabela 1	Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).....	193
----------	---	-----

Tabela 2	Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila.....	196
----------	---	-----

Tabela 3	Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras sob a presença e ausência de luz, analisadas durante seis meses.....	202
----------	---	-----

LISTA DE SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AMPAC	Associação Mineira de Produtores de Cachaça de Qualidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalise
CE	Carbamato de etila
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DAD	Diode array detector
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazila
EFSA	European Food Safety Authority
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAO	Food and Agriculture Organization
FC	Fosfato de carbamila
FID	Detector de ionização por chama
FLD	Detector de fluorescência
GSH	Glutathione
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	International Agency for Research on Câncer
IBRAC	Instituto Brasileiro da Cachaça
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCA	Análise de Componentes Principais
PIQs	Padrões de Identidade e Qualidade
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SISVAR	Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados
SIM	Monitoramento seletivo de íons
SOD	Superóxido dismutase
SPME	Microextração em fase sólida
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	A cachaça.....	22
2.2	Compostos secundários e contaminantes presentes na cachaça.....	24
2.3	Carbamato de Etila (CE).....	32
2.3.1	Aplicações e características.	33
2.3.2	Mecanismos de formação de CE em bebidas alcoólicas..	34
2.3.3	Técnicas aplicadas para a detecção e quantificação de CE em bebidas.....	46
2.3.4	Quantificação de CE em bebidas alcoólicas.....	48
2.4	O envelhecimento da cachaça.....	52
2.5	Oxidações em sistemas biológicos e antioxidantes.....	55
2.6	Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	60
	REFERÊNCIAS	69
	CAPÍTULO 2: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE CACHAÇAS ENVELHECIDAS.....	83
1	INTRODUÇÃO.....	85
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1	Obtenção das amostras.....	87
2.2	Análises Físico- químicas.....	88
2.2.1	Exame organoléptico.....	89
2.2.2	Teor alcoólico.....	89
2.2.3	Extrato seco	89
2.2.4	Acidez volátil.....	89
2.2.5	Álcoois superiores.....	90
2.2.6	Aldeídos.....	91
2.2.7	Furfural.....	91
2.2.8	Ésteres.....	92
2.2.9	Metanol	93
2.2.10	Cobre	95
2.3	Delineamento experimental.....	96
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
3.1	Análises físico-químicas.....	97
4	CONCLUSÃO.....	103
	REFERÊNCIAS.....	104
	CAPÍTULO 3: EFEITO DA LUMINOSIDADE NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE CACHAÇAS	

	ARMAZENADAS EM VIDRO POR UM PERÍODO DE SEIS MESES	107
1	INTRODUÇÃO.....	109
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	111
2.1	Obtenção das amostras.....	111
2.2	Reagentes e solventes.....	112
2.3	Preparação das amostras e padrões.....	113
2.4	Equipamento.....	113
2.5	Metodologia e condições cromatográficas.....	114
2.6	Delineamento experimental.....	115
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
3.1	Análises cromatográficas.....	116
3.2	Quantificação dos compostos fenólicos.....	120
4	CONCLUSÃO.....	153
	REFERÊNCIAS.....	154
	CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CACHAÇAS ENVELHECIDAS EM DIFERENTES BARRIS DE MADEIRA E ARMAZENADAS EM VIDRO POR UM PERÍODO DE SEIS MESES	158
1	INTRODUÇÃO.....	160
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	162
2.1	Obtenção das amostras.....	162
2.2	Metodologia.....	163
2.3	Delineamento experimental.....	166
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	167
4	CONCLUSÃO.....	182
	REFERÊNCIAS.....	183
	CAPÍTULO 5: EFEITO DA LUMINOSIDADE NA CONCENTRAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA DE CACHAÇAS ARMAZENADAS EM VIDRO POR UM PERÍODO DE SEIS MESES	188
1	INTRODUÇÃO.....	190
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	192
2.1	Obtenção das amostras.....	192
2.2	Metodologia, reagentes e solventes.....	193
2.3	Derivação do padrão de carbamato de etila.....	194
2.4	Derivação das amostras.....	195
2.5	Condições cromatográficas.....	195
2.6	Delineamento experimental.....	196
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	198
3.1	Carbamato de etila.....	198

4	CONCLUSÃO.....	210
	REFERÊNCIAS	211
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	216

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida típica brasileira, e um dos destilados mais consumidos em nosso país. É obtida do caldo de cana fermentado e suas denominações variam de acordo com a região do país. É produzida por milhares de produtores espalhados por vários estados, diferenciando-se pelas características culturais e históricas de cada região. Estima-se uma produção anual de 1,6 bilhão de litros da bebida, dos quais 90% são provenientes da produção industrial e 10% da cachaça de alambique (LIMA et al., 2006). Minas Gerais destaca-se como o maior produtor de cachaça de alambique do país, representando 44% da produção nacional. Estima-se que, no estado, o número de produtores não ultrapasse a cinco mil, gerando cerca de 240 mil empregos diretos (PEREIRA et al., 2003; SEBRAE, MG, 2008, AMPAC, 2010).

Atualmente, o agronegócio da bebida caracteriza-se por uma busca incessante de pesquisas e projetos que melhorem a qualidade do produto, visando a atender a demanda cada vez maior do mercado interno e externo. Para isso, busca-se desenvolver ou aprimorar práticas de fabricação que resultem em produtos padronizados e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais. No entanto, a produção de cachaça com qualidade requer um aprimoramento técnico e científico das etapas de produção, com estudos e pesquisas nas áreas de desenvolvimento genético de mudas de cana, corte e manejo, fermentação, destilação e envelhecimento (MACHADO, 2010).

Entre as diversas etapas de produção da cachaça, o envelhecimento é uma etapa determinante que, com a melhoria da qualidade da bebida, agrega valor a ela. Nesse processo, ocorrem diversas reações químicas que proporcionam a incorporação de compostos provenientes das madeiras utilizadas

na confecção dos tonéis, assim como reações entre alguns compostos presentes na bebida, os quais são provenientes de etapas anteriores ao envelhecimento. A incorporação destes à bebida depende da espécie de madeira e do tratamento a ela aplicado, do período de armazenamento, das condições ambientais e do teor alcoólico do destilado armazenado. Tais reações são responsáveis por mudanças químicas, físicas e sensoriais no produto. Entretanto, observa-se ainda uma escassez no estudo dos compostos incorporados à cachaça durante o envelhecimento (CARDELLO; FARIA, 1998; CAVALHEIRO et al., 2003; AQUINO et al., 2006).

Entre esses compostos agregados à bebida tem-se a incorporação de compostos fenólicos, substâncias antioxidantes, cujas propriedades têm sido muito estudadas, principalmente em vinhos. Essas moléculas antioxidantes atuam como sequestradores de radicais livres e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Nesse processo, os produtos intermediários formados são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por essas substâncias (SOARES, 2002).

Além dos compostos secundários provenientes de diferentes etapas do processo de produção da cachaça, responsáveis pelo sabor e aroma característicos da bebida e dos compostos agregados a ela após o envelhecimento, alguns contaminantes podem ser encontrados na cachaça. O carbamato de etila é um contaminante orgânico, altamente carcinogênico, encontrado naturalmente em baixas concentrações em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados. No Brasil, a legislação estabelece um limite máximo desse contaminante em cachaça de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). No entanto, sua origem e formação ainda não estão bem elucidadas na bebida. Alguns autores sugerem que esse contaminante origina-se da degradação de aminoácidos; outros, que venham de reações entre o etanol e o ácido

cianídrico catalisado pelo cobre ou pela auto-oxidação de compostos insaturados induzidos pela radiação ultravioleta (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a influência da luz na composição fenólica e do carbamato de etila de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, bem como determinar sua atividade antioxidante durante o período de seis meses.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cachaça, largamente consumida no país, é uma bebida produzida em todas as regiões e consumida por todas as classes sociais. Sua produção iniciou-se nos tempos da colonização do Brasil e atualmente observa-se um aumento acentuado em seu consumo, tanto no mercado interno quanto no mercado externo, requerendo, portanto, um produto de melhor qualidade. Nesse contexto, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de aprimorar tanto a qualidade da matéria-prima, quanto o processo de produção da bebida, identificando e caracterizando compostos orgânicos e inorgânicos (VARGAS; GLÓRIA, 1995; ANJOS et al., 2011).

2.1 A cachaça

Atualmente, a legislação brasileira define a aguardente de cana como a bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% em volume, a 20° C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro. A expressão “cachaça” é definida pelo Decreto nº 4851/03 e é uma denominação típica e exclusiva do Brasil, definida como sendo toda aguardente de cana que apresenta graduação alcoólica entre 38% e 48% em volume (BRASIL, 2005).

Para que a bebida seja considerada envelhecida, deve-se enquadrar na denominação descrita anteriormente e conter, no mínimo, 50% de cachaça ou aguardente de cana envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de setecentos litros, por um período não inferior a um ano. No entanto, a legislação vigente ainda descreve a cachaça premium e extra premium, que se referem à bebida que contiver 100% de aguardente de cana

envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de setecentos litros, por um período não inferior a um a três anos, respectivamente (BRASIL, 2005).

O processo produtivo da cachaça estabelece-se em quase todos os estados brasileiros, havendo mais de 30 mil produtores de cachaça, que produzem mais de 5 mil marcas, gerando 600 mil empregos diretos e indiretos. O estado de São Paulo é o maior produtor (44%), seguido por Pernambuco (12%) e Ceará (12%) e Minas Gerais (8%), Goiás (8%) e Rio de Janeiro (8%); Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Paraíba dividem o restante da produção nacional (IBRAC, 2012).

Em Minas Gerais, a produção da cachaça tem relevante importância econômica e social. Atualmente, o estado possui cerca de 5.000 alambiques, 1216 marcas registradas e uma estimativa de produção que alcança 200 milhões de litros por ano, movimentando R\$ 1,5 bilhão só com o mercado interno e gerando cerca de 240 mil empregos. Entre as regiões produtoras, destaca-se o Norte, Jequitinhonha e o Rio Doce, as quais detêm 63% da produção mineira; porém, acredita-se que do total produzido, apenas 0,3% seja exportado. Minas é responsável por aproximadamente 8% do total da produção nacional da bebida e, embora a atividade da produção de cachaça de alambique seja economicamente importante, estima-se que aproximadamente 90% da produção no Estado ocorra em alambiques clandestinos (SEBRAE, MG, 2008).

Com a crescente importância e participação na economia do país, a cachaça vem conquistando espaço tanto no mercado interno quanto no externo, sendo hoje a segunda bebida mais consumida no Brasil e o terceiro destilado mais consumido no mundo. Estima-se um consumo de 70 milhões de doses diárias no país, o que equivale a aproximadamente seis litros/habitante/ano (LIMA et al., 2006; CANÇADO-JÚNIOR; PAIVA; ESTANISLAU, 2009). Segundo dados do Ibrac (2012), em 2011, a cachaça foi exportada para mais de

60 países por 90 empresas brasileiras, que exportaram um total 9,80 milhões de litros, gerando uma receita de US\$ 17,28 milhões. Entre os principais mercados, estão Alemanha, Portugal, Estados Unidos e França.

Diante da ampliação do mercado consumidor da cachaça, melhorias e controles mais rígidos vêm sendo implementados ao processo de produção da bebida, buscando um produto de melhor qualidade sensorial e química, que atenda aos padrões de identidade e qualidade (PIQ's) exigidos. Aliada a essas melhorias, verifica-se também mudanças no ambiente institucional no que se refere à atividade produtora de cachaça, tanto no âmbito nacional quanto estadual. Tais ações objetivaram-se tornar a atividade mais eficiente e articulada, visando aumentar o nível das exportações, mediante a qualidade do produto oferecido e a uma política de marketing (RECHE; FRANCO, 2009).

2.2 Compostos secundários e contaminantes presentes na cachaça

Durante o processo de fermentação do mosto de cana-de-açúcar para a produção da cachaça, ocorre a formação de diversos compostos, entre os quais o produto majoritário é o álcool etílico. Também são formados outros compostos, em quantidades menores quando comparado ao álcool etílico produzido, denominados de compostos secundários, tais como os aldeídos, álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos. Esses compostos são formados por rotas bioquímicas ou químicas durante e após a fermentação alcoólica (DATO; PIZAURO JÚNIOR; MUTTON, 2005).

De acordo com a Instrução Normativa de nº 13 de 2005, os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para a aguardente de cana-de-açúcar e para a cachaça, estabelecidos pela legislação brasileira no decreto 4.851 em 2003, foram mantidos e acrescentados limites para outros contaminantes, como

carbamato de etila (CE), propenal-2 (acroleína), butanol-2, butanol-1, chumbo e arsênio, conforme Quadro 1 (BRASIL, 2005).

A formação excessiva de componentes secundários pode estar relacionada a fatores edafoclimáticos, tais como solo, clima e altitude ou diferenças na metodologia empregada na elaboração da bebida, como matéria-prima, micro-organismos utilizados, condições da fermentação (temperatura, pH, aeração, dentre outras), maneira de destilar e envelhecimento, como o tempo, tipo de madeira e volume do recipiente (SIEBALD; CANUTO; SILVA, 2009). Durante a destilação, deve-se realizar o corte das frações denominadas de *cabeça*, *coração* e *cauda*, sendo a maioria dos componentes secundários encontrada no destilado de *cabeça*; porém, a parte que deve ser consumida é o destilado de *coração*, devido aos menores teores de contaminantes nessa fração. Um procedimento inicial para diminuir o teor de componentes secundários consiste em avaliar a eficiência do refluxo na coluna do alambique e ajustar o tamanho do destilado de cabeça. Algumas reações ocorrem nessa etapa, como hidrólise, esterificação, acetilação, reações com o cobre e produção de furfural, entre outros (LEAUTÉ, 1990).

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

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica (aguardente)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,00	54,00
Graduação alcoólica (cachaça)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,00	48,00
Sacarose, em açúcar refinado, invertido ou glicose	g L ⁻¹	6,00	30,00
Acidez volátil, em ácido acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	150,00
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL de álcool anidro	-	200,00
Aldeídos, em aldeído acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	30,00
Furfural	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,00
Álcoois superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360,00
Congêneres**	mg/100 mL de álcool anidro	200,00	650,00
Álcool metílico	mg/100 mL de álcool anidro	-	20,00
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg/100 mL de álcool anidro		10,00
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg/100 mL de álcool anidro		3,00
Acroleína (2-propenal)	mg/100 mL de álcool anidro		5,00
Carbamato de etila	µg L ⁻¹	-	150,00
Cobre	mg L ⁻¹	-	5,00
Arsênio	µg L ⁻¹	-	100,00
Chumbo	µg L ⁻¹	-	200,00
Extrato seco	g L ⁻¹	-	6,00

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico

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

Fonte: Brasil (2005)

Os álcoois superiores são álcoois com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo oxidativo ou a partir do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras (GALHIANE, 1989). Os álcoois com até cinco átomos de carbono apresentam odores característicos “flavour” tradicionalmente associados com bebidas destiladas, destacando-se os álcoois amílico e propílico, e seus respectivos isômeros. Com o aumento do número de carbonos, o aroma modifica-se substancialmente e os álcoois tornam-se oleosos, sendo denominados de óleo fúsel, diminuindo o valor comercial e a qualidade da aguardente de cana (MAIA, 1999). Segundo Cardoso (2006), esses compostos podem ser formados quando a cana é estocada, para depois, ser moída. Outros fatores que contribuem para o aumento da concentração de álcoois superiores na aguardente de cana é a temperatura elevada durante o processo fermentativo e o pH muito ácido. Esses álcoois, assim como os ésteres, em quantidades normais, são responsáveis pelo aroma e sabor característico da bebida. Os principais álcoois superiores encontrados em aguardentes são os álcoois isoamílico (2-metilbutanol-1), amílico (1-pentanol), isobutílico (2-metilpropanol-1) e propílico (propanol) (VILELA et al., 2007). Segundo Gutierrez (1993), alguns fatores influenciam a formação de álcoois superiores pelas leveduras, como a espécie e a linhagem, temperatura e composição do meio. A Instrução Normativa de junho de 2005 incluiu na lista dos PIQs de aguardente de cana/ cachaça limites para os álcoois superiores: butanol-1 e butanol-2, que devem ser quantificados separadamente (BRASIL, 2005).

O metanol é um álcool indesejável na bebida devido a sua alta toxicidade. A ingestão, mesmo em quantidades reduzidas, por longos períodos, pode ocasionar cegueira ou mesmo a morte (BADOLATO; DURAN, 2000). Origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar durante o processo de fermentação; portanto, deve-se evitar uma fermentação realizada na presença de frutas ricas em pectina, como laranja, maçã, abacaxi e

também na presença de bagacilhos no caldo da cana a ser fermentado (CARDOSO, 2006).

Os ésteres alifáticos são produzidos principalmente na fermentação alcoólica durante o metabolismo secundário intracelular das leveduras e a partir dos intermediários da síntese dos ácidos monocarboxílicos de cadeia longa (PARAZZI et al., 2008). Durante a destilação e envelhecimento, esses compostos são formados pelas reações de esterificação entre os álcoois e os ácidos carboxílicos formados durante o processo oxidativo. O acetato de etila é o principal éster encontrado na aguardente de cana, sendo formado por pequenas quantidades de etanol e ácido acético provenientes do processo de fermentação. Esse éster é responsável, quando em quantidades limitadas, pela incorporação de um aroma agradável de frutas, desejável nessa bebida. Quando em excesso, confere à aguardente um sabor enjoativo e indesejável (PEREIRA et al., 2003 e MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006).

Os aldeídos, principalmente o acetaldeído, são formados pela ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer nas etapas finais, desde que o mosto sofra aeração. Outra forma de obtenção desses compostos é pela oxidação de etanol e álcoois superiores (CARDOSO, 2006).

O furfural e o hidróximetilfurfural, aldeídos cuja presença é indesejável na bebida, resultam da decomposição química de pentoses e hexoses, respectivamente. São formados principalmente pela pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A contaminação da bebida por esses compostos pode ser evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. No entanto, esses compostos podem estar presentes no caldo de cana-de-açúcar quando a colheita for precedida da queima do palhiço. Nas aguardentes de cana envelhecidas, esses compostos podem se originar da ação de ácidos sobre pentoses, hexoses e seus polímeros

(hemiceluloses), podendo provir, pelo menos em parte, da madeira dos recipientes utilizados no armazenamento da bebida (MASSON et al., 2007).

O 2-propenal, também conhecido como acroleína, é extremamente tóxico por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos. Os vapores de acroleína são lacrimogênicos, muito irritantes aos olhos, nariz e garganta. O limite de percepção olfativa da acroleína no ambiente é de $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ e concentrações dez vezes maiores são consideradas perigosas à vida e à saúde. É formada durante o processo de fermentação, pela desidratação do glicerol, podendo estar associada a bactérias termofermentativas (CARDOSO, 2006; AZEVÊDO et al., 2007). É um líquido amarelo que apresenta um sabor e odor amargo. Nos últimos anos, tem-se observado um considerável interesse por parte do World Health Organization, particularmente pela International Agency for Research on Cancer, para identificar esses e outros congêneres presentes em bebidas alcoólicas que podem ser carcinogênicos, mutagênicos ou tóxicos (NASCIMENTO et al., 1997). Na aguardente de cana, o seu limite é de $5,00 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro.

Em estudos recentes, Zacaroni et al. (2011) detectaram a presença de acroleína acima do limite estabelecido em apenas uma das doze amostras analisadas. A concentração desse contaminante variou de não detectado a $7,45 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool anidro. Masson et al. (2012) encontraram valores que variaram de não detectado a $21,97 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool anidro, em 71 amostras analisadas, das quais 9,85% das amostras apresentaram concentrações acima do limite estabelecido; no entanto, poucos estudos abordam a presença desse contaminante na bebida.

Entre os ácidos produzidos durante a fermentação alcoólica, o ácido acético tem sido quantitativamente o principal componente da fração ácida das aguardentes, expresso em acidez volátil. Os ácidos carboxílicos são compostos

normais da fermentação, produzidos por leveduras ou bactérias provenientes de contaminação. Também pode ser formado pela oxidação do acetaldeído, mesmo quando a fermentação é totalmente controlada. Quantidades elevadas desse ácido carboxílico são frequentemente associadas às práticas de estocagem da cana e às contaminações do mosto com bactérias acéticas, decorrentes de um tempo excessivo de descanso entre o processo de fermentação e a destilação (PEREIRA et al., 2003; CARDOSO, 2006).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) caracterizam-se por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. Apresentam alto potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico (PEREIRA NETO et al., 2000).

Na Alemanha, "The German Society for Fat Science" fixou para o teor total de HPAs em alimentos o limite de $25,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e de $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para o teor de HPAs de alta massa molecular (1,2-benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)pirileno e benzo(a)antraceno). Segundo a legislação escocesa, as concentrações máximas toleradas de HPAs em alimentos são de $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para o naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenatreno e antraceno e de $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fluoranteno, pireno e criseno (BETTIN; FRANCO, 2005). Apesar de não haver ainda legislação brasileira para HPAs, sua existência em bebidas já foi relatada. Serra; Pupin; Toledo (1995) analisaram duas amostras de cachaça e identificaram a presença de benzo[a]pireno e de benzo[a]antraceno, com níveis similares àqueles encontrados por Tfouni; Vitorino e Toledo (2007), de $0,27$ e $0,40 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Bettin e Franco (2005) identificaram e quantificaram os HPAs (naftaleno, acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, 1,2- benzo(e)pireno, criseno, benzo(e)pireno, 2,3-benzo(a)antraceno, 1,2-benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)pirileno) em vinte e oito amostras de aguardentes de cana. Os resultados experimentais para as amostras da bebida foram analisados

em termos de análises de componentes principais (PCA), possibilitando a diferenciação entre o perfil das aguardentes de cana produzidas de cana-de-açúcar queimada e não queimada.

Além da queima da cana, a presença de HPAs em aguardentes de cana pode ser proveniente de contaminações nas etapas do processo de produção, tais como o emprego de lubrificantes nos equipamentos, utilização de recipientes não adequados para o armazenamento da bebida, tanques revestidos com resinas asfálticas ricas em HPAs, pelo açúcar adicionado a bebida e durante a maturação da bebida em tonéis de madeira tratada termicamente (HAWTHORNE; TREMBLEY; MONIOT, 2000; ZAMPERLINNI; SILVA-SANTIAGO; VILEGAS, 2000).

Entre os contaminantes orgânicos, o carbamato de etila (CE) tem recebido atenção especial devido ao seu alto potencial carcinogênico. É encontrado naturalmente em baixas concentrações em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados; porém, sua origem e formação ainda não estão bem elucidadas. Alguns autores acreditam que se originam da degradação de aminoácidos; outros, que venham de reações entre o etanol e o ácido cianídrico catalisado pelo cobre ou ferro ou pela auto-oxidação de compostos insaturados induzidos pela radiação ultravioleta. Acredita-se também que sua formação seja favorecida por altas temperaturas resultante do mau dimensionamento do sistema de destilação ou operação com níveis de refluxo impróprios (MACKENZIE; CLYNE; MACDONALD, 1990; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; BOSCOLO, 2002; POLASTRO et al., 2001; BRUNO et al., 2007).

Entre os contaminantes inorgânicos encontrados na cachaça, podem-se citar o cobre, o chumbo e o arsênio. A quantificação de metais em aguardentes é efetuada com diversas finalidades, sendo a mais importante a verificação da presença de espécies metálicas em níveis tóxicos, atendendo às especificações

exigidas pelas leis do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (ROSE; HARRISON, 1970).

Um dos metais mais importantes que pode ser encontrado na cachaça é o cobre. Esse metal é proveniente, principalmente, do material constituinte dos alambiques. Ele contribui para a eliminação de certos odores desagradáveis observados em aguardentes destiladas em alambiques confeccionados com materiais, onde não está presente esse metal, tal como aço inox. De modo geral, o que se observa é que a assepsia cuidadosa dos alambiques, após o procedimento de alambicagem, tende a reduzir consideravelmente os problemas de excesso de cobre nas aguardentes (LIMA et al., 2006).

O chumbo e o arsênio podem contaminar a bebida por meio das embalagens, soldas de ligas metálicas endurecidas do material utilizado na confecção do destilador, por meio da utilização de produtos agroquímicos, como pesticidas e inseticidas, ou pelo solo (CARDOSO, 2006; CALDAS; OLIVEIRA; GOMES NETO, 2009).

2.3 Carbamato de etila

O carbamato de etila (CE), também conhecido como uretana ou etiluretana (CAS nº 51-79-6), é um éster etílico do ácido carbâmico, massa molar de $89,09 \text{ g mol}^{-1}$, cuja estrutura química está representada na Figura 1. Apresenta alta solubilidade em água, etanol, éter, cetonas, ésteres e solventes clorados, temperatura de ebulição e fusão que variam de 182°C a 184°C e de 48°C a 50°C , respectivamente. Encontra-se na forma de cristal incolor, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo. Essas propriedades conferem ao CE alta polaridade e baixa volatilidade, além de se decompor à baixa temperatura. (MERCK, 2001).

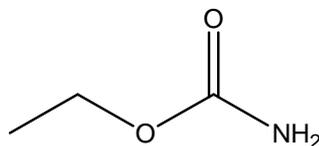


Figura 1 Estrutura química do carbamato de etila

2.3.1 Aplicações e características

O CE tem várias aplicações comerciais, tais como preparação e modificação de aminorresinas, cossolvente para pesticidas ou síntese de fármacos, e como um intermediário químico na indústria têxtil, transmitindo propriedades de lavagem e desgaste (IARC, 1974). Na medicina, foi utilizado como agente antineoplásico para o tratamento principalmente de mieloma múltiplo (HOLLAND et al., 1966). O CE também foi utilizado em hipnose de humanos e como anestésico para animais de laboratório. Na década de 40, essa substância foi considerada tóxica e cancerígena. Atualmente, o CE e outros carbamatos simples (fenil, metil ou butil) são utilizados apenas para fins de pesquisa (BELAND et al., 2005; WEBER; SHARYPOV, 2009).

O CE é encontrado naturalmente em alimentos e em bebidas fermentadas e fermento-destiladas, tais como pão, vinho, iogurte, uísque, vodca, rum, cachaça e tiquira (LACHENMEIER et al., 2005; HOFFLER et al., 2005). É genotóxico e cancerígeno em um número de espécies, incluindo ratos, ratazanas, hamsters e macacos, o que sugere um potencial risco carcinogênico para humanos (BELAND et al. 2005). O CE é absorvido rapidamente e quase completamente a partir do trato gastrointestinal e da pele e o seu metabolismo envolve três vias principais: hidrólise, N-hidroxilação ou C-hidroxilação e oxidação da cadeia lateral. (CHA et al., 2000; EFSA, 2007).

Devido ao seu alto potencial carcinogênico (classe 2B pela Agência Internacional de Investigação do Câncer), limites máximos foram estabelecidos para o CE em bebidas, tais como 30,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para vinho, 100,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para vinho fortificado, 150,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para conhaque e uísque e 400,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para aguardentes de fruta e licor. Esses limites estabelecidos pela legislação canadense têm sido utilizados como referência em outros países, e no Brasil, a concentração máxima permitida desse contaminante em cachaça é de 150,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IARC, 1987, ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; BELAND et al., 2005; ABREU et al. 2005; BRASIL, 2005). Atualmente, Canadá, EUA, França, República Tcheca, Alemanha e Suíça controlam a presença de CE em bebidas alcoólicas (EFSA, 2007).

Em 2007, por meio de um programa para a normalização de alimentos FAO/WHO (Comitê do Codex sobre contaminantes em alimentos), foram estabelecidos pelo Joint Expert Committee on Food Additives doses de CE a um limite de 0,30 mg kg^{-1} de peso corporal por dia e o consumo médio de CE a partir de alimentos de aproximadamente 15,00 ng kg^{-1} de peso corporal por dia. Esses índices foram baseados em alimentos relevantes, incluindo pães, produtos lácteos fermentados e bebidas de soja. No entanto, bebidas alcoólicas não foram incluídas. Com a inclusão delas, a estimativa aumenta para 80,00 ng kg^{-1} de peso corporal por dia. O alto consumo de aguardentes de frutas com caroço pode conduzir a um maior consumo de CE; portanto, medidas devem ser tomadas e pesquisas realizadas com o objetivo de reduzir as concentrações de carbamato de etila em bebidas alcoólicas.

2.3.2 Mecanismos de formação de CE em bebidas alcoólicas

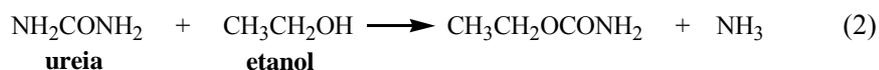
O CE é produzido em níveis baixos (ng L^{-1} ou ng kg^{-1} até mg L^{-1}) em alimentos fermentados, alimentos assados e bebidas alcoólicas

por meio de vários precursores, tais como ácido cianídrico, ureia, citrulina e aminoácidos N-carbamil (incluindo fosfato de carbamila por reação com etanol) (DENNIS et al., 1986; VAHL, 1993; BELAND et al., 2005).

Em diversos estudos, há relatos sobre as possíveis vias de formação do CE em bebidas alcoólicas. Na década de 70, acreditava-se que o pirocarbonato de dietila ou carbonato de dietila, aditivo antimicrobiano adicionado aos alimentos, reagia com a amônia em pH neutro ou alcalino, formando o CE (equação 1). A partir de então, a utilização desse composto foi proibida em alimentos e principalmente na fabricação de vinhos (JAGERDEO et al., 2002).



Na fermentação do vinho, os mecanismos propostos parecem estar bem elucidados e são aplicados para o estudo durante a fermentação da cachaça. Esses mecanismos envolvem os aminoácidos arginina, ornitina, citrulina e fosfato de carbamila; porém, a ureia e seus derivados são os compostos principais na reação com etanol para formar o CE. A rota mais comum de produção de CE na fermentação é a reação da ureia com etanol, em meio ácido (equação 2), sendo a cinética favorecida a altas temperaturas (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; JAGERDEO et al., 2002; WANG et al., 2007).



Outros mecanismos de formação de CE a partir da ureia estão descritos. Bruno et al. (2007) citam que o CE pode ser formado pela decomposição térmica da ureia (60 a 100° C) em soluções aquoetanólicas a cianato e isocianato (equação 3). Eles podem reagir com o etanol, em meio ácido, formando o CE. Outra possível via é a decomposição térmica da ureia à amônia e ácido ciânico, e

posterior reação deste último com etanol (equações 4 e 5) (SCHABER et al., 2004).



Como citado anteriormente, além da ureia, compostos como o fosfato de carbamila (FC), citrulina e aminoácidos N-carbamil são prováveis precursores de CE em bebidas alcoólicas, pois estão presentes no vinho e podem reagir com etanol em pH ácido (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003). Esse subproduto origina-se da degradação enzimática da arginina durante o processo de fermentação, conforme representado na Figura 2. A etanólise desses precursores leva à produção de CE, na qual o FC reage com etanol para formar o CE (equação 6). Da mesma forma, a citrulina reage espontaneamente com o etanol para formar o CE (TONON; LONVAUD-FUNEL, 2002; UTHURRY et al., 2006). Essa reação de formação do contaminante pode ser favorecida pela presença de compostos nitrogenados durante a destilação, altas temperaturas sob condições ácidas e longo período de armazenamento do produto (POLASTRO et al., 2001; JARGEDEO et al., 2002; IIDA et al., 2006; BRUNO et al., 2007).

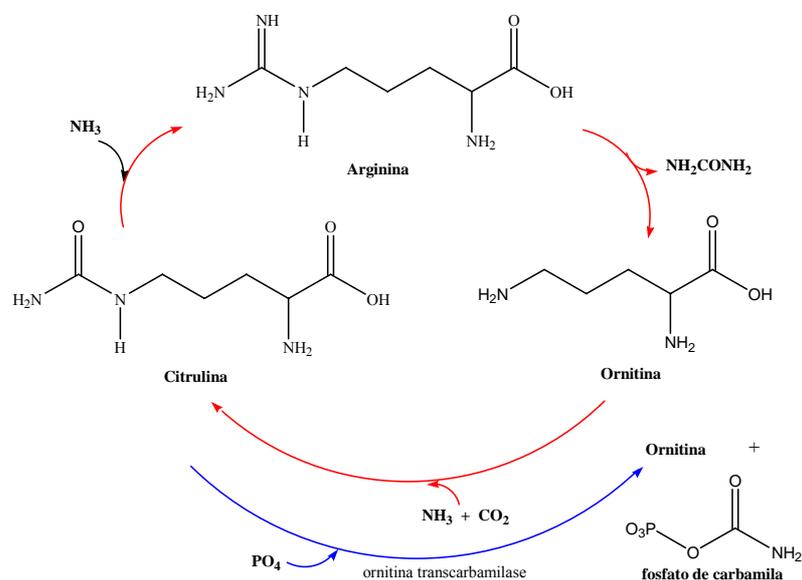
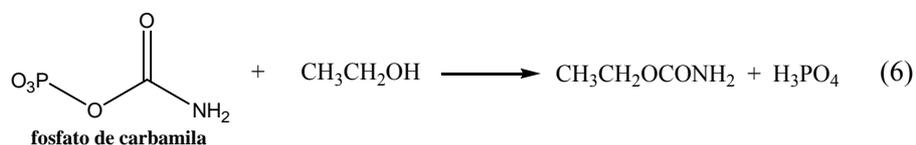


Figura 2 Esquema geral dos precursores envolvidos no ciclo da uréia
Fonte: Anjos (2011)



O cianeto (CN^-) ou os intermediários cianato (^-OCN) ou isocianato (^-NCO) são considerados precursores durante e após o processo de destilação (ANJOS et al., 2011). Segundo Galinaro e Franco (2011), para bebidas destiladas como uísque, rum e destilados de frutas com caroço, apenas uma pequena concentração de uretana presente no mosto fermentado é incorporada ao destilado final, sendo o íon cianeto relatado como o principal precursor de CE. Segundo Lachenmeier (2005), esse cianeto (CN^-), ânion do ácido cianídrico,

(HCN) seria formado pela ação enzimática e clivagem térmica dos glicosídeos cianogênicos presentes em alguns vegetais (cevada, mandioca, aveia, arroz, centeio, trigo, maçã e manga), podendo ser oxidado a cianato (CNO^-). Embora até o presente momento não esteja descrito na literatura qual o glicosídeo cianogênico presente na cana-de-açúcar, é bem razoável admitir a sua existência nesse vegetal. Na Figura 3, são exemplos de glicosídeos encontrados no centeio e trigo (a) e na mandioca, aveia e cereais (b).

