



WILDER DOUGLAS SANTIAGO

**TEORES DE CARBAMATO DE ETILA E
COMPOSIÇÃO FENÓLICA NO PROCESSO DE
PRODUÇÃO E NO ENVELHECIMENTO DE
CACHAÇA EM TONÉIS DE CARVALHO
(*Quercus* sp) E AMBURANA (*Amburana cearensis*)**

LAVRAS - MG

2013

WILDER DOUGLAS SANTIAGO

**TEORES DE CARBAMATO DE ETILA E COMPOSIÇÃO FENÓLICA
NO PROCESSO DE PRODUÇÃO E NO ENVELHECIMENTO DE
CACHAÇA EM TONÉIS DE CARVALHO (*Quercus* sp) E AMBURANA
(*Amburana cearensis*)**

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

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS - MG

2013

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

Santiago, Wilder Douglas.

Teores de carbamato de etila e composição fenólica no processo de produção e no envelhecimento de cachaça em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*) / Wilder Douglas Santiago. – Lavras : UFLA, 2013.

168 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Cachaça. 2. Análise físico-química. 3. Carbamato de etila. 4. Compostos aromáticos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.63

WILDER DOUGLAS SANTIAGO

**TEORES DE CARBAMATO DE ETILA E COMPOSIÇÃO FENÓLICA
NO PROCESSO DE PRODUÇÃO E NO ENVELHECIMENTO DE
CACHAÇA EM TONÉIS DE CARVALHO (*Quercus* sp) E AMBURANA
(*Amburana cearensis*)**

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

Aprovada em 22 de fevereiro de 2013.

Dra. Adelir Aparecida Saczk

UFLA

Dra. Ana Maria de Resende Machado

CEFET/MG

Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

LAVRAS - MG

2013

A Deus, pela vida e a conquista de mais uma vitória;

*Aos meus amados pais, Lourival e Maria de Fátima, pela compreensão,
apoio e incentivo;*

*À minha noiva, Juliana, por ser imprescindível na minha vida, pelo
incentivo, apoio e amor;*

Aos meus irmãos, Luiz e Josley, pelo carinho, incentivo e amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus queridos pais, Lourival e Maria de Fátima, por acreditarem em mim ao longo de mais uma vitória.

A minha noiva, Juliana, que tanto amo, pelo apoio, companheirismo e amor.

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

À Profa. Maria das Graças Cardoso, pelos anos de convivência, ensinamentos compartilhados, confiança, atenção, incentivo e amizade.

Às Prof^{as} Adelir Aparecida Saczk e Josefina Aparecida Souza, pelo apoio, compreensão, atenção e amizade.

À professora Ana Maria de Resende Machado, pela participação na banca avaliadora, conhecimentos compartilhados e amizade.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Josiane Maria Mendes e sua família, produtores da Cachaça Artesanal João Mendes, pela valiosa contribuição e apoio, ao nos ceder as amostras de cachaças. Meus agradecimentos ao funcionário José Geraldo (Pelinha), pela atenção, apoio e profissionalismo.

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

Aos amigos e companheiros de trabalho, Lidiany, Jean, Felipe, João, Leonardo e Rafaela. E, em especial, à nossa Técnica Cleusa de Fátima e Silva Ribeiro, por seu profissionalismo, amizade e por estar disposta sempre a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica: Milene, Juliana Valério, Lucilene, Cíntia, Maria Luíza, Christiane, Karen e Bruna. Em especial, ao grande amigo Marcos, pelo companheirismo, amizade e valiosas contribuições.

Aos órgãos de fomento, CNPq, FAPEMIG e a CAPES, pelo suporte financeiro.

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

RESUMO

A cachaça, tradicional e popular bebida brasileira, é o destilado mais consumido em nosso país. O conhecimento de sua composição química é importante, visto que os estudos dos compostos potencialmente tóxicos têm sido um fator determinante no controle de qualidade. Entre esses compostos destaca-se, o carbamato de etila, por ser considerado um carcinógeno humano. O hábito do envelhecimento está se tornando uma prática comum entre os produtores que buscam agregar valores ao seu produto. Madeiras nativas vêm sendo usadas para o envelhecimento, substituindo a tradicional madeira de carvalho. Diante do exposto, no presente trabalho teve-se como objetivo realizar um acompanhamento periódico da qualidade físico-química e do perfil cromatográfico quanto aos teores de carbamato de etila e da composição fenólica da cachaça no processo de produção e no envelhecimento em tonéis de carvalho e amburana. Pelas análises de variância e ACP, foram observadas importantes alterações químicas na bebida. Os parâmetros físico-químicos no envelhecimento em tonel de carvalho mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação, enquanto nas amostras em amburana, a acidez volátil apresentou-se elevada a partir do 1º mês de envelhecimento. Em ambas as madeiras em estudo, ocorreram um aumento progressivo na incorporação de compostos fenólicos à bebida, sendo os compostos majoritários para o tonel de carvalho o ácido gálico, siringaldeído e ácido siríngico, e no tonel de amburana, o ácido vanílico, siringaldeído, ácido sinápico e ácido gálico. A concentração de carbamato de etila, ao longo do processo de produção e na etapa de envelhecimento, apresentou valor inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação para esse composto.

Palavras-chave: Cachaça. Envelhecimento. Compostos fenólicos. Carbamato de etila.

ABSTRACT

Cachaça, a traditional and popular Brazilian beverage, is the most extensively consumed distilled beverage in Brazil. The knowledge of its chemical composition is important, including studies of potentially toxic compounds, has been a determining factor in quality control. Among these compounds, ethyl carbamate is emphasized because it is already considered a human carcinogen. The habit of aging the beverage is becoming a common practice among producers who seek to increase the value to their product. Native woods have been used for aging as a replacement for traditional oak wood. The present study sought to perform regular monitoring of the physical-chemical and chromatographic profile of the cachaça to determine the concentrations of ethyl carbamate and phenolic composition during the production process and aging in oak and amburana barrels. Major chemical changes were observed in the beverage through the analysis of variance and PCA. The physical-chemical parameters observed after aging in oak barrels remained within the limits set by the legislation, while for the samples aged in amburana, volatile acidity was high after the first month of aging. A progressive increase in the incorporation of phenolic compounds into the beverage was observed for both types of wood. The major compounds encountered in the cachaça aged in the oak barrel were gallic acid, syringaldehyde and syringic acid, and those found in the amburana were vanillic acid, gallic acid, syringaldehyde and sinapic acid. The concentration of ethyl carbamate throughout the production process and the aging step was lower than the maximum prescribed by law for this compound.

Keywords: Cachaça. Aging. Phenolic compounds. Ethyl carbamate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma do processo de produção da cachaça de alambique.....	30
Figura 2	Equação simplificada da fermentação alcoólica.....	34
Figura 3	Fórmula estrutural do carbamato de etila.....	49
Figura 4	Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas.....	57
Figura 5	Aspectos macroscópicos da madeira.....	62
Figura 6	Estrutura química da lignina.....	65
Figura 7	Conversão de alguns fenóis derivados da lignina.....	66
Figura 8	Principais compostos fenólicos incorporados à cachaça	67
Figura 9	Atividades e análises realizadas.....	70
Figura 10	Reações químicas envolvidas na análise dos ésteres.....	73
Figura 11	Reações químicas envolvidas na análise de aldeídos.....	74
Figura 12	Reações químicas envolvidas na análise de álcoois superiores.....	75
Figura 13	Reações químicas envolvidas na análise de furfural.....	76
Figura 14	Reações químicas envolvidas na análise de metanol.....	77
Figura 15	Reações químicas envolvidas na análise de cobre.....	78
Figura 16	Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	80
Figura 17	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, quanto aos seus parâmetros físico-químicos.....	98
Figura 18	Avaliação da graduação alcoólica em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e	

	Amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	99
Figura 19	Avaliação da acidez volátil em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	101
Figura 20	Avaliação de ésteres em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	103
Figura 21	Avaliação de aldeídos em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	104
Figura 22	Avaliação de álcoois superiores em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	105
Figura 23	Avaliação de cobre em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)..	107
Figura 24	Avaliação de metanol em função do tempo de	

	envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	108
Figura 25	Avaliação de furfural em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	110
Figura 26	Avaliação de extrato seco em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$).....	112
Figura 27	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana, quanto aos seus parâmetros físico-químicos.....	113
Figura 28	Evolução da composição fenólica total durante o período de envelhecimento das cachaças.....	114
Figura 29	Evolução da intensidade da cor em função do tempo de envelhecimento.....	116
Figura 30	Cromatograma da solução-padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido <i>p</i> -cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona e (12) ácido <i>o</i> -cumárico. Concentração de cada padrão: $1,161 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	118

Figura 31	Cromatograma da cachaça nova e da cachaça nova fortificada com os padrões de compostos fenólicos numa concentração de $1,04 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido <i>p</i> -cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido <i>o</i> -cumárico.....	120
Figura 32	Cromatograma da cachaça envelhecida no primeiro e décimo segundo mês em tonel de carvalho. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) ácido siríngico; (5) vanilina; (6) siringaldeído; (7) ácido <i>p</i> -cumárico; (8) ácido sinápico; (9) cumarina; (10) ácido <i>o</i> -cumárico.....	133
Figura 33	Cromatograma da cachaça envelhecida no primeiro e décimo segundo mês em tonel de amburana. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido <i>p</i> -cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido <i>o</i> -cumárico.....	134
Figura 34	Evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho utilizando as técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência.....	135
Figura 35	Evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça em tonel de amburana utilizando as técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência.....	136

Figura 36	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana, quanto aos compostos fenólicos (HPLC).....	137
Figura 37	Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	138
Figura 38	Cromatograma das amostras de cachaças (1° e 12° mês) envelhecidas em tonel de carvalho - comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE).....	145
Figura 39	Cromatograma das amostras de cachaças (1° e 12° mês) envelhecidas em tonel de amburana - comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE).....	146
Quadro 1	Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) exigida pela legislação brasileira (Brasil, 2005a).....	28
Quadro 2	Características das respectivas frações do destilado de cachaça.....	39
Quadro 3	Limites estabelecidos pelo Canadá para teores de carbamato de etila em bebidas alcoólicas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Gradiente de eluição da fase móvel para a análise dos compostos fenólicos.....	84
Tabela 2	Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila.....	87
Tabela 3	Avaliações físico-químicas das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”.....	94
Tabela 4	Coefficientes de correlação entre o extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade da cor nas amostras envelhecidas no tonel de carvalho.....	117
Tabela 5	Coefficientes de correlação entre o extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade da cor nas amostras envelhecidas no tonel de amburana.....	117
Tabela 6	Parâmetros, coeficientes de correlação (r^2) das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	121
Tabela 7	Resultado de exatidão (expressos em recuperação) dos compostos fenólicos nas amostras de cachaça envelhecidas.....	123
Tabela 8	Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho.....	128
Tabela 9	Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de envelhecimento da cachaça em tonel de amburana.....	130
Tabela 10	Resultado de exatidão (expressos em recuperação) de carbamato de etila nas amostras de cachaça	

	envelhecidas.....	140
Tabela 11	Concentração de carbamato de etila do caldo de cana, do mosto fermentado e das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”.....	141
Tabela 12	Concentração de carbamato de etila durante o envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana.....	143

LISTA DE SIGLAS

PIQ's	Padrões de Identidade e Qualidade
% v/v	Porcentagem de um líquido compreendido em outro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
IARC	International Agency for Research on Cancer
EFSA	European Food Safety Authority
GC	Gas Chromatography
MS	Mass Spectrometry
HECD	Hall Electrolytic Conductivity Detector
FID	Flame Ionization Detector
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
FLD	Fluorescence Detector
EC	Eletroforese Capilar
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
DAD	Diode Array Detector
RSD	Relative Standard Desviation
CV	Coefficiente de Variação
HPA's	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
ACP	Análise de Componentes Principais
MOE's	Margens de exposição
DMAB	Dimetilaminobenzaldeído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	Generalidades sobre bebidas alcoólicas.....	22
2.1.1	Uma pequena dose de história sobre a origem da cachaça....	23
2.1.2	Cenário atual.....	24
2.2	Aguardente de cana e cachaça: definição pela legislação brasileira.....	25
2.3	Etapas do processo de produção.....	28
2.3.1	Matéria-prima.....	31
2.3.2	Preparo do caldo.....	33
2.3.3	Fermentação.....	34
2.3.4	Destilação.....	36
2.3.5	Envelhecimento.....	40
2.3.6	Engarrafamento.....	41
2.4	Compostos secundários e contaminantes presentes na cachaça.....	41
2.5	Carbamato de etila.....	48
2.5.1	Ocorrência em bebidas alcoólicas.....	50
2.5.2	Mecanismos de formação.....	52
2.5.3	Métodos de análise para carbamato de etila.....	55
2.6	O envelhecimento da cachaça.....	58
2.7	Análise multivariada.....	68
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.1	Produção e obtenção das amostras.....	71
3.2	Análises físico-químicas.....	71
3.2.1	Grau alcoólico.....	72
3.2.2	Acidez volátil.....	72
3.2.3	Determinação dos ésteres.....	72
3.2.4	Determinação de aldeídos.....	73
3.2.5	Álcoois superiores.....	74
3.2.6	Determinação de furfural.....	75
3.2.7	Determinação de metanol.....	76
3.2.8	Determinação de cobre.....	77
3.2.9	Análise de extrato seco.....	78
3.3	Compostos fenólicos totais.....	79
3.4	Intensidade da cor.....	80
3.5	Análises cromatográficas das cachaças.....	81
3.5.1	Compostos fenólicos.....	81
3.5.1.1	Preparação dos padrões e amostras.....	82