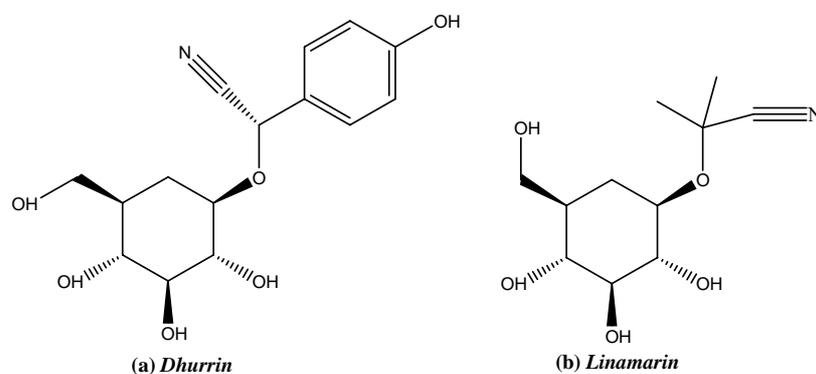


Figura 3 Exemplos de glicosídeos cianogênicos
Fonte: Galinaro e Franco (2011)

Os precursores da CE e os correspondentes mecanismos de formação em fase líquida, principalmente durante a fermentação, foram descritos anteriormente. No entanto, em bebidas destiladas, vários outros mecanismos aumentam a concentração de CE por diferentes reações em fase gasosa durante a destilação. Segundo Weber e Sharypov (2009), apenas uma minoria do CE produzido na fermentação é vaporizado e encontrado nos destilados, devido ao seu ponto de ebulição elevado 184°C . No entanto, CE pode ser transportado

como aerossol para o condensador no alambique (BRUNO et al., 2007). Além disso, estima-se que cerca de 80% do CE encontrados nos destilados sejam formados durante a etapa de destilação e/ou dentro das primeiras 48 h após a destilação (RIFFIKIN et al., 1989; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001.; BRUNO et al., 2007; FOX; STACHOWIAK, 2007). No último caso, o papel de precursores do CE em fase gasosa é crucial. HCN, HNCO e/ou HOCN presentes ou formados durante a destilação são os precursores da CE. Devido ao seu baixo ponto de ebulição ($< 30^{\circ} \text{C}$), esses ácidos são vaporizados e podem produzir CE em fase gasosa e/ou por reações heterogêneas (gás/sólido), principalmente por ação catalítica do cobre, que é o material utilizado na confecção dos alambiques (CARLEY; CHINN; PARKINSON, 2003). Esses autores demonstraram a oxidação de HCN para HNCO (ou HOCN) sobre a superfície de cobre a 300 K (equação 7).



Adsorvido ou não, HNCO e/ou HOCN reagem com etanol em fase gasosa produzindo intermediários (equações 8-12), como o ácido carbâmico (equação 8) ou cianato de etila (equação 10), que formam o CE em destilados (WEBER; SHARIPOV, 2009).



A necessidade da presença de uma espécie oxidante tem sido confirmada com a formação de CE no escuro, pela adição de diacetil ou peróxido de hidrogênio em soluções então estáveis de etanol, cianeto e diacetil (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990). Christoph, Schmitt e Hillenbrand (1988) propuseram que peróxidos ou radicais livres resultantes de fontes como benzaldeído e íons cúprico poderiam participar da reação de formação de CE na presença de luz.

Portanto, duas rotas sintéticas foram propostas para a formação do carbamato de etila a partir do cianeto. A primeira baseia-se na complexação do cianeto com o cobre (II), metal proveniente do alambique, conforme equação (13) e, em seguida, a sua oxidação para cianogênio, equação (14). O cianogênio em meio básico sofre uma reação de desproporcionamento a cianato e cianeto, conforme descrito na equação (15). O cianato pode reagir com etanol, em meio ácido, para formar carbamato de etila, como demonstrado na equação (16).

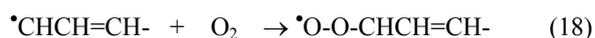


Mecanismos fotoquímicos também são relatados para formação de CE. A segunda via é baseada na auto-oxidação de compostos insaturados presentes em bebidas alcoólicas, sob luz ultravioleta, que produzem radicais livres, ou hidroperóxidos orgânicos, que catalisam a oxidação do cianeto a cianato, como apresentado nas equações 17 a 25 (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

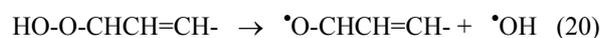
Iniciação



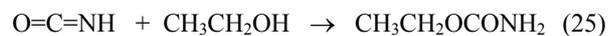
Propagação



Auto-oxidação



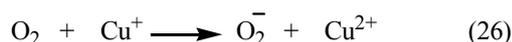
Formação do carbamato de etila



Segundo Battaglia, Conacher e Page (1990), os fatores que influenciam a formação do carbamato de etila a partir do cianeto são pH, luz, concentração de etanol, temperatura, natureza dos grupos carbonilas nas moléculas orgânicas e a concentração dos íons metálicos (Cu (II) ou Fe (III)) na bebida. Além disso, um efeito sinérgico entre a concentração do íon metálico e a irradiação foi observada, segundo Guerain e Leblond (1993). Esses mecanismos não são restritamente fotoquímicos e não só ocorrem após a destilação, podendo ocorrer também em diferentes etapas do processo de produção. Admite-se também que

mecanismos radicalares possam ocorrer na fase gasosa durante a destilação, produzindo precursores do CE.

Investigando fatores que influenciam a formação de CE, Aresta, Boscolo e Franco (2001) estudaram o efeito do oxigênio dissolvido na bebida para a formação de CE e o papel dos íons Cu^{2+} como catalisador para a conversão de cianeto a CE, independentemente de sua forma (orgânico ou inorgânico). Os autores observaram que o oxigênio não participa diretamente da oxidação do cianeto a cianato; porém, é provável que ele esteja envolvido na oxidação do Cu^+ a Cu^{2+} , uma reação bastante conhecida por ocorrer em processos industriais, conforme apresentado na equação 26.



O mecanismo de formação do CE em bebidas alcoólicas via cianeto requer a atuação de catalisador; no caso de cachaças de alambique, o cobre (II) é que vai promover a conversão do cianeto a cianato e este reage com etanol, conforme equações 27-31; porém, a transformação do cianeto em cianato é possível na ausência de catalisador, mas requer pH ácido e ocorre lentamente (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; BRUNO et al., 2007).



Segundo os autores, o cianato complexa-se com o cobre (II) e a coordenação com o metal se faz pelo nitrogênio, tornando o átomo de carbono mais positivo e facilitando o ataque nucleofílico do etanol ou da água (Figura 4).

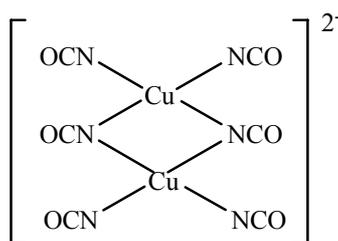
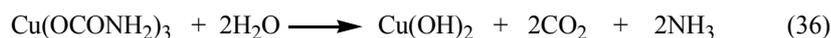


Figura 4 Estrutura do complexo cianeto-cobre
Fonte: Aresta, Boscolo e Franco (2001)

A partir desse complexo, duas rotas foram propostas: na primeira, o álcool etílico ataca o complexo cobre – isocianato, formando um intermediário de unidade carbâmica; esse, por sua vez, sofre hidrólise para formar o CE, conforme equações 32 e 33.



A segunda via envolve inicialmente o ataque pela água do isocianato no complexo com o cobre, formando um complexo com unidade carbâmica, que sofre etanólise para formar o CE. A água compete com o etanol no ataque ao complexo com unidade carbâmica e os compostos formados são hidróxido de cobre (II), dióxido de carbono e amônia, conforme equações 34, 35 e 36. Segundo os autores, essa via é mais provável de ocorrer durante a destilação.



A presença de cianeto durante a destilação foi comprovada em estudos de Mackenzie, Clyne e MacDonald (1990) que, aplicando técnicas como cromatografia iônica, difração de raios X e espectrometria de massas aos sólidos formados naturalmente dentro dos destiladores, identificaram espécies tais como CuCN, CuCNO, Cu₂O, Cu₂S, CuS e Cu-NC⁻, cluster iônicos como CuCN, Cu(CN)²⁻, Cu₂(CN)³⁻ e Cu₃(CN)⁴⁻ e uma mistura de espécies Cu(CN)₂S⁻, CuSCN⁻, e CuCNO⁺, demonstrando que reações catalíticas de complexos de superfície ocorrem durante o destilação. Segundo os autores, quando cobre é empregado na parte ascendente do fluxo, como ocorre nos alambiques, espera-se que ocorra uma fixação de cianeto, diminuindo a concentração deste no destilado e, conseqüentemente, reduzindo o teor de carbamato de etila.

Quanto à influência da luz e armazenamento na formação desse contaminante, mecanismos envolvidos ainda não estão bem elucidados, podendo observar comportamentos diferentes para diferentes amostras. Tegmo-Larsson e Spittler (1990) avaliaram a formação e/ou aumento do CE durante o armazenamento de quinze amostras de vinhos tintos e brancos de mesa, em diferentes temperaturas (43°C, 32°C e 22°C no escuro e a 22°C sob luz fluorescente). A concentração de CE foi determinada inicialmente e após 3, 6 e 12 meses de armazenamento. Na maioria dos vinhos, o carbamato de etila aumentou em função do tempo e temperatura. Após 12 meses no escuro a 43°C, o carbamato de etila em dois vinhos tintos aumentou de 20 a 30 vezes. Em nove dos vinhos, aumentou de 3 a 9 vezes, mantendo-se inalterado em quatro

amostras. No entanto, a luz não influenciou significativamente a formação de carbamato de etila, seja em garrafas verdes, seja em claras.

Em 2005, Lachnmeier, Nerlich e Kuballa, encontraram resultados contrários aos do trabalho citado acima, em aguardentes de frutas. Eles observaram que a exposição à luz UV levou ao aumento no teor de CE nas amostras, em média, de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ e que o armazenamento da bebida no escuro não levou a diferenças estatisticamente significativas. Segundo os autores, essa formação relaciona-se à presença de cianeto, cuja reação para formação de CE é influenciada pela luz, pH, temperatura, teor de etanol, proximidade de grupos carbonílicos em moléculas orgânicas e pela presença de íons cobre ou ferro na bebida. Para Zimmeli e Schlatter (1991), a formação natural de CE em aguardentes de fruta ocorre na presença de etanol, cianeto de hidrogênio e substâncias ativas fotoquimicamente. Em vinhos, além dos cianetos de hidrogênio, precursores importantes podem estar envolvidos como o carbamoil e ureia.

Nóbrega et al. (2009), avaliando 25 amostras de cachaças produzidas na Paraíba, levando-se em consideração características como cor (branca ou envelhecida), destilação (simples ou dupla), e cor do frasco, não encontraram correlação entre a concentração de CE em amostras armazenadas em garrafas escuras ou transparentes. No entanto, há evidências de que as cachaças envelhecidas tendem a ser mais contaminadas do que a branca, assim como aquelas amostras produzidas em alambiques com colunas não refrigeradas.

Andrade Sobrinho et al. (2009), em trabalhos correlatos, avaliaram a variação da concentração de CE com o tempo, analisando-se a concentração desse composto em 15 amostras de aguardente de cana após 36 meses de repouso e ao abrigo da luz. Esses pesquisadores observaram que as diferenças entre as concentrações de CE encontradas para essas amostras apresentaram uma variação de -5,3 a 6,7%, sugerindo que esse composto é estável após a sua

formação. Em trabalho posterior, Galinarro e Franco (2011) analisaram 15 amostras de aguardente coletadas *in loco* em diferentes destilarias, quanto à presença de CE, avaliando parâmetros como presença e ausência de luz, temperatura e bidestilação da bebida. De acordo com os resultados, os autores não encontraram diferenças significativas na concentração de CE entre as amostras irradiadas e não irradiadas com luz solar, descartando a hipótese de haver um provável precursor ativado fotoquimicamente.

2.3.3 Técnicas aplicadas para a detecção e quantificação de CE em bebidas

Em razão do risco para a saúde dos consumidores, o monitoramento constante dos teores de carbamato de etila de forma segura e confiável é exigido cada vez mais pelas autoridades competentes. Inúmeras técnicas têm sido descritas na literatura para a análise de carbamato de etila em bebidas alcoólicas. A mais utilizada é a cromatografia em fase gasosa acoplada a diferentes detectores, entre eles, espectrômetro de massas - GC-MS, detecção seletiva para nitrogênio/fósforo, detector eletrolítico de condutividade de Hall, detector de infravermelho por transformada de Fourier e detecção por luminescência. O CG-EM tem sido preferido por ser mais seletivo, rápido e por não requerer purificação e extração da amostra (LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008).

Para a quantificação de CE, os trabalhos que utilizam GC/MS fazem o monitoramento seletivo dos íons (modo SIM), característicos do espectro de massas para esse composto. São selecionados os seguintes íons de massa: m/z 89, 74, 62 e 44 e outros íons de alguns isótopos, quando esses são utilizados como padrão interno (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2000). Os padrões internos mais utilizados na quantificação de CE em alimentos e bebidas são os carbamatos de metila, propila, isopropila, butila e o de etila deuterado, ^{13}C ou

¹⁵N, sendo os dois últimos mais indicados, por proporcionarem recuperação mais precisa e por evitar coeluição (HASNIP et al., 2007).

Embora o método considerado como oficial para a análise de CE em bebidas alcoólicas seja o GC-MS, alguns autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD), para a determinação de CE em diferentes matrizes. Esse método envolve apenas a derivação prévia do CE com 9-xantidrol permitindo, assim, sua detecção com a utilização do detector de fluorescência. Hebert et al. (2002), analisando 42 amostras de vinho pelo método HPLC-FLD, obtiveram uma recuperação média de 96% entre as amostras estudadas, um limite de detecção de 4,2 µg L⁻¹ e uma precisão média intermediária de 6,3%. Comparando os resultados ao do CG/EM, estes foram estatisticamente iguais, com probabilidade de 97,5%. Valores similares referentes à exatidão e precisão do método foram obtidos nos trabalhos de Madrera e Valles (2009), Machado (2010) e Anjos et al. (2011). Esse método tem se apresentado como uma alternativa à substituição ao método oficial, pois apresenta níveis de detecção similares, além de proporcionar maior rapidez na etapa de preparação das amostras, já que não necessita de etapas prévias de extração e concentração do analito.

Além desses métodos citados acima, diferentes metodologias de extração têm sido testadas, tais como extração líquido-líquido (FAUHL; WITTKOWSKI, 1992), extração em fase sólida (JAGERDEO et al., 2002; BUMLEY et al., 1988; HASNIP et al., 2007), combinada com GC-MS. Outra técnica que vem sendo empregada sem o uso de solventes é a microextração em fase sólida (SPME) (WHITON; ZOECKLEIN, 2002; LACHENMEIER; NERLICH; KUBALLA, 2006; ZHANG; ZHANG, 2008; MACHADO, 2010). Essa metodologia apresenta várias vantagens quando comparada com os procedimentos convencionais de extração por solvente. SPME é rápida, fácil de manusear, isento de solventes, sensível, e não requer qualquer procedimento de

concentração prévia do analito, evitando, assim, a produção de subprodutos; no entanto, é uma técnica relativamente onerosa.

Técnicas mais sofisticadas vêm sendo testadas para a quantificação de CE. Perestrelo et al. (2010) utilizaram a cromatografia em fase gasosa bidimensional com a espectrometria gasosa em tempo de voo para a quantificação de CE em amostras de vinhos fortificados e previamente tratadas por microextração em fase sólida combinada ao headspace. Os limites de detecção do método variaram de 2,75 a 4,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os limites de quantificação, de 9,16-14,38 $\mu\text{g L}^{-1}$, com porcentagens de recuperação variando de 89% a 99%. Esse método baseia-se na aplicação de duas colunas de CG revestidas com diferentes fases estacionárias, uma apolar e outra polar, ligadas em série por meio de uma interface especial. A composição da fase estacionária do primeiro sistema é, geralmente, menos polar do que o utilizado no segundo, de modo que a separação é governada pelas propriedades da temperatura de ebulição no primeiro e polaridade no segundo. No entanto, a utilização dessas técnicas mais robustas oneram ainda mais a análise.

2.3.4 Quantificação de CE em bebidas alcoólicas

Visando ao controle e à elucidação dos precursores e dos mecanismos envolvidos na formação do CE em cachaças, vários estudos vêm sendo desenvolvidos.

Andrade-Sobrinho et al. (2002) relataram a presença de níveis elevados de carbamato de etila em cachaça, utilizando 126 amostras comerciais dessa bebida, provenientes de vários Estados. Os autores encontraram um valor médio de 630,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, 770,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 930,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para amostras de cachaça produzidas em alambiques, em sistemas de destilação com pequenas áreas

confeccionadas em cobre nas partes ascendentes e em colunas de destilação, respectivamente.

Barcelos et al. (2007), investigando os teores de CE em cachaças produzidas nas regiões Norte e Sul de Minas Gerais, observaram concentrações que variaram de não detectado a 643,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Pelos resultados, verificou-se mostraram que as amostras pertencentes ao Vale do Jequitinhonha apresentaram concentrações acima do limite estabelecido pela legislação, mostrando a necessidade de identificação e controle desse composto na bebida.

Masson (2009) avaliou 71 amostras de cachaça provenientes das regiões Norte e Sul de Minas Gerais. Os resultados demonstraram que 63,63% das amostras analisadas na região Norte apresentaram concentração acima do exigido pela legislação, sendo consideradas impróprias para o consumo. Diferentemente, todas as amostras analisadas na região Sul apresentaram-se dentro dos padrões exigidos pelo Mapa. Esses e outros estudos não encontraram, portanto, correlação positiva entre a presença do íon cobre na bebida e a formação desse contaminante (LABANCA, 2004; BARCELOS et al., 2007; MASSON, 2009; ZACARONI et al., 2011).

Bruno et al. (2007) estudaram os fatores do processo de destilação que podem ter influência na formação de CE em aguardentes de cana, tais como material e construção do destilador, tipo de destilação (alambique ou coluna), temperatura e fluxo de destilação, presença de cobre no destilado recém-obtido, presença de precursores nitrogenados no destilado, entre outros. Os autores observaram uma grande dependência da configuração do destilador e do próprio processo de destilação, na formação do CE em cachaças.

Nóbrega et al. (2009) avaliaram o teor de CE em 25 marcas de cachaças de alambique de 19 destilarias do estado da Paraíba, Brasil. Os valores encontrados variaram de 55,00-700,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, com mais de 70% das marcas excedendo o limite internacional de CE para as aguardentes (150,00 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Também avaliaram características intrínsecas das marcas, tais como cor (branca ou amarela), destilação (simples ou dupla) e coloração da garrafa, não observando correlação significativa com os níveis da CE. No entanto, quando avaliaram os teores de CE de cachaças provenientes de mesma destilaria e destiladas uma única vez, na cor amarela (armazenado em madeira) e incolor, a cachaça amarela apresentou-se mais fortemente contaminada. Com relação ao processo de destilação (cortes na destilação, sistema de aquecimento, forma das caldeiras e sistema de resfriamento da coluna), observou-se correlação entre os teores de CE e o sistema de refrigeração, com as colunas não refrigeradas e refrigeradas dominando as marcas com elevado (200,00-700,00 $\mu\text{g L}^{-1}$) e baixo (55,00-100,00 $\mu\text{g L}^{-1}$) níveis de contaminação, respectivamente.

Esses mesmos autores, em trabalhos posteriores, durante o ano de 2011, encontraram 18 marcas fora dos padrões estabelecidos, sendo 89% representados por bebidas provenientes da destilação em coluna, com 33 cachaças do Estado de Pernambuco. Eles atribuíram os baixos níveis observados em cachaças produzidas em alambiques à maximização da taxa refluxo nas partes ascendentes e minimização da exposição de cobre nas partes descendentes (utilizando aço inoxidável). Nesse estudo também ficou evidente que cachaças amarelas tendem a ser mais contaminadas com CE do que as brancas; porém, nenhuma inferência a esse fato foi reportada.

Baffa Júnior et al. (2011) investigaram a presença de CE durante o processo de fermentação e nas frações durante o processo de destilação, bem como na vinhaça. A concentração de CE foi crescente durante a fermentação, com teor médio de 122,00 mg L^{-1} . Na fração cabeça, o teor médio encontrado foi de 59,70 mg L^{-1} ; para a fração coração, 52,00 $\mu\text{g L}^{-1}$; e para a fração cauda, 1,57 mg L^{-1} . Para a vinhaça, o teor encontrado foi de 53,17 mg L^{-1} . Os autores atribuem a formação de CE na fermentação durante o metabolismo das leveduras, uma vez que nenhum nutriente foi adicionado ao tanque de

fermentação. O fosfato de carbamila (FC), produzido pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), pode reagir com etanol para gerar carbamato de etila. O FC vem da arginina, catalisada pela carbamil sintase, envolvendo ATP, CO₂ e amônia (INGLEDEW; MAGNUS; PATTERSON, 1987). Intermediários, tal como fosfato de carbamila (CH₄NO₅P), também são facilmente formados in vitro. Quanto ao processo de destilação, os autores atribuem a possibilidade de ele ser arrastado durante todo o processo e, na fração cabeça, pode estar presente devido a interações moleculares entre o etanol e outros compostos químicos presentes no meio.

Segundo Lachenmeier (2005), ações preventivas têm sido propostas para evitar a formação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas, tais como: medidas de boas práticas de fabricação (uso de matérias-primas de boa qualidade, higienização adequada durante a fermentação e o armazenamento e controle das condições de destilação), controle da irradiação da luz e redução do tempo de armazenamento, no intuito de evitar a liberação de cianeto.

Enzimas também podem ser empregadas para diminuir a concentração de carbamato de etila, como a urease (OUGH; TRIOLI, 1988) e a rodanese (TAKY et al., 1992), para destruir a ureia e o cianeto, respectivamente; a adição dos sais de cobre e prata (LAUGEL; BLINDER, 1992), para precipitar o cianeto; eliminação de Cu(II) pelo tratamento da bebida com resinas de troca iônica (RIFFKIN et al., 1989) e, ainda, procedimentos não práticos, como armazenamento dos frascos a baixa temperatura e na ausência de luz (TEGMO-LARSSON; SPITTLER, 1990). A bidestilação também tem sido um procedimento muito comum para remover carbamato de etila de bebidas alcoólicas destiladas, em virtude de sua baixa volatilidade em soluções alcoólicas (RIFFKIN et al., 1989; GALINARRO; FRANCO, 2011). No entanto, esse procedimento geralmente leva a perdas no rendimento em etanol e no aroma.

2.4 O envelhecimento da cachaça

O envelhecimento da cachaça é uma etapa que pode ou não ser inserida durante o processo de fabricação da bebida. O hábito de envelhecer a bebida está se tornando uma prática comum entre os produtores, que buscam agregar valores ao seu produto, tornando-o mais competitivo no mercado. Durante essa etapa, mudanças importantes ocorrem, a complexidade do aroma é aumentada devido à extração de alguns compostos presentes na madeira; os compostos fenólicos são solubilizados a partir da madeira, melhorando o sabor; e oxidações suaves de alguns compostos fenólicos ocorrem, reduzindo a adstringência e alterando a cor (ALANÓN et al., 2011). Dias, Maia e Nelson (2002) mostraram que, após estocagem em barris de madeira, praticamente não se detectam diferenças significativas entre cachaças destiladas em alambiques de cobre e de aço inoxidável.

Os recipientes utilizados para o envelhecimento são os barris e tonéis de madeira, que atuam como uma membrana semipermeável, permitindo a passagem de vapores de álcool e água, que ocorrem em razão das condições de umidade relativa e da temperatura do local de armazenamento. No entanto, as perdas ao longo do ano dependem de vários outros fatores, tais como dilatação e contração da aguardente de cana dentro do tonel, vazamentos e expulsão de aguardente por frestas e consequente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, devido à inadequação de instalações e de ambientes, além do modo de armazenamento (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006).

A composição química da madeira divide-se em substâncias macromoleculares e substâncias de baixo peso molecular. Na classe das macromoléculas, estão presentes a celulose (principal componente da parede celular, que é um polímero linear constituído de β -D-glicose), polioses ou

hemiceluloses que se originam das hexoses (glicose, manose e galactose) e das pentoses (xilose e arabinose) e ligninas, que são constituídas por um sistema aromático compostos de unidades de fenilpropano, que irão dar origem aos fenóis, aos ácidos e aldeídos aromáticos. As substâncias de baixo peso molecular, que também são chamadas de materiais acidentais ou estranhos, são responsáveis, muitas vezes, por certas propriedades da madeira, como cheiro, gosto, cor, etc. Essas substâncias se dividem em compostos de origem orgânica ou extrativos e compostos de origem inorgânica (Ca, K e Mg). Os primeiros darão origem aos taninos, responsáveis principalmente pela cor e adstringência da bebida, aos flavonoides, terpenos e ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente na forma de seus ésteres com glicerol (óleo) ou como álcoois (ceras) (KLOCK et al., 2005).

No envelhecimento da bebida, a madeira sofre degradação pela ação do álcool e da água. Ocorre hidrólise da hemicelulose e da lignina, sendo os produtos dessa hidrólise passados para o destilado (SHEREV; BRINK, 1980). Durante o envelhecimento da bebida, a hemicelulose é ligeiramente degradada em pentoses e hexoses, resultando no aumento da concentração de açúcares no produto final (PUECH; MOUTOUNET, 1988).

A lignina tem estreita relação com o desenvolvimento de aroma e sabor nos destilados envelhecidos, porque libera para a bebida ácidos e aldeídos aromáticos durante o período de envelhecimento, sendo pequena fração é solúvel e, conseqüentemente, extraída durante o processo (SINGLETON, 1995).

Os barris empregados para o envelhecimento são termicamente tratados e, durante o processo, diversos compostos são extraídos da madeira por influência da bebida, interferindo, assim, nas características organolépticas do produto final (REAZIN, 1981). Portanto, para obter um produto de qualidade, parâmetros, como a espécie da madeira, o tamanho, pré-tratamento dos barris, condições ambientais e tempo de envelhecimento, devem ser observados, pois

irão influenciar as interações entre a bebida e a madeira. Quando a bebida é envelhecida em temperaturas mais elevadas e em recipientes menores, há uma maior extração e, conseqüentemente, uma maior concentração de componentes da madeira. De acordo com Trindade (2006), bebidas envelhecidas em ambientes cuja temperatura varia de 9 a 15°C e a umidade relativa é próxima a 73% apresentam aroma mais fino e agradável.

A temperatura de armazenamento e o tipo de pré-tratamento sofrido pela madeira durante o processo de envelhecimento, geralmente reduz o teor alcoólico da bebida. Pesquisas de Maia e Campelo (2006) mostraram que, essas perdas de etanol podem ser reduzidas durante o envelhecimento, mantendo a temperatura da adega abaixo de 20°C e a umidade relativa do ar em torno de 85%. Mesmo assim, pode ainda ocorrer uma perda de 1% ao ano. No Brasil, são comuns perdas de álcool em torno de 3 a 4% ao ano, seja pela qualidade dos tonéis utilizados, seja pela idade das madeiras em uso.

O tratamento térmico é o tratamento mais comum sofrido pela madeira durante o processo de envelhecimento. Esse tratamento é necessário para dar forma aos barris, bem como para modificar as estruturas moleculares da madeira, causando a degradação de polímeros, tais como polissacarídeos e polifenóis, permitindo o surgimento de novas substâncias aromáticas, que conferem um sabor diferenciado as bebidas envelhecidas (LEÃO, 2006). Pesquisas anteriores realizadas por Campos et al. (2004), mostraram que cada madeira necessita de condições específicas durante o tratamento, a fim de se obter uma extração mais efetiva dos compostos fenólicos presentes nesta.

Além das alterações de cor, sabor, aroma e teor alcoólico, observa-se durante o processo de envelhecimento um aumento no teor de extrato seco, devido à extração dos compostos não voláteis da madeira. A acidez volátil e a concentração de aldeídos também são acrescidas devido à oxidação do acetaldeído e do etanol. Outra reação que pode ocorrer é a esterificação dos

álcoois e ácidos, produzindo ésteres e levando as bebidas envelhecidas a apresentarem maiores concentrações dessas substâncias (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006).

2.5 Oxidações em sistemas biológicos e antioxidantes

Os efeitos tóxicos relacionados ao oxigênio já são conhecidos desde o final do século XIX, mesmo assim, a identificação dos radicais livres causadores dessa toxicidade somente foi possível a cerca de 50 anos, quando Denham Harman lançou sua teoria sobre o envolvimento desses radicais livres em processos de metagênese, câncer e envelhecimento (AUGUSTO, 2006).

A determinação da oxidação nos componentes celulares é feita de forma indireta pelos efeitos causados por meio da oxidação dos lipídeos, dos grupamentos sulfidril(a) das proteínas, das bases púricas e pirimídicas, o que leva a uma alteração no DNA e no balanço tiol/dissulfeto (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1990). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997). Esses compostos podem ser formados *in vivo* por fontes endógenas, via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência

de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (respiração aeróbica, inflamações, peroxissomos, enzimas do citocromo P450) ou pela exposição à fatores exógenos (tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, medicamentos, dieta e radiações). Os principais radicais formados nos processos biológicos são as espécies reativas de oxigênio, os íons superóxido, alcoxila, peroxila, peridroxila, os complexos de metais de transição, os radicais de carbono, de enxofre e de nitrogênio (SOARES, 2002). Entre esses radicais formados, atenção especial é voltada para as espécies reativas de oxigênio (EROs), cujo metabolismo gera vários intermediários reativos, conforme Figura 5 e Quadro 2. Essas espécies reativas podem atacar os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares. A fosfolipase, ativada pelas espécies tóxicas, desintegra os fosfolípidos, liberando os ácidos graxos não saturados, resultando nas seguintes ações deletérias dos peróxidos lipídicos: ruptura das membranas celulares (bombas Na/K e Ca/Mg); mutações do DNA; oxidação dos lipídeos insaturados; formação de resíduos químicos como o malondialdeído; comprometimento dos componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

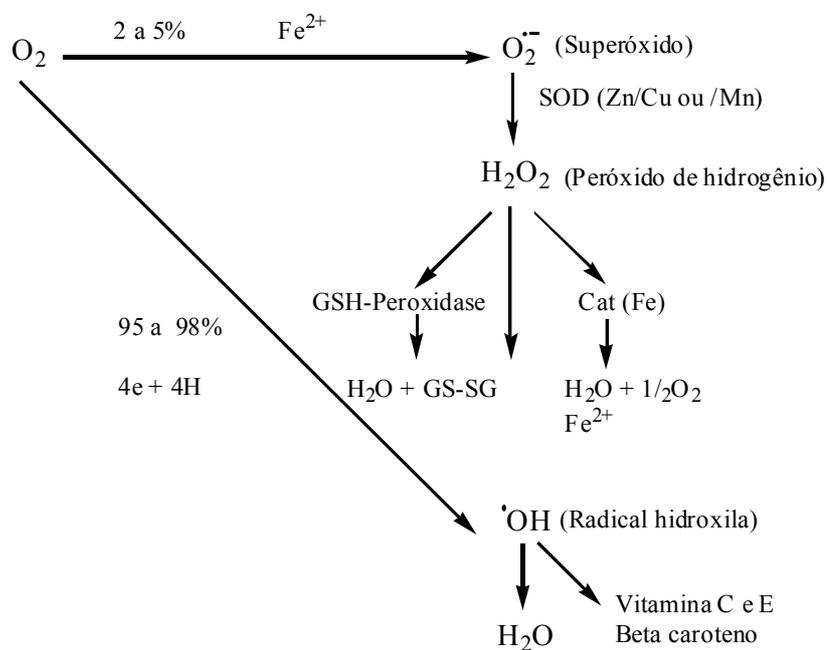


Figura 5 Formação dos EROs durante o metabolismo (SOD – Superóxido dismutase, Cat–catálise, GSH – Glutathione)
 Fonte: Sies (1991)

Quadro 2 Espécies reativas de oxigênio (SIES, 1991).

$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido ou radical superóxido
HO_2^{\cdot}	Radical perhidroxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\cdot OH$	Radical hidroxila
RO^{\cdot}	Radical alcooxil
ROO^{\cdot}	Radical peroxil
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico (ex.: lipoperóxido)
1O_2	Oxigênio singlete
RO^*	Carbonila excitada

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares. Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese. A Figura 6 ilustra os danos causados por esses radicais livres no organismo humano.

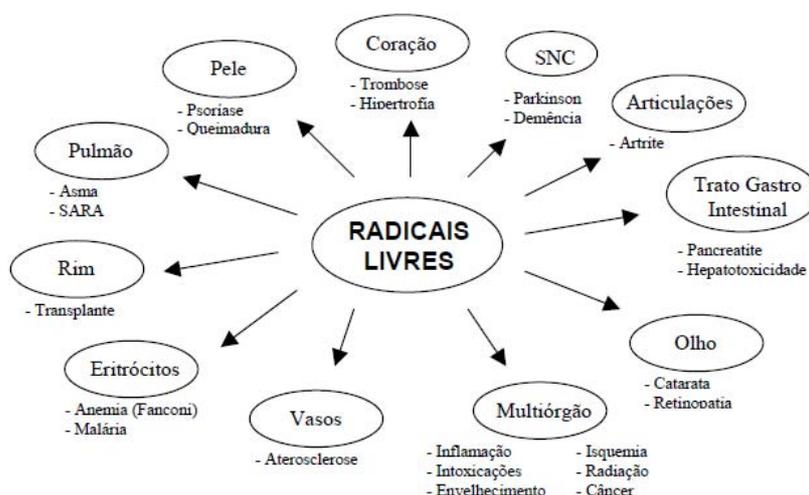


Figura 6 Principais doenças relacionadas à ação dos radicais livres
Fonte: Bianchi e Antunes (1999)

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina.

Os antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas

complexos, evitando o início ou propagação das reações em cadeia no processo de oxidação. Essa inibição dos radicais livres pode ocorrer via dois mecanismos: no primeiro, os antioxidantes atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante, que pode reagir com outro radical livre; no segundo, os antioxidantes atuam retardando a etapa de iniciação da auto-oxidação por diferentes mecanismos, que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. (ÂNGELO; JORGE, 2007).

O próprio organismo possui sistemas naturais que atuam eliminando os radicais livres ou impedindo sua transformação em produtos mais tóxicos para a célula. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando estão em concentrações excessivas no organismo, impedindo-o de neutralizá-lo por vias naturais. Essa situação é denominada de estresse oxidativo (ÂNGELO; JORGE, 2007).