3.5.1.2	Condições cromatográficas.....	82
3.5.2	Carbamato de etila.....	84
3.5.2.1	Derivação do padrão de carbamato de etila.....	85
3.5.2.2	Derivação das amostras.....	85
3.5.2.3	Condições cromatográficas.....	86
3.5.3	Validação analítica.....	87
3.5.3.1	Seletividade.....	88
3.5.3.2	Linearidade.....	89
3.5.3.3	Limite de detecção.....	89
3.5.3.4	Limite de quantificação.....	90
3.5.3.5	Exatidão.....	90
3.6	Análise estatística.....	91
3.6.1	Análise de variância.....	91
3.6.2	Análise das Componentes Principais.....	92
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
4.1	Avaliação físico-química.....	93
4.2	Compostos fenólicos totais e intensidade da cor.....	114
4.3	Análises cromatográficas.....	118
4.3.1	Compostos fenólicos.....	118
4.3.1.1	Certificação do método analítico para compostos fenólicos...	119
4.3.1.2	Quantificação dos compostos fenólicos nas amostras envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana.....	127
4.3.2	Carbamato de etila.....	138
4.3.2.1	Certificação do método analítico para carbamato de etila.....	139
4.3.2.2	Quantificação do carbamato de etila no caldo de cana, no mosto fermentado, nas frações do destilado e nas amostras envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana.....	141
5	CONCLUSÃO.....	148
	REFERÊNCIAS.....	149
	ANEXOS.....	164

1 INTRODUÇÃO

A produção de cachaça artesanal no Brasil iniciou-se no período colonial, quando os negros escravos descobriram acidentalmente a fermentação do caldo de cana. Acredita-se que essa proeza tenha ocorrido em um engenho da Capitania de São Vicente, entre 1536 a 1548, sendo denominada pelos escravos de cagaça. A cachaça se tornou um produto genuinamente brasileiro em 2001, por meio de um decreto presidencial, devido a problemas de ordem comercial, a fim de evitar conflitos com os países produtores de rum.

Por ser produzida em todo o país, a cachaça torna-se diferenciada pelos métodos de produção, pelas características culturais e históricas que caracterizam cada região. É a bebida destilada mais consumida em nosso país. 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. Para agradar e satisfazer aos países importadores, os produtores de cachaça no Brasil estão buscando associar à bebida uma imagem de qualidade. O Governo Federal vem apoiando esse esforço dos produtores, incentivando principalmente os pequenos fabricantes a se reestruturarem para colocar seu produto com qualidade no mercado. A instituição do Programa de Identidade da Cachaça, por meio da Instrução Normativa n.13, de 29/06/2005, e o Regulamento de Avaliação de Conformidade da Cachaça, foram contribuições indispensáveis ao fortalecimento da bebida. Com isso, o Governo Federal espera aumentar a aceitação e o consumo da bebida nacional e internacionalmente.

Apesar da tradição e importância econômica dessa bebida, a cadeia produtiva da cachaça no país não é homogênea, havendo uma busca no desenvolvimento de tecnologias para aperfeiçoar e controlar a qualidade e a padronização da bebida nos aspectos físico-químicos e sensoriais. A produção

de cachaça com qualidade requer conhecimentos científicos e tecnológicos apurados, competência, sensibilidade e dedicação.

Na cadeia produtiva da cachaça, existem contaminantes residuais orgânicos e inorgânicos. Entre os orgânicos, o carbamato de etila é o composto que vem sendo mais pesquisado, pelo fato de ser um composto potencialmente tóxico. Esse contaminante já foi encontrado em diversos alimentos e bebidas fermentadas. Nos últimos anos, várias pesquisas em toda cadeia produtiva de vinhos, uísques e cachaça vêm sendo desenvolvidas para elucidar as causas da formação do carbamato de etila. A legislação brasileira estabeleceu um limite máximo de $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para essa substância em cachaças, baseando-se na legislação do Canadá, que há algum tempo tem demonstrado preocupação quanto à presença desse composto em alimentos e bebidas. Sendo assim, se faz necessário aprofundar os estudos sobre a formação do carbamato de etila em cachaça e aguardente de cana, uma vez que pesquisas nessa área ainda se encontram insuficientes.

Devido à grande competitividade da bebida no mercado, o seu envelhecimento em barril de madeira tem se tornado uma prática comum entre os produtores, agregando, assim, maior valor ao produto.

O carvalho (*Quercus* sp) é a madeira mais utilizada no envelhecimento, pois contempla o maior número de propriedades desejáveis ao processo, tais como cor, cheiro, durabilidade natural, permeabilidade, trabalhabilidade, densidade e resistência mecânica. Além dessa madeira, várias outras de origem nativa brasileira têm sido utilizadas na confecção de barris para o envelhecimento da cachaça. Entre essas, uma das espécies que tem sido muito estudada quanto ao envelhecimento de cachaça é a amburana (*Amburana cearensis*) pertencente à família Leguminosae Papilonoideae (Fabaceae) e popularmente conhecida como amburana, imburana-de-cheiro e cumaru.

O envelhecimento é uma etapa do processo de produção da cachaça no qual ocorrem diversas reações químicas entre os compostos extraídos da madeira e alguns compostos presentes na bebida, os quais são provenientes de etapas anteriores ao envelhecimento.

Os compostos fenólicos, alguns dos compostos extraídos pela bebida no processo de envelhecimento, têm sido largamente estudados na tentativa de estabelecer um perfil quanto à caracterização química de cachaças envelhecidas. Esses compostos têm despertado o interesse de estudiosos pelo fato de serem específicos para cada espécie de madeira utilizada para o envelhecimento da bebida, e apresentarem conhecidas propriedades antioxidantes.

Com base no exposto, no presente trabalho objetivou realizar um acompanhamento periódico da qualidade físico-química e do perfil cromatográfico, quanto aos teores de carbamato de etila e da composição fenólica da cachaça no processo de produção e no envelhecimento em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*), a fim de contribuir para a melhoria da qualidade do produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Generalidades sobre bebidas alcoólicas

As bebidas alcoólicas são tão antigas quanto a humanidade e numerosas como suas etnias. Fenícios, assírios, babilônios, hebreus, egípcios, chineses, germanos, gregos e romanos mencionaram-nas. Cada povo praticamente tem as suas a partir das fontes naturais próprias de açúcares e amiláceos, como frutas, cana-de-açúcar, milho, trigo, arroz, batata, centeio, aveia, cevada e mesmo raízes e folhas. Vale ressaltar que produtos oriundos de fermentação alcoólica originavam-se na antiguidade de processos espontâneos de fermentação, e só em época mais recente, começaram a ser usados nas indústrias, para sua fabricação, que são os modernos métodos da biotecnologia (AQUARONE et al., 2005).