Os sistemas enzimáticos de defesa são compostos pelas seguintes enzimas: glutathion-peroxidase (necessita do Se), catalase, metionina-redutase e superóxido-dismutase (há vários tipos, e os 2 principais necessitam de Zn, Cu e Mn), os quais combatem, no organismo, os seguintes radicais livres: peróxido de hidrogênio, superóxido, oxigênio singlete, íon hidroxila, óxido nítrico e óxido nitroso (ÂNGELO; JORGE, 2007).

Os antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria, são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos por alimentação apropriada. Os principais podem ser divididos em vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, beta-caroteno), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B), ubiquinona, ceruloplasmina, ácido úrico, taurina, flavonoides e outros

compostos fenólicos de origem vegetal. Além desses, há vários nutrientes essenciais de origem mineral que participam do processo antioxidante, em associação com enzimas, tais como zinco, cobre, manganês, selênio e ferro (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL, 1990; SIES, 1991).

2.6 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos constituem um grande grupo de produtos secundários dos vegetais, que possuem um anel aromático, tendo um ou mais substituintes hidroxila. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (SIMÕES et al., 2004).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. No entanto, essa atividade é determinada por sua estrutura química, em particular por hidroxilas, que podem doar elétrons e se estabilizarem por meio da deslocalização eletrônica em torno do sistema aromático (DORNAS et al., 2007). Radtke, Linseisen e Wolfram (1998), Clifford (1999), Mattila, Hellstrom e Torronem (2006) mostraram que vários grãos, frutas e bebidas são consideradas fontes moderada ou boa de ácidos fenólicos.

Ângelo e Jorge (2007) classificam os compostos fenólicos como compostos pouco distribuídos na natureza e compostos largamente distribuídos na natureza.

Na classe dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona, o resorcinol e os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos.

Alguns compostos fenólicos não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais. São aqueles presentes sob a forma de polímeros, na qual estão os taninos e as ligninas. Os taninos são compostos de alto peso molecular, que

conferem ao alimento a sensação de adstringência, e classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural, taninos hidrolisáveis (Figura 7) e taninos condensados (Figura 8). Os primeiros contêm um núcleo central de glicose, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. Os outros são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina, não facilmente hidrolisáveis por tratamento ácido. As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica, constituídas basicamente de unidades fenilpropano. Sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico, apresentando estreita relação com o desenvolvimento de aroma e sabor nos destilados envelhecidos (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006). Diante da complexidade da estrutura da lignina, ela pode ser constituída de diferentes precursores primários, como os álcoois trans-coniferílico, trans-sinapílico e trans-p-cumárico (KLOCK et al., 2005).

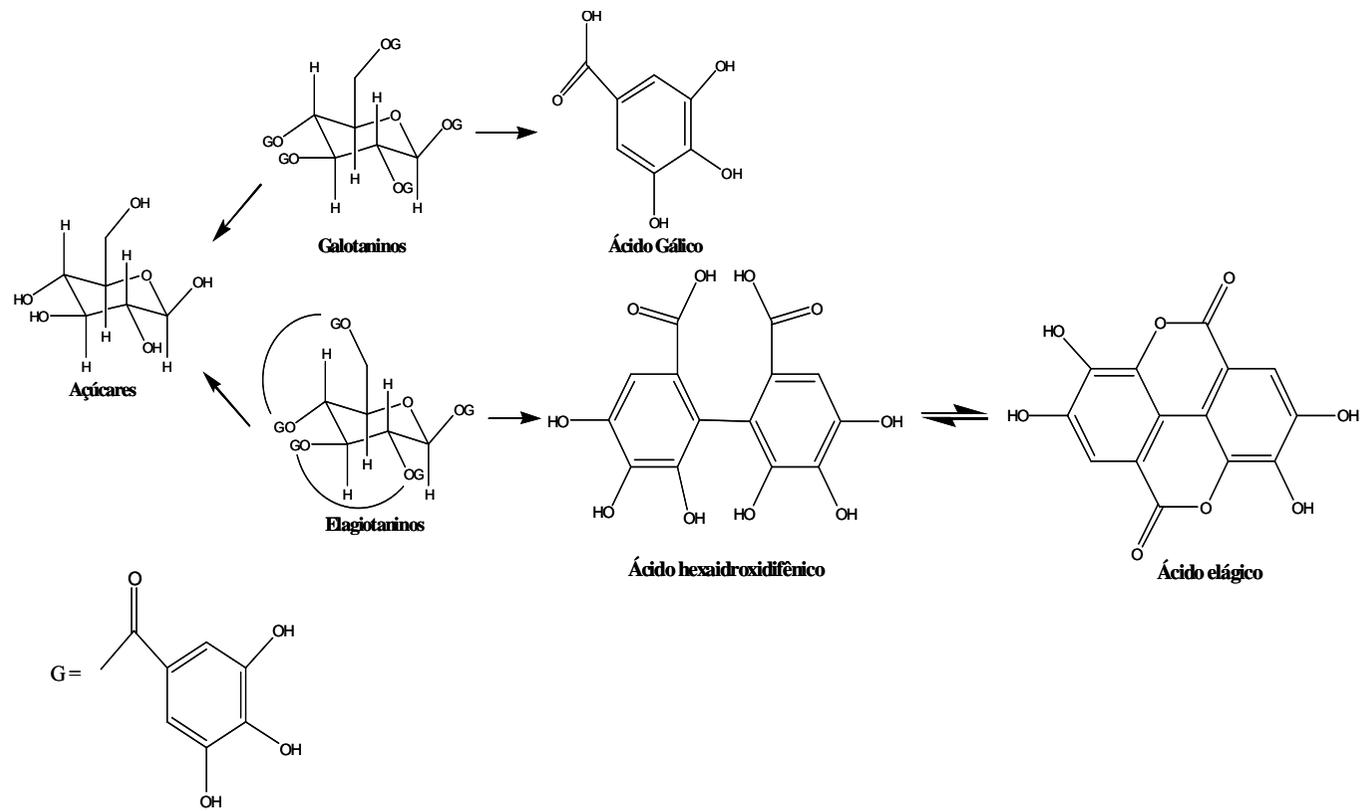


Figura 7 Degradação dos taninos hidrolisáveis liberando para o destilado ácido gálico e ácido elágico (SOARES, 2002)

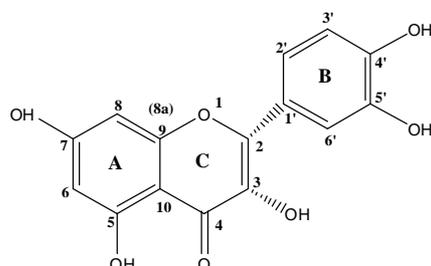


Figura 8 Monômero básico para a formação dos taninos condensados (flavan-3-ol)

Fonte: Simões (2004)

Na classe dos compostos largamente distribuídos na natureza, estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal que, muitas vezes, podem estar localizados em uma só planta. Esses fenólicos estão divididos em dois grandes grupos, os flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (ÂNGELO; JORGE, 2007).

A estrutura química dos flavonoides (Figura 9) favorece sua ação antioxidante. Os hidrogênios dos grupos hidroxilas adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo ($-C=O$) de algumas moléculas de flavonoides fornecem a esses compostos alta atividade antioxidante (MAMEDE; PASTORE, 2004).

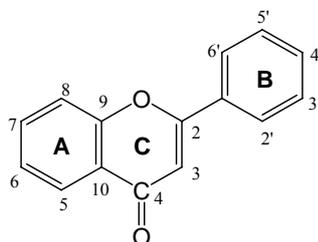


Figura 9 Estrutura química básica dos flavonoides
Fonte: Simões (2004)

Em geral, a atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidrocinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzoicos. A presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Provavelmente, há conjugação da dupla ligação do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ com as duplas do anel (BEHLING et al., 2004).

Os compostos fenólicos atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante, que pode reagir com outro radical livre (ÂNGELO; JORGE, 2007).

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxila por ser esse mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (DECKER, 1998). O radical fenoxila resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação, ao reagir com um radical peroxila, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como

pelo tamanho da cadeia desses grupos (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Esse mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana, não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (NAMIKI, 1990; RAMARATHNAM et al., 1995).

A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos já estudados que possuem esse potencial são resveratrol, quercetina, ácido cafeico e flavonóis.

Os fenóis em geral são altamente sensíveis à oxidação enzimática e não enzimática. Para que as propriedades desses compostos sejam asseguradas, o tecido das frutas deve estar livre de lesão e os produtos manufaturados, serem armazenados ao abrigo da luz. Os antioxidantes são sensíveis à luz em razão das suas duplas ligações alternadas (ÂNGELO; JORGE, 2007).

Os processamentos de alimentos derivados de plantas e frutas são valiosas fontes naturais de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos (ANTOLOVICH et al., 2000; MOURE et al., 2001). Numerosos estudos têm sido dedicados à capacidade bioativa de subprodutos agrícolas (casca de arroz, cascas de amêndoas, cascas de frutas cítricas e de resíduos de sementes, cascas de maçã, e subprodutos da indústria do vinho, etc), em particular, para encontrar algumas alternativas para alimentos antioxidantes sintéticos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Estudos prévios mostraram a presença de ácidos fenólicos, polifenóis e flavonoides na cana-de-açúcar (NUTT; O'SHEA; ALLSOPP, 2004; COLOMBO; LANCÜAS; YARIWAKE, 2006), no melaço de cana e no açúcar mascavo (PALLA, 1982), e

a presença de compostos fenólicos antioxidantes a partir de cana-de-açúcar não centrifugada (TAKARA et al., 2002).

Payet, Sing e Smadja (2006) investigaram a atividade antioxidante de frações coletadas nas diferentes etapas do processo de produção de açúcar utilizando ensaios com o 2,2 - azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Os fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, e os compostos polifenólicos foram identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) em todas as frações estudadas. Análises multivariadas foram aplicadas a todos os resultados para comparar as amostras e encontrar o produto mais relevante em termos de compostos bioativos. Neste estudo, observou-se maior teor de compostos fenólicos totais na fração melaço. Dos 65 ácidos fenólicos, catequinas, flavonoides e fenóis simples pesquisados da biblioteca, os ácidos fenólicos foram os principais componentes dos extratos. Foram identificados e quantificados a vanilina, quatro derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e cinco derivados dos ácidos hidroxibenzoicos. Não encontraram catequinas e flavonoides nos extratos. Para todos os produtos do açúcar, os ácidos p-cumárico e ferúlico foram os compostos preponderantes. Quanto à atividade antioxidante, tanto para o radical livre ABTS como para o DPPH, a capacidade de inibição dos produtos de fabricação do açúcar aumentou durante o processo, desde sucos claros, que exibiram baixa atividades, até o melaço, que foi o mais ativo.

O interesse em medir a atividade antioxidante em alimentos e bebidas têm resultado em pesquisas nessa linha, nos últimos anos. Estudos relatam sobre a atividade antioxidante desses compostos em bebidas alcoólicas como vinho, cuja atividade é atribuída à classe dos flavonoides, uísques, tiquira, licor e aguardente de cana (SOARES, 2002).

Behling et al. (2004); Mamede e Pastore (2004); Dornas et al. (2007); Iacopini et al. (2008); Canas, Casanova e Belchior (2008) relacionaram as propriedades antioxidantes dos vinhos aos compostos, catequina, ácido gálico (oriundo principalmente dos barris de envelhecimento), malvidina, ácido cafeico, mircetina, quercetina e ácido sinápico. Para os autores, esses compostos atuam prevenindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças inflamatórias.

Assim como as catequinas, galatos, ácidos cinâmicos e os flavonoides são conhecidos por suas atividades antioxidantes potentes nos chás, cafés e vinhos, polifenóis, como os ácidos gálico e elágico, tem apresentado atividade significativa em uísques. McPhail et al. (1999) avaliaram a atividade antioxidante em relação aos métodos de produção e os perfis de composição de nove compostos fenólicos e seus derivados furanos de oito uísques, utilizando a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (ESR). Os autores observaram que a atividade antioxidante relaciona-se mais à presença dos ácidos elágico, gálico, siríngico e vanílico e aos aldeídos siringaldeído e coniferaldeído, não apresentando nenhuma correlação com o hidróximetilfurfural. Eles sugeriram que os antioxidantes advêm do processo de envelhecimento em barris de carvalho.

Em trabalho posterior, Aoshima et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante em uísque japonês pelo método de DPPH após vários períodos de envelhecimento. Como esperado, a atividade antioxidante aumentou com o período de envelhecimento do uísque, com fatores de correlação muito alto (0,960-0,995). Nesse mesmo trabalho, avaliou-se também a atividade antioxidante em outros tipos de uísque empregando-se o mesmo método. Os autores observaram que diferentes tipos de uísque armazenados sob diferentes condições, tais como, tipo de barril, espécie de carvalho, ou pré-tratamento da madeira, etc, apresentaram atividades antioxidantes não proporcionais ao período de envelhecimento.

Trabalhando com 21 amostras de cachaças, Bettin et al. (2002) analisaram a presença de ácidos fenólicos e flavonoides, a tendência de formação de radical e a capacidade antioxidante medida pelo método de DPPH. Pelos resultados, verificou-se que a formação de radical depende muito do teor de cobre, ao passo que a capacidade antioxidante da bebida depende do teor de flavonoides, sendo a (+)-catequina e (-)-epicatequina os compostos mais importantes.

Cardoso, Frederiksen, Silva, Franco e Skibsted (2008) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes madeiras brasileiras (amendoim, canela-sassafrás, castanheira, ipê, jatobá e louro-canela), comparadas ao carvalho, utilizando-se o método de DPPH e peroxidação lipídica. Eles observaram que o amendoim e o jatobá são as madeiras que mais se assemelham ao carvalho, tanto na atividade antioxidante quanto na qualidade sensorial.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. M. et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, p. 498-503, 2005.
- ALANÓN, M. E. et al. Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. **Food Chemistry**, London, v. 129, p. 1584-1590, 2011.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (Cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 1074-1077, 2002.
- ANDRADE SOBRINHO, L. G. et al. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ANJOS, J. P. et al. Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 874-878, 2011.
- ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, London, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- AOSHIMA, H. et al. Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 5240-5244, 2004.
- AQUINO, F. W. B. et al. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 145-149, 2006.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 49, p. 2819–2824, 2001.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DOS PRODUTORES DE CACHAÇA DE QUALIDADE. **Aguardente em ascensão**. Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <<http://www.ampaq.com.br>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

AUGUSTO, O. **Radicais livres bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. p. 115.

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

BADOLATO, E. S. G.; DURAN, M. C. Risco de intoxicação por metanol pela ingestão de bebidas alcoólicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 27, n. 2, 2000. Disponível em: <<http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol27/n2/art90.htm>>. Acesso em 15 jun. 2012.

BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography–mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. **Food Chemistry**, London, v. 129, p. 1383–1387, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, p.191-203, 2006.

BARCELOS, L. V. F. et al. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 1009-1011, 2007.

BATTAGLIA, R.; CONACHER, H. B. S.; PAGE, B. D. Ethyl carbamate in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 7, p. 477-496, 1990.

BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

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

BETTIN, S. M.; FRANCO D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) em aguardentes. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 234-238, 2005.

BETTIN, S. M. et al. Phenols and metals in sugar-cane spirits. Quantitative analysis and effect on radical formation and radical scavenging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 215, p. 169–175, 2002.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOSCOLO, M. **Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana: ocorrência e quantificação**. 2002. 100p. Tese (Doutorado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

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

BUMLEY, W. C. et al. Quantitation of ethyl carbamate in whiskey, sherry, port, and wine by gas chromatography/tandem mass spectrometry using a triple quadrupole mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, p. 975-978, 1988.

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

CAMPOS, J. O. S. et al. Influence and effect of thermal treatment in elaboration of regional wood extracts for cachaça. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, p. 179-185, 2004.

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

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

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, maio/jul.1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000200005>. Acesso em 15 jun. 2012.

CARDOSO, D. R. et al. Sugarcane spirit extracts of oak and Brazilian woods: antioxidant capacity and activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 1109-1116, 2008.

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

CARLEY, A. F.; CHINN, M.; PARKINSON, C. Adsorption and reaction of CN + O = OCN on Cu(100) surface: a density functional theory study. **Surface Science Reports**, Amsterdam, v. 537, p. 64–74, 2003.

CAVALHEIRO, S. F. L. et al. Influência do envelhecimento no teor de cobre em cachaças. **Boletim do CEPPA**: Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 99-108, jan./jun. 2003.

CHA, S.W. et al. Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 115, n. 3, p.173–181, 2000.

CHRISTOPH, N.; SCHMITT, A.; HILLENBRAND, K. Ethylcarbamate in obstbranntwein. **Alkohol Industrial**, v. 16, p. 369–374, 1988.

CLIFFORD, M. Chlorogenic acids and other cinnamates: Nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 362-372, 1999.

COLOMBO, R.; LANCÜAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal of Chromatography A.**, v. 1103, p.118-124, 2006.

DATO, M. C. F.; PIZAULO JÚNIOR, J. M.; MUTTON, M. J. R. Análise dos componentes secundários produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras selvagens durante a produção de cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 70-74, jan./mar. 2005.

DECKER E.A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 241-248, 1998.

DENNIS, M. J. et al. Investigation of ethyl carbamate levels in some fermented foods and alcoholic beverages. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, p. 383-389, 1986.

DIAS, S. M. B. C.; MAIA, A. B. R. A.; NELSON, D. L. Utilização de madeiras nativas no envelhecimento da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 46-51, 2002.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific opinion of the panel on contaminants. **Journal EFSA**, v. 551, p. 1-44, 2007.

FAUHL, C.; WITTKOWSKI, R. Determination of ethyl carbamate in wine by GC-SIM-MS after continuous extraction with diethyl ether. **HRC: journal of high resolution chromatography**, Weinheim, v. 15, p. 203-205, 1992.

FOX, N. J.; STACHOWIAK, G. W. Vegetable oil-based lubricants: a review of oxidation. **Tribology Internacional**, v. 40, n. 7, p. 1035-1046, 2007.

GALHIANE, M. S. **Análise de aroma em bebidas por cromatografia gasosa de alta resolução**. 1989. 99 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)– Universidade de São Paulo, São Carlos, 1989.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. F. Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-distiladas; proposta para seu controle. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 996-1000, 2011.

GUERAIN, J.; LEBLOND, N. Formation du carbamate d'éthyle et élimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits à noyaux. In: CANTAGREL, R. (Ed.). **Élaboration et connaissance des spiritueux, recherche de la qualité, tradition et innovation**. Paris: BNIC, diffusion Tec et Doc Lavoisier, 1993. p. 330–338.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 1989. 543 p.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, London, v. 9, p. 1-32, 1990.

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

HAWTHORNE, S. B.; TREMBLEY, S.; MONIOT, C. B. Static subcritical water extraction with simultaneous solid-phase extraction for determining polycyclic aromatic hydrocarbons on environmental solids. **Journal of Chromatography and Analysis**, San Diego, v. 886, p. 237-244, 2000.

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

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

HOLLAND, J. R. et al. A controlled trial of urethane treatment in multiple myeloma. **Blood**: leading the world in reporting basic and applied hematology research, v. 27, n. 3, p. 328–342, 1966.

IACOPINI, P. et al. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, p. 589–598, 2008.

IIDA, Y. et al. Novel determination system for ureain alcoholic beverages by using an FIA system with an acid urease column. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 26, p. 173-176, 2006.

INGLEDEW, W. M.; MAGNUS, C. A.; PATTERSON, J. R. Yeast foods and ethyl carbamate in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 38, n. 4, p. 332–335, 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA. **Mercado**. Disponível em: <<http://www.ibraccachacas.org>> Acesso em: 5 jul. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man**. Some antithyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals. Lyon, 1974. v. 7p. 111–140.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. Lyon, 1987. v. 1–42, 440 p. (Supplement, 7). Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/index.php>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

JAGERDEO, E. et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 50, p. 5797-5802, 2002.

KLOCK, U. et al. **Química da madeira**. 3. ed. Curitiba: UFPR, 2005. 86 p.

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

LABANCA, R. A. **Teores de carbamato de etila, cobre e grau alcoólico em aguardentes produzidas em Minas Gerais**. 2004. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

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

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

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

LAUGEL, P.; BINDLER, F. Le carbamate d'ethyle dans les eaux-the-vie the fruits a` noyaux. In : CANTAGREL, R. (Ed.). **Elaboration et connaissance des spiriteux**. Paris: Tec&Doc, 1992. p. 290-295.

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

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

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

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

MACKENZIE, W. M.; CLYNE, A. H.; MACDONALD, L. S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II: The identification and determination of cyanamide related species involved in ethyl carbamate formation in scotch grain whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, n. 4, p. 223-232, 1990.

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

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: Sebrae/MG/Sindbebedidas, 2006. 129 p.

MAIA, A. B. R.A. Componentes secundários da aguardente. **STAB**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-34, 1999.

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

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

MASSON, J. et al. Determination of acrolein, ethanol, volatile acidity, and copper in different samples of sugarcane spirits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n.3, p. 568-572, 2012.

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

MATTILA, P.; HELLSTROM, J.; TORRONEN, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 54, p. 7193-7199, 2006.

MCPHAIL, D. B. et al. Assessment of the Antioxidant Potential of Scotch Whiskeys by Electron Spin Resonance Spectroscopy: Relationship to Hydroxyl-Containing Aromatic Components. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 47, p. 1937-1941, 1999.

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

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

MOURE, A. et al. Natural antioxidant from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, p. 145-171, 2001.

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

NAMIKI M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

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

NÓBREGA, I. C. C. et al. Ethyl carbamate in cachaça (Brazilian sugarcane spirit): Extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation. **Food Chemistry**, London, v. 127, p. 1243-1247, 2011.

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

NUTT, K. A.; O'SHEA, M. G.; ALLSOPP, P. G. Feeding by sugarcane whitegrubs induces changes in the types and amounts of phenolics in the roots of sugarcane. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 51, p. 155-165, 2004.

OUGH, C. S.; TRIOLI, G. Urea removal from wine by an acid urease. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 4, p. 303-307, 1988.

PALLA, G. Isolation and identification of phenolic glucosides in liquid sugars from cane molasses. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 30, p.764-766, 1982.

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

PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 54, p. 7270-7276, 2006.

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

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

PERESTRELO, R. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction as a powerful tool for quantification of ethyl carbamate in fortified wines. The case study of madeira wine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 3441-3445, 2010.

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

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

PUECH, J. L.; MOUTOUNET, M. Liquid chromatographic determination of scopoletin in hydroalcoholic extracts of oak wood and in matured distilled alcoholic beverages. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 71, p. 512-514, 1988.

RADTKE, J.; LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Phenolsaurezufuhr erwachsener in einen bayerischen teilkollektiv der nationalen verzehrstudie. **Z. Ernährungswiss**, v. 37, p. 190-197, 1998.

RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends in Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

REAZIN, G. H. Chemical mechanisms in whiskey maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, n. 4, p. 283-289, 1981.

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

RIFFKIN, H. L. et al. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **Journal of the Institute Brewing**, v. 95, p. 115-119, 1989.

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

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cachaça artesanal estudos de mercado**. Brasília, 2008. 42 p. Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em: 30 jun. 2012.

SCHABER, P. M. et al. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 424, p. 131-142, 2004.

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

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

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

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

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. 31S-38S, 1991. (Supplement, 3C).

SIMÕES, C. M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/Florianópolis: UFSC, 2004. 1102 p.

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

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

TAKARA, K. et al. New antioxidative phenolic glycosides isolated from KOKUTO noncentrifugated cane sugar. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v. 66, p. 29-35, 2002.

TAKY, N. et al. Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Japan Journal Toxicology Environment Health**, v. 38, n. 6, p. 498-505, 1992.

TEGMO-LARSSON, I. M.; SPITTLER, T. D. Temperature and light effect on the ethyl carbamate formation in wine during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 4, p. 166-1169, 1990.

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

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

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

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

VAHL, M. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold inDenmark. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 10, n. 5, p. 585-592, 1993.

VARGAS, E. A.; GLÓRIA, M. B. Qualidade de aguardentes de cana (*Saccharum officinarum*) produzida, comercializada e/ou engarrafada no Estado de Minas Gerais **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 43-49, 1995.

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.

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

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

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

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

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

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, p. 325-350, 1991.

ZHANG, Y.; ZHANG, J. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design. **Journal Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 627, p. 212-218, 2008.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 379, n. 2, p.201-210, 1997.

CAPÍTULO 2: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS EM AMOSTRAS DE CACHAÇAS ENVELHECIDAS

RESUMO

A cachaça é um produto típico brasileiro, quimicamente complexa e altamente consumida no país e com representativa importância no mercado internacional. Por ser produzida na maioria dos estados brasileiros e, por apresentar algumas diferenças no processo de produção, faz-se necessária uma análise de qualidade, principalmente a avaliação físico-química. No presente trabalho objetivou-se avaliar o perfil físico-químico das amostras de cachaça envelhecidas em diferentes madeiras. As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/6/2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Das amostras analisadas, 70% estavam fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira quanto aos parâmetros graduação alcoólica, acidez volátil, furfural e cobre.

Palavras-chave: Legislação. Conformidade química. Cachaça.

ABSTRACT

The sugarcane spirits are a typically Brazilian product, chemically complex and widely consumed in the country and with a representative importance in the international market. For being produced in most of the Brazilian states and for presenting some differences in the production process, quality analysis is necessary, mainly the physiochemical evaluation. In the present work the objective was to evaluate the physiochemical profile of the sugarcane spirit samples aged in different wood. The physiochemical analyses were conducted according to the parameters established by the Normative Instruction No.13, of 6/29/2005, of the Ministry of Agriculture, Livestock and Provisioning (MAPA). Of the analyzed samples, 70% did not meet the standards stipulated by the Brazilian legislation regarding the parameters alcohol content, volatile acidity, furfural and copper.

Key words: Legislation. Chemical compliance. Sugarcane spirits.

1 INTRODUÇÃO

A cachaça, destilado produzido do caldo de cana-de-açúcar fermentado, foi descoberta pelos escravos no século XVI nos engenhos de açúcar. No século XVIII, representou para a sociedade brasileira um símbolo de resistência a dominação portuguesa. No século XIX e início do século XX, a cachaça foi desvalorizada por alguns grupos que buscavam uma identidade mais próxima à sociedade europeia. O fim da resistência à sua aceitação ocorreu em 1922, com o movimento cultural “Semana de Arte Moderna”, que defendia a total identidade da arte e dos costumes da cultura brasileira, valorizando a cachaça e reconduzindo-a ao posto de símbolo da cultura nacional (QUEIROZ, 2012; CARDOSO, 2006).

Atualmente, a cachaça é uma das bebidas mais populares do Brasil; depois da cerveja, é a segunda bebida alcoólica mais consumida. No exterior, é considerada o terceiro destilado mais consumido. Estima-se que a produção anual da bebida seja de 1,5 bilhão de litros com exportações, perfazendo a margem de 1% do total destinado a países como Alemanha, Itália, França, EUA e Japão. Portanto, praticamente toda a produção é destinada ao mercado nacional. Do total comercializado, aproximadamente 1,0 bilhão de litros são provenientes das indústrias e o restante é atribuído à cachaça de alambique (SEBRAE, 2008). O setor aquece o mercado financeiro, criando empregos e riqueza nas indústrias, bares, restaurantes, casas noturnas e hotéis. Tal movimento é hoje estimado em R\$ 2 bilhões de faturamento, respondendo por 600 mil empregos diretos e indiretos (IBRAC, 2012).

A produção da cachaça ocorre de uma forma pulverizada em quase todos os Estados brasileiros, observando-se, dessa forma, uma heterogeneidade no processo de produção. Segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, há cerca de 1.800 estabelecimentos produtores de cachaça

registrados e mais de 30 mil produtores em todo o país. A maior parte está localizada nos estados de São Paulo, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais. Esses estados respondem por cerca de 75% da produção nacional. Considera-se que há mais de 5 mil marcas, tanto de empresas de grande porte quanto de pequenos alambiques (CARUSO; NAGATO; ALABURDA, 2008).

O processo produtivo da cachaça constitui-se basicamente das seguintes etapas: plantio, colheita e moagem da cana-de-açúcar, decantação e filtragem do caldo, fermentação e destilação. Na etapa de fermentação, o etanol é formado como composto majoritário e, em pequenas quantidades, os componentes denominados produtos secundários ou voláteis “não álcool”, tais como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e álcoois superiores (CARDOSO, 2006). Após a destilação, a bebida deve passar por um período de descanso, aproximadamente três meses, tempo necessário para que haja equilíbrio entre os componentes e eles possam contribuir efetivamente para o buquê da cachaça. Também pode ser inserido ao processo a etapa de envelhecimento, acondicionando a bebida em recipientes apropriados de madeira por um período não inferior a um ano, conforme estabelecido na legislação (BRASIL, 2005).

Mesmo com o controle correto das etapas de produção da bebida, é de se esperar que as cachaças brasileiras apresentem semelhanças e diferenças entre si, em razão da sua origem, como observadas para outras bebidas (RECHE et al., 2004). Diante do exposto, realizaram-se as análises físico-químicas das dez amostras de cachaças envelhecidas, objetivando avaliar a conformidade delas com a legislação vigente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as amostras foram coletadas e analisadas conforme apresentado abaixo.

2.1 Obtenção das amostras

As cachaças utilizadas no experimento foram coletadas em diferentes unidades produtoras da Região Sul, do Estado de Minas Gerais, provenientes de processo de destilação em alambiques de cobre. Logo após a coleta, as amostras foram analisadas físico-quimicamente e armazenadas em garrafas de vidro de 700 mL, transparentes e em garrafas cobertas com folha de alumínio, constituindo-se os tratamentos do experimento. Na Tabela 1, estão algumas características referentes às amostras analisadas.

Tabela 1 Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).

Amostra	Local	Madeira	Capacidade do barril (L)	Tempo de armazenamento (meses)
A	Passa Quatro	Castanheira	700	36
B	Passa Quatro	Carvalho	200	36
C	Passa Quatro	Jequitibá	20.000	36
D	Barbacena	Jequitibá	10.000	60
E	Lavras	Amburana	10.000	48
F	Piranguinho	Louro-canela	50.000	24
G	Piranguinho	Carvalho	50.000	48
H	Itajubá	Jatobá	4.000	6
I	Itajubá	Carvalho	1.000	24
J	Perdões	Carvalho	200	12

2.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente no Departamento de Química da Ufla, segundo os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/6/2005 do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Inicialmente as amostras foram redestiladas em triplicata, para a análise do teor alcoólico, álcoois superiores, furfural, aldeídos, ésteres, metanol e acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (-15°C). As metodologias empregadas para as análises estão descritas a seguir.

2.2.1 Exame organoléptico

Foi determinado, observando-se as amostras contra um transluminador de luz branca, cujos parâmetros analisados foram: aspecto, coloração, limpidez, presença de corpos estranhos e vazamentos.

2.2.2 Teor alcoólico

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

2.2.3 Extrato seco

Foi efetuado por meio de métodos gravimétricos. Inicialmente, uma cápsula de alumínio foi previamente pesada em balança analítica. Em seguida, uma alíquota de 25 mL da amostra sem redestilar foi transferida para a cápsula e evaporada em banho-maria a 95°C por 3 horas. Após esse período, o material foi levado à estufa a 100°C por 30 minutos e, em seguida, resfriado em dessecador. Pesou-se então, em balança analítica, o resíduo sólido remanescente. Os resultados obtidos foram expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra.

2.2.4 Acidez volátil

Foi determinada por titulação volumétrica de neutralização. Os ácidos voláteis foram extraídos da bebida por arraste de vapor, utilizando o Destilador Eletrônico Enochimico Gibertini. Posteriormente, os ácidos obtidos foram

titulados com hidróxido de sódio 0,1 N em presença de fenolftaleína 1% como indicador. Os resultados obtidos foram expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra ou por 100 mL de álcool anidro.

2.2.5 Álcoois superiores

A quantidade total de álcoois superiores foi determinada por meio de reação colorimétrica e quantificação em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC a 540 nm. As concentrações foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1. A quantidade total desses compostos foi expressa em miligrama por 100 mL de álcool anidro. As reações desse processo estão descritas na Figura 1.

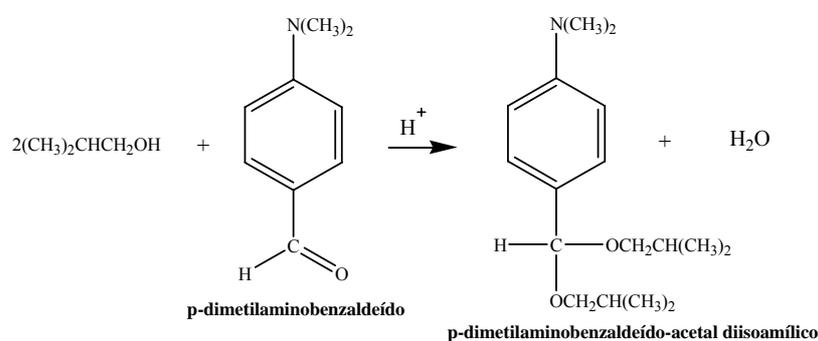


Figura 1 Reação colorimétrica dos álcoois superiores com o p-dimetilaminobenzaldeído para quantificação espectrofotométrica
Fonte: Machado (2010)

2.2.6 Aldeídos

Foram analisados pelo método titulométrico direto com iodo 0,05 N, titulando o SO₂ formado por meio das reações envolvidas na análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro. As reações decorrentes desse processo estão descritas na Figura 2.



O SO₂ em excesso reage com I₂ em meio ácido



Em meio alcalino, o aldeído é então determinado



Figura 2 Reações envolvidas na titulação direta com iodo para quantificação de aldeídos

Fonte: Machado (2010)

2.2.7 Furfural

A quantificação foi realizada por meio das leituras espectrofotométricas na região visível do espectro a 520 nm, por comparação das absorvâncias observadas nas amostras da bebida com valores de absorvâncias de uma curva analítica previamente construída com soluções padrão de etanol/furfural. Para a análise de furfural, o grau alcoólico do destilado foi corrigido para 50° GL. Os

resultados obtidos foram expressos em miligrama de furfural por 100 mL de álcool anidro. A reação colorimétrica envolvida nesse processo está descrita na Figura 3.