Portanto, uma bebida alcoólica dever ser constituída, em sua maior parte, de álcool etílico e ser oriunda de uma fermentação. Ressalta-se que, apesar da antiguidade de conhecimentos das bebidas alcoólicas, tem só pouco mais de um século a descoberta do fundamental papel microbiano em sua obtenção. Hoje, a bebida alcoólica está completamente difundida, e por isso, buscam-se diferentes formas de preparo e de consumo. Os drinks e cocktails são coloridos e bonitos, despertam o desejo de consumo e são deliciosos. Cada um tem um nome e uma forma de preparo, e são válidas misturas do álcool com temperos, frutas, sucos, refrigerantes, energéticos e até outras bebidas alcoólicas. As principais bebidas alcoólicas comercializadas no Brasil são a cerveja, o vinho, o licor, a cachaça, o uísque, o conhaque e os coquetéis (AQUARONE et al., 2005; CARDOSO, 2006).

2.1.1 Uma pequena dose de história sobre a origem da cachaça

A cachaça é uma bebida fermento-destilada cuja origem vem desde o tempo da escravidão, especificadamente no século XVI com a vinda dos portugueses e as primeiras plantações de cana-de-açúcar.

Os primeiros relatos sobre a fermentação vêm dos antigos egípcios, os quais julgavam que a inalação de vapores de líquidos aromatizados e fermentados, absorvidos diretamente do bico de uma chaleira, em um ambiente fechado, curava várias moléstias. O nome dado ao produto fermentado era “água-da-vida”, acquavite em italiano, eau-de-vie em francês, acqua ardens em grego e uisgebeatha em gaélico (PATARO et. al., 2002).

Não há documentos escritos e informações precisas sobre a origem da cachaça, mas sabe-se que, na América do Sul, os índios brasileiros já utilizavam bebidas alcoólicas antes da chegada dos portugueses. Sabe-se que os ameríndios desconheciam o processo de destilação e que as bebidas por eles usadas eram produzidas por fermentação de mostos de caju, mandioca, banana da terra, milho, ananás, batata, jenipapo e mel de abelha. Tal processo foi utilizado na ativação ou iniciação do processo de fermentação, consistindo, basicamente, na mastigação prévia dos frutos ou raízes usados como matéria-prima (CASCUDO, 1983).

Os primeiros colonizadores que vieram para o Brasil apreciavam a bagaceira portuguesa e o vinho do porto trazidos da corte. Em território brasileiro, um vinho proveniente da cana-de-açúcar, a garapa-azeda, foi descoberto, num dos engenhos de Capitania de São Vicente, atualmente São Paulo, entre 1536 a 1548. O líquido ficava ao relento dentro de cochos de madeira para os animais, exalando um aroma frutado, fermentado em decorrência de sua permanência acentuada nesse recipiente, resultando, assim, em uma bebida alcoólica. Os escravos passaram a ingerir tal bebida e,

rapidamente, a notícia chegou aos senhores de engenho. Esses, que já conheciam as técnicas de destilação aplicadas ao mosto fermentado de uva para a produção da bagaceira, decidiram aplicá-las ao mosto fermentado de cana-de-açúcar, dando origem à aguardente de cana (cachaça). No início, a bebida era reservada apenas aos escravos. No entanto, com o aprimoramento das técnicas de produção, passou a fazer parte também das mesas dos senhores de engenho. Nos meados do século XVI até metade do século XVII, as “casas de cozer méis” se multiplicaram nos engenhos e a bebida tornou-se moeda corrente para a compra de escravos na África (CARDOSO, 2006; MAIA; CAMPELO, 2006; TRINDADE, 2006).

Hoje, várias marcas de alta qualidade de cachaça figuram no comércio nacional e internacional, estando presentes nos melhores restaurantes e adegas residenciais do Brasil e do mundo. A cachaça deixou de ser bebida de pobre e passou a ter lugar de destaque nos brindes nacionais, nas festas de requinte e entre os estrangeiros. Ganhou nome próprio no exterior “Cachaça do Brasil” e a ela são voltados vários planos e projetos do governo para a sua expansão em âmbito nacional e internacional (CARDOSO, 2006; APEX, 2008).

2.1.2 Cenário atual

Com uma defasagem de quase um século em relação ao uísque, em meados do século XX, a produção de cachaça passa a viver um novo momento, com um aumento na demanda e um crescente interesse pelo produto. Buscando consolidar essa fase de crescimento, ampliando a comercialização da cachaça, as empresas produtoras passaram a investir e ainda investem intensamente. Entre as áreas prioritárias se destacam o controle de qualidade e o marketing. Assim, são necessários os investimentos para o país nesse setor, pois, apesar dos aspectos polêmicos associados à produção de bebidas alcoólicas, é importante lembrar a

importância econômica e social do setor (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, SEBRAE, 2008).

O mercado de bebidas alcoólicas no Brasil é representado por bebidas destiladas (cachaça, whisky e vodca) e fermentadas (cerveja e vinho). Em relação ao volume, o mercado nacional de bebidas se divide entre cerveja (88,8%), cachaça (6,6%) e demais bebidas (4,6%); a cachaça ocupa a primeira posição no país em relação a bebidas destiladas (em volume) com mais de 87% do mercado (SEBRAE, 2008).

O agronegócio da cachaça é uma prática representativa no mercado brasileiro. Estima-se que o setor produza anualmente 1,6 bilhão de litros da bebida, tendo um total de 30 mil estabelecimentos produtores, gerando mais de 450 mil empregos diretos e indiretos. No ranking nacional, ela se destaca como a segunda bebida mais consumida. No exterior, ela é destaque como o terceiro destilado mais consumido, e a caipirinha, como um dos oito drinks mais vendidos. No entanto, a exportação da cachaça ainda é inexpressiva, sendo exportado apenas 1% do total produzido para países como Alemanha, Itália, França, EUA e Japão, de forma que praticamente toda a produção é destinada ao mercado nacional (APEX, 2008; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS, ABRABE, 2011).

O processo produtivo da cachaça se estabelece em quase todos os estados brasileiros, sendo os principais Estados produtores São Paulo, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais. Esses Estados respondem por cerca de 75% da produção nacional. O Estado de São Paulo é especializado na produção da cachaça industrial, feita em grande escala em colunas de fracionamento de aço inox. Minas Gerais é considerado o polo da produção da cachaça de alambique, que é feita em pequena escala utilizando-se alambiques de cobre. Estima-se que esse Estado represente 50% da produção da bebida de alambique, contendo 5.000 alambiques e produzindo 200 milhões de

litros/ano, com destaque para as Regiões Norte, Jequitinhonha e Rio Doce, as quais detêm cerca de 63% da produção mineira; porém, acredita-se que apenas 0,3% do que é produzido no Estado seja exportado. Embora os processos de produção dessas bebidas já estejam diferenciados, estudos devem ser realizados no intuito de diferenciá-las físico-quimicamente, de forma a gerar uma impressão digital que permita aos órgãos competentes estabelecer uma diferenciação oficial entre as cachaças industrial e de alambique (CANÇADO JÚNIOR; PAIVA; ESTANISLAU, 2009; OLIVEIRA; MAGALHÃES; BERGERAT, 2009).

A ampliação do mercado consumidor de cachaça vem incentivando melhorias, implementando controles mais rígidos e estudos mais detalhados com relação ao processo de produção da bebida, bem como na melhoria da qualidade química e sensorial (RECHE; FRANCO, 2009). Portanto, para a cachaça se destacar no mercado mundial, sua produção deve superar alguns entraves. A padronização do produto, o controle de contaminantes, como o carbamato de etila, acroleína e os metais pesados, bem como a resolução de problemas ambientais, podem ser apontados como pontos integrantes de uma pauta mínima para o crescimento do setor.

2.2 Aguardente de cana e cachaça: definição pela legislação brasileira

Atualmente, a cachaça é um produto consumido por todas as classes sociais, exigindo, portanto, um produto de melhor qualidade. Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de aprimorar tanto a qualidade da matéria-prima e variedades de cana-de-açúcar, quanto os cuidados durante o processo de produção da bebida, assim como o controle de compostos contaminantes (CARDOSO, 2006).

O Decreto Federal 4.851 de 2003, baseado na portaria 371 do Decreto original nº 2314, de 04/09/1997, dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e a fiscalização de bebidas. De acordo com esse decreto e complementado pela Instrução Normativa de nº 13, de 30/06/2005, **Aguardente de cana** é a bebida com graduação alcoólica entre 38% e 54% v/v a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares em até 6,0 g L⁻¹, expressos em sacarose. **Cachaça** é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica entre 38% e 48% v/v a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares em até 6,0 g L⁻¹, expressos em sacarose. Visando a proteger a marca brasileira no cenário internacional, o artigo 92 dessa Lei define que cachaça é um produto genuinamente brasileiro (BRASIL, 2003; BRASIL, 2005a).

De acordo com a Instrução Normativa de nº 13 de 2005, foram mantidos e acrescentados limites para outros contaminantes. Entre eles, citam-se o carbamato de etila, propenal-2 (acroleína), butanol-2, butanol-1, chumbo e arsênio (BRASIL, 2005a). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina os seguintes limites para os compostos secundários e contaminantes em aguardente de cana e cachaça (Quadro 1):

Quadro 1 Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) exigida pela legislação brasileira (BRASIL, 2005a).

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica (aguardente)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,0	54,0
Graduação alcoólica (cachaça)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,0	48,0
Sacarose, em açúcar refinado, invertido ou glicose	g L ⁻¹	6,0	30,0
Acidez volátil, em ácido acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	150,0
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL de álcool anidro	-	200,0
Aldeídos, em aldeído acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	30,0
Furfural	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Álcoois superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360,0
Álcool sec-butílico (butanol-2)	mg/100 mL de álcool anidro	-	10,0
Álcool butílico (butanol-1)	mg/100 mL de álcool anidro	-	3,0
Congêneres**	mg/100 mL de álcool anidro	200,0	650,0
Álcool metílico	mg/100 mL de álcool anidro	-	20,0
Acroleína	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Carbamato de etila	µg L ⁻¹	-	150,0
Cobre	mg L ⁻¹	-	5,0
Arsênio	µg L ⁻¹	-	100,0
Chumbo	µg L ⁻¹	-	200,0
Extrato seco	g L ⁻¹	-	6,0

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico

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

2.3 Etapas do processo de produção

Há dois tipos de produção da bebida: a industrial, que é destilada em colunas de aço inox, característica de empresas de médio e grande porte, com produção em larga escala, e a de alambique (artesanal), destilada em alambique de cobre, e produzida em pequena escala. Dentro de cada tipo, é construído um conceito de qualidade próprio, atrelado à sua estrutura produtiva e organizacional. A grande vantagem da cachaça de alambique sobre a industrial é

o aroma e o flavour característicos, enquanto a vantagem da industrial sobre a artesanal é a padronização do produto (AQUARONE et al., 2005; CARDOSO, 2006).

O processo de produção da cachaça de alambique pode ser dividido em quatro etapas fundamentais: obtenção do mosto, fermentação, destilação e envelhecimento (AQUINO et al., 2006a). Todo o processo está apresentado de maneira simplificada na Figura 1.