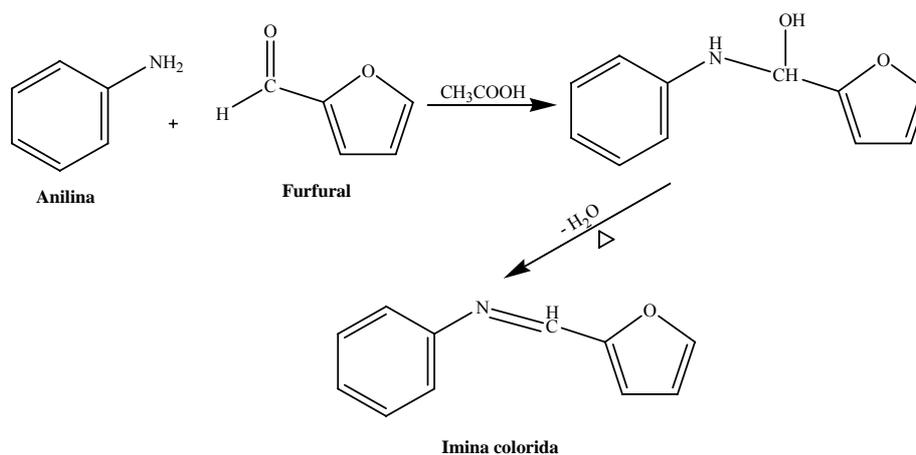


Figura 3 Reação colorimétrica do furfural com a anilina para quantificação espectrofotométrica

Fonte: Machado (2010)

2.2.8 Ésteres

Os ésteres foram determinados pela titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas bebidas. Suas quantidades foram expressas em gramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro. As reações desse processo estão descritas na Figura 4.

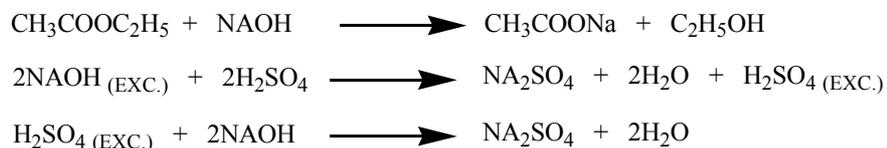


Figura 4 Reação de substituição nucleofílica para a quantificação dos ésteres por titulação do excesso de ácido sulfúrico

Fonte: Machado (2010)

2.2.9 Metanol

O metanol foi quantificado por reações colorimétricas e determinado no espectrofotômetro a 575 nm. As quantidades desse composto foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol. Os resultados obtidos foram expressos em mL de metanol por 100 mL de álcool anidro. As reações decorrentes desse processo estão descritas na Figura 5.

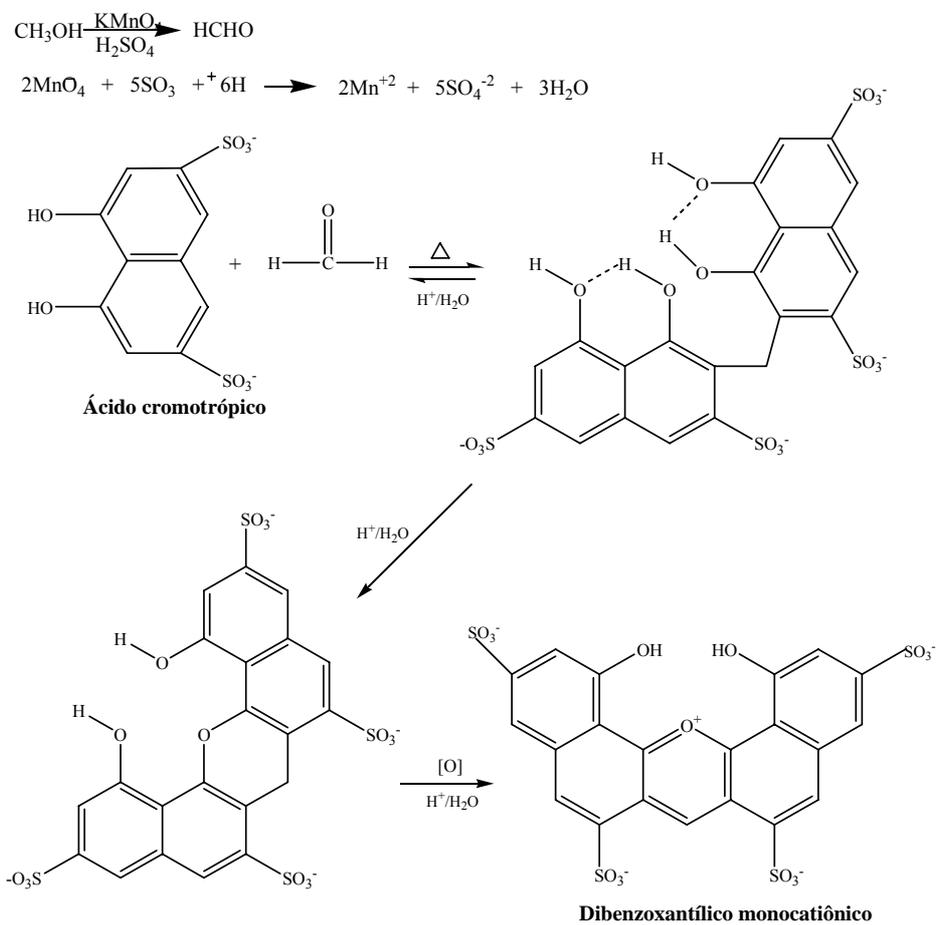


Figura 5 Reações de oxidação do metanol a formaldeído e reação deste com ácido cromotrópico para a formação do complexo com propriedades colorimétricas

Fonte: Machado (2010)

2.2.10 Cobre

A quantificação do cobre presente nas aguardentes de cana / cachaças foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro (546 nm), comparado a valores de absorbância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando-se sulfato de cobre como padrão primário. As reações colorimétricas foram realizadas previamente nas amostras de cachaças sem redestilar. Os resultados obtidos foram expressos em mg/L e as reações envolvidas nessa análise estão descritas na Figura 6.

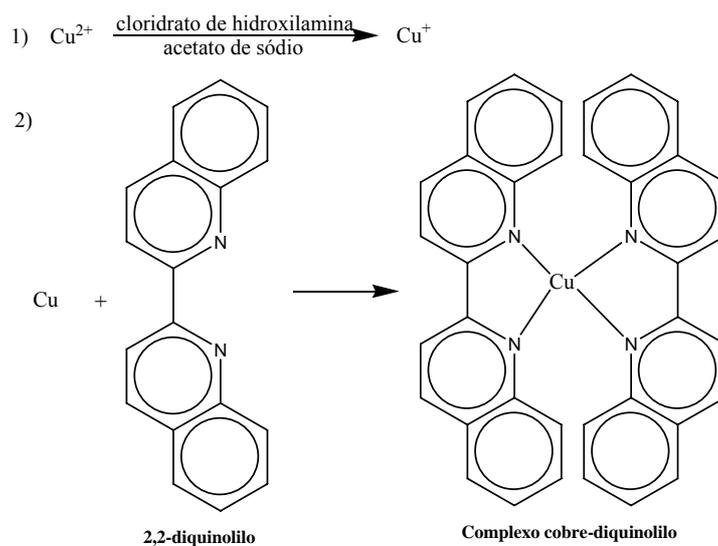


Figura 6 Reações de redução do cobre e formação do complexo para quantificação colorimétrica
Fonte: Machado (2010)

2.3 Delineamento experimental

Os resultados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott Knott (1974), a 95% de confiança. Para a avaliação dos dados, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar, segundo Ferreira (2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram analisadas físico-quimicamente, conforme estabelecido pelo Mapa e os resultados estão apresentados abaixo.

3.1 Análises físico-químicas

Os resultados obtidos por meio das análises físico-químicas realizadas no início do experimento estão representados na Tabela 2. Pode-se observar que 70% das amostras analisadas estão fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira (Figura 7). Valores inferiores ao estabelecido para a graduação alcoólica foi observado para a amostra H. Observam-se também valores superiores de acidez volátil (H), furfural (exceto C, F e J) e cobre (H).

Tabela 2 Análises físico-químicas das aguardentes de cana envelhecidas.

Amostra	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Análises										
GR(%)	41,95 ± 0,10(a2)	46,29 ± 0,07(a3)	43,61 ± 0,05(a2)	38,04 ± 0,06 (a1)	42,92 ± 0,06(a3)	47,68 ± 0,20(a3)	51,70 ± 0,13(a4)	36,93 ± 0,25(a1)	38,02 ± 1,90(a1)	42,08 ± 0,08(a2)
DENS.(g/mL)	0,9465 ± 1,6x10 ⁻⁴ (b5)	0,9388 ± 1,1x10 ⁻⁴ (b3)	0,9436 ± 7,6x10 ⁻⁵ (b4)	0,9528 ± 7,6x10 ⁻⁵ (b6)	0,9448 ± 1,04x10 ⁻⁴ ⁴ (b4)	0,9362 ± 3,9x10 ⁻⁴ (b2)	0,9283 ± 2,8x10 ⁻⁴ (b1)	0,9544 ± 3,68x10 ⁻⁴ ⁵ (b7)	0,9527 ± 2,95x10 ⁻⁴ ³ (b6)	0,95 ± 6,6x10 ⁻⁴ (b5)
*Ac. Volátil	84,71 ± 3,54(c5)	37,83 ± 1,90(c1)	57,86 ± 1,99(c3)	86,64 ± 2,23(c5)	135,69 ± 4,01(c7)	46,90 ± 1,98(c2)	75,44 ± 0,19(c4)	181,63 ± 1,23(c8)	109,56 ± 4,89(c6)	76,12 ± 2,09(c4)
*Aldeídos	24,93 ± 0,07(d9)	15,46 ± 0,03(d4)	10,93 ± 0,13(d1)	16,77 ± 0,27(d6)	12,22 ± 0,15(d2)	16,07 ± 0,53(d5)	21,35 ± 0,27(d8)	12,21 ± 0,08(d2)	12,92 ± 0,19(d3)	19,81 ± 0,11(d7)
*Álcoois Superiores	176,90 ± 11,88(e1)	225,30 ± 13,03(e2)	164,69 ± 8,16(e1)	271,35 ± 6,93(e3)	171,74 ± 5,51(e2)	199,40 ± 4,79(e2)	221,63 ± 6,18(e2)	180,43 ± 4,02(e1)	185,94 ± 3,74(e1)	323,32 ± 8,80(e4)
*Furfural	25,10 ± 0,12(f7)	10,38 ± 1,14(f4)	4,66 ± 0,98(f2)	7,71 ± 0,25(f3)	23,98 ± 1,26(f7)	4,28 ± 0,61(f2)	25,62 ± 1,07(f7)	20,90 ± 1,25(f6)	12,01 ± 0,51(f5)	0,85 ± 0,07(f1)
*Ésteres	38,90 ± 4,41(g1)	37,86 ± 2,29(g1)	42,95 ± 1,19(g2)	69,09 ± 0,11(g5)	99,96 ± 1,19(g6)	43,73 ± 3,96(g2)	56,69 ± 0,91(g3)	71,17 ± 0,48(g5)	61,26 ± 2,50(g4)	36,98 ± 4,42 (g1)
*Metanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,83 ± 2,70
Cobre (mg/L)	1,14 ± 0,03(h3)	0,73 ± 0,02(h2)	3,13 ± 0,05(h7)	2,21 ± 0,06(h5)	1,67 ± 0,09(h4)	2,86 ± 0,27(h6)	0,72 ± 0,04(h2)	8,48 ± 0,13(h9)	4,32 ± 0,10(h8)	0,53 ± 0,02(h1)
Extrato seco (g/L)	0,29 ± 0,01(i2)	0,22 ± 0,004(i1)	0,15 ± 0,01(i1)	0,19 ± 0,02(i1)	0,34 ± 0,02(i2)	0,20 ± 0,02(i1)	0,39 ± 0,05(i2)	0,15 ± 0,02(i1)	0,22 ± 0,008(i1)	0,20 ± 0,01(i1)
*Congêneres	325,44 ± 16,06(j2)	316,46 ± 13,22(j2)	276,43 ± 9,36(j1)	443,85 ± 4,84(j4)	422,14 ± 6,94(j4)	306,10 ± 8,99(j2)	375,11 ± 6,62(j3)	445,44 ± 3,33(j4)	369,68 ± 5,64(j3)	457,08 ± 4,42(j4)

Médias ± desvio-padrão; médias seguidas de mesma letra e número são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$); * unidade: mg/100 mL álcool anidro; Congêneres = acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores; ND = não detectado.

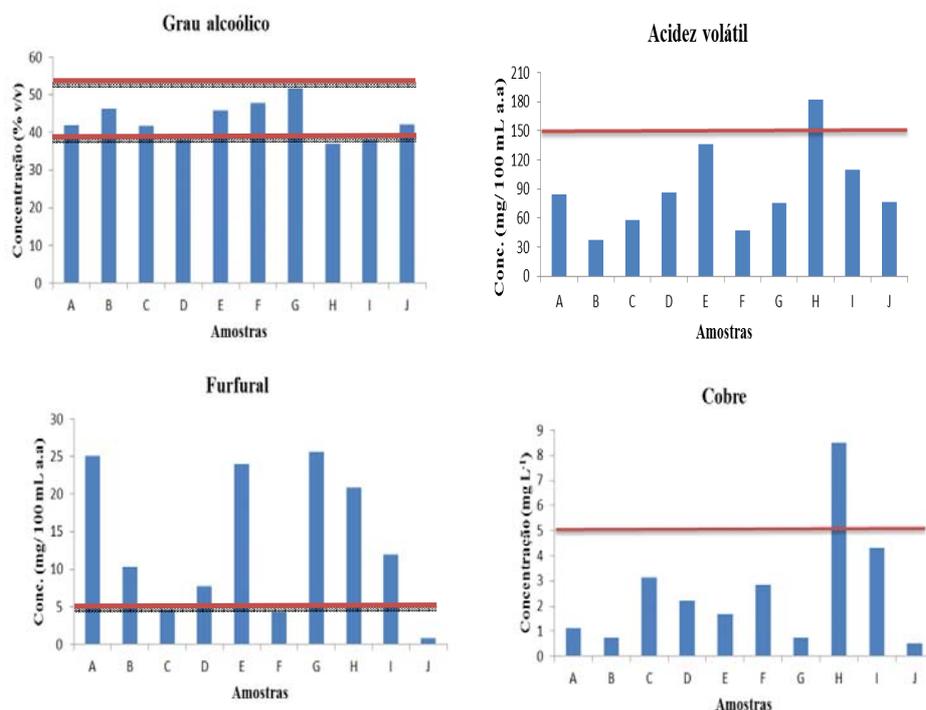


Figura 7 Concentração de álcool, ácidos voláteis, furfural e cobre nas 10 amostras de cachaças analisadas envelhecidas em diferentes barris de madeira

A graduação alcoólica obtida para as amostras variou de 36,93% (v/v) a 51,70% (v/v). Mori et al. (2003) mostram que madeiras mais porosas aumentam as perdas de álcool para o ambiente durante o período de armazenamento. E segundo Maia (2004), as reações de esterificação ocorrem de maneira lenta durante o armazenamento da bebida em barris de madeira. O teor alcoólico inferior a 38% v/v encontrado para a amostra H (36,93% v/v) envelhecida em jatobá pode ser resultado do corte incorreto das frações no processo de destilação, perdas ao longo do processo de envelhecimento, resultante do armazenamento da bebida em barris de madeira e das condições ambientais ou

pelo próprio consumo do etanol nas reações de esterificação com ácidos durante o armazenamento (CARDOSO, 2006; MIRANDA et al., 2008). As perdas ao longo do processo de envelhecimento podem ser amenizadas pelo armazenamento da bebida à baixa temperatura e umidade mais elevada.

A acidez volátil da bebida variou de 37,83 a 181,63 mg 100 mL⁻¹ a.a, tendo a amostra H teor mais elevado. Como as bebidas originam-se de alambiques distintos, as diferenças observadas podem originar do processo de fermentação pela contaminação do mosto com bactérias acéticas ou por aeração excessiva, que leva à oxidação de álcoois e aldeídos a ácidos. A estocagem da cana e o corte incorreto das frações durante a destilação também podem resultar em bebidas com teor mais elevado de ácidos. Além disso, durante o processo de envelhecimento, oxidações podem ocorrer devido às condições de armazenamento e porosidade da madeira, bem como à incorporação à bebida de ácidos provenientes do barril (CARDOSO, 2006). Segundo Nascimento et al. (1998), o ácido encontrado em maior quantidade é o ácido acético (90% do total de 14 ácidos identificados), e sua presença em pequena quantidade é desejável, pois contribui para a formação dos ésteres.

Na Instrução Normativa de nº 13, de junho de 2005, o teor máximo estabelecido para o somatório das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural é 5,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005). Para as amostras analisadas, 70% apresentaram limites superiores ao estabelecido, com concentrações que variaram de 0,85 a 25,62 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. O furfural e hidroximetilfurfural são produzidos, principalmente, da degradação das pentoses e hexoses, respectivamente. Esses açúcares podem ser degradados quando a colheita da cana é precedida da queima do palhiço ou quando a destilação ocorre na presença de matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques (MASSON et al., 2007). Quanto ao processo de envelhecimento, esse pode contribuir para o aumento desses aldeídos quando os barris de madeira

passam pelo processo de requeima antes do armazenamento (AZEVEDO et al., 2007).

Como na região sul de Minas Gerais não é comum a colheita precedida da queima do palhicho, a alta concentração observada em 70% das amostras pode ser atribuída a parâmetros do processo de destilação e envelhecimento citados anteriormente. Portanto, faz-se necessário promover a conscientização dos produtores para o controle desse contaminante, uma vez que sua ingestão e contato podem causar dermatite, irritação da mucosa e trato respiratório e afetar o sistema nervoso central. Medidas de prevenção devem ser inseridas ao processo, que perpassam pela inserção da colheita mecanizada, controle adequado da fermentação para a não destilação de açúcar residual, ou pela filtragem adequada para que esse processo não ocorra na presença de bagacilhos (MAIA, 2002; AZEVEDO et al., 2007).

Considerando os limites estabelecidos pela legislação brasileira quanto à concentração de cobre na bebida (5 mg L^{-1}), observa-se que apenas a amostra H excedeu esse valor ($8,48 \text{ mg L}^{-1}$). No entanto, se avaliarmos essas amostras segundo os parâmetros para exportação, 50% estariam fora dos padrões internacionais (2 mg L^{-1}). Em estudos similares, Labanca et al. (2006) analisaram 71 amostras de cachaça da região de Minas Gerais, encontrando 7% das amostras fora dos padrões da legislação vigente. Quando analisadas em relação ao limite do mercado externo (2 mg L^{-1}), apenas 50,7% atenderiam aos padrões internacionais. No estado do Rio Grande do Sul, Garbin, Bogusz Junior e Montano (2005) constataram que, das 25 amostras analisadas, 38,3% apresentaram teores elevados de cobre.

Embora o cobre seja desejável em baixas concentrações, pois promove a redução ou eliminação do gás sulfídrico e dos tióis, atuando como catalisador nas reações de oxidação a sulfeto e dissulfeto, em altas concentrações, esse metal pode causar uma séria doença conhecida como hipercupremia. Em altas

concentrações, o metal pode reagir com grupos SH das proteínas e enzimas, o que está relacionado a doenças como epilepsia, melanoma e artrite reumática (SARGENTELLI et al., 1996; NASCIMENTO et al., 1998; CARDOSO; LIMA-NETO; FRANCO, 2003).

Como o cobre advém principalmente da dissolução do carbonato básico de cobre $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3]$ presente nas paredes internas do alambique, pelos vapores ácidos da bebida, a contaminação da bebida pode ser evitada fazendo uma cuidadosa higienização dos alambiques nas safras e entressafras, utilizando-se água e limão na primeira destilação (CARDOSO, 2006). Propõe-se também a utilização de filtros com adsorventes, como o carvão ativado e as resinas de troca iônica. Portanto, deve-se ter cuidado na utilização desses últimos, pois alguns materiais retiram, além do cobre, substâncias importantes para o sabor e aroma da bebida, descaracterizando-a (LIMA et al., 2006 e CANTÃO et al., 2010). Materiais alternativos também têm sido estudados para a remoção do metal, tais como CaCO_3 e MgCO_3 , sílicas, aluminossilicatos e argilas; porém, a não interferência na concentração dos congêneres deve ser observada (BIZELLI; RIBEIRO; NOVAES, 2000; CATANHEDE et al., 2005; NEVES et al., 2007; CANTÃO et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

Físico-quimicamente, 70% das amostras analisadas estão fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira. Valores inferiores ao estabelecido para a graduação alcoólica foi observado para a amostra H. Observam-se também valores superiores de acidez volátil (H), furfural (A, B, D, E, G, H, I) e cobre (H). Infere-se com esses resultados que o controle do processo produtivo da bebida apresenta deficiências, e práticas de conscientização devem ser realizadas. Ainda há uma grande lacuna dentro do processo de envelhecimento, em que parâmetros envolvendo a obtenção, o pré-tratamento do barril e as condições de armazenamento devem ser mais bem estabelecidos.

REFERÊNCIAS

- AZEVÊDO, L. C. et al. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1968-1975, dez. 2007.
- BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, 57, n. 4, p. 623-627, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Instrução normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.
- CANTANHEDE, L. B. et al. Uso de sílica e sílica-titânia organofuncionalizadas para a remoção de Cu(II) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 500-505, jul./set. 2005.
- CANTÃO, F. O. et al. Avaliação e remoção de cobre em aguardentes de cana pela utilização dos aluminossilicatos: zeólita e bentonita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1109-1115, set./out. 2010.
- CARDOSO, D. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n.2, p. 165-169, mar./abr. 2003.
- CARDOSO, M. das G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 444 p.
- CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.; ALABURDA, J. Avaliação do teor alcoólico e componentes secundários de cachaças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67 n. 1, p. 28-33, 2008.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6 (Build 61). Lavras: UFLA/DEX, 2003. Software.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA. **Mercado**. Disponível em: < <http://www.ibraccachacas.org>>. Acesso em: 5 jul. 2012.

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

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

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

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

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Editora, 2004.

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

MIRANDA, M. B. et al. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 84-89, 2008.

MORI, F. A. et al. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento de aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 396-400, 2003.

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

NEVES, E. A. et al. Simple and efficient elimination of copper(II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 101, p. 33-36, 2007.

QUEIROZ, L. **História da cachaça**. Disponível em:
<<http://www.museudacachaca.com.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

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

SARGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem, **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 290-293, 1996.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cachaça artesanal estudos de mercado**. Brasília, 2008. 42 p. Disponível em:
<<http://www.biblioteca.sebrae.com.br/>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

**CAPÍTULO 3: EFEITO DA LUMINOSIDADE NA COMPOSIÇÃO
FENÓLICA DE AGUARDENTES DE CANA/ CACHAÇAS
ARMAZENADAS EM VIDRO POR UM PERÍODO DE SEIS MESES**

RESUMO

A cachaça envelhecida é apreciada pelos consumidores devido, principalmente, ao seu sabor alcoólico mais suave, mais doce e amadeirado. É uma etapa do processo de produção não obrigatória, mas bastante adotado por produtores que buscam agregar valor ao produto final. Durante o envelhecimento, diversas reações ocorrem entre os compostos presentes no destilado e os compostos da madeira. A extração e incorporação dos compostos presentes na madeira dependem das condições ambientais do armazenamento, bem como da espécie vegetal e parte dela é empregada para a confecção dos barris. Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da luz e do período de armazenamento na composição fenólica das cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira. Os treze compostos fenólicos analisados foram quantificados por HPLC com detector de arranjo de diodos. Aliquotas foram analisadas no tempo 0, 2, 4 e 6 meses após o acondicionamento, sob a presença e ausência de luz natural. O ácido gálico foi o composto majoritário das amostras A, C, D, F e I, sofrendo influência da luminosidade durante o período de armazenamento, com diminuição mais acentuada da concentração nas amostras armazenadas no escuro, exceto na amostra F, na qual se observou um aumento na concentração. Nas amostras envelhecidas em carvalho (B, G e J), constatou-se a presença de siringaldeído como composto majoritário, com comportamentos distintos frente ao tratamento luminosidade. Na amostra H, observou-se apenas a presença de catequina em baixa concentração, tendo a luz contribuído significativamente para a degradação desse composto. Na amostra E, constatou-se a presença de 1,2-benzopirona (cumarina) em concentrações de aproximadamente 13 mg L^{-1} . Todas as amostras analisadas apresentaram heterogeneidade na composição fenólica, diferindo apenas na concentração deles, exceto a amostra H, na qual se quantificou apenas a catequina em baixa concentração.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Madeira. Cachaça. Luminosidade.

ABSTRACT

Aged sugarcane spirits are appreciated by consumers mainly because of their woody, softer, sweeter alcoholic flavor. It is a non-obligatory stage of the production process, but quite adopted by producers that seek to aggregate value to the final product. During the aging, several reactions occur among the compounds present in the distillate and wood compounds. The extraction and incorporation of the compounds present in the wood depends on the environmental conditions of the storage, as well as the plant species and its part used for barrel making. As such, the objective of this study was to evaluate the influence of light and storage period on the phenolic composition of the sugarcane spirits aged in different wood barrels. The thirteen phenolic compounds analyzed were quantified by HPLC with diode array detector. Aliquots were analyzed at 0, 2, 4 and 6 months after packaging, under the presence and absence of natural light. Gallic acid was the majority compound of the samples A, C, D, F and I, undergoing influence of the light during the storage period, with an accentuated decrease of the concentration in the samples stored in the darks, except sample F. In the samples aged in oak (B, G and J), the syringaldehyde presence was verified as the majority compound, with different behaviors in view of the light treatment. In the sample H, only the catechin presence was observed in low concentration, the light having contributed significantly to the degradation of that compound. In the sample E, the presence of 1,2-benzopyrone (coumarin) was verified at concentrations of approximately 13 mg L^{-1} . All of the analyzed samples presented heterogeneity in the phenolic composition, only differing in their concentration, except sample H, in which only catechin was quantified at low concentrations.

Key words: Phenolic compounds. Wood. Sugarcane spirits. Luminosity.

1 INTRODUÇÃO

Bebidas alcoólicas recém-destiladas, em geral, apresentam características sensoriais pouco apreciadas por parte dos consumidores. O envelhecimento de bebidas em tonéis de madeira é largamente empregado pela indústria em razão das conhecidas melhorias sensoriais conferidas às bebidas submetidas a este processo. Essa é a razão pela qual o uísque, o rum, o conhaque e a grappa, por exemplo, incluem em seu processo de produção a etapa de armazenagem em tonéis de madeira. Em alguns casos, como os do uísque e do conhaque, essa etapa é obrigatória para a sua comercialização (SILVA et al., 2012).

Segundo a legislação brasileira, há três denominações para a bebida, cachaça envelhecida, cachaça premium e extra premium. Todas devem ser envelhecidas em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L. Para ser denominada envelhecida, deve-se envelhecer no mínimo 50% de cachaça por um período de 1 ano. Para denominá-las de premium ou extra premium, deve-se envelhecer 100% de cachaça por um período não inferior a um e três anos, respectivamente (BRASIL, 2005).

O envelhecimento, embora não seja uma etapa obrigatória na cadeia produtiva da cachaça, tem sido muito empregada pelos produtores que desejam agregar qualidade e valor ao seu produto, pois promove a diminuição significativa do sabor alcoólico e da agressividade da bebida, aumentando simultaneamente a doçura e o sabor de madeira, proporcionando efetiva melhoria sensorial do produto (MIRANDA et al., 2008).

A mudança do aroma, cor e sabor da bebida maturada deve-se a alterações na composição e na concentração dos seus compostos, as quais são causadas por extração dos compostos da madeira; quebra de suas macromoléculas e extração dos seus produtos; reações entre os compostos do

destilado e da madeira; reação entre os próprios extrativos da madeira; reação entre os próprios componentes do destilado; e evaporação dos compostos voláteis (MOSEDALE; PUECH, 1998).

Os fatores que influenciam a qualidade e a composição química da cachaça envelhecida são: tipo de madeira empregada e pré-tratamento sofrido pelo barril, tempo e condições de envelhecimento (temperatura e umidade), tamanho do recipiente e qualidade inicial do destilado (PARAZZI et al., 2008).

A madeira mundialmente utilizada para a confecção de tonéis para o envelhecimento de bebidas destiladas é o carvalho. No entanto, essa madeira deve ser importada elevando o custo e sendo, na maioria das vezes, reutilizada de processos de envelhecimento de vinhos e uísques. Observa-se nos últimos anos uma crescente busca por madeiras nacionais que promovam à bebida características sensoriais similares ao carvalho. Diversos trabalhos atestam e caracterizam cachaças envelhecidas em madeiras como amendoim, pereiro, jatobá, bálsamo, pau-d'arco, jequitibá, louro-canela e amburana (DIAS; MAIA; NELSON, 2002; FARIA et al., 2003; AQUINO et al., 2006; ZACARONI et al., 2011, CATÃO et al., 2011).

Os principais compostos extraídos da madeira dos barris pelos destilados são óleos voláteis, substâncias tânicas, açúcares, glicerol e ácidos orgânicos não voláteis (NISHIMURA; MATSUYAMA, 1989). Aos compostos fenólicos são atribuídas as principais mudanças de aroma e sabor observados na cachaça envelhecida. Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a influência da luminosidade na composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as amostras foram coletadas e analisadas conforme apresentado abaixo.

2.1 Obtenção das amostras

Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de 2 meses, durante um período de 6 meses, das amostras de cachaça envelhecidas sob diferentes condições (Tabela 1), acondicionadas em garrafas transparentes e em garrafas cobertas com folha de alumínio, constituindo-se os tratamentos do experimento. Durante a realização do experimento, tanto os recipientes de vidro como os cobertos com folha de alumínio foram armazenados à temperatura ambiente e expostos à luminosidade natural, na bancada do laboratório, objetivando-se avaliar o seu período de prateleira. Essas amostras foram analisadas por HPLC quanto à sua composição fenólica no Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente do Departamento de Química da UFLA.

Tabela 1 Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).

Amostra	Local	Madeira	Capacidade do barril (L)	Tempo de armazenamento (meses)
A	Passa Quatro	Castanheira	700	36
B	Passa Quatro	Carvalho	200	36
C	Passa Quatro	Jequitibá	20.000	36
D	Barbacena	Jequitibá	10.000	60
E	Lavras	Amburana	10.000	48
F	Piranguinho	Louro-canela	50.000	24
G	Piranguinho	Carvalho	50.000	48
H	Itajubá	Jatobá	4.000	6
I	Itajubá	Carvalho	1.000	24
J	Perdões	Carvalho	200	12

2.2 Reagentes e solventes

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

2.3 Preparação das amostras e padrões

Os analitos foram quantificados pelo método de padronização externa. As curvas analíticas foram construídas por diluições das soluções-estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de cada padrão solubilizado em etanol 40%. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação (R²) de 0,9900. Um total de 10 amostras de cachaças foram analisadas em duplicata.

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

2.4 Equipamento

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

2.5 Metodologia e condições cromatográficas

Utilizou-se para o experimento o método analítico validado por Anjos (2011).

Os solventes de eluição utilizados foram solução de ácido acético 2% em água (Fase A) e metanol: água: ácido acético (70: 20: 2% v/v) (Fase B). As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente apresentado na Tabela 2. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

Tabela 2 Gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos.

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

*Fase móvel: Solvente A – solução de ácido acético 2% em água

Solvente B – metanol: água: ácido acético (70: 28: 2% v/v)

A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões. A quantificação foi feita utilizando a padronização externa com concentrações que variaram de: ácido gálico (0,071 – 1,565 mg L⁻¹), catequina (0,116 -2,322 mg L⁻¹), ácido vanílico (0,067 – 1,345 mg L⁻¹), fenol (0,038 – 0,866 mg L⁻¹), ácido siríngico (0,079 - 1,823 mg L⁻¹), vanilina (0,061 - 1,582 mg L⁻¹), siringaldeído (0,073 – 1,895 mg L⁻¹), ácido *p*-cumárico (0,066 – 1,312 mg L⁻¹), ácido sinápico (0,090 – 2,063 mg

L⁻¹), cumarina (0,058 – 1,169 mg L⁻¹), 4-metilumbeliferona (0,070 – 1,832 mg L⁻¹), ácido *o*-cumárico (0,066 – 1,509 mg L⁻¹) e eugenol (0,066 – 1,902 mg L⁻¹). No entanto, para amostras que apresentaram concentrações elevadas de alguns desses compostos, diluições foram realizadas em etanol 40 % para ajuste à curva analítica. Calcularam-se também os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, baseando-se nos parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando as seguintes relações matemáticas (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997):

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

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

Em que: *s* é a estimativa do desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e *S* é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

2.6 Delineamento experimental

Os resultados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Scott Knott (1974), ao nível de 95% de confiança. Para a avaliação dos dados, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com os tratamentos dispostos em esquema fatorial (10 X 4 X 2), sendo dez amostras de diferentes tonéis, quatro tempos de coleta (0, 2, 4 e 6 meses) e condições de luminosidade (claro e escuro), com duas repetições. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar, segundo Ferreira (2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram analisadas quanto a presença de 13 compostos fenólicos utilizando a técnica de cromatografia.

3.1 Análises cromatográficas

A Figura 1 ilustra o perfil cromatográfico de todos os padrões analisados, podendo-se observar a separação de todos os compostos.

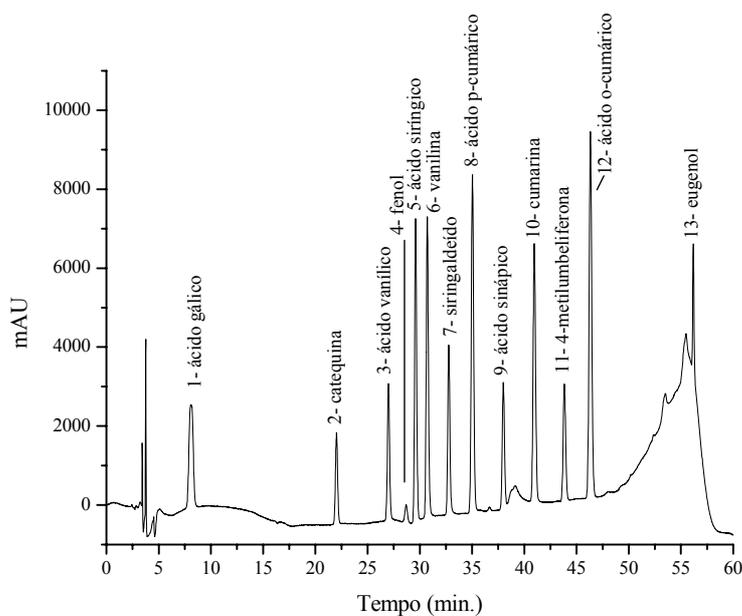


Figura 1 Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica. Concentração de cada padrão: $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

Na Tabela 3 tem-se o tempo de retenção médio obtido para cada composto analisado, na qual se observa a não coeluição entre os compostos, sendo esses um parâmetro importante para a identificação e quantificação do composto.

Tabela 3 Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos analisados.

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

*Média ± desvio padrão.

Na Figura 2, observa-se a sobreposição dos cromatogramas da amostra A armazenados sob a presença e ausência de luz, no mês 0 e após seis meses de armazenamento em luz natural. Observam-se variações apenas do ácido *o*-cumárico armazenado sob a presença de luz e dos ácidos gálico e *o*-cumárico para a amostra armazenada sob a ausência de luz.

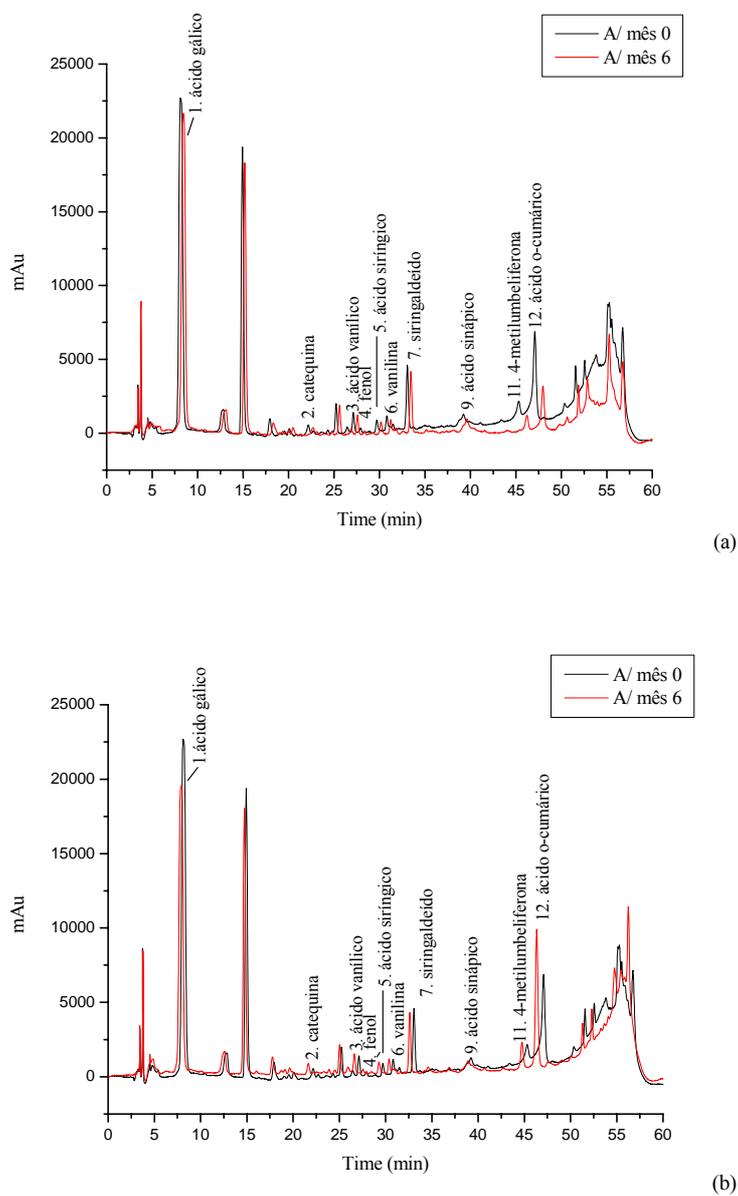


Figura 2 Sobreposição dos cromatogramas da amostra A, no mês 0 e no mês 6, armazenada sob a presença (a) e sob a ausência de luz (b)

As equações das curvas analíticas foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados, medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração, após a injeção em triplicata das soluções contendo todos os padrões. Por meio dessas, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de determinação, que é um parâmetro que permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009). A Anvisa, Brasil (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Inmetro (2003), um valor acima de 0,90. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, podem-se observar coeficientes de correlação variando de 0,9949 a 0,9998 indicando forte correlação linear entre as concentrações das substâncias e as áreas dos picos.

Tabela 4 Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas*.

Composto	b	a	R^2
Ácido gálico	58170,08637	-1636,74687	0,9982
Catequina	14684,47967	-33,65995	0,9996
Ácido vanílico	38336,08005	-350,87278	0,9996
Fenol	9963,46341	-153,8343	0,9991
Ácido siríngico	67465,54859	-515,73199	0,9998
Vanilina	90908,88265	-342,08561	0,9998
Siringaldeído	42417,97624	-928,67925	0,9993
Ácido <i>p</i> -cumárico	104685,92255	7,4115	0,9998
Ácido sinápico	27967,09852	-1275,34555	0,9992
Cumarina	92644,51366	-568,47925	0,9998
4-metilumbeliferona	37331,72435	-1369,2762	0,9995
Ácido <i>o</i> -cumárico	127440,90374	-296,05277	0,9998
Eugenol	21316,24767	509,6179	0,9949

*Regressão linear: $y = bx + a$

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para o método analítico estão apresentados na Tabela 5. Os valores encontrados variaram de 0,0178 a 0,1630 mg L⁻¹ para o LD e de 0,0541 a 0,4940 mg L⁻¹ para o LQ, valores esses correspondentes a cumarina e eugenol. Esses valores mostraram-se próximos aos obtidos por Anjos et al. (2011) e inferiores aos relatados por Aquino et al. (2006) e Zaccaroni et al. (2011).

Tabela 5 Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos analisados.

Composto	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido gálico	0,0694	0,2103
Catequina	0,0529	0,1604
Ácido vanílico	0,0269	0,0814
Fenol	0,0322	0,0977
Ácido siríngico	0,0303	0,0918
Vanilina	0,0240	0,0727
Siringaldeído	0,0509	0,1542
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,0214	0,0649
Ácido sinápico	0,0710	0,2151
Cumarina	0,0178	0,0541
4-metilumbeliferona	0,0461	0,1397
Ácido <i>o</i> -cumárico	0,0240	0,0728
Eugenol	0,1630	0,4940

3.2 Quantificação dos compostos fenólicos

A quantificação dos compostos fenólicos nas amostras analisadas, a cada dois meses, durante os seis meses de armazenamento, sob a presença e ausência de luz, estão apresentados nas Tabelas 6 à 15.

Observa-se estatisticamente que, para a maioria dos compostos analisados, nas diferentes amostras, a luminosidade e/ou período analisado

interferiram significativamente, principalmente na concentração dos compostos majoritários. Como esperado, esses compostos fenólicos podem ser degradados fotoquimicamente, principalmente em função das hidroxilas presentes em sua estrutura química, que podem sofrer facilmente reações de oxidação. Essas oxidações ocorrem devido ao aumento de energia do meio, ocasionado pela luz. Além dessas reações, outras podem ser ativadas tais como, condensação, polimerização e epimerização (LOCKHART; PAINE, 1996).

Tabela 6 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados na amostra A (Passa Quatro/ Castanheira/ 700L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	11,16 ± 0,727 Aa	11,11 ± 0,295 Aa	10,07 ± 0,050 Bb	10,93 ± 0,013 Aa
	Escuro	11,16 ± 0,727 Aa	10,95 ± 0,019 Aa	10,50 ± 0,047 Ab	9,68 ± 0,021 Bc
Catequina	Claro	0,86 ± 0,037 Aa	0,88 ± 0,019 Aa	0,78 ± 0,001 Aa	0,50 ± 0,001 Bb
	Escuro	0,86 ± 0,037 Aa	0,83 ± 0,046 Aa	0,88 ± 0,012 Aa	0,80 ± 0,019 Aa
Ácido vanílico	Claro	0,50 ± 0,007 Aa	0,54 ± 0,006 Aa	0,51 ± 0,001 Aa	0,51 ± 0,003 Aa
	Escuro	0,50 ± 0,010 Aa	0,50 ± 0,019 Aa	0,51 ± 0,04 Aa	0,48 ± 0,001 Aa
Fenol	Claro	0,21 ± 0,003 Aa	0,29 ± 0,089 Aa	0,25 ± 0,001 Aa	0,30 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,21 ± 0,003 Aa	0,24 ± 0,054 Aa	0,26 ± 0,012 Aa	0,25 ± 0,011 Aa
Ácido siringico	Claro	0,19 ± 0,004 Aa	0,21 ± 0,003 Aa	0,20 ± 0,001 Aa	0,21 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,19 ± 0,004 Aa	0,19 ± 0,001 Aa	0,18 ± 0,013 Aa	0,17 ± 0,017 Aa
Vanilina	Claro	0,13 ± 0,001 Aa	0,09 ± 0,003 Aa	0,11 ± 0,003 Aa	0,12 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,13 ± 0,001 Aa	0,12 ± 0,001 Aa	0,14 ± 0,001 Aa	0,13 ± 0,001 Aa
Siringaldeído	Claro	1,64 ± 0,004 Aa	1,65 ± 0,018 Aa	1,50 ± 0,017 Aa	1,62 ± 0,001 Aa
	Escuro	1,64 ± 0,004 Aa	1,58 ± 0,015 Aa	1,55 ± 0,010 Aa	1,48 ± 0,001 Aa
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LD	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido sinápico	Claro	0,29 ± 0,007 Aa	0,35 ± 0,005 Aa	0,33 ± 0,087 Aa	0,34 ± 0,035 Aa
	Escuro	0,29 ± 0,007 Aa	0,31 ± 0,010 Aa	0,28 ± 0,023 Aa	0,29 ± 0,035 Aa
Cumarina	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Continua..

Tabela 6, continuação

4- metilumbeliferona	Claro	0,11 ± 0,007 Aa	0,12 ± 0,014 Aa	0,13 ± 0,007 Aa	0,13 ± 0,013 Aa
	Escuro	0,11 ± 0,007 Aa	0,11 ± 0,002 Aa	0,12 ± 0,017 Aa	0,13 ± 0,021 Aa
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	0,85 ± 0,038 Aa	0,71 ± 0,086 Bb	0,88 ± 0,004 Ba	0,60 ± 0,004 Bb
	Escuro	0,85 ± 0,038 Ab	1,04 ± 0,010 Ab	1,54 ± 0,029 Aa	1,47 ± 0,011 Aa
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 7 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados na amostra B (Passa Quatro/ Carvalho/ 200L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	0,68 ± 0,017 Aa	0,50 ± 0,051 Bd	0,59 ± 0,009 Ac	0,64 ± 0,015 Ab
	Escuro	0,68 ± 0,017 Aa	0,55 ± 0,053 Ab	0,57 ± 0,041 Ab	0,67 ± 0,010 Aa
Catequina	Claro	0,17 ± 0,002 Ab	0,16 ± 0,002 Ab	0,15 ± 0,006 Ab	0,20 ± 0,002 Aa
	Escuro	0,17 ± 0,002 Aa	0,16 ± 0,009 Aa	0,16 ± 0,015 Aa	0,16 ± 0,001 Aa
Ácido vanílico	Claro	0,21 ± 0,005 Ab	0,18 ± 0,012 Ab	0,18 ± 0,027 Ab	0,25 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,21 ± 0,005 Aa	0,20 ± 0,007 Aa	0,20 ± 0,001 Aa	0,22 ± 0,006 Aa
Fenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Ácido siríngico	Claro	0,40 ± 0,006 Aa	0,41 ± 0,043 Aa	0,40 ± 0,013 Aa	0,39 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,40 ± 0,006 Aa	0,40 ± 0,030 Aa	0,39 ± 0,001 Aa	0,39 ± 0,002 Aa
Vanilina	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Siringaldeído	Claro	1,23 ± 0,004 Ab	1,28 ± 0,020 Aa	1,17 ± 0,080 Ac	1,24 ± 0,003 Ab
	Escuro	1,23 ± 0,004 Aa	1,25 ± 0,011 Aa	1,26 ± 0,031 Aa	1,23 ± 0,002 Aa
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	0,16 ± 0,005 Aa	0,13 ± 0,002 Aa	0,13 ± 0,004 Aa	0,14 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,16 ± 0,005 Aa	0,15 ± 0,014 Aa	0,16 ± 0,007 Aa	0,16 ± 0,002 Aa
Ácido sinápico	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Cumarina	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

Continua...

Tabela 7, continuação

4- metilumbeliferona	Claro	0,09 ± 0,005 Aa	0,12 ± 0,033 Aa	0,12 ± 0,007 Aa	0,13 ± 0,005 Aa
	Escuro	0,09 ± 0,005 Aa	0,11 ± 0,003 Aa	0,11 ± 0,006 Aa	0,13 ± 0,001 Aa
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	0,33 ± 0,015 Ab	0,33 ± 0,015 Ab	0,39 ± 0,083 Ba	0,36 ± 0,010 Ba
	Escuro	0,33 ± 0,015 Ab	0,30 ± 0,012 Ab	0,49 ± 0,004 Aa	0,47 ± 0,002 Aa
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 8 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados na amostra C (Passa Quatro/ Jequitibá/ 20.000L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento. 125

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	0,82 ± 0,059 Aa	0,69 ± 0,019 Bb	0,64 ± 0,001 Ac	0,66 ± 0,017 Ac
	Escuro	0,82 ± 0,059 Aa	0,71 ± 0,008 Ab	0,54 ± 0,028 Bd	0,60 ± 0,004 Bc
Catequina	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	0,26 ± 0,024 Aa	0,26 ± 0,024 Aa	0,22 ± 0,024 Ab
Ácido vanílico	Claro	0,08 ± 0,001 Aa	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	0,08 ± 0,001 Aa	<LQ	<LQ	<LQ
Fenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Ácido siríngico	Claro	0,17 ± 0,001 Aa	0,17 ± 0,002 Aa	0,17 ± 0,003 Aa	0,17 ± 0,006 Aa
	Escuro	0,17 ± 0,001 Aa	0,18 ± 0,015 Aa	0,15 ± 0,002 Ab	0,18 ± 0,002 Aa
Vanilina	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Siringaldeído	Claro	0,34 ± 0,002 Aa	0,32 ± 0,008 Ab	0,28 ± 0,018 Bc	0,31 ± 0,004 Ab
	Escuro	0,34 ± 0,002 Aa	0,32 ± 0,005 Ab	0,31 ± 0,008 Ab	0,31 ± 0,006 Ab
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido sinápico	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Cumarina	Claro	0,14 ± 0,001 Aa	0,15 ± 0,003 Aa	0,14 ± 0,001 Aa	0,14 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,14 ± 0,001 Aa	0,15 ± 0,002 Aa	0,14 ± 0,001 Aa	0,14 ± 0,003 Aa

Continua...

Tabela 8, continuação

4- metilumbeliferona	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	0,13 ± 0,004 Ab	0,13 ± 0,001 Ab	0,17 ± 0,016 Ba	0,16 ± 0,009 Ba
	Escuro	0,13 ± 0,004 Ab	0,14 ± 0,004 Ab	0,23 ± 0,004 Aa	0,21 ± 0,001 Aa
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

126

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 9 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados amostra D (Barbacena/ Jequitibá/ 10.000L/ 60 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.

127

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	2,79 ± 0,030 Ab	2,80 ± 0,020 Ab	2,93 ± 0,026 Aa	2,77 ± 0,054 Ab
	Escuro	2,79 ± 0,030 Aa	2,59 ± 0,022 Bb	2,55 ± 0,032 Bb	2,58 ± 0,040 Bb
Catequina	Claro	0,21 ± 0,002 Ab	0,32 ± 0,045 Aa	0,28 ± 0,016 Aa	0,27 ± 0,056 Ba
	Escuro	0,21 ± 0,002 Ab	0,34 ± 0,008 Aa	0,31 ± 0,011 Aa	0,33 ± 0,071 Aa
Ácido vanílico	Claro	0,10 ± 0,004 Aa	0,11 ± 0,005 Aa	0,10 ± 0,003 Aa	0,11 ± 0,002 Aa
	Escuro	0,10 ± 0,004 Aa	0,11 ± 0,002 Aa	0,11 ± 0,008 Aa	0,09 ± 0,001 Aa
Fenol	Claro	0,11 ± 0,008 Aa	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	0,11 ± 0,008 Aa	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido siríngico	Claro	0,08 ± 0,002 Ab	0,42 ± 0,014 Aa	0,44 ± 0,008 Aa	0,43 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,08 ± 0,002 Ad	0,22 ± 0,003 Bc	0,29 ± 0,002 Bb	0,35 ± 0,007 Ba
Vanilina	Claro	<LD	<LD	0,08 ± 0,023 Aa	0,10 ± 0,004 Aa
	Escuro	<LD	<LQ	<LQ	<LQ
Siringaldeído	Claro	1,03 ± 0,023 Aa	1,05 ± 0,005 Aa	0,99 ± 0,002 Ab	1,07 ± 0,001 Aa
	Escuro	1,03 ± 0,023 Aa	1,08 ± 0,009 Aa	0,99 ± 0,002 Ab	0,99 ± 0,002 Bb
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido sinápico	Claro	0,32 ± 0,004 Aa	0,31 ± 0,016 Aa	0,30 ± 0,013 Aa	0,34 ± 0,015 Aa
	Escuro	0,32 ± 0,004 Aa	0,34 ± 0,045 Aa	0,20 ± 0,002 Bb	0,23 ± 0,007 Bb
Cumarina	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD

		Escuro	<LD	<LD	<LD	<LD
Tabela 9, continuação						Continua...
4- metilumbeliferona	Claro	0,18 ± 0,009 Aa	0,13 ± 0,030 Aa	0,13 ± 0,001 Aa	0,15 ± 0,013 Aa	
	Escuro	0,18 ± 0,009 Aa	0,17 ± 0,019 Aa	0,12 ± 0,001 Ab	0,12 ± 0,008 Ab	
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	0,14 ± 0,002 Ab	0,19 ± 0,024 Aa	0,21 ± 0,013 Aa	0,18 ± 0,003 Ba	
	Escuro	0,14 ± 0,002 Ab	0,13 ± 0,003 Bb	0,24 ± 0,007 Aa	0,25 ± 0,003 Aa	
Eugenol	Claro	0,32 ± 0,089 Aa	0,30 ± 0,025 Aa	0,29 ± 0,073 Aa	0,28 ± 0,010 Aa	
	Escuro	0,32 ± 0,089 Aa	0,27 ± 0,034 Ab	0,33 ± 0,019 Aa	0,33 ± 0,033 Aa	

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 10 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados na amostra E (Lavras/ Amburana/ 10.000L/ 48 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.

129

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	0,26 ± 0,042 Aa	0,22 ± 0,009 Aa	0,20 ± 0,001 Aa	0,22 ± 0,012 Aa
	Escuro	0,26 ± 0,042 Aa	0,23 ± 0,004 Aa	0,24 ± 0,006 Aa	0,21 ± 0,002 Aa
Catequina	Claro	1,29 ± 0,011 Aa	1,44 ± 0,036 Aa	1,40 ± 0,044 Aa	1,27 ± 0,013 Aa
	Escuro	1,29 ± 0,011 Aa	1,2 ± 0,024 7Aa	1,33 ± 0,012 Aa	1,39 ± 0,012 Aa
Ácido vanílico	Claro	3,43 ± 0,026 Aa	3,48 ± 0,004 Aa	3,32 ± 0,003 Aa	3,29 ± 0,007 Aa
	Escuro	3,43 ± 0,026 Aa	3,37 ± 0,015 Aa	3,39 ± 0,007 Aa	3,23 ± 0,002 Aa
Fenol	Claro	0,10 ± 0,001 Aa	0,13 ± 0,004 Aa	0,10 ± 0,002 Aa	0,12 ± 0,014 Aa
	Escuro	0,10 ± 0,001 Aa	0,12 ± 0,001 Aa	0,10 ± 0,010 Aa	0,13 ± 0,002 Aa
Ácido siríngico	Claro	0,28 ± 0,004 Aa	0,35 ± 0,001 Aa	0,35 ± 0,002 Aa	0,34 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,28 ± 0,004 Aa	0,35 ± 0,006 Aa	0,29 ± 0,011 Aa	0,34 ± 0,002 Aa
Vanilina	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Siringaldeído	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido sinápico	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Cumarina	Claro	13,35 ± 0,039 Ab	13,88 ± 0,023 Aa	13,37 ± 0,019 Ab	13,04 ± 0,037 Ac
	Escuro	13,35 ± 0,039 Aa	13,52 ± 0,017 Ba	13,18 ± 0,006 Ab	12,95 ± 0,002 Ac

Continua...

Tabela 10, continuação

4- metilumbeliferona	Claro	1,93 ± 0,001 Ab	2,40 ± 0,030 Aa	2,32 ± 0,001 Aa	2,25 ± 0,054 A
	Escuro	1,93 ± 0,001 Ab	2,32 ± 0,002 Aa	1,87 ± 0,025 Bb	2,22 ± 0,002 Aa
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	<LQ	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LQ	<LD	<LD	<LD
Eugenol	Claro	10,27 ± 0,238 Aa	9,79 ± 0,153 Ab	10,25 ± 0,533 Aa	9,70 ± 0,202 Ab
	Escuro	10,27 ± 0,238 Aa	9,87 ± 0,784 Ab	9,83 ± 0,434 Bb	9,79 ± 0,302 Ab

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 11 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados na amostra F (Piranguinho/ Louro-canela/ 50.000L/ 24 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.

131

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	5,46 ± 0,052 Ab	5,43 ± 0,053 Bb	5,62 ± 0,015 Aa	5,35 ± 0,041 Bc
	Escuro	5,46 ± 0,052 Ab	5,75 ± 0,025 Aa	5,50 ± 0,033 Bb	5,48 ± 0,017 Ab
Catequina	Claro	1,20 ± 0,203 Aa	1,20 ± 0,158 Ba	0,77 ± 0,008 Bb	0,35 ± 0,080 Bc
	Escuro	1,20 ± 0,203 Ac	1,93 ± 0,135 Aa	1,83 ± 0,056 Ab	1,96 ± 0,049 Aa
Ácido vanílico	Claro	0,15 ± 0,012 Ab	0,22 ± 0,017 Aa	0,27 ± 0,008 Aa	0,23 ± 0,012 Aa
	Escuro	0,15 ± 0,012 Ab	0,20 ± 0,026 Ab	0,29 ± 0,019 Aa	0,11 ± 0,011 Bb
Fenol	Claro	0,14 ± 0,008 Aa	0,14 ± 0,005 Aa	0,10 ± 0,002 Aa	0,14 ± 0,012 Aa
	Escuro	0,14 ± 0,008 Aa	0,11 ± 0,032 Aa	0,17 ± 0,003 Aa	0,15 ± 0,022 Aa
Ácido siríngico	Claro	0,20 ± 0,012 Aa	0,19 ± 0,008 Aa	0,19 ± 0,010 Aa	0,19 ± 0,003 Aa
	Escuro	0,20 ± 0,012 Aa	0,18 ± 0,005 Aa	0,16 ± 0,006 Aa	0,19 ± 0,005 Aa
Vanilina	Claro	2,93 ± 0,007 Aa	2,91 ± 0,005 Aa	2,82 ± 0,001 Ab	2,70 ± 0,021 Ac
	Escuro	2,93 ± 0,007 Aa	2,96 ± 0,012 Aa	2,74 ± 0,004 Bb	2,70 ± 0,082 Ab
Siringaldeído	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	0,16 ± 0,004 Aa	0,19 ± 0,002 Aa	0,17 ± 0,002 Aa	0,21 ± 0,007 Aa

	Escuro	0,16 ± 0,004 Aa	0,16 ± 0,003 Aa	0,21 ± 0,003 Aa	0,18 ± 0,002 Aa
Ácido sinápico	Claro	0,39 ± 0,010 Ab	0,31 ± 0,002 Ab	0,57 ± 0,010 Aa	0,51 ± 0,003 Ba
	Escuro	0,39 ± 0,010 Ac	0,34 ± 0,017 Ac	0,45 ± 0,066 Bb	0,62 ± 0,016 Aa

Continua...

Tabela 11, continuação

Cumarina	Claro	1,11 ± 0,030 Aa	1,11 ± 0,009 Aa	1,20 ± 0,009 Aa	1,15 ± 0,003 A
	Escuro	1,11 ± 0,030 Aa	1,11 ± 0,009 Aa	1,03 ± 0,033 Bb	1,17 ± 0,017 Aa
4-metilumbeliferona	Claro	0,30 ± 0,011 Aa	0,29 ± 0,024 Aa	0,29 ± 0,008 Aa	0,28 ± 0,005 Aa
	Escuro	0,30 ± 0,011 Aa	0,29 ± 0,003 Aa	0,31 ± 0,001 Aa	0,24 ± 0,022 Aa
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

132

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 12 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados na amostra G (Piranguinho/ Carvalho/ 50.000L/ 48 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.

133

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	5,88 ± 0,025 Ac	6,54 ± 0,689 Aa	6,13 ± 0,035 Ab	5,70 ± 0,031 Bc
	Escuro	5,88 ± 0,025 Ac	6,45 ± 0,033 Aa	6,07 ± 0,014Ab	6,17 ± 0,310 Ab
Catequina	Claro	<LQ	0,22 ± 0,069 Aa	0,28 ± 0,008Aa	0,24 ± 0,024 Aa
	Escuro	<LQ	0,27 ± 0,004 Aa	0,35 ± 0,013 Aa	0,39 ± 0,201 Aa
Ácido vanílico	Claro	0,93 ± 0,054 Aa	0,75 ± 0,028 Ab	0,63 ± 0,018 Ab	0,55 ± 0,009 Ab
	Escuro	0,93 ± 0,054 Aa	0,35 ± 0,008 Bb	0,33 ± 0,002 Bb	0,36 ± 0,014 Bb
Fenol	Claro	0,27 ± 0,001 Aa	0,32 ± 0,006 Aa	0,29 ± 0,035 Aa	0,31 ± 0,030 Aa
	Escuro	0,27 ± 0,001 Aa	0,30 ± 0,002 Aa	0,19 ± 0,018 Aa	0,30 ± 0,041 Aa
Ácido siríngico	Claro	2,49 ± 0,005 Aa	2,55 ± 0,016 Ba	2,62 ± 0,005 Aa	2,63 ± 0,303 Aa
	Escuro	2,49 ± 0,005 Ac	2,90 ± 0,117 Aa	2,68 ± 0,009 Ab	2,43 ± 0,015 Bc
Vanilina	Claro	<LD	<LD	<LQ	<LQ
	Escuro	<LD	<LQ	<LQ	<LQ
Siringaldeído	Claro	18,93 ± 0,002 Ab	19,1 ± 0,135 1Ba	18,79 ± 0,001 Ab	17,74 ± 0,006 Bc
	Escuro	18,93 ± 0,002 Ab	19,42 ± 0,039 Aa	18,74 ± 0,020 Ac	18,28 ± 0,148 Ad
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	0,89 ± 0,006 Aa	0,91 ± 0,018 Aa	0,87 ± 0,070 Aa	0,93 ± 0,002 Aa

	Escuro	0,89 ± 0,006 Aa	0,92 ± 0,048 Aa	1,00 ± 0,001 Aa	0,86 ± 0,043 Aa
Ácido sinápico	Claro	0,48 ± 0,079 Aa	0,35 ± 0,002 Ba	0,43 ± 0,089Aa	0,37 ± 0,004 Aa
	Escuro	0,48 ± 0,079 Aa	0,58 ± 0,041 Aa	0,60 ± 0,016 Aa	0,54 ± 0,020 Aa
Cumarina	Claro	1,42 ± 0,005 Aa	1,60 ± 0,002 Aa	1,57 ± 0,009 Aa	1,47 ± 0,001 Aa
	Escuro	1,42 ± 0,005 Ab	1,57 ± 0,001 Aa	1,38 ± 0,033 Bb	1,59 ± 0,018 Aa

Continua...

Tabela 12, continuação

4- metilumbeliferona	Claro	0,13 ± 0,010 Aa	0,22 ± 0,003 Aa	0,20 ± 0,005 Aa	0,21 ± 0,008 Aa
	Escuro	0,13 ± 0,010 Aa	0,29 ± 0,011 Aa	0,24 ± 0,004 Aa	0,25 ± 0,041 Aa
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	1,73 ± 0,080 Ab	1,86 ± 0,048 Ab	2,15 ± 0,056 Aa	2,02 ± 0,015 Aa
	Escuro	1,73 ± 0,080 Ab	1,83 ± 0,068 Ab	2,22 ± 0,005 Aa	2,15 ± 0,024 Aa
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 13 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados amostra H (Itajubá/ Jatobá/ 4.000L/ 36 meses) durante os 6 meses de acondicionamento. 135

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Catequina	Claro	0,19 ± 0,002 Aa	<LQBb	<LQBb	<LQBb
	Escuro	0,19 ± 0,002 Aa	0,16 ± 0,007 Ac	0,17 ± 0,012 Ab	0,17 ± 0,001 Ab
Ácido vanílico	Claro	<LQ	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LQ	<LD	<LD	<LD
Fenol	Claro	<LQ	<LQ	ND	ND
	Escuro	<LQ	<LQ	ND	ND
Ácido siríngico	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Vanilina	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Siringaldeído	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD

	Escuro	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido sinápico	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Cumarina	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

Continua...

Tabela 13, continuação

4- metilumbeliferona	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LD	<LD	<LD
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

136

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 14 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados amostra I (Itajubá/ Carvalho/ 1.000L/ 24 meses) durante os 6 meses de acondicionamento.

137

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	0,84 ± 0,007 Aa	0,79 ± 0,077 Ab	0,86 ± 0,004 Aa	0,80 ± 0,002 Ab
	Escuro	0,84 ± 0,007 Aa	0,82 ± 0,005 Ab	0,81 ± 0,034 Bb	0,75 ± 0,015 Bc
Catequina	Claro	0,26 ± 0,014 Aa	0,22 ± 0,019 Ab	0,17 ± 0,017 Bc	0,19 ± 0,006 Ac
	Escuro	0,26 ± 0,014 Aa	0,25 ± 0,011 Aa	0,22 ± 0,011 Ab	0,20 ± 0,004 Ab
Ácido vanílico	Claro	0,09 ± 0,018 Ab	0,12 ± 0,017Aa	0,12 ± 0,008 Aa	0,14 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,09 ± 0,018 Ab	0,15 ± 0,010 Aa	0,11 ± 0,013 Aa	0,11 ± 0,005 Aa
Fenol	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido siríngico	Claro	0,33 ± 0,002 Aa	0,33 ± 0,011 Aa	0,30 ± 0,001 Ab	0,34 ± 0,001 Aa
	Escuro	0,33 ± 0,002 Aa	0,28 ± 0,012 Bb	0,27 ± 0,004 Ab	0,23 ± 0,001 Bc
Vanilina	Claro	0,19 ± 0,006 Ab	0,19 ± 0,010 Ab	0,22 ± 0,003 Aa	0,19 ± 0,003 Ab
	Escuro	0,19 ± 0,006 Aa	0,21 ± 0,010 Aa	0,19 ± 0,009 Ba	0,20 ± 0,001 Aa
Siringaldeído	Claro	0,62 ± 0,004 Aa	0,64 ± 0,008 Aa	0,60 ± 0,002 Aa	0,62 ± 0,003 Ba

	Escuro	0,62 ± 0,004 Ac	0,66 ± 0,009 Ab	0,58 ± 0,002 Ad	0,79 ± 0,001 Aa
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido sinápico	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LD	<LD	<LD	<LD
Cumarina	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LD	<LD	<LD	<LD

Continua...

Tabela 14, continuação

4- metilumbeliferona	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	0,28 ± 0,012 Ac	0,31 ± 0,010 Ab	0,48 ± 0,008 Aa	0,34 ± 0,008 Bb
	Escuro	0,28 ± 0,012 Ad	0,31 ± 0,002 Ac	0,43 ± 0,001 Bb	0,47 ± 0,001 Aa
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 15 Avaliação do efeito da luminosidade na concentração dos compostos fenólicos (mg L⁻¹) quantificados amostra J (Perdões/ Carvalho/ 200L/ 12 meses) durante os 6 meses de acondicionamento. 139

Compostos	Luminosidade	Período (mês)			
		0	2	4	6
Ácido gálico	Claro	0,96 ± 0,161 Ac	1,14 ± 0,006 Ab	1,11 ± 0,001 Ab	1,22 ± 0,016 Aa
	Escuro	0,96 ± 0,161 Ac	1,17 ± 0,008 Ab	1,14 ± 0,026 Ab	1,29 ± 0,015 Aa
Catequina	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ácido vanílico	Claro	0,22 ± 0,030 Aa	0,28 ± 0,014 Aa	0,29 ± 0,002 Aa	0,26 ± 0,005 Aa
	Escuro	0,22 ± 0,030 Aa	0,20 ± 0,025 Ba	0,25 ± 0,005 Aa	0,20 ± 0,002 Aa
Fenol	Claro	<LD	<LD	<LD	<LD
	Escuro	<LQ	<LD	<LD	<LD
Ácido siríngico	Claro	0,56 ± 0,089 Ab	0,68 ± 0,059 Aa	0,68 ± 0,005 Aa	0,66 ± 0,010 Aa
	Escuro	0,56 ± 0,089 Ab	0,63 ± 0,002 Aa	0,59 ± 0,002 Bb	0,64 ± 0,006 Aa
Vanilina	Claro	0,28 ± 0,010 Aa	0,27 ± 0,035 Aa	0,30 ± 0,004 Aa	0,30 ± 0,006 Aa
	Escuro	0,28 ± 0,010 Aa	0,31 ± 0,002 Aa	0,27 ± 0,001 Aa	0,30 ± 0,004 Aa

Siringaldeído	Claro	1,14 ± 0,025 Ab	1,20 ± 0,037 Aa	1,26 ± 0,010 Aa	1,13 ± 0,003 Ab
	Escuro	1,14 ± 0,025 Aa	1,19 ± 0,006 Aa	1,15 ± 0,002 Ba	1,19 ± 0,010 Aa
Ácido <i>p</i> -cumárico	Claro	0,10 ± 0,003 Aa	0,09 ± 0,005 Aa	0,09 ± 0,002 Aa	0,09 ± 0,003 Aa
	Escuro	0,10 ± 0,003 Aa	0,10 ± 0,002 Aa	0,10 ± 0,009 Aa	0,10 ± 0,002 Aa
Ácido sinápico	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cumarina	Claro	<LD	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LD	<LQ	<LQ

Continua...