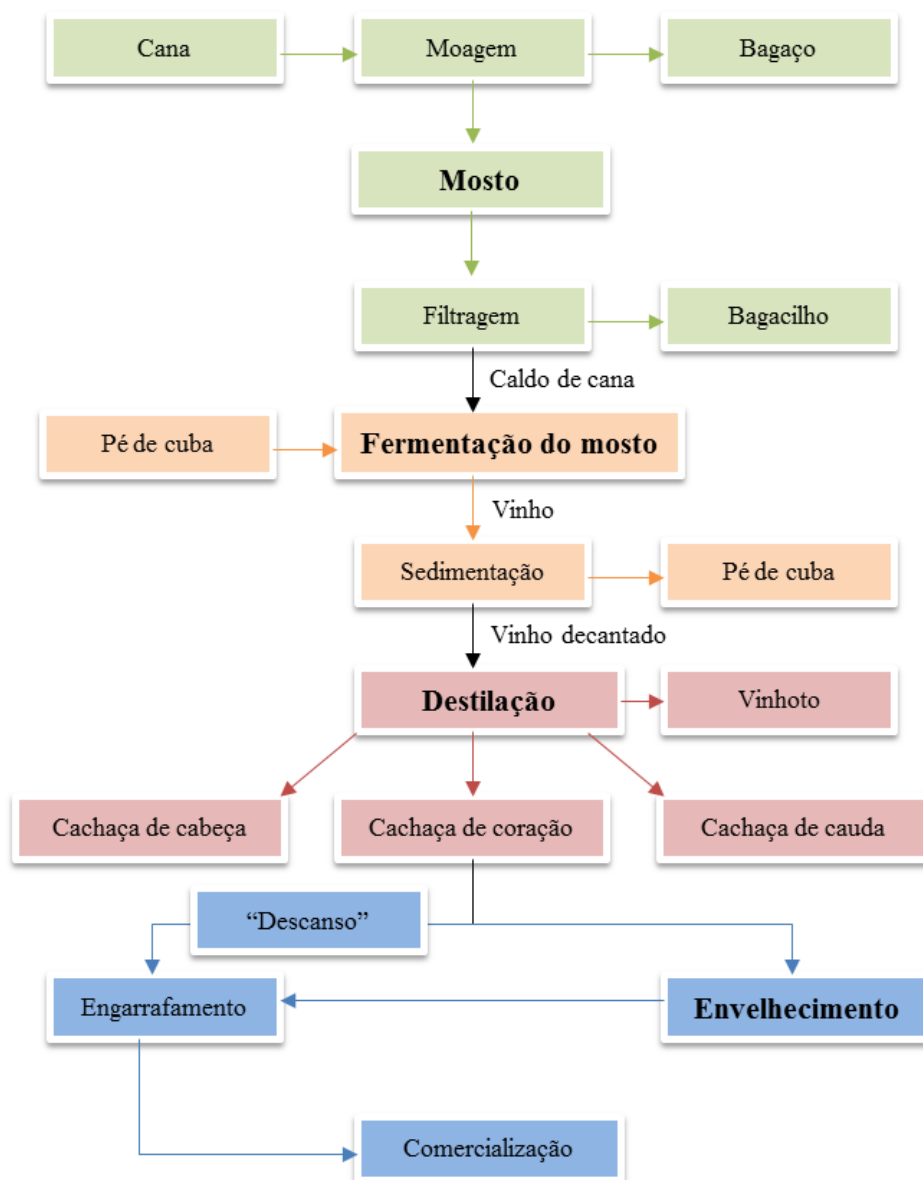


Figura 1 Fluxograma do processo de produção da cachaça de alambique

2.3.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada para a produção da cachaça é uma “*gramineae*”, pertencente à classe das Monocotiledôneas, família *Poaceae* e gênero *Saccharum*. Atualmente, todas as variedades de cana cultivadas são híbridas, resultantes do cruzamento entre diferentes espécies de cana-de-açúcar. Assim, hoje, o nome científico da cana é *Saccharum* spp. A cana-de-açúcar teve sua origem na Ásia e Oceania, chegando ao Brasil no século XVI, onde se adaptou muito bem ao clima e relevo (ANDRADE, 2006).

O Brasil, considerado o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, tem uma área plantada de aproximadamente 5,0 milhões de hectares. Para a produção da cachaça, estima-se que no país são produzidas mais de 10 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano, sendo o Estado de Minas Gerais o quarto produtor nacional de cana (ANDRADE, 2006; GALINARO, 2006; CORRÊA, 2007). Com o resultado dos avanços na tecnologia agrícola, o rendimento médio dos canaviais, que era de 50 toneladas por hectare há alguns anos, pode ser estimado de 85 toneladas por hectare. O rendimento industrial médio é que a cada tonelada de cana são produzidos 100 litros de cachaça (AQUARONE et al., 2005).

De acordo Andrade (2006), os colmos da cana-de-açúcar devem ser utilizados em estágio ideal de maturação, sadios, recém-cortados, normalmente despontados e livres de matéria estranha, para serem considerados como uma boa matéria-prima para a produção da cachaça.

Novaes (1997) e Andrade (2006) mostraram que não há variedades de cana que sejam específicas para a produção de cachaça, pois as pequenas diferenças na sua composição físico-química provavelmente não teriam qualquer influência na qualidade da bebida final. As variedades de cana devem ser adaptadas às condições edafoclimáticas da região onde se encontra instalada a

unidade produtora, com a finalidade de apresentar elevada produtividade de açúcar por área. De acordo com Maia e Nelson (1994), as diferenças existentes de uma variedade de cana-de-açúcar para outra não é um fator limitante da qualidade, pois desde que a cana forneça o teor necessário de açúcar, todos os demais requisitos nutricionais das leveduras, no momento da fermentação, poderão ser suplementados pelo fabricante.

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

Os produtores de cachaças e indústrias alcooleiras fazem a colheita da cana-de-açúcar manualmente ou mecanicamente, e os produtores aderem mais ao serviço braçal, que é visto economicamente com bons olhos. Em algumas propriedades, a colheita é feita após a queima prévia do canavial, sendo essa prática muito observada nas grandes empresas. Esse recurso é utilizado para eliminar a palha e a ponteira da cana e facilitar a colheita manual, além de proteger os cortadores de adversidades oriundas dos canaviais, como folhas afiadas, insetos e animais peçonhentos (ANDRADE, 2006; TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007).

De acordo com Masson et al. (2007) e pesquisa de Dórea et al. (2008), a queima do palhicho da cana provoca a exsudação do açúcar, tornando-se um

excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas do solo, minerais e outros, além de possibilitar a contaminação da bebida por compostos tóxicos, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas e, posteriormente, para o alambique, chegando ao produto final, sendo indesejáveis e reduzindo a qualidade da bebida. Por isso, fica evidente e de grande importância o uso de cana fresca na produção de cachaça, pois quando ela é queimada, há uma modificação considerável na fisiologia e morfologia dos colmos, acarretando contaminação da bebida.

2.3.2 Preparo do caldo

Após a obtenção da matéria-prima (cana-de-açúcar), ela é levada para a moagem, etapa na qual se faz a extração do caldo, com o auxílio das moendas. A extração é feita por esmagamento direto nas moendas. O caldo obtido, chamado por alguns de garapa, é constituído de água (65-75%), açúcares (11-18%), pequenas quantidades de substâncias nitrogenadas, ceras, lipídios, pectinas, materiais corantes e sais minerais. Seu pH é pouco ácido (4,8-6,0), o que favorece o desenvolvimento de micro-organismos (SCHWAN et al., 2006).

Após a moagem da cana, o caldo passa por um processo de limpeza, com o uso de sistemas de filtração e decantação. Opcionalmente, a concentração de açúcares pode ser ajustada para um maior controle do processo de fermentação. O caldo limpo e diluído passa a ser chamado de mosto, estando pronto para a adição do fermento (LIMA, 2001; CARDOSO, 2006).

e ácidos orgânicos, que compõem o sabor e aroma característicos da bebida (SCHWAN et al., 2006). Portanto, entre muitos fatores que podem influenciar na qualidade de bebidas alcoólicas, as condições de fermentação são fundamentais na determinação do sabor, uma vez que a maioria dos compostos secundários é formada durante essa etapa do processo de produção (SCHWAN et al., 2006; BERNARDI et al. 2008; GOMES et al., 2009).

A composição química do mosto é outro aspecto importante na produção de cachaça. Para Ribeiro, Lopes, Ferrari (1987) e Maia e Campelo (2006), células de leveduras apresentam necessidades nutricionais diferenciadas durante o processo de fermentação alcoólica. Assim, a disponibilidade de nutrientes influenciará a multiplicação e o crescimento celular, bem como a eficiência da transformação de açúcar em álcool.