Tabela 15, continuação

4-metilumbeliferona	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND
Ácido <i>o</i> -cumárico	Claro	0,48 ± 0,011 Ac	0,74 ± 0,033 Bb	0,96 ± 0,001 Ba	0,94 ± 0,005 Ba
	Escuro	0,48 ± 0,011 Ad	0,80 ± 0,053 Ac	1,08 ± 0,006 Ab	1,27 ± 0,003 Aa
Eugenol	Claro	ND	ND	ND	ND
	Escuro	ND	ND	ND	ND

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha e a maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Para as amostras envelhecidas em castanheira (A), jequitibá (C e D), louro-canela (F) e carvalho (I), o composto fenólico encontrado em maior quantidade foi o ácido gálico, tendo a amostra A teor mais elevado. Em todas essas amostras, constatou-se influência da luminosidade durante o período de armazenamento na concentração desse composto, com diminuição mais acentuada da concentração de ácido gálico nas amostras armazenadas no escuro, exceto na amostra F, na qual se observou um aumento na concentração nos meses 2 e 4 e diminuição mais acentuada na concentração de ácido gálico na amostra submetida à presença de luz (Figura 3).

Esse fenólico advém principalmente da degradação dos taninos condensados, que perfazem, aproximadamente, a metade da matéria seca da casca de muitas árvores (Figura 4). Na madeira, esses taninos constituem a segunda fonte de polifenóis, perdendo apenas para a lignina (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002). São substâncias responsáveis pela adstringência e amargor nas bebidas, são extraídos dos tonéis e gradativamente hidrolisados durante o processo de maturação, formando ácido gálico e elágico ou dímeros e oligômeros originados desses ácidos (SCALBERT; LAPIERRE; MOUTOUNETS, 1993).

A diminuição observada na concentração de ácido gálico nas amostras armazenadas sob a presença de luz pode se relacionar a possíveis oxidações das hidroxilas, redução do grupo carboxílico ou reações de condensação entre esse composto e outros presentes na matriz. Para as amostras sob a ausência de luz, a diminuição mais acentuada pode relacionar-se à disponibilidade dos taninos para sofrerem hidrólise, cuja reação é favorecida na presença de luz. Além disso, dímeros e oligômeros podem ser formados, conforme citado acima (SCALBERT; LAPIERRE; MOUTOUNETS, 1993). Como essas reações são dependentes do meio (concentração inicial de espécies reagentes, pH do meio, temperatura, condições de envelhecimento, disponibilidade de oxigênio e da

concentração de agentes antioxidantes), o aumento observado na amostra F pode relacionar-se à disponibilidade dos taninos para sofrerem a hidrólise e a não ocorrência de oxidações.

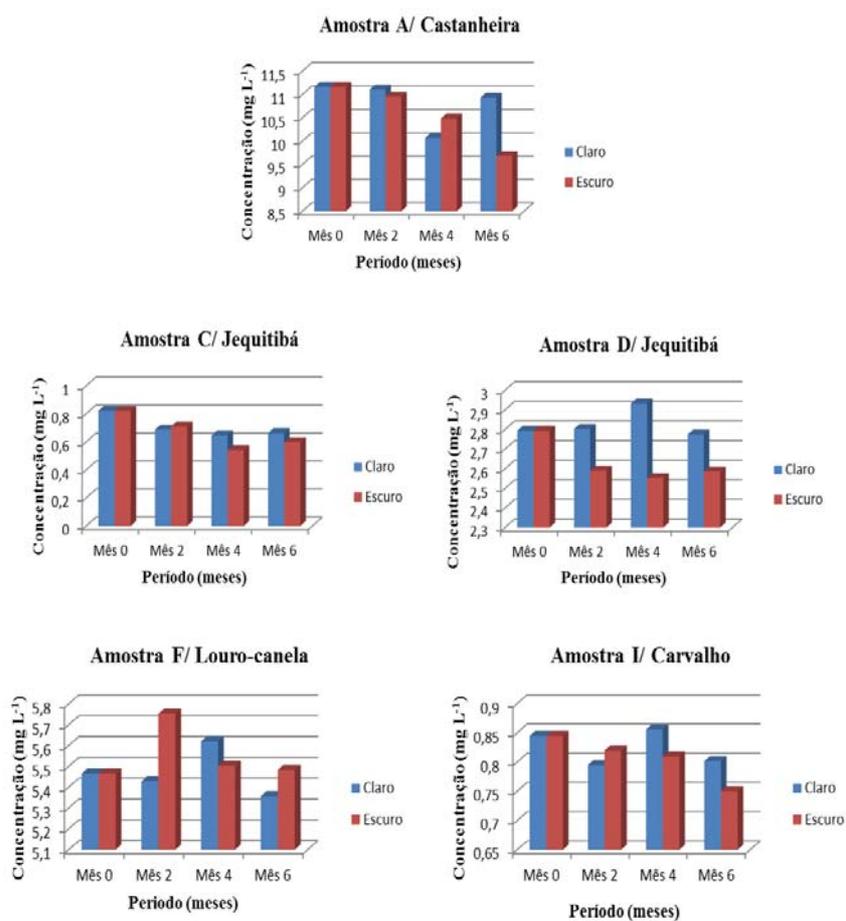


Figura 3 Influência da luz na concentração de ácido gálico em amostras de cachaça armazenadas em vidro na ausência e presença de luz, por um período de seis meses

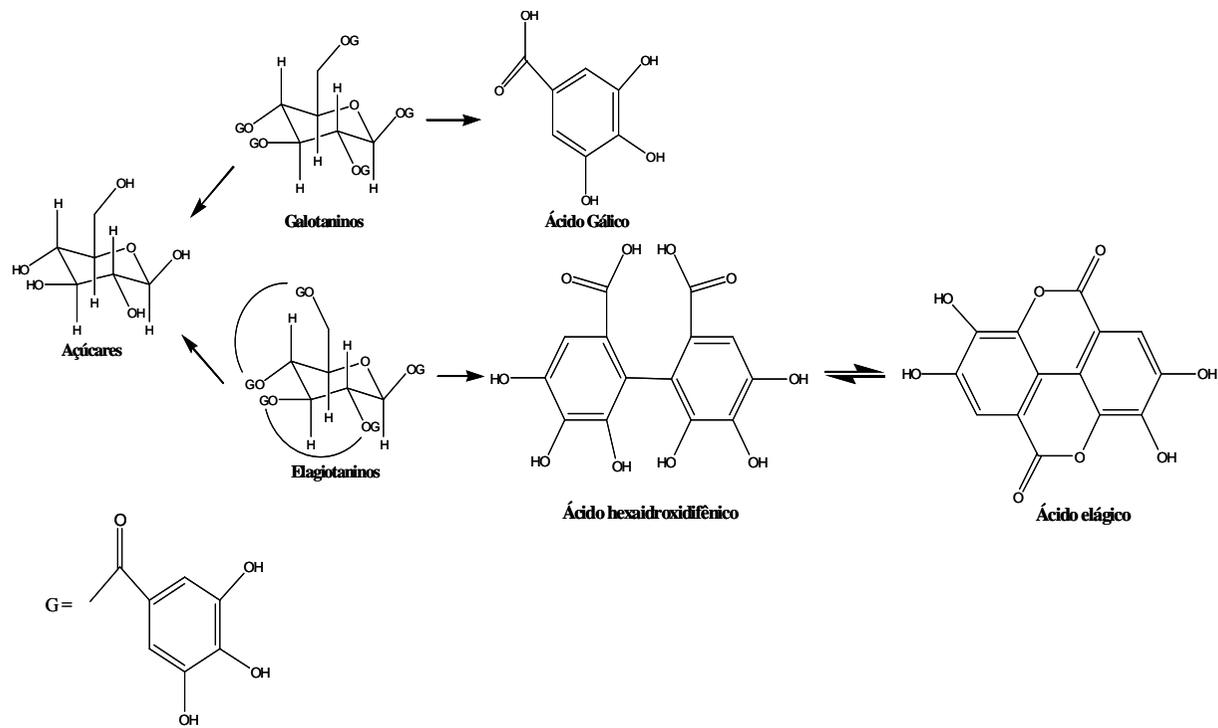


Figura 4 Reação de hidrólise dos taninos, liberando para o destilado ácido gálico e elágico durante o armazenamento

Para as amostras envelhecidas em carvalho (B, G e J), constatou-se a presença de siringaldeído como composto majoritário, diferentemente do observado para a amostra I. Esses resultados corroboram com o encontrado por Anjos et al. (2011). No entanto, Dias, Maia e Nelson (2002) observaram a predominância de compostos como ácidos elágico e vanílico no carvalho e Zacaroni et al. (2011), ácido elágico, siringaldeído e ácido p-cumárico. Segundo Klock e colaboradores (2005), além das condições de armazenamento da bebida (tamanho e pré-tratamento do barril, temperatura, umidade e teor alcoólico da bebida), citadas por Miranda; Horii e Alcarde (2006), a presença de compostos fenólicos na bebida pode se relacionar com a posição da madeira (próximo da casca, medula, topo ou base) utilizada na confecção dos barris, assim como a idade da árvore para obtenção da madeira. Isso se deve à complexidade química da madeira empregada no processo de envelhecimento, que é formada por materiais de parede celular (celulose, polioses e lignina) e por extrativos (compostos fenólicos, esteroides, terpenos, etc).

O siringaldeído comportou-se diferentemente para cada amostra. Na amostra B, o composto não sofreu interferência significativa da luz, observando-se apenas pequenas variações nos meses 2 e 4 para a amostra submetida a luz, mantendo a concentração constante ao final do período analisado para ambos os tratamentos. Na amostra G, o siringaldeído foi degradado na presença e ausência de luz, sendo mais acentuada na amostra submetida a luz. Para a amostra J, observam-se variações na concentração de siringaldeído nos meses 2 e 4 para a amostra submetida a luz, com a luz interferindo significativamente no mês 4, mantendo a concentração constante ao final do período analisado para ambos os tratamentos, conforme apresentado na Figura 5.

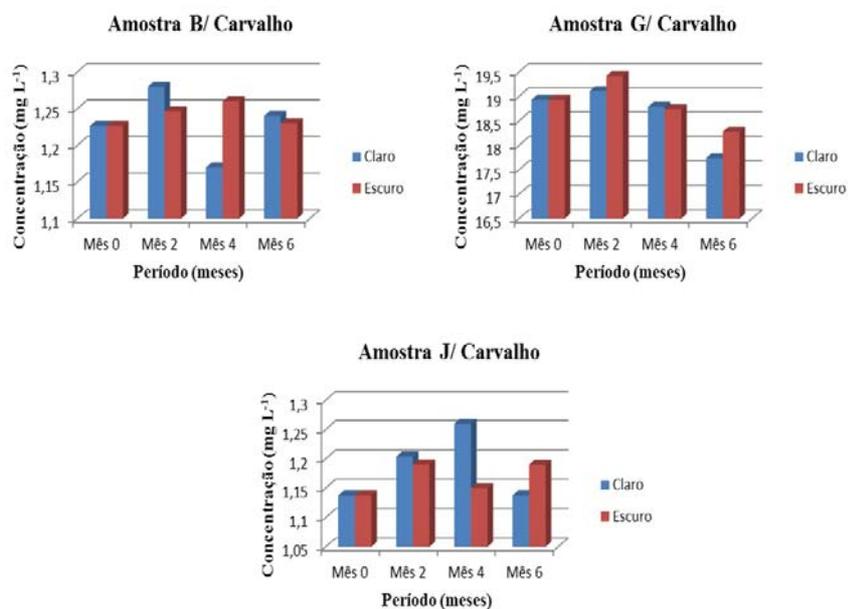


Figura 5 Influência da luz na concentração de siringaldeído em amostras de cachaça armazenadas em vidro na ausência e presença de luz, por um período de seis meses

Essa diminuição observada pode se relacionar a processos oxidativos convertendo o siringaldeído em ácido síringico (Figura 6) ou reações de condensação entre o siringaldeído e compostos presentes na matriz, sendo essas reações favorecidas pelo aumento da energia no meio fornecidos pela luz. Alves et al. (2008), avaliando a transmissão de luz de embalagens plásticas e vidros, constataram que o vidro transparente apresentou percentual de transmissão de luz cerca de 10% para comprimentos de onda em torno de 300 nm e, para valores acima dessa faixa, o vidro apresentou transmissão de luz em torno de 80%, o que se deve à sua estrutura amorfa e elevada transparência.

O aumento das concentrações observadas em alguns meses pode estar relacionado à quebra de possíveis oligômeros ou dímeros presentes no destilado.

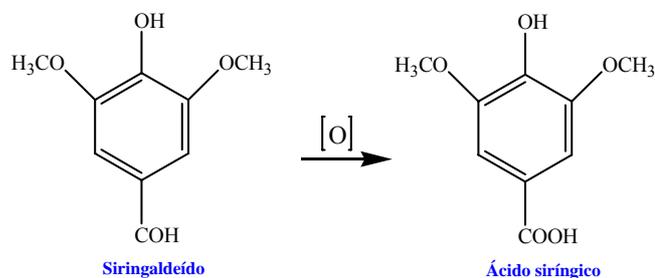


Figura 6 Oxidação do siringaldeído a ácido siringico

Na amostra envelhecida em jatobá (H), observou-se apenas a presença de catequina em baixa concentração, tendo a luz contribuído significativamente para a degradação desse composto, levando a níveis de concentração abaixo do limite de quantificação do método. Na amostra armazenada na ausência de luz, houve um pequeno decréscimo na concentração da catequina. Segundo dados da literatura, a catequina e a epicatequina são descritas como polifenóis mais extensamente envolvidas nas reações de oligomerização, com capacidade de formar ligações principalmente nos carbonos C4 e C8, formando os taninos condensados (KAMEYAMA et al., 1997).

Na amostra E, envelhecida em amburana, constatou-se a presença de 1,2-benzopirona (cumarina) em concentrações de aproximadamente 13 mg L⁻¹. Vale ressaltar que a presença desse composto não é desejada, devido ao grau de toxicidade observado em humanos, sendo proibida sua utilização como aromatizante na indústria de alimentos (BRASIL, 1965). Na Europa, a concentração máxima de cumarinas permitida em bebidas alcoólicas e em certos caramelos é de 10 mg Kg⁻¹. Portanto, essa cachaça envelhecida em amburana não serve para exportação. Valores elevados de cumarina (22 mg L⁻¹) também foram observados por Silva (2006) em amostras envelhecidas em amburana.

Observa-se na Tabela 10 que a luz não exerceu influência na concentração dessa substância, observando-se apenas diminuição dela com o período de armazenamento, exceto no mês 2, no qual houve diferença estatística no tratamento luminosidade e um aumento na concentração de cumarina na amostra submetida a luz. A cumarina pode ser formada por ciclização do ácido o-cumárico.

O comportamento peculiar observado para os compostos analisados nas diferentes amostras estudadas, frente à luminosidade e ao período de armazenamento, se deve a várias reações que eles podem sofrer, sendo a condensação uma das mais importantes. Essas reações podem ocorrer entre os compostos fenólicos (ácidos benzoicos, ácidos hidróxicinâmicos e flavonoides) e entre esses e outros compostos presentes na bebida, tais como acetaldeído e piruvato, dando origem a oligômeros ou polímeros mais estáveis. A taxa e a extensão dessas reações é influenciada por vários parâmetros, incluindo a concentração inicial de espécies reagentes, pH do meio, temperatura, condições de envelhecimento, disponibilidade de oxigênio e da concentração de agentes antioxidantes, tais como os sulfitos (GIOVANELLI; BRENNAN, 2007).

Entre os compostos fenólicos analisados, o eugenol apresentou-se menos expressivo na caracterização das cachaças envelhecidas, sendo encontrado apenas nas amostras D e E, resultados que corroboram com aqueles observados por Anjos et al. (2011) e Zacaroni et al. (2011).

Analisando a Tabela 16, que apresenta a soma dos compostos fenólicos quantificados, observa-se que, para a amostra G (carvalho), obteve-se maior teor de compostos fenólicos, seguido das amostras E (amburana) e A (castanheira). Todas as amostras analisadas apresentaram heterogeneidade na composição fenólica, diferindo apenas na concentração desses compostos, conforme observado nas Tabelas 6 a 15, exceto a amostra H, na qual se quantificou apenas a catequina em baixa concentração. Essa heterogeneidade é característica de

bebidas envelhecidas em madeira, principalmente nas amostras oriundas do carvalho. Quanto às madeiras brasileiras, jequitibá, bálsamo e amburana são as mais citadas na literatura e, portanto, largamente empregada pelos produtores, embora essa última não possa ser recomendada devido ao seu elevado teor de cumarina.

Tabela 16 Fenólicos totais obtidos pela somatória dos compostos quantificados por CLAE.

Amostras	Mês							
	0		2		4		6	
	Claro	Escuro	Claro	Escuro	Claro	Escuro	Claro	Escuro
A	15,94C	15,94C	15,93C	15,89C	14,75C	15,94C	15,25C	14,87C
B	3,26J	3,26J	3,01I	3,12I	3,13J	3,34I	3,35I	3,43I
C	1,69L	1,69L	1,46J	1,77L	1,41L	1,62K	1,44K	1,67K
D	5,28G	5,28G	5,68G	5,21G	5,76G	5,14G	5,70G	5,28G
E	30,92B	30,92B	31,69B	31,05B	31,31B	30,25B	30,25B	30,27B
F	12,05D	12,05D	12,00D	13,03D	12,00D	12,70D	11,13D	12,80D
G	33,15A	33,15A	34,44A	34,88A	33,98A	33,82A	32,18A	33,34A
H	0,19M	0,19M	0,00K	0,17M	0,00M	0,17L	0,00L	0,17L
I	2,62K	2,62K	2,63I	2,68J	2,75J	2,62J	2,63J	2,76J
J	3,75I	3,75I	4,40H	4,41H	4,70H	4,57H	4,61H	4,99G

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott Knott.

Os compostos encontrados em maior quantidade nas amostras analisadas foram ácido gálico e siringaldeído (A, B, C, D, G, I e J), cumarina e eugenol (E) e ácido gálico e vanilina (F).

Analisando os valores referentes às amostras envelhecidas em jequitibá (C e D), constatou-se maior teor fenólico e maior heterogeneidade química da amostra D, sendo o composto majoritário representado pelo ácido gálico, em ambas. Esses resultados podem ser explicados pelas condições de armazenamento da bebida durante o processo de envelhecimento, em que, na amostra D, há maior superfície de contato entre amostra e bebida (10.000L comparado a 20.000L) e maior período de armazenamento (60 meses comparado a 36 meses) (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006).

Comparando-se os valores dos fenólicos totais obtidos para as amostras envelhecidas em carvalho (B, G, I e J) e as condições de armazenamento informadas pelos produtores, constata-se que não há relação direta entre todos esses parâmetros. A amostra G, que apresentou maior teor fenólico (33,62 mg L⁻¹), possui menor superfície de contato; porém, maior período de envelhecimento (48 meses) e maior graduação alcoólica (51,68% v/v). Em seguida, têm-se as amostras J (4,40 mg L⁻¹) e B (3,24 mg L⁻¹) armazenadas em barril de mesmo volume, consideradas estatisticamente diferentes pelo teste aplicado. Embora a amostra B possua maior teor alcoólico (46,27% v/v comparado a 42,13% v/v) e maior período de armazenamento (36 meses comparados a 12 meses), a amostra J apresentou maior composição fenólica. Estudos demonstram que espécies diferentes de carvalho, oriundas de regiões geográficas distintas, apresentam composição fenólica diferente (CANAS et al., 2002, CARDOSO et al., 2008). Isso se deve à morfologia da célula e a distribuição dos compostos, cujas características variam de espécie para espécie e com a idade do vegetal. Essa morfologia engloba tamanho de fibra, distribuição de vasos e espessura de parede celular. Dependendo da espécie, esses vasos podem estar obstruídos,

impedindo a penetração da bebida e, conseqüentemente, o seu contato com os extrativos e com as substâncias da parede celular, diminuindo a incorporação dos compostos à bebida (KLOCK et al., 2005).

4 CONCLUSÃO

O ácido gálico foi o composto majoritário das amostras envelhecidas em castanheira (A), jequitibá (C e D), louro-canela (F) e carvalho (I), tendo a amostra A teor mais elevado. Em todas essas amostras, constatou-se influência da luminosidade durante o período de armazenamento.

Constatou-se a presença de siringaldeído como composto majoritário, nas amostras B, G e J, tendo a luz influenciado significativamente, exceto na amostra B.

Na amostra envelhecida em jatobá (H), observou apenas a presença de catequina em baixa concentração, tendo a luz contribuído significativamente para a degradação desse composto.

A presença de 1,2-benzopirona (cumarina) em concentrações de aproximadamente 13 mg L^{-1} , foi constatada na amostra E, envelhecida em amburana, tendo a luz influenciado apenas no segundo mês.

Entre os compostos fenólicos analisados, o eugenol apresentou-se menos expressivo na caracterização das cachaças envelhecidas, sendo encontrado apenas nas amostras D e E.

Todas as amostras analisadas apresentaram heterogeneidade na composição fenólica, diferindo apenas na concentração destes, exceto a amostra H, na qual se quantificou apenas a catequina em baixa concentração. A luz modifica a concentração desses compostos no destilado, podendo, assim, interferir na qualidade química e sensorial do produto. Portanto, faz-se necessário avaliar a necessidade da utilização de embalagens escuras para o armazenamento de bebidas envelhecidas.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. M. V. et al. Embalagens plásticas e de vidro para produtos farmacêuticos: avaliação das propriedades de barreira à luz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 2, p. 167-178, 2008.

ANJOS, J. P. et al. Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 874-878, 2011.

AQUINO, F. W. B. et al. Simultaneous determination of agind markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 569-574, 2006.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 9 de abril de 1965.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm>.

Acesso em: 15 jun. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 2 de junho de 2003. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15

de jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

CANAS, S. et al. Kinetic of impregnation/ evaporation and release of phenolic compounds from wood to brandy in experimental model. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Vina, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2002.

CARDOSO, D. R. et al. Sugarcane spirit extracts of oak and Brazilian woods: antioxidant capacity and activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 1109-1116, 2008.

CATÃO, C. G. et al. Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 7, p. 741-747, 2011.

DIAS, S. M. B. C.; MAIA, A. B. R. A.; NELSON, D. L. Utilização de madeiras nativas no envelhecimento da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 46-51, 2002.

FARIA, J. B. et al. Evaluation of Brazilian woods as an alternative to oak for cachaças aging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 83-87, 2003.

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

GIOVANELLI, G.; BRENNER, O. V. Oxidative stability of red wine stored in packages with different oxygen permeability. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 226, p. 169-179, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

KAMEYAMA, M. O. et al. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry. **Mass Spectrometry**, London, v. 11, p. 31-36, 1997.

KLOCK, U. et al. **Química da madeira**. 3. ed. Curitiba, 2005. 86 p.

LOCKHART, H.; PAINE, F. A. **Packaging of pharmaceutical and healthcare products**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 211 p.

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

MIRANDA, M. B. et al. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 84-89, 2008.

MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverages. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 95-101, 1998.

NISHIMURA, A.; MATSUYAMA, R. Maturation and maturation chemistry. In: _____. **The science and technology of whiskies**. [S.l.]: Longma Scientific & Technical, 1989. 210 p.

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

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

SCALBERT, C. V. A.; LAPIERRE, C.; MOUTOUNETS, M. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, San Diego, v. 41, p. 1872- 1879, 1993.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SILVA, A. A. **Compostos fenólicos em madeiras brasileiras**. 2006. 113 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2006.

SILVA, A. A. et al. Identificação de extratos etanólicos de madeiras utilizando seu espectro eletrônico de absorção e análise multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 563-566, 2012.

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

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

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM AGUARDENTES DE CANA/ CACHAÇAS ENVELHECIDAS EM DIFERENTES BARRIS DE MADEIRA E ARMAZENADAS EM VIDRO POR UM PERÍODO DE SEIS MESES

RESUMO

O processo de envelhecimento utilizado pelos produtores de cachaça não é uma forma de melhorar apenas as características organolépticas do produto, mas também de desenvolver outras propriedades interessantes, como o aumento da atividade antioxidante. Essa atividade antioxidante se deve principalmente à presença de compostos fenólicos extraídos dos barris de madeira. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da luminosidade e do período de armazenamento na atividade antioxidante de 10 amostras de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras sob diferentes condições, utilizando o método do DPPH. Entre as amostras de cachaça analisadas, apenas a amostra H sofreu influência significativa da luminosidade e do período analisado. Para a maioria das amostras não houve correlação linear entre a atividade antioxidante e a composição fenólica avaliada. A maior atividade antioxidante foi observada nas cachaças G (49,40%) e A (45,42%), seguidas da amostra F (33,56%), cujo composto majoritário foi o siringaldeído (G) e ácido gálico (A e F). Para as cachaças envelhecidas em carvalho, observou-se maior atividade para a amostra G, seguida das amostras J, I e B, sendo as duas últimas consideradas estatisticamente iguais. Para as cachaças envelhecidas em jequitibá (C e D), observou-se maior atividade antioxidante para a amostra D.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Composição fenólica. Cachaça. Luminosidade.

ABSTRACT

The aging process used for producing sugarcane spirits is not a way of only improving the organoleptic characteristics of the product, but also of developing other interesting properties, such as the increase of antioxidant activity. That antioxidant activity is due mainly to the presence of phenolic compounds extracted from the wooden barrels. Therefore, the objective in this study was to evaluate, using the DPPH method, the influence of light and storage period on the antioxidant activity of 10 samples of sugarcane spirits aged in different wood under different conditions. Among the samples of sugarcane spirits analyzed, only the sample H underwent a significant influence of the light and the analyzed period. For most of the samples there was no linear correlation between the antioxidant activity and the appraised phenolic composition. The highest antioxidant activity was observed in the sugarcane spirits G (49.40%) and A (45.42%), followed by the sample F (33.56%), whose majority compound was syringaldehyde (G) and gallic acid (A and F). For the sugarcane spirits aged in oak, higher activity was observed for the sample G, followed by the samples J, I and B, the latter two being considered statistically equal. For the sugarcane spirits aged in Jequitiba (C and D), higher antioxidant activity was observed for the sample D.

Key words: Antioxidant activity. Phenolic composition. Sugarcane spirits. Luminosity.

1 INTRODUÇÃO

Em vários estudos observa-se que o consumo de alimentos e bebidas com alto teor de fenólicos correlaciona-se com a redução de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares e mortalidade por câncer (UMAR et al., 2003). Os compostos fenólicos têm sido estudados por apresentar várias atividades biológicas, tais como, antibacteriana, antiviral, antimutagênica, anti-inflamatória e ações vasodilatadora, sendo a atividade antioxidante um dos seus mecanismos de ação (MATILA; HELLSTROM; TORRONEN, 2006).

Diversos estudos demonstram a forte atividade antioxidante de alguns ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, tais como, o ácido gálico e elágico (PORTO et al., 2000; VINSON et al., 2001; MULLEN et al., 2002; PRIYADARSINI et al., 2002; SROKA; CISOWSKI, 2003; CANAS; CASANOVA; BELCHIOR, 2008).

Entre as bebidas alcoólicas, aquelas envelhecidas são ricas em compostos fenólicos, devido à sua maturação em barris de madeira (VIRIOT et al., 1993; CANAS, 2003). Esse processo tem grande aceitação entre os produtos, pois melhora sensorialmente a bebida e agrega valor ao produto final.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura química, concentração e estado de oxidação, que são determinados principalmente pelas condições de envelhecimento, incluindo as características do barril, como a espécie botânica, pré-tratamento do barril, tamanho e condições ambientais de armazenamento (CANAS et al., 1999; BELCHIOR et al., 2003; ALAÑÓN et al. 2011).

Estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante de vinhos, uísques, conhaques, vodkas e martinis, destacando a relação entre o seu tempo de envelhecimento e o poder antioxidante

(GOLDBERG et al., 1999; PORTO et al., 2000; UMAR et al., 2003, AOSHIMA et al., 2004; BARTOSZECK; POLAK, 2012).

No Brasil, a madeira mais utilizada para o envelhecimento da cachaça é o carvalho. Essa madeira geralmente é importada da América do Norte e da Europa, podendo ter seus extrativos reduzidos devido à sua prévia utilização para a maturação de vinhos, conhaques e uísques. Diante da rica flora brasileira, estudos têm sido realizados com o objetivo de utilizar madeiras nativas para o envelhecimento da cachaça, caracterizando e quantificando os fenólicos presentes, buscando madeiras que tenham similaridade em todos os aspectos com o carvalho. Atributos sensoriais de cachaças envelhecidas em barris construídos com espécies de madeiras brasileiras têm sido recentemente relatados, sugerindo que as espécies de amendoim, pereiro e jatobá poderiam ser utilizadas para a manufatura dos barris para o envelhecimento da cachaça (FARIA et al., 2003). No entanto, diferenças na composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras têm sido relatadas (BETTIN et al., 2002; CARDOSO et al., 2008; CATÃO et al., 2011; ZACARONI et al., 2011).

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da luminosidade e do período de armazenamento na atividade antioxidante de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, sob diferentes condições.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as amostras foram coletadas e analisadas conforme apresentado abaixo.

2.1 Obtenção das amostras

Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de 2 meses, durante um período de 6 meses, das amostras de cachaça envelhecidas sob diferentes condições (Tabela 1), acondicionadas em garrafas transparentes e em garrafas cobertas com folha de alumínio, constituindo os tratamentos do experimento. Durante a realização do experimento, tanto os recipientes de vidro como os cobertos com folha de alumínio foram armazenados à temperatura ambiente e expostos à luminosidade natural, objetivando avaliar o seu período de prateleira. Essas amostras foram avaliadas pelo método de DPPH no Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente do Departamento de Química da UFLA. Na Tabela 1, há algumas características referentes às amostras analisadas.

Tabela 1 Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).

Amostra	Local	Madeira	Capacidade do barril (L)	Tempo de armazenamento (meses)
A	Passa Quatro	Castanheira	700	36
B	Passa Quatro	Carvalho	200	36
C	Passa Quatro	Jequitibá	20.000	36
D	Barbacena	Jequitibá	10.000	60
E	Lavras	Amburana	10.000	48
F	Piranguinho	Louro-canela	50.000	24
G	Piranguinho	Carvalho	50.000	48
H	Itajubá	Jatobá	4.000	6
I	Itajubá	Carvalho	1.000	24
J	Perdões	Carvalho	200	12

2.2 Metodologia

O método utilizado para a determinação da atividade antioxidante em cachaça foi o de DPPH (2,2-di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazil) adaptado da metodologia de Payet, Sing e Smadja (2006).

A 0,30 mL da amostra, adicionaram-se 3,12 mL de DPPH (0,004%), preparada em etanol 95%. Essa mistura foi incubada por 10 min, a 30°C, sob o abrigo de luz. Decorrido esse tempo, realizaram-se as leituras espectrofotométricas a 515 nm (Shimadzu UV-1601 PC), por um período de 60 min. As leituras das amostras foram comparadas ao controle, que continha

0,30mL de etanol 95%. As porcentagens de inibição (%A) foram calculadas de acordo com a equação 1.

$$\%A = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (1)$$

No método do DPPH, ocorre a redução do radical livre estável (2,2-di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazil, que na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), em meio alcoólico, forma o 2,2-di(4-tert-octilfenil)-picrilhidrazina (Figura 1).

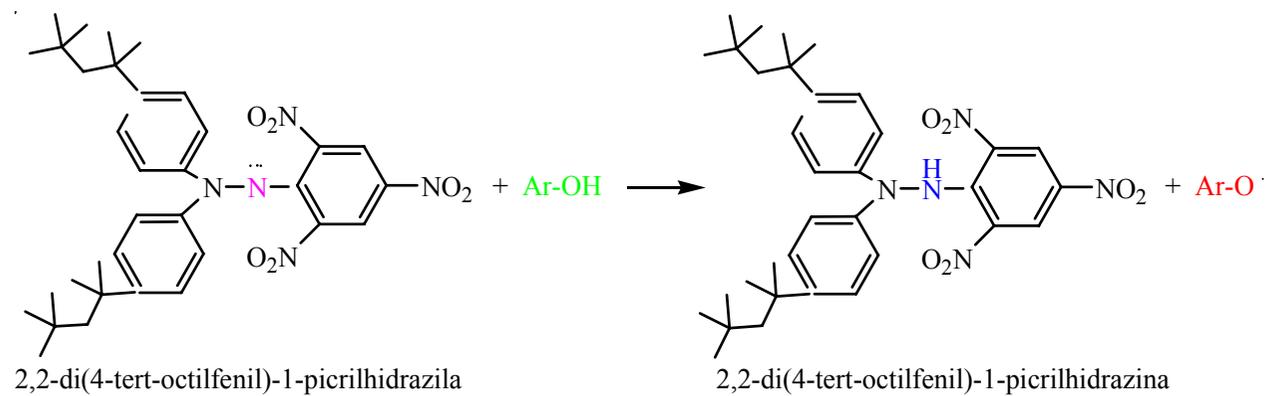


Figura 1 Reação química entre o radical DPPH e os compostos fenólicos da cachaça

2.3 Delineamento experimental

Os resultados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Scott Knott (1974), a 95% de confiança. Para a avaliação dos dados, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com os tratamentos dispostos em esquema fatorial (10 X 4 X 2), sendo dez amostras de diferentes tonéis, quatro tempos de coleta (0, 2, 4 e 6 meses) e condições de luminosidade (claro e escuro), com duas repetições. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar, segundo Ferreira (2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância, verificou-se que a luminosidade e o tempo não exerceram influência significativa sobre a atividade antioxidante das amostras analisadas, com exceção da amostra H, na qual se observou efeito significativo dos parâmetros avaliados.

Na Tabela 2 podem-se observar as diferenças estatisticamente identificadas entre as atividades antioxidantes das amostras analisadas, envelhecidas sob diferentes condições. Estão descritos também na Tabela os correspondentes valores da somatória dos compostos fenólicos obtidos separadamente por HPLC, para cada amostra (Tabela 16/ Capítulo 3). Observando a Tabela 2 e a Figura 2, constatou-se que para a maioria das amostras não há correlação linear ($r^2 = 0,367$) entre o teor total dos fenólicos e sua capacidade de sequestrar o radical DPPH. Esses resultados observados são contrários aos de alguns autores, que encontraram correlação linear entre os dois parâmetros (CANAS et al., 2003; ALONSO et al., 2004; CARDOSO et al., 2008; CANAS; CASANOVA; BELCHIOR, 2008, LI; BETA, 2011). Essa não correlação observada pode ser atribuída à presença de compostos não quantificados, como os da classe dos flavonoides ou a presença de compostos com baixa ou nenhuma atividade antioxidante.

Tabela 2 Atividade antioxidante das cachaças envelhecidas em diferentes condições, comparadas à sua composição fenólica total.

Amostras	Ativ. Antiox. (%inibição)	Fenólicos Totais (mg L⁻¹)	Condições (madeira/ volume barril - L/ tempo armazenamento - meses)
A	45,47 ± 5,33 A	15,56 ± 0,52	Castanheira/ 700L/ 36M
B	17,97 ± 1,83 D	3,24 ± 0,14	Carvalho/ 200L/ 36M
C	10,49 ± 4,04 E	1,59 ± 0,14	Jequitibá/ 20.000L/ 36M
D	19,93 ± 4,61 D	5,42 ± 0,25	Jequitibá/ 10.000L/ 60M
E	16,25 ± 2,69 D	30,83 ± 0,54	Amburana/ 10.000L/ 48M
F	33,56 ± 4,31 B	12,22 ± 0,60	Louro-canela/ 50.000L/ 48M
G	49,40 ± 2,67 A	33,62 ± 0,85	Carvalho/ 50.000L/ 48M
I	18,43 ± 2,51 D	2,66 ± 0,06	Carvalho/ 1.000L/ 24M
J	24,08 ± 4,93 C	4,40 ± 0,44	Carvalho/ 200L/ 12M

Médias seguidas da mesma letra, sendo maiúscula na coluna (entre amostras para a atividade antioxidante) não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

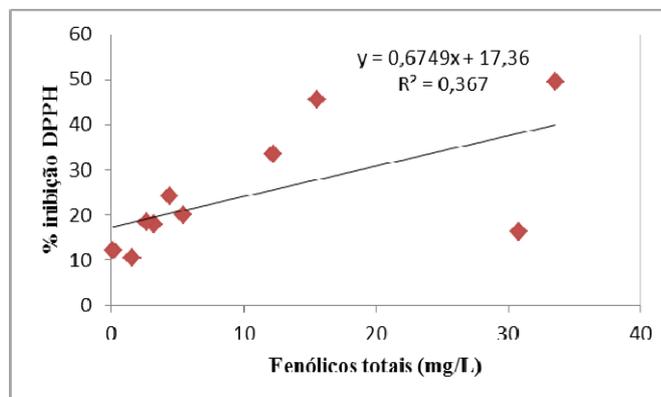


Figura 2 Capacidade de sequestrar o radical DPPH (% inibição) versus o teor total de fenólicos (mg L^{-1})

Quanto às diferenças observadas entre as atividades antioxidantes nas amostras analisadas, elas podem estar relacionadas às variáveis existentes no processo do envelhecimento. Segundo Segundo Miranda, Horii e Alcarde (2006), os fatores que influenciam a qualidade da cachaça envelhecida são espécie da madeira, tamanho e pré-tratamento do barril, condições ambientais, tempo de envelhecimento e teor de álcool da bebida. Esses resultados corroboram com os de Aoshima et al. (2004), que avaliaram a atividade antioxidante em vários tipos de uísques pelo método de DPPH. Os autores observaram que diferentes tipos de uísque armazenados sob diferentes condições, tais como tipo de barril, espécie de carvalho, ou pré-tratamento da madeira, etc, apresentaram atividades antioxidantes não proporcionais ao período de envelhecimento. Alañón et al. (2011) comprovam a influência da espécie botânica empregada para a confecção dos barris no teor e na qualidade fenólica dos extratos, bem como em suas atividades antioxidantes.

Segundo pesquisas (GULÇIN, 2012), a presença de outros compostos com atividade antioxidante maior pode interferir nesses resultados. Comparando os ácidos benzoicos aos ácidos hidróxicinâmicos, atribui-se maior capacidade de sequestrar radicais livres aos ácidos hidróxicinâmicos. Isso se deve à presença da

ramificação ($-\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$), que aumenta a dispersão de cargas, exercendo maior contribuição para a estabilização do radical por meio das estruturas ressonantes do que aquela observada para o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) nos ácidos benzoicos. No entanto, deve-se levar em conta a concentração e a disponibilidade das hidroxilas desses compostos no meio.

Além disso, essa não correlação observada pode ser explicada com base nos efeitos sinérgicos (VINSON et al., 2001; PSARRA et al., 2002) e antagonistas (PINELO et al., 2004), que podem existir entre os compostos fenólicos ou entre esses e os compostos voláteis presentes na bebida (LEE; SHIBAMOTO, 2001). Processos oxidativos (MOCHIZUKI et al., 2002), de epimerização (WANG; ZHOU; JIANG, 2008) e polimerização (BIANCHI; MARCHETTI; SCALIA, 2011) podem ocorrer, conforme Figura 3:

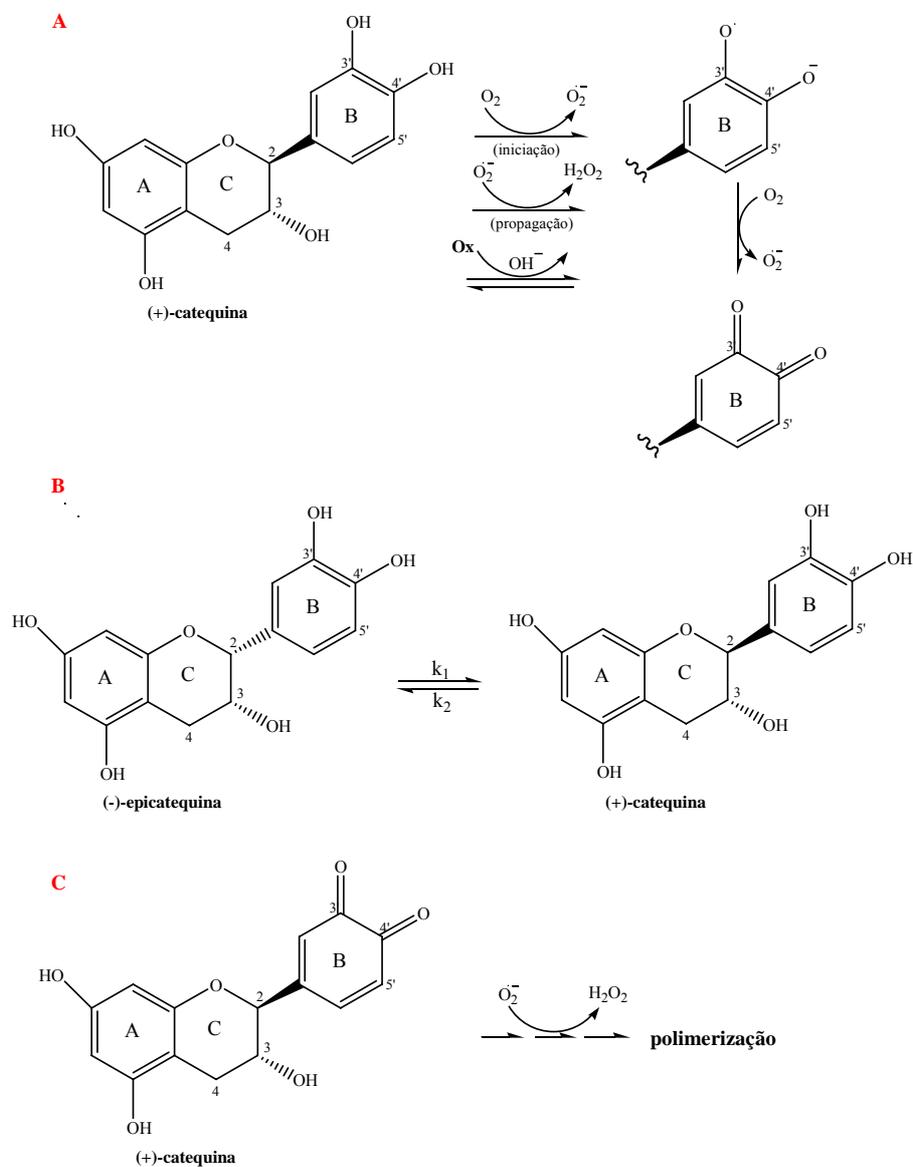


Figura 3 Processos oxidativos (A), de epimerização (B) e polimerização (C) com a molécula de catequina

Em diversos estudos, (CHEN; HO, 1995; WANG; JIN; HO, 1999) elucidam claramente que a capacidade de sequestro de radicais livres por compostos fenólicos é devida à sua capacidade de doar hidrogênio: quanto maior

o número de grupos hidroxilas, maior a possibilidade de atividade antioxidante. No entanto, a disponibilidade desses grupos depende estreitamente da estrutura química e conformação espacial, que pode modificar a reatividade das moléculas.

É sabido que alguns compostos fenólicos são capazes de polimerizar principalmente os compostos da classe dos flavonoides. Hagerman et al.(1998) e Lu e Yeap Foo (2000) mostram que monofenóis apresentam menor atividade antioxidante do que oligômeros correspondentes, provavelmente devido à sua estabilização por estruturas ressonantes.

Pinelo et al. (2004) mostram que quando o grau de polimerização excede um valor crítico, a crescente complexidade molecular promove uma diminuição na capacidade antioxidante, provavelmente por causa do impedimento estérico, o que reduz a disponibilidade dos grupos hidroxilas. Os pesquisadores avaliaram a atividade antioxidante pelo método de DPPH de soluções etanólicas contendo a mistura de quercetina (10^{-4} M), catequina (10^{-4} M) e resveratrol (10^{-4} M) e de soluções individuais dos compostos, observando que a combinação dos três polifenóis não só impede o aumento da atividade antioxidante, como também promove uma diminuição considerável nesse parâmetro. Segundo os autores, a concentração mais elevada do sistema complexo permite maior possibilidade de colisões eficazes entre as moléculas individuais, favorecendo a reação de polimerização e reduzindo a interação molécula individual com radicais DPPH.

Quanto às espécies de madeira analisadas, pode-se observar a predominância de diferentes compostos fenólicos. Na bebida envelhecida em barris de castanheira (A) e louro-canela (F), tem-se a predominância do ácido gálico e, na amburana, predominou-se a cumarina (E). Avaliou-se também a predominância desses compostos em quatro barris de carvalho (B, G, I e J) e dois de jequitibá (C e D). Para o carvalho, o composto majoritário encontrado foi o siringaldeído com exceção da amostra I, que apresentou concentrações

maiores de ácido gálico. Nas bebidas envelhecidas em jequitibá, o ácido gálico foi o composto predominante.

Analisando os dados referentes à atividade antioxidante expressos na Tabela 2, pode-se observar que a maior atividade antioxidante foi observada nas cachaças G (49,40%) e A (45,47%), seguidas da amostra F (33,56%), cujo composto majoritário foi o siringaldeído (G) e o ácido gálico (A e F). Embora a amostra E (30,83 mg L⁻¹) tenha apresentado um teor fenólico próximo à amostra G (33,62 mg L⁻¹), sua atividade antioxidante foi 3 vezes menor, podendo atribuir esse comportamento ao composto majoritário presente (1,2-benzopirona). Isso pode ser explicado pela estabilização do composto fenólico após reação com o radical DPPH, conforme apresentado na Figura 4. Observa-se que a cumarina (Figura 5) não possui hidroxilas em sua estrutura, não contribuindo efetivamente para a atividade antioxidante nessa amostra. Portanto, pode-se atribuir a atividade antioxidante observada (16,25%) ao eugenol, que foi o segundo composto encontrado em maior concentração.

Embora o siringaldeído e o eugenol contribuam com a mesma quantidade de estruturas ressonantes, a atividade antioxidante maior é atribuída ao primeiro composto. O grupo aldólico presente na estrutura do siringaldeído é mais eletronegativo, deixando o hidrogênio das hidroxilas mais ácido e, portanto, mais susceptível à reação (HENDRICKSON; CRAM; HAMMOND, 1970).

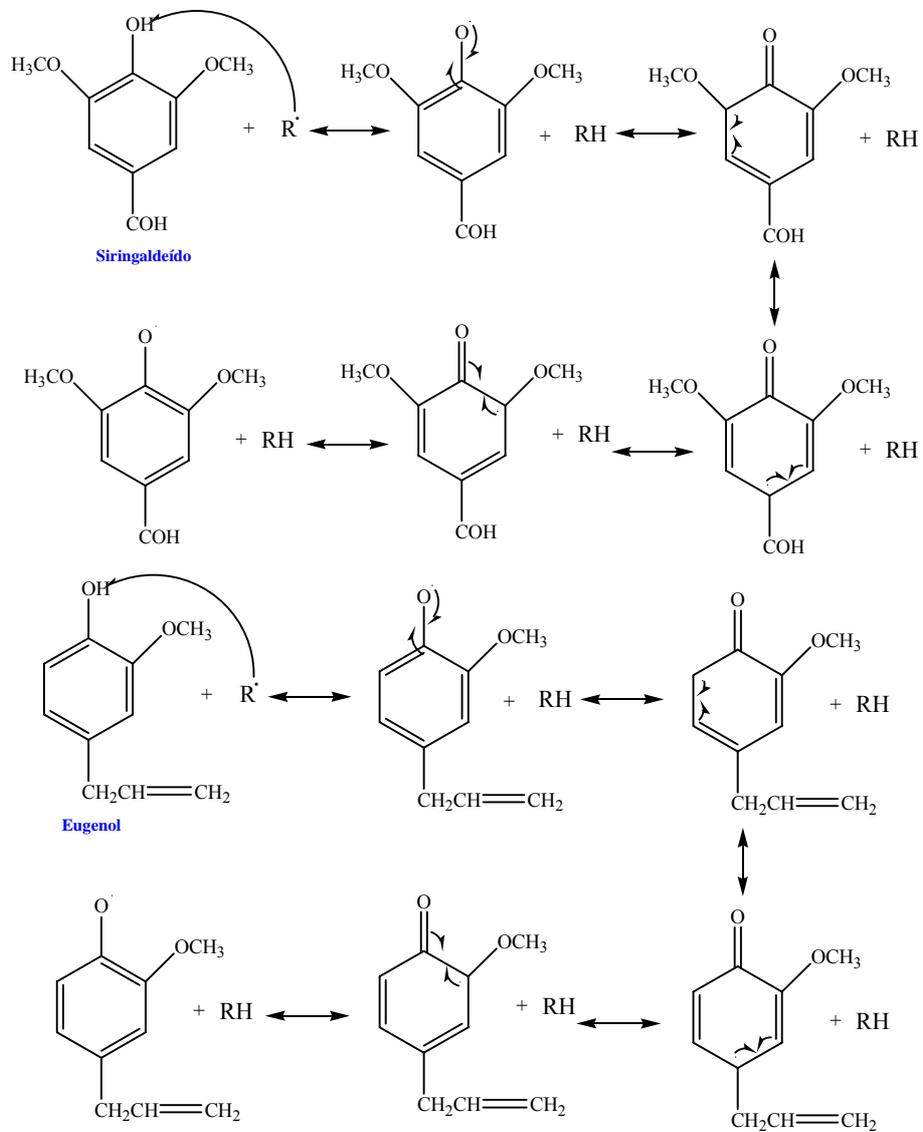


Figura 4 Reação entre o siringaldeído e o radical DPPH (R^\cdot); entre o eugenol e o radical DPPH (R^\cdot)



Figura 5 Estrutura química da 1,2-benzopirona (cumarina)

Comparando as cachaças envelhecidas em carvalho (Figura 6), observa-se maior atividade para a amostra G, seguida das amostras J, I e B, sendo as duas últimas consideradas estatisticamente iguais.

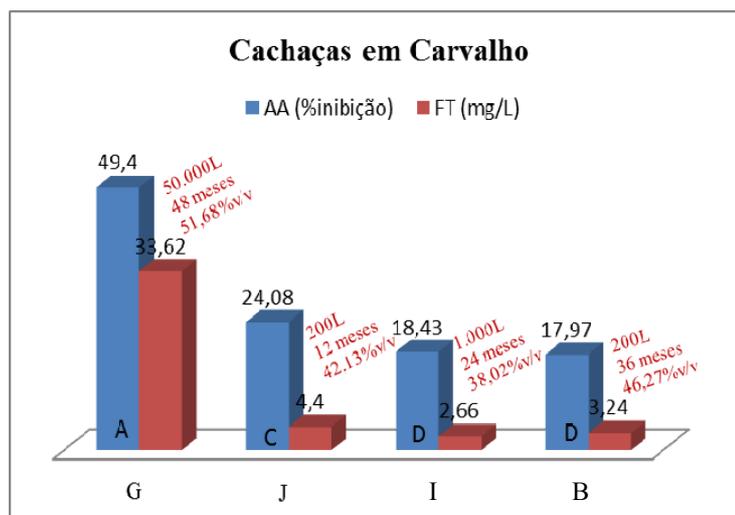


Figura 6 Atividade antioxidante (AA) e fenólicos totais (FT) de cachaças envelhecidas em carvalho, sendo consideradas estatisticamente iguais às médias seguidas de mesma letra, pelo teste de Scott Knott

O primeiro ponto a se considerar seria a capacidade de estabilização das estruturas ressonantes dos compostos majoritários. Tem-se na amostra I a presença do ácido gálico e nas demais a presença do siringaldeído. Embora o ácido gálico possua 3 hidroxilas capazes de fornecer hidrogênio ao radical DPPH contra uma hidroxila do siringaldeído, maior atividade foi observada para a amostra G. Esse comportamento pode se relacionar à disponibilidade do composto fenólico no meio. Conforme dados apresentados na Tabela 3, observam-se teores médios de siringaldeído de aproximadamente 18,74 mg L⁻¹ na amostra G, seguidos de 1,17 mg L⁻¹; 0,64 mg L⁻¹ e 1,24 mg L⁻¹ para as amostras J, I e B, respectivamente. Essa concentração mais elevada aumenta a possibilidade de colisões eficazes entre as moléculas de siringaldeído e de DPPH, aumentando a atividade antioxidante.

Tabela 3 Concentração média de siringaldeído e ácido gálico nas amostras envelhecidas em carvalho.

Compostos	Amostras (mg L ⁻¹)			
	G	J	I	B
Siringaldeído	18,74	1,17	0,64	1,24
Ácido gálico	6,10	1,12	0,81	0,61

Em relação à diferença estatística observada entre a amostra J, comparadas à amostra I, essa diferença pode ser explicada pela maior superfície de contato entre amostra e barril e maior graduação alcoólica, que aumenta a extração dos compostos da madeira (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006). No entanto, esse conceito não se aplica quando se comparam as amostras J e B. Mori (2006) e Klock et al. (2005) indicam que outros fatores mostram-se

relevantes para o processo de envelhecimento, tais como tempo de uso dos barris, que é inversamente proporcional ao teor de compostos fenólicos presente na bebida; a posição da madeira utilizada na confecção dos barris (próximo da casca, medula, topo ou base) e a idade da árvore utilizada para obtenção da madeira. Cardoso et al. (2008), avaliando a atividade antioxidante de diferentes madeiras brasileiras comparadas ao carvalho, também obtiveram variações nesse parâmetro, atribuindo a esses resultados a influência da localização geográfica, origem da madeira e tratamentos durante o cultivo da árvore.

Como as madeiras de carvalho utilizadas no envelhecimento da cachaça são madeiras importadas da Europa ou Estados Unidos, e que geralmente já foram utilizadas para o armazenamento de vinhos e uísques, parâmetros como origem geográfica, tempo de utilização e pré-tratamento empregado para a reutilização desses barris deveriam ser inseridos e exigidos para a obtenção de uma bebida padronizada.

Além desses parâmetros, efeitos sinérgicos ou antagonistas podem ocorrer entre os compostos presentes na bebida, aumentando ou diminuindo a atividade antioxidante, respectivamente (VINSON et al., 2001; PSARRA et al., 2002 e PINELO et al., 2004).

Na Figura 7, referente ao comportamento das cachaças envelhecidas em jequitibá, observa-se maior atividade antioxidante para a amostra que também apresentou a maior concentração de compostos fenólicos (D). Em relação às condições de envelhecimento, predominou nas amostras a maior superfície de contato e o maior período de armazenamento, não sendo relevante nessa situação a graduação alcoólica.

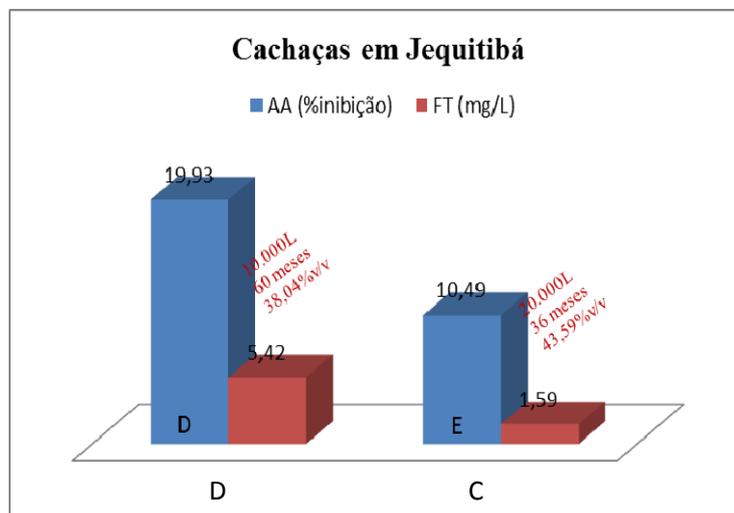


Figura 7 Atividade antioxidante (AA) e fenólicos totais (FT) de cachaças envelhecidas em jequitibá, sendo consideradas estatisticamente iguais às médias seguidas de mesma letra pelo teste de Scott Knott

Entre as amostras analisadas, a amostra H foi a única que apresentou diferenças estatísticas entre o tratamento luminosidade e o período (meses), quanto à atividade antioxidante. Na Tabela 4 e Figura 8, podem-se observar uma diminuição na atividade antioxidante da bebida armazenada sob a presença de luz e uma atividade antioxidante constante da amostra mantida sob ausência de luz.

Tabela 4 Influência da luminosidade e do tempo na atividade antioxidante da cachaça envelhecida em jatobá (H).

Compostos	Luminosidade	Mês			
		0	2	4	6
H	Claro	16,52Aa ± 1,79	2,99Bb ± 0,89	2,16Bb ± 0,71	2,26Bb ± 0,69
	Escuro	16,52Aa ± 1,79	22,02Aa ± 2,32	17,40Aa ± 1,47	16,32Aa ± 1,54

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha (entre meses) e a maiúscula na coluna (entre luminosidade), não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

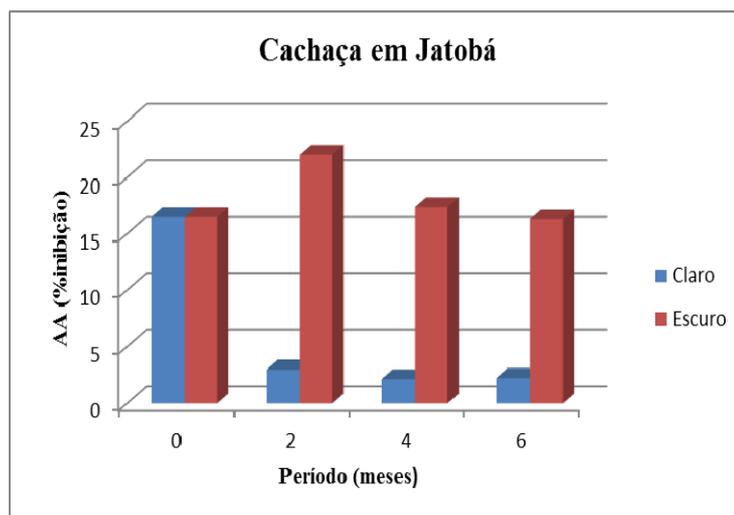


Figura 8 Influência da luminosidade e do tempo na atividade antioxidante da cachaça envelhecida em jatobá (H)

Nessa amostra envelhecida em jatobá somente foi encontrada a catequina. Observa-se, portanto, comportamento similar para a composição fenólica, reportada em relação à catequina, conforme Tabela 5.

Tabela 5 Influência da luminosidade e do tempo na concentração de catequina da cachaça envelhecida em jatobá (H).

Compostos	Luminosidade	Mês			
		0	2	4	6
H	Claro	0,19Aa	<LQBb	<LQBb	<LQBb
		± 0,0025			
	Escuro	0,19Aa	0,16Aa	0,17Aa	0,17Aa
		± 0,0025	± 0,0067	± 0,012	± 0,0013

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha (entre meses) e a maiúscula na coluna (entre luminosidade), não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

A estrutura química da catequina e sua provável estabilização após reação com o radical DPPH está representada na Figura 9. Observa-se que é uma estrutura altamente estabilizada por ressonância, com quatro hidroxilas susceptíveis a reação.

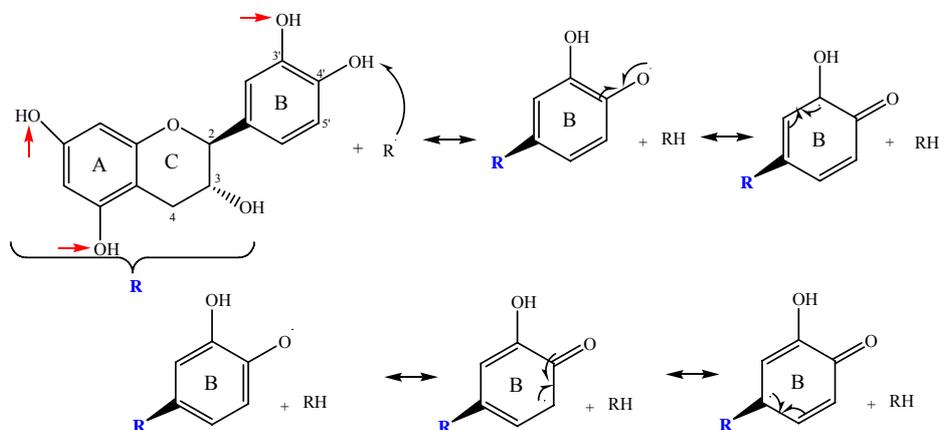


Figura 9 Reação entre a catequina e o radical DPPH ($R\cdot$) e estabilização do radical por estruturas ressonantes

Segundo Lockhart e Paine (1996), a energia radiante de fontes luminosas naturais ou artificiais, seja ultravioleta (UV), seja visível, é capaz de afetar a estabilidade de compostos fotossensíveis, uma vez que pode iniciar e acelerar reações de degradação fotoquímica. Tais reações alteram as características intrínsecas do produto por meio do aumento dos níveis energéticos dos compostos, formando produtos altamente oxidantes, como radicais livres e íons. Portanto, a luz e o calor podem contribuir para a ocorrência de processos hidrolíticos, oxidativos, de epimerização e polimerização (WANG; ZHOU; JIANG, 2008; BIANCHI; MARCHETTI; SCALIA, 2011).

A fotossensibilidade de determinado composto depende de fatores, como concentração, polaridade e reatividade, matriz ou solvente, pH do meio, concentração de oxigênio dissolvido, composição de sais e íons metálicos, solubilidade e viscosidade (TENNESEN, 2002).

Além das considerações enumeradas aqui para os diferentes comportamentos observados nas amostras analisadas, deve-se levar em conta a complexidade dos compostos presentes na matriz cachaça, como outros antioxidantes e polifenóis não quantificados, metais, etc. Todas essas variáveis citadas tornam difícil prever o comportamento antioxidante de cachaças envelhecidas sob diferentes condições. Portanto, estudos devem ser realizados visando à caracterização do maior número possível de compostos fenólicos presentes na cachaça, aliados às informações de parâmetros envolvidos no processo de envelhecimento. Tais parâmetros devem envolver espécie vegetal, origem geográfica, parte da madeira empregada para a confecção dos barris, tempo de uso dos barris, condições ambientais (temperatura e umidade), volume e tempo de armazenamento. Com essas informações, pode-se, então, traçar o perfil antioxidante da bebida.

4 CONCLUSÃO

Entre as amostras de cachaça analisadas, apenas a amostra H sofreu influência significativa da luminosidade e do período analisado, com diminuição da atividade antioxidante e do teor de catequina nas amostras, sob a presença de luz.

Para a maioria das amostras, não houve correlação linear entre a atividade antioxidante e a composição fenólica avaliada.

A maior atividade antioxidante foi observada nas cachaças G (49,40%) e A (45,47%), seguidas da amostra F (33,56%), cujo composto majoritário foi o siringaldeído (G) e ácido gálico (A e F).

Nas cachaças envelhecidas em carvalho, observou-se maior atividade para a amostra G, seguida das amostras J, I e B, sendo as duas últimas consideradas estatisticamente iguais.

Para as cachaças envelhecidas em jequitibá (C e D), observou-se maior atividade antioxidante na amostra que também apresentou a maior concentração de compostos fenólicos (D).

Dependendo da composição fenólica e concentração no meio, a embalagem de vidro transparente pode afetar as propriedades antioxidantes das amostras envelhecidas.

REFERÊNCIAS

- ALANÓN, M. E. et al. Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. **Food Chemistry**, London, v. 129, p. 1584-1590, 2011.
- ALONSO, A. M. et al. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from sherry wines and correlation with their content in polyphenols. **Food Research International**, v. 37, p. 715-721, 2004.
- AOSHIMA, H. et al. Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 52, p. 5240-5244, 2004.
- BARTOSZEK, M.; POLAK, J. An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. **Food Chemistry**, London, v. 132, p. 2089-2093, 2012.
- BELCHIOR, A. P. et al. Ensaio laboratorial sobre a cinética de extração de compostos de baixa massa molecular da madeira pela aguardente. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Runa, v. 18, p. 29-41, 2003.
- BETTIN, S. M. et al. Phenols and metals in sugar-cane spirits. Quantitative analysis and effect on radical formation and radical scavenging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 215, p. 169-175, 2002.
- BIANCHI, A.; MARCHETTI, N.; SCALIA, S. Photodegradation of (-)-epigallocatechin-3-gallate in topical cream formulations and its photostabilization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 56, p. 692-697, 2011.
- CANAS, S.; CASANOVA, V.; BELCHIOR, A. P. Antioxidant activity and phenolic content of portuguese wine aged brandies. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, p. 626-633, 2008.
- CANAS, S. et al. High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in brandies. Development and validation. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 26, p. 496-502, 2003.

CANAS, S. et al. Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (*Castanea sativa* L.) and corresponding aged brandies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 47, p. 5023-5030, 1999.

CARDOSO, D. R. et al. Sugarcane spirit extracts of oak and Brazilian woods: antioxidant capacity and activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 1109-1116, 2008.

CATÃO, C. G. et al. Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 7, p. 741-747, 2011.

CHEN, C. W.; HO, C. T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black tea. **Journal Food Lipids**, v. 2, n. 1, p. 35-46, Mar. 1995.

FARIA, J. B. et al. Evaluation of Brazilian woods as an alternative to oak for cachaças aging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 83-87, 2003.

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

GOLDBERG, D. M. et al. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 47, p. 3978-3985, 1999.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archive Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

HAGERMAN, A. E. et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 46, p. 1887-1992, 1998.

HENDRICKSON, J. B.; CRAM, D. J.; HAMMOND, G. S. **Organic chemistry**. 3. ed. Tokyo: Kogakusha, 1970. 1279 p.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of volatile components isolated from eucalyptus species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, San Diego, v. 81, p. 1573-1579, 2001.

LI, W.; BETA, T. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of anthograin liqueur. **Food Chemistry**, London, v. 127, p. 968-975, 2011.

LOCKHART, H.; PAINE, F.A. **Packaging of pharmaceutical and healthcare products**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 211 p.

LU, Y.; YEAP FOO, L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, London, v. 68, p. 81-85, 2000.

KLOCK, U. et al. **Química da madeira**. 3. ed. rev. Curitiba: UFP/DETF, 2005. 86 p.
Disponível em: <
<http://www.marioloureiro.net/ciencia/biomass/quimicadamadeira.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J.; TORRONEN, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. **Journal Agricultural Food Chemistry**, San Diego, v. 54, p. 7193-7199, 2006.

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

MOCHIZUKI, M. et al. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1569, p. 35-44, 2002.

MORI, F. A. et al. Influência da qualidade da madeira no envelhecimento da aguardente. In: _____. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. p. 243-270.

MULLEN, W. et al. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 50, p. 5191-5196, 2002.

PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 54, p. 7270-7276, 2006.

PINELO, M. et al. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 52, p. 1177-1180, 2004.

PORTO, C. da. et al. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 48, p. 4241-4245, 2000.

PRIYADARSINI, K. I. et al. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 50, p. 2200-2006, 2002.

PSARRA, E. et al. Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1014-1020, 2002.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 753-758, 2003.

TENNESEN, H. H. Photodecomposition of drugs. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. editors. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 2nd ed. New York: M. Dekker; 2002. v. 3, p. 2197-2203.

UMAR, A. et al. Effect of age of armagnac extract and duration of treatment on antithrombotic effects in a rat thrombosis model. **Thrombosis Research**, v. 111, p. 185-189, 2003.

VINSON, J. A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 49, p. 5315-5321, 2001.

VIRIOT, C. et al. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 41, p. 1872-1879, 1993.

ZACARONI, L. M. et al. Determination of phenolic compounds and coumarins in sugar cane spirit aged in different species of wood. **Analytical Letters**, v. 44, n. 12, p. 2061-2073, 2011.

WANG, M.; JIN, Y.; HO, C. T. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2,-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 47, p. 3974-3977, 1999.

WANG, R.; ZHOU, W. B.; JIANG, X. H. Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide range of temperature, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, San Diego, v. 56, p. 2694-2701, 2008.

CAPÍTULO 5: EFEITO DA LUMINOSIDADE NA CONCENTRAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA DE AGUARDENTES DE CANA/ CACHAÇAS ARMAZENADAS EM VIDRO POR UM PERÍODO DE SEIS MESES

RESUMO

O efeito carcinogênico e mutagênico atribuído ao carbamato de etila (CE) nas últimas décadas tem incentivado as pesquisas na busca por técnicas adequadas para detecção e quantificação desse contaminante, que permita adequadamente apontar os precursores e a etapa do processo de produção da bebida responsável por sua formação. Até o momento, não se tem definido se o CE se forma na fermentação, destilação ou armazenamento do produto. Alguns pesquisadores acreditam que venha da ativação fotoquímica de precursores presentes na cachaça ativados pelo metal cobre, outros apontam a possível formação de CE durante o armazenamento em barris de madeira. Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da luz de cachaças envelhecidas armazenadas em vidro por um período de seis meses. A quantificação de CE foi feita por HPLC com detector de fluorescência, após derivação prévia das amostras e padrões com 9-xantidrol. De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras analisadas apresentaram concentração de CE abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira, sendo a maior concentração encontrada de 79,70 $\mu\text{g L}^{-1}$. Quanto aos fatores luminosidade e período de armazenamento, 70% das amostras sofreram a influência desses parâmetros, observando-se diminuição mais acentuada da concentração de CE nas amostras F, G, H e I submetidas à ausência de luz. Para as amostras A e C, observou-se aumento na concentração de CE nas amostras submetidas à luz e diminuição na concentração naquelas submetidas à ausência de luz. No entanto, para a amostra B, a concentração de CE permaneceu constante sob a ausência de luz, aumentando em sua presença. Para a amostra J, observou-se diminuição na concentração de CE para quantidades abaixo do LQ do método, para ambos os tratamentos analisados. Nas demais amostras (D e E), os valores encontrados apresentaram-se abaixo do LQ do método.