Devido à sua importância para as leveduras, o nitrogênio é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento do fermento. Esse nutriente entra como constituinte de várias substâncias orgânicas encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, pirimidinas, purinas, pigmentos respiratórios (citocromos), lecitina, vitaminas e cefalina (WHITE, 1954; JERONIMO et al., 2008).

A presença de nitrogênio no mosto pode ser associada à composição do caldo ou à suplementação do mosto com compostos nitrogenados. No entanto, apesar da necessidade de nitrogênio, quando ureia ou sulfato de amônio são adicionados diretamente ao mosto, a assimilação pela levedura não é imediata. A disponibilidade de nutrientes bem como sua assimilação pelo fermento são importantes, pois podem favorecer a multiplicação de micro-organismos contaminantes ou levar à ocorrência de reações indesejadas, com a formação de compostos prejudiciais à qualidade da cachaça (SCHWAN et al., 2006; STELLA, 2010). A disponibilidade de nutrientes está diretamente associada à formação de carbamato de etila. Estudos sobre a presença de compostos

nitrogenados na produção de bebidas destiladas, incluindo a cachaça, mostram que tais compostos podem estar presentes até no produto final (POLASTRO et al., 2001; ANDRADE SOBRINHO et al., 2009).

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

2.3.4 Destilação

O processo de destilação consiste na etapa final da produção de cachaça, cuja finalidade é a separação dos componentes voláteis presentes por meio do aquecimento do vinho em alambique e posterior condensação dos vapores gerados. Na destilação, ocorrem algumas reações químicas, tais como a hidrólise, a esterificação e a acetilação, induzidas pelo calor. Portanto, a qualidade da bebida dependerá também da forma pela qual é conduzida a destilação (CARDOSO, 2006).

Os vinhos são constituídos de etanol, água e congêneres, como ácidos, alcoóis, ésteres, compostos carbonilados, acetais, fenóis, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, compostos sulfurados e açúcar. Na destilação, esses compostos serão concentrados, atingindo valores que não só caracterizam a bebida, como ainda a qualificam (SUOMALAINEN; LEHTONEN, 1979; CARDOSO, 2006).

A destilação emprega basicamente dois tipos de equipamentos, com materiais diferentes; os aparelhos descontínuos (destilação simples, por alambiques), utilizados para produção em pequena escala, ou em aparelhos

contínuos (destilação sistemática, por torres ou colunas de destilação), que são usados para grandes produções. Os aparelhos de destilação simples, os tradicionais alambiques, são constituídos principalmente de cobre e os destiladores de colunas de aço inoxidável. Desde o início da produção de bebidas fermento-destiladas, o cobre tem sido o material mais utilizado nas construções de alambiques, por apresentar resistência à corrosão e boa condução de calor (AQUARONE et al., 2005; CARDOSO, 2006). Bebidas destiladas nesses alambiques podem apresentar níveis elevados do metal, quando esse não é adequadamente higienizado. Segundo Maia e Campelo (2006), a contaminação pelo cobre em bebidas ocorre nas partes descendentes do alambique, com maior contaminação ocorrida na serpentina. Para esses, o uso de serpentina de inox reduz drasticamente o teor de cobre.

O efeito do material de constituição do destilador sobre a qualidade da cachaça foi avaliado por Cardoso, Lima-Neto e Franco (2003). Para tal, a destilação foi conduzida em colunas de vidro recheadas com cobre, aço inox, alumínio e porcelana. Pelos resultados, verificou-se que o material de composição do destilador alterou as características químicas e sensoriais do destilado, sendo o aço inox o que mais se assemelha ao cobre. Anteriormente, estudos de Nascimento et al. (1998), comparando a destilação em destilador de aço inox com outro, de cobre, detectaram diferenças significativas na concentração de compostos aromáticos, com maior qualidade para o produto obtido em destilador de cobre.

Quando o vinho é submetido ao processo de destilação, resultam duas frações denominadas flegma e vinhaça: a primeira é o produto principal da destilação do vinho, sendo constituída por uma mistura hidroalcoólica, cuja graduação alcoólica e composição dependem do tipo de aparelho utilizado na destilação e da extração das frações destiladas; a vinhaça, que recebe diversas denominações regionais, tais como vinhoto, garapão, restilo, entre outras, é o

resíduo da destilação do vinho. Sua percentagem alcoólica deve ser baixa, praticamente nula, acumulando-se todas as substâncias fixas do vinho, juntamente com parte das voláteis (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005; DIAS, 2006).

Quando a destilação é realizada em alambiques, três frações são separadas com base no seu teor alcoólico, denominadas de “cabeça”, “coração” e “cauda”. O principal objetivo dessa separação é o de assegurar que o “coração” (fração que deve ser consumida) apresente uma baixa concentração de substâncias tóxicas e compostos que diminuam a qualidade sensorial da bebida, bem como apresentar concentrações aceitáveis de etanol e de compostos que sejam favoráveis ao sabor e aroma da cachaça (RECHE et al., 2007). Algumas características das respectivas frações do destilado estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 Características das respectivas frações do destilado de cachaça (DIAS, 2006; SOUZA et al., 2009).

Fração do destilado	Características
“Cabeça”	Corresponde aos primeiros vapores, possui alto teor alcoólico (50-70% v/v). Devido à volatilidade do álcool presente no vinho, a separação da fração poderá ser realizada pelo recolhimento de 1 a 5% do volume total do vinho ou 5 a 8% do total do destilado, dependendo da geometria do aparelho. Contém altos teores de componentes secundários que se tornam indesejáveis, dependendo da quantidade; deve ser desprezada.
“Coração”	Corresponde ao destilado desejado, “a cachaça”. É recolhido após a separação do destilado de cabeça, apresenta um volume correspondente a 16% do volume total do vinho. Dependendo da graduação alcoólica desejada para o produto, corresponde a 80% do destilado, caso todo o álcool contido no vinho tenha se convertido em cachaça.
“Cauda”	Conhecida como “água fraca”, pelo fato de apresentar um baixo teor alcoólico (10-38% v/v). Corresponde a 3% do volume total do vinho ou 15% do destilado; assim como a fração “cabeça”, deve ser desprezada por conter substâncias indesejáveis e tóxicas.

Na destilação realizada em colunas de aço inoxidável, não ocorre a separação do destilado em frações, pelo fato de que o sistema é contínuo, ou seja, a alimentação da coluna com o vinho e a saída do destilado ocorrem simultaneamente durante todo o processo (RECHE; FRANCO, 2009).

Na literatura, alguns pesquisadores relacionam a influência do processo de destilação e da composição do destilador na formação de carbamato de etila em aguardentes de cana-de-açúcar, observando-se uma dependência entre a concentração de carbamato de etila, a geometria do destilador e o processo de destilação (NASCIMENTO et al., 1998; CARDOSO; LIMA-NETO; FRANCO, 2003; BRUNO et al., 2007).