Palavras-chave: Contaminante. Cachaça. Luminosidade.

ABSTRACT

The carcinogenic and mutagenic effect attributed to ethyl carbamate (EC) in recent decades has been motivating research in the search for appropriate techniques for detection and quantification of that pollutant, allowing to adequately indicate the precursors and the drink production process stage the responsible for its formation. Until the moment, it has not been defined if EC is formed during the fermentation, distillation or storage of the product. Some researchers believe that it comes from the photochemical activation of precursors present in the sugarcane spirits activated by the metal copper, others point to the possible formation of EC during the storage in wooden barrels. Based on the above, this study aimed to evaluate the influence of light on aged sugarcane spirits stored in glass for a period of six months. The quantification of EC was made by HPLC with fluorescence detector, after previous derivation of the samples and standards with 9-xantidrol. According to the obtained results, all of the analyzed samples presented an EC concentration below the limit established by the Brazilian legislation, the highest concentration found being $79.70 \mu\text{g L}^{-1}$. As for the factors light and storage period, 70% of the samples demonstrated the influence of those parameters, there being an accentuated decrease of the EC concentration in the samples F, G, H and I submitted to light absence. For the samples A and C, an increase was observed in the concentration of EC in the samples submitted to light and a decrease in the concentration of those submitted to light absence. However, for the sample B, the EC concentration of remained constant under the light absence, increasing in its presence. For the sample J, a decrease was observed in the EC concentration for amounts below the quantification limit (QL) of the method, for both analyzed treatments. In the other samples (D and E), the values found were below the QL of the method.

Key words: Contaminant. Sugarcane spirits. Luminosity.

1 INTRODUÇÃO

O carbamato de etila ($C_2H_5OCONH_2$) (CE) é conhecido por seu potencial efeito carcinogênico (IARC, 1987; ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991), podendo ser encontrado em muitos alimentos fermentados, especialmente bebidas alcoólicas (EFSA, 2007; LACHENMEIER, 2005). Acredita-se, que possa ser formado pela reação entre etanol e compostos nitrogenados, tais como o citrulina, ureia e o cianeto de hidrogênio. Este último normalmente deriva de glicosídeos cianogênicos presentes nas matérias-primas (EFSA, 2007).

Níveis relativamente elevados de carbamato de etila (CE) foram encontrados em cachaça desde o início deste século (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008; LACHENMEIER et al., 2010), causando preocupação no Brasil. Recentemente, esses resultados foram agravados por um estudo de avaliação de risco, mostrando que CE representa um risco significativo de câncer para a população brasileira que consome bebidas alcoólicas, com maior exposição resultante da cachaça (LACHENMEIER et al., 2010).

Em 2005, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu pela instrução normativa nº 13 o valor de $150,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para o CE presente na cachaça até 2010 (BRASIL, 2005). Em 2012, a instrução normativa nº 27 de 13/09 prorrogou esse tempo até 2014 (BRASIL, 2012).

A formação desse contaminante na cachaça ainda não está bem elucidada. Alguns autores acreditam que ele venha do processo de fermentação, outros que sejam formados durante a destilação, atribuindo a esse processo forte evidências da relação entre o tipo de destilador (contínuo ou descontínuo), constituição de partes ascendentes e descendentes (cobre ou aço inoxidável), tipo de aquecimento (direto ou indireto), corte das frações (cabeça, coração e cauda) e taxa de refluxo durante o processo, aos níveis de CE encontrados. No

entanto, alguns estudos apontam possível formação de CE durante o armazenamento em barris de madeira (NÓBREGA et al., 2009; 2011).

O cianeto é um provável precursor do CE e, até o momento, duas rotas químicas têm sido propostas como as mais prováveis. A primeira baseia-se na complexação de cianeto com Cu^{2+} , seguido pela sua oxidação para o cianogênio, com desproporcionamento subsequente de cianeto a cianato; o cianato, então, reage com etanol para formar carbamato de etila. A segunda via é baseada na oxidação sob luz UV de compostos insaturados presentes em bebidas alcoólicas, que produzem radicais livres (ou hidroperóxidos orgânicos), os quais catalisam a oxidação de cianeto a cianato, o que pode ocorrer durante o armazenamento de bebidas (GUERAIN; LEBLOND, 1993). Os fatores que influenciam a formação de carbamato de etila a partir de cianeto são pH, luz, teor de etanol, temperatura, presença de grupos carbonila em moléculas orgânicas, concentração de íons Cu^{2+} na bebida (RIFFIKIN et al., 1989; BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990).

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da luz e do período de armazenamento em garrafas de vidro, na concentração de carbamato de etila de cachaças envelhecidas sob diferentes condições.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as amostras foram coletadas e analisadas conforme apresentado abaixo.

2.1 Obtenção das amostras

Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de 2 meses, durante um período de 6 meses, das amostras de cachaça envelhecidas sob diferentes condições (Tabela 1), acondicionadas em garrafas transparentes e em garrafas cobertas com folha de alumínio, constituindo os tratamentos do experimento. Durante a realização do experimento, tanto os recipientes de vidro como os cobertos com folha de alumínio foram armazenados à temperatura ambiente e expostos à luminosidade natural, objetivando-se avaliar o seu período de prateleira. Essas amostras foram analisadas por HPLC quanto à concentração de CE no Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente do Departamento de Química da UFLA. Na Tabela 1, estão algumas características referentes às amostras analisadas.

Tabela 1 Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).

Amostra	Local	Madeira	Capacidade do barril (L)	Tempo de armazenamento (meses)
A	Passa quatro	Castanheira	700	36
B	Passa quatro	Carvalho	200	36
C	Passa quatro	Jequitibá	20.000	36
D	Barbacena	Jequitibá	10.000	60
E	Lavras	Amburana	10.000	48
F	Piranguinho	Louro-canela	50.000	24
G	Piranguinho	Carvalho	50.000	48
H	Itajubá	Jatobá	4.000	6
I	Itajubá	Carvalho	1.000	24
J	Perdões	Carvalho	200	12

2.2 Metodologia, reagentes e solventes

O método utilizado para a quantificação de carbamato de etila consistiu da derivação prévia, para posterior análise cromatográfica, conforme metodologia validada por Machado (2010).

Os reagentes empregados para análise foram padrão de carbamato de etila 97% (Acros Organics), etanol, propanol, hexano, ácido clorídrico (HCl), acetato de etila, acetato de sódio, acetonitrila grau HPLC (Merck), água ultra-pura, 9-xantidrol 97% (Acros Organics). Para a realização dos experimentos, o 9-xantidrol foi purificado por recristalizações sucessivas em hexano (ANJOS et al., 2011).

2.3 Derivação do padrão de carbamato de etila

A reação química envolvida na etapa de derivação do carbamato de etila está apresentada na Figura 1.

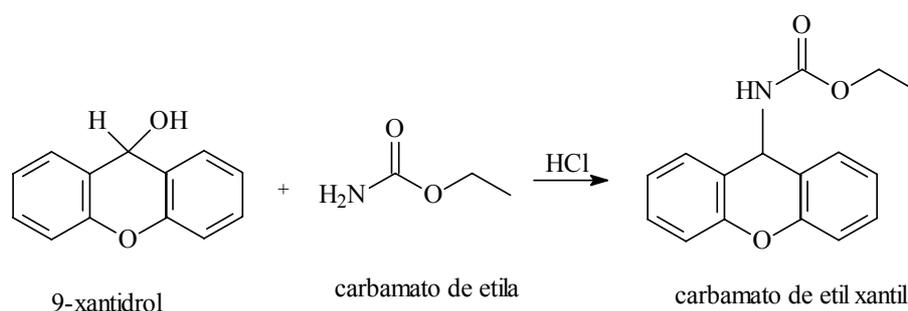


Figura 1 Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas (Fonte: Anjos et al., 2011)

Em frasco âmbar, preparou-se uma solução de 9-xantidrol $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em propanol; a esta foram adicionados 20 mL de uma solução padrão de carbamato de etila $4,00 \text{ g L}^{-1}$, preparada em etanol 40%. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de HCl $5,50 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura reacional foi mantida sob agitação por aproximadamente 1 minuto; após agitação, foi mantida em repouso por 60 minutos. Os cristais obtidos foram filtrados e recristalizados em hexano (MACHADO, 2010; ANJOS et. al., 2011).

Para a análise quantitativa, preparou-se uma solução-estoque do carbamato de etila derivado, numa concentração de $10,00 \text{ mg L}^{-1}$, em acetato de etila. Para a construção da curva analítica, foram realizadas diluições em etanol 50% a partir da solução-estoque previamente preparada, sendo preparadas soluções de trabalho em concentrações que variaram de $5,00$ a $100,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

2.4 Derivação das amostras

Em frasco âmbar, adicionaram-se 4,00 mL de cachaça, seguidos de 0,80 mL de solução de xantidrol $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (preparada em propanol). Após agitação, adicionou-se 0,40 mL de HCl $1,50 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo a mistura reacional sob agitação por 1 minuto. Em seguida, ela foi mantida em repouso por 60 minutos, sendo, posteriormente, filtrada em membranas de polietileno $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) (MACHADO, 2010; ANJOS et. al., 2011).

Para as análises do carbamato de etila (CE), foram consideradas as amostras acondicionadas em recipientes de vidro mantidas sob a presença e ausência de luz, a fim de avaliar a influência do armazenamento da bebida, em diferentes condições, na concentração de carbamato de etila.

2.5 Condições cromatográficas

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

A quantificação do carbamato de etila foi realizada utilizando-se o método de padronização externa. Os comprimentos de onda de excitação e emissão empregados foram 233 nm e 600 nm, respectivamente. O fluxo utilizado em toda a análise foi de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de $20,00 \text{ }\mu\text{L}$. A eluição foi realizada em sistema do tipo

gradiente (Tabela 2), sendo a fase móvel composta por solução de acetato de sódio 20 mmol L⁻¹ (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B).

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

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

*Fase móvel: Solvente A: solução de acetato de sódio 20 mM
Solvente B: acetonitrila

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

2.6 Delineamento experimental

Os resultados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Scott Knott (1974), ao nível de 95% de confiança. Para a avaliação dos dados, utilizou-se o delineamento inteiramente

casualizado (DIC), com os tratamentos dispostos em esquema fatorial (10 X 4 X 2), sendo dez amostras de diferentes tonéis, quatro tempos de coleta (0, 2, 4 e 6 meses) e condições de luminosidade (claro e escuro), com duas repetições. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar, segundo Ferreira (2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O carbamato de etila foi quantificado por HPLC em todas as amostras analisadas.

3.1 Carbamato de etila

Na Figura 2 verifica-se o cromatograma obtido para o padrão de CE, na concentração de $90,00 \mu\text{g L}^{-1}$. Esse cromatograma evidencia separação adequada do padrão de carbamato de etila derivado, corroborando com os resultados apresentados por Machado (2010). O tempo de retenção médio obtido para o CE foi de 13,01 minutos.

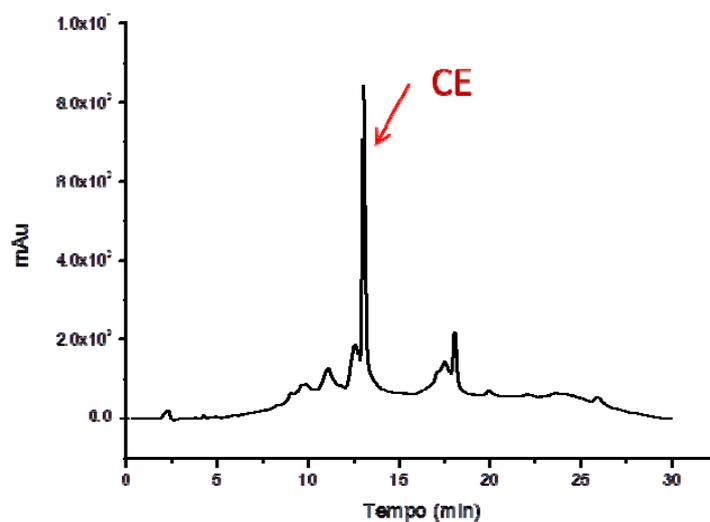


Figura 2 Cromatograma de uma solução padrão de CE derivado ($90 \mu\text{g L}^{-1}$)

Na Figura 3, observa-se o perfil cromatográfico de uma das amostras analisadas (amostra B), após seis meses de armazenamento, frente aos dois tratamentos empregados, observando-se nessa amostra um aumento na concentração de CE para a amostra armazenada sob a presença de luz.

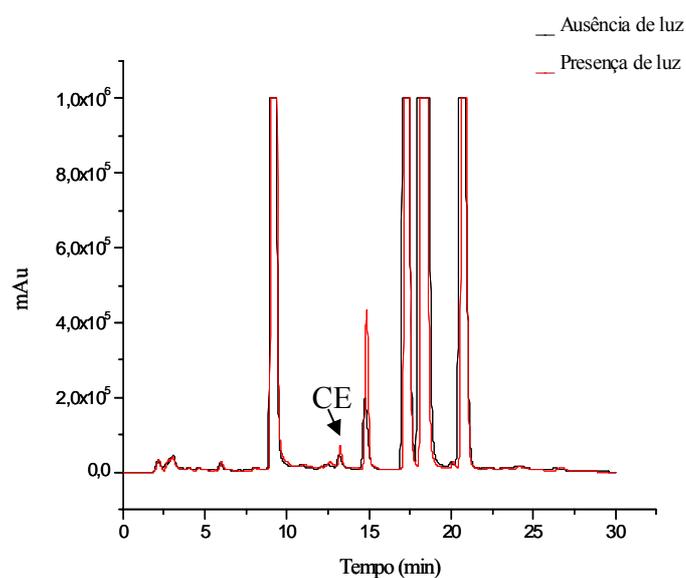


Figura 3 Sobreposição dos cromatogramas do CE da amostra B sob a presença e ausência de luz, após 6 meses de armazenamento em recipientes de vidro

A quantificação de CE nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 5155,20 + 8027,10x$), em que o y é a área do pico obtida por meio das análises de soluções-padrão de carbamato de etila e x, a concentração correspondente (Figura 4). Por meio dessas, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de determinação, que é um parâmetro que permite estimar a

qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009). A Anvisa recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 Brasil (2003) e o Inmetro (2003) um valor acima de 0,90. O coeficiente de determinação obtido de 0,9979 indica forte correlação linear entre a concentração de CE e a área do pico.

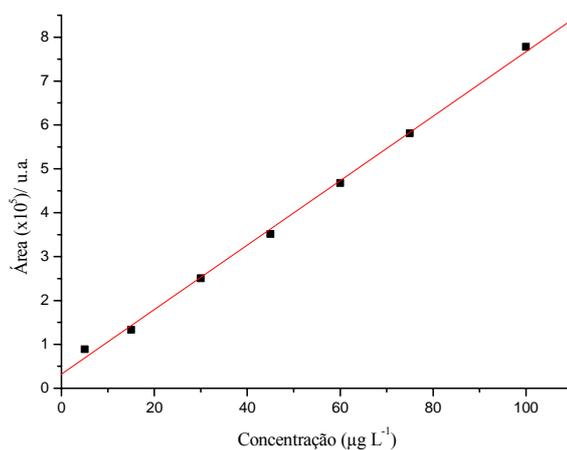


Figura 4 Curva analítica construída para a quantificação de carbamato de etila ($5\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando os parâmetros da curva analítica, cujos valores encontrados foram $3,81$ e $11,53 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos foram similares ao de trabalhos em que se utilizaram a mesma técnica para a quantificação do CE em diferentes bebidas alcoólicas, com valores de limites de

detecção que variam de 0,02 a 4,20 $\mu\text{g L}^{-1}$, e de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 4,00 mg L^{-1} , para o limite de quantificação (HERBERT et al., 2002; MADRERA; VALLES, 2009; MACHADO, 2010; ANJOS et al., 2011).

As concentrações de carbamato de etila obtidas nas amostras de cachaça sob a presença e ausência de luz, analisadas a cada dois meses durante seis meses, estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras sob a presença e ausência de luz, analisadas durante seis meses.

Amostras	Luminosidade	Mês			
		0	2	4	6
A	Claro	16,57±0,51Ab	16,46±0,60Ab	18,28±0,62Aa	19,44±0,29Aa
	Escuro	16,57±0,51Aa	14,31±0,51Bb	<LQ	<LQ
B	Claro	38,02±1,41Ab	38,07±0,77Ab	43,75±2,87Aa	44,13±2,24Aa
	Escuro	38,02±1,41Aa	37,73±0,40Aa	37,04±0,27Ba	35,58±1,22Ba
C	Claro	11,95±0,02Ab	11,49±0,40Ab	23,58±1,37Aa	23,04±0,12Aa
	Escuro	11,95±0,02Aa	<LQ	<LQ	<LQ
D	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
E	Claro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
F	Claro	13,90±0,26Aa	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	13,90±0,26Aa	<LQ	<LQ	<LQ
G	Claro	15,24±0,22Aa	13,68±0,31Aa	14,51±0,27Aa	15,44±0,14Aa
	Escuro	15,24±0,22Aa	<LQ	<LQ	<LQ
H	Claro	79,70±0,53Aa	79,25±0,90Aa	78,76±1,12Aa	72,20±0,30Ab
	Escuro	79,70±0,53Aa	67,91±0,16Bb	69,54±0,12Bb	68,78±0,50Bb
I	Claro	51,40±0,24Aa	51,04±0,09Aa	52,54±0,99Aa	45,38±0,56Ab
	Escuro	51,40±0,24Aa	44,35±1,18Bb	42,66±0,75Bb	42,50±1,47Bb
J	Claro	12,46±2,32Aa	<LQ	<LQ	<LQ
	Escuro	12,46±2,32Aa	<LQ	<LQ	<LQ

Médias seguidas da mesma letra, sendo a minúscula na linha (entre meses) e a maiúscula na coluna (entre luminosidade), não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Por meio dos resultados obtidos, pode-se observar que todas as amostras apresentaram concentração abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira ($150,00 \mu\text{g L}^{-1}$), sendo a maior concentração encontrada de $79,70 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses resultados são similares aos de Barcelos et al. (2007), Masson (2009), Machado (2010) e Anjos et al. (2011), que também não encontraram níveis de carbamato de etila acima do permitido nas cachaças provenientes do sul de Minas Gerais.

Analisando os dados da Tabela 3, constatam-se que, entre as amostras analisadas, 70% sofreram a influência da luminosidade, observando-se diminuição mais acentuada da concentração de CE nas amostras F, G, H e I submetidas à ausência de luz. Nas amostras A e C, observam-se aumento na concentração de CE para aquelas submetidas à luz e diminuição na concentração deste, para aquelas submetidas à ausência de luz. No entanto, na amostra B, a concentração de CE permaneceu constante sob a ausência de luz, aumentando na sua presença. Para a amostra J, observou-se diminuição na concentração de CE para quantidades abaixo do LQ do método, para ambos os tratamentos analisados. Nas demais amostras (D e E), os valores encontrados apresentaram-se abaixo do LQ do método.

Esses resultados sugerem que o CE possa ser formado por meio de precursores ativados fotoquimicamente; no entanto, os diferentes comportamentos observados entre as amostras analisadas podem ser atribuídas à concentração dos compostos nitrogenados (ureia, arginina, citrulina e ornitina) e às condições (temperatura e pH) empregadas durante o processo de fermentação da cachaça. Além disso, embora todas as cachaças sejam oriundas de alambiques de cobre, Nóbrega et al. (2009; 2011); Baffa Júnior et al. (2011) mostraram correlações existentes entre a concentração deste contaminante e parâmetros envolvidos durante o processo de destilação, tais como, constituição de partes ascendentes e descendentes (cobre ou aço inoxidável), tipo de aquecimento

(direto ou indireto), corte das frações (cabeça, coração e cauda) e taxa de refluxo durante o processo. Ainda considerando esse processo, acredita-se que os principais precursores sejam cianeto (CN⁻), cobre e etanol. Segundo Lachenmeier (2005), esse cianeto seria formado pela ação enzimática e clivagem térmica dos glicosídeos cianogênicos provavelmente presentes na cana-de-açúcar, sendo a qualidade dessa extremamente importante. Estudos recentes também apontam possível formação de CE durante o armazenamento em barris de madeira; portanto, parâmetros como esses envolvidos no processo de destilação devem ser informados para uma correlação satisfatória frente à formação de CE.

Quanto a diminuição observada para algumas amostras, esta pode relacionar-se às reações de substituição no carbono acila. Como o CE é formado por um grupo éster e um grupo amida, reações podem ocorrer em ambas as partes (Figura 5).

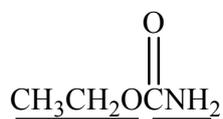


Figura 5 Estrutura química do CE constituído por um grupo éster e um grupo amida

No entanto, os ésteres possuem maior reatividade do que os grupos amidas (Figura 6).

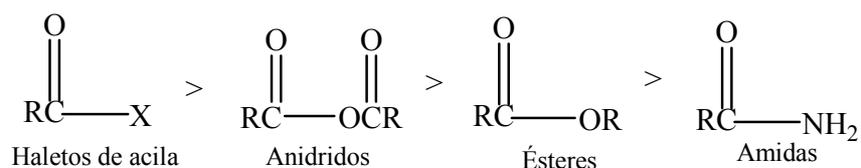


Figura 6 Ordem de reatividade dos derivados dos ácidos carboxílicos
 Fonte: Solomons; Fryhle (2002)

Apesar de as amidas apresentarem um grupo amino, elas são menos básicas que as aminas alifáticas e aromáticas. O par de elétrons do nitrogênio é doado para o grupo carbonila adjacente e, portanto, está menos disponível para formar a ligação com um próton. Em virtude da sua considerável estabilização por ressonância (Figura 7), as amidas sofrem as reações de substituição nucleofílica com mais dificuldade do que os ésteres e outros derivados dos ácidos carboxílicos (SOLOMONS; FRYHLE, 2002). Portanto, para que as reações ocorram no grupo amida, condições mais drásticas são exigidas, como tempo mais longo e temperatura mais alta, do que para os ésteres.

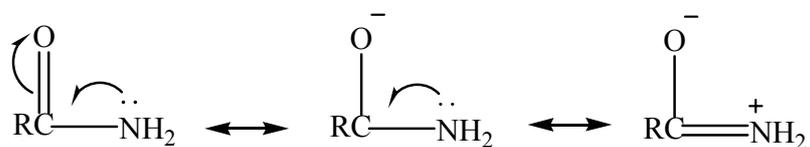


Figura 7 Estruturas de ressonância das amidas
 Fonte: Solomons; Fryhle (2002)

Além disso, as amidas sofrem apenas reação de hidrólise, podendo os ésteres sofrerem reações de hidrólise, etanolise e amonólise (Figura 8) (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

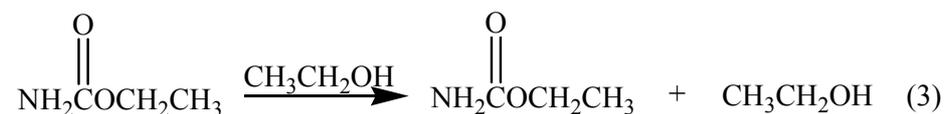
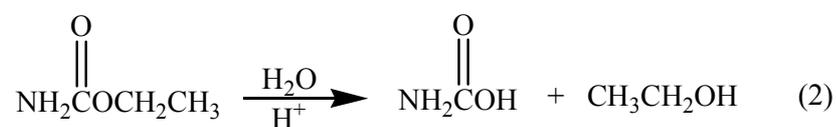
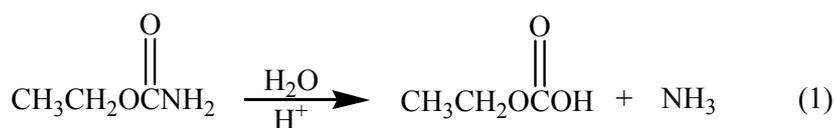


Figura 8 Reações de hidrólise no grupo amida (1) e reações de hidrólise (2), etanolise (3) e amonólise (4) com o grupo éster

Fonte: Solomons; Fryhle (2002)

Andrade Sobrinho et al. (2009), em trabalhos correlatos, avaliaram a variação da concentração de CE com o tempo, analisando a concentração desse composto em 15 amostras de aguardente de cana após 36 meses de repouso e ao abrigo da luz. Observaram que as diferenças entre as concentrações de CE encontradas para essas amostras apresentaram uma variação de -5,3 a 6,7%, sugerindo que esse composto é estável após a sua formação. Posteriormente, Galinarro e Franco (2011) analisaram o CE em 15 amostras de aguardente coletadas *in loco* em diferentes destilarias, avaliando parâmetros como presença

e ausência de luz, temperatura e bidestilação da bebida. De acordo com os resultados, os autores não encontraram diferenças significativas na concentração de CE entre as amostras irradiadas e não irradiadas com luz solar, descartando a hipótese de haver um provável precursor ativado fotoquimicamente; porém como são amostras oriundas de diferentes destilarias e processos de produção, a presença de precursores do CE e sua concentração e disponibilidade no meio podem variar. No entanto, em trabalhos anteriores relatam-se a influência da luz e estocagem na formação desse contaminante em vinhos. Tegmo-Larsson e Spittler (1990), pesquisando a influência da luz e estocagem na formação de CE, avaliaram a formação e/ou aumento deste em 15 amostras de vinhos tintos e brancos de mesa, armazenados em três temperaturas (43°C, 32°C e 22°C) no escuro e a 22°C sob luz fluorescente. A concentração de CE foi determinada inicialmente e após 3, 6 e 12 meses de armazenamento. Na maioria dos vinhos, o CE aumentou em função do tempo e temperatura. Após 12 meses no escuro a 43°C, o carbamato de etila em dois vinhos tintos aumentou de 20 a 30 vezes. Em nove dos vinhos, aumentou de 3 a 9 vezes, mantendo-se inalterado em quatro amostras. No entanto, a luz não influenciou significativamente a formação de carbamato de etila, seja em garrafas verdes, seja em claras.

Lachenmeier et al. (2005) encontraram resultados contrários aos do trabalho citado acima, em aguardentes de frutas. Eles observaram que a exposição à luz UV levou ao aumento no teor de CE nas amostras, em média de 2,3 mg L⁻¹ e que o armazenamento da bebida no escuro não levou a diferenças estatisticamente significativas. Segundo os autores, essa formação relaciona-se à presença de cianeto, cuja reação para formação de CE é influenciada pela luz, pH, temperatura, teor de etanol, proximidade de grupos carbonílicos em moléculas orgânicas e à presença de íons cobre ou ferro na bebida. Para Zimmeli e Schlatter (1991), a formação natural de CE em aguardentes de fruta ocorre na presença de etanol, cianeto de hidrogênio e substâncias ativas fotoquimicamente.

Em vinhos, além dos cianetos de hidrogênio, precursores importantes também podem estar envolvidos, como o carbamoil e ureia.

Lawrence et al. (1990) e Cook et al. (1990) relataram a correlação existente entre a formação de CE e o período de armazenamento, sugerindo que isso ocorre de forma gradativa, por meio da reação do etanol e a ureia formada pela degradação de compostos nitrogenados, tais como a arginina, citrulina e ornitina. Além desses, compostos nitrogenados, como o fosfato de carbamila e o íon cianeto, têm sido estudados como possíveis precursores na formação de CE, antes e após o processo de destilação.

Stevens e Ough (1993) avaliaram por dois anos a influência do tempo e temperatura de armazenamento de vinhos em garrafas de 125 mL, na formação de CE, por meio da reação do etanol com ureia e com citrulina, constatando que a concentração de ureia e citrulina e a temperatura de estocagem do vinho têm relação direta com a formação de CE durante o período de armazenamento da bebida.

Em 2004, Hasnip et al. estudaram durante três anos os efeitos do tempo e da temperatura na concentração de carbamato de etila em vinho. Nesse estudo, monitoraram a mudança na concentração de carbamato de etila, de etanol, de ureia e de citrulina, sendo esses dois últimos os precursores principais do carbamato de etila no vinho. Eles observaram diminuição na concentração de ureia e de citrulina e um aumento na concentração de CE. No entanto, para bebidas destiladas, rotas de formação de CE têm sido propostas durante o processo de destilação da bebida e durante o armazenando, considerando como precursores o cianeto, etanol, cobre e compostos ativados fotoquimicamente.

Embora alguns autores acreditem que a destilação da cachaça em alambiques de cobre promova a formação do CE catalisado pelo metal (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; BRUNO et al., 2007), em estudos recentes foi demonstrado a não correlação

entre a concentração de cobre e CE em cachaças (BARCELOS et al., 2007; MASSON, 2009; MACHADO, 2010; ZACARONI et al., 2011; ANJOS et al., 2011).

Em face dos diferentes comportamentos observados nas bebidas armazenadas na luz, observa-se grande dependência da formação do CE com a presença de precursores formados durante o processo produtivo, bem como sua disponibilidade no meio durante o armazenamento. Como relatado, o CE pode sofrer reação de substituição tanto no grupo éster como no grupo amida, o que pode ter relação direta com as diferentes composições químicas das bebidas analisadas, seja pelo processo de fermentação ou destilação, seja pela incorporação de compostos da madeira. Portanto, estudos mais detalhados envolvendo outros fatores e etapas do processo de produção da bebida devem ser investigados, com uma caracterização mais ampla dos compostos da bebida a fim de que se esclareçam quais são os principais precursores e o que levam à formação do CE.

4 CONCLUSÃO

Todas as amostras analisadas apresentaram concentração de CE abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira ($150,00 \mu\text{g L}^{-1}$), sendo a maior concentração encontrada de $79,70 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os fatores luminosidade e período de armazenamento exerceram influência em 70% das amostras analisadas, observando-se diminuição mais acentuada da concentração de CE nas amostras F, G, H e I submetidas à ausência de luz. Para as amostras A e C, observou-se aumento na concentração de CE nas amostras submetidas à luz e diminuição na concentração deste naquelas submetidas à ausência de luz. Na amostra B, a concentração de CE permaneceu constante sob a ausência de luz, aumentando na sua presença. Para a amostra J, observou-se diminuição na concentração de CE para quantidades abaixo do LQ do método, para ambos os tratamentos analisados. Nas demais amostras (D e E), os valores encontrados apresentaram-se abaixo do LQ do método.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (Cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 1074-1077, 2002.
- ANDRADE SOBRINHO, L. G. et al. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.
- ANJOS, J. P. et al. Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 874-878, 2011.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, San Diego, v. 49, 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**, London, v. 129, p. 1383–1387, 2011.
- BARCELOS, L. V. F. et al. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 1009-1011, 2007.
- BATTAGLIA, R.; CONACHER, B. S.; PAGE, B. D. Ethyl carbamate in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Additives and Contaminantes**, v. 7, p. 477-496, 1990.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 2 de junho de 2003. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 de jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 jun. 2005. Seção 1. Disponível em:

<<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

BRASIL. Ministério das Cidades. **Instrução Normativa n. 27**, de 13 de setembro de 2012. Regulamenta o processo seletivo simplificado para habilitação e contratação, relativo aos exercícios de 2012 e 2013, de operações de crédito para a execução de ações de saneamento básico, nas modalidades de abastecimento de água e esgotamento sanitário. Disponível em:

<http://www.editoramagister.com/legis_23756422_instrucao_normativa_n_27_de_13_de_setembro_de_2012.aspx>. Acesso em: 15 jun. 2012.

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

COOK, R. et al. Ethyl carbamate formation in grain-based spirits. Part III. The primary source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, p. 233-244, 1990.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. ETHYL carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific opinion of the panel on contaminants. **EFSA Journal**, n. 551, p. 1-44, 2007.

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

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. F. Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destiladas; proposta para seu controle. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 996-1000, 2011.

GUERAIN, J.; LEBLOND, N. Formation du carbamate d'éthyle et élimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits à noyaux. In: CANTAGREL,

R. (Ed.). **Élaboration et connaissance des spiritueux, recherche de la qualité, tradition et innovation**. Paris: BNIC, Diffusion Tec et Doc Lavoisier, 1993. p. 330-338.

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

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. 2003.

Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. Lyon, 1987. v. 1-42, 440 p. (Supplement, 7). Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/index.php>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

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

LACHENMEIER, D. W. Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 382, p. 1407-1412, 2005.

LACHENMEIER, D. W. et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **BMC Câncer**, London, v. 10, p. 1-15, 2010.

LAWRENCE, J. F.; PAGE, B. D.; CONACHER, H. B. S. The formation and determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Advances Enviromental Science and Technology**, v. 23, p. 457-471, 1990.

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

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

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

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

NÓBREGA, I. C. C. et al. Ethyl carbamate in cachaça (Brazilian sugarcane spirit): Extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation. **Food Chemistry**, London, v. 127, p. 1243–1247, 2011.

RIFFKIN, H. L. et al. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **BMC Câncer**, London, v. 95, p. 115-119, 1989.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

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

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. 2 v.

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

TEGMO-LARSSON, I. M.; SPITTLER, T. D. Temperature and light effect on the ethyl carbamate formation in wine during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 4, p. 166-1169, 1990.

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

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, p. 325-350, 1991.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cachaça armazenada sob a presença de luz pode sofrer variações na concentração de compostos fenólicos e carbamato de etila. No entanto, a variação observada para a concentração dos compostos fenólicos não é significativa o suficiente para influenciar a atividade antioxidante da bebida. Além disso, essa atividade tem estreita relação com a composição fenólica da bebida, que irá variar de acordo com a madeira utilizada no envelhecimento. A estrutura química desses compostos pode agir inibindo mais ou menos a ação do radical. Quanto ao carbamato de etila, seu comportamento variado nas diversas amostras estudadas, com tendência maior à formação do contaminante nas bebidas submetidas à luz, sugere fortemente a presença de precursores ativados fotoquimicamente. No entanto, estudos mais detalhados devem ser realizados, buscando elucidar se esses são precursores advindos da fermentação, destilação ou se há alguma relação com a madeira e/ou o processo de envelhecimento.