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

2.3.5 Envelhecimento

O envelhecimento é a última etapa do processo de produção, mas não é obrigatória sua realização. É uma etapa importante na fabricação da cachaça que possibilita ao produtor agregar valor em sua bebida. A bebida recém-destilada apresenta características sensoriais um pouco agressivas e forte sabor alcoólico, características que podem ser atenuadas pelo envelhecimento (BOZA; OETTERER, 1999; CARDOSO, 2006).

Durante o processo de envelhecimento, ocorre tanto a extração de componentes da madeira pela cachaça, contribuindo para o desenvolvimento de uma cor diferenciada, como também permite o contato com o oxigênio atmosférico que entra pelos poros da madeira, favorecendo, portanto, reações de

oxidação dos componentes presentes da cachaça, conferindo à bebida características sensoriais extremamente distintas. Segundo Cardello e Faria (1998), em 2 anos de envelhecimento em carvalho, observam-se características sensoriais, antes inexistentes, como aroma e sabor de madeira, doçura, aroma de baunilha, corpo e coloração amarela. A incorporação desses compostos à bebida depende exclusivamente da espécie de madeira utilizada para armazenar/envelhecer a cachaça e, também, do tempo de sua permanência no interior dos tonéis (AQUINO et al., 2006a).

2.3.6 Engarrafamento

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

2.4 Compostos secundários e contaminantes presentes na cachaça

No processo de fermentação do mosto de cana-de-açúcar, são formados diversos compostos, entre os quais, o produto majoritário é o álcool etílico. Nesse mesmo processo, ocorre a formação de outros compostos, em menores quantidades denominados de compostos secundários, tais como aldeídos, álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos (DATO; PIZAURO JÚNIOR; MUTTON, 2005; CARDOSO, 2006).

A formação excessiva de componentes secundários pode estar relacionada a más condições nutricionais para o fermento, contaminações e, ainda, a condições inadequadas na fermentação (temperatura, pH, aeração, entre outras). 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, acetalização, reações com o cobre, produção de furfural, entre outros (LEAUTÉ, 1990).

Os aldeídos são formados durante o processo de fermentação alcoólica. A sua formação tem origem na ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer nas etapas finais pela oxidação a ácido acético, formado principalmente durante a aeração excessiva do mosto. O principal aldeído formado nessa etapa de produção da bebida é o acetaldeído. Os demais aldeídos são obtidos provavelmente a partir da oxidação de álcoois superiores. A intoxicação por aldeídos pode levar a sérios problemas relacionados o com sistema nervoso central (PEREIRA et al., 2003; CARDOSO, 2006).

Os álcoois superiores constituem, quantitativamente, o maior grupo de substâncias voláteis nas bebidas destiladas. São aqueles com mais de dois átomos de carbono, que podem ser formados durante o processo oxidativo ou ser provenientes das transformações dos aminoácidos durante o processo de fermentação, devido à baixa atividade das leveduras, as altas temperaturas e ao baixo pH do mosto. Os álcoois com três a cinco átomos de carbono são frequentemente encontrados em bebidas destiladas, e são conhecidos como óleo fúsel, apresentando um odor característico de flores. Esses compostos, juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo flavour da cachaça. Os principais álcoois superiores encontrados nas aguardentes são os álcoois isoamílico (3-metilbutanol-1), amílico (pentanol-1), isobutílico (2-

metilpropanol-1) e propílico (propanol) (CARDOSO, 2006; VILELA et al., 2007; PENTEADO; MASINI, 2009).

A Instrução Normativa de n. 13, de junho de 2005, incluiu na lista dos PIQ's de Aguardente de Cana e de Cachaça duas substâncias que fazem parte dos álcoois superiores, butanol-1 e butanol-2, mas que devem ser quantificadas separadamente e ainda estabeleceu limites permitidos para elas (BRASIL, 2005a).

Penteado e Masini (2009) analisaram 33 amostras de aguardentes artesanais e industriais produzidas em quatro Estados do Brasil e observaram uma grande variação na concentração dos álcoois superiores dessas bebidas e com consequente heterogeneidade das características sensoriais. Neste estudo, foram identificados e quantificados, entre outros, butanol-1 e butanol-2, presentes nas amostras e em concentrações superiores ao estabelecido por lei, que são 3,0 e 10,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, respectivamente. Parazzi et al. (2008) avaliaram os efeitos da madeira sobre a composição química e na concentração de butanol-1 da aguardente envelhecida em barris de carvalho, encontrando para o butanol-1 a concentração média de 1,05 mg 100,0 mL⁻¹.

A formação dos álcoois superiores em excesso pode ser evitada tomando algumas medidas, como não armazenar a cana por longo período após o corte, evitando a degradação de aminoácidos, e a posterior formação dos álcoois superiores; não utilizar cana bisada e lavar a cana após o corte, impedindo sua contaminação por bactérias, que podem interferir no desempenho das leveduras durante a fermentação (CARDOSO, 2006).

Os ésteres constituem a maior classe de compostos aromáticos (aroma) em bebidas alcoólicas. Os ésteres mais comuns encontrados são: acetato de etila, formato de etila (sabor artificial de rum), acetato de pentila (aroma de banana), acetato de octila (laranja), butirato de etila (abacaxi) e butirato de pentila (abricó) (STELLA, 2010). Uma quantidade significativa de ésteres é formada

durante o metabolismo secundário intracelular das leveduras, cujos componentes-chave da reação são o acetil-CoA e o etanol (NYKÄNEN, 1986).

De acordo com Pereira et al. (2003) e Miranda, Horri, Alcarde (2006), os ésteres geralmente são formados em cachaças por meio das reações de esterificação entre os álcoois e os ácidos carboxílicos formados durante o processo oxidativo. O acetato de etila representa aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça, sendo formado por meio de 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.

No processo de envelhecimento, a formação de ésteres ocorre por reações químicas diretas (esterificação) entre os ácidos carboxílicos da madeira e álcoois presentes no destilado (CARDOSO, 2006). Trabalhos realizados por Miranda et al. (2008), estudando o perfil físico-químico de aguardente no processo de envelhecimento por 390 dias, verificaram que a aguardente envelhecida apresentou maior concentração de ésteres; sendo que a concentração desse composto praticamente triplicou durante o período.

Entre os produtos secundários formados durante a fermentação alcoólica, o ácido acético tem sido quantitativamente o principal componente da fração ácida das cachaças, expresso em acidez volátil. Quantidades elevadas desse ácido carboxílico estão frequentemente associadas à prática de estocagem da cana e contaminações do mosto por bactérias acéticas, decorrentes de um tempo excessivo de descanso entre o processo de fermentação e a destilação (CARDOSO, 2006).

Na cachaça, contaminantes orgânicos também podem ser encontrados, destacando-se o metanol, furfural, hidróximetilfurfural, acroleína e o carbamato de etila. Esse último vem despertando grande interesse devido ao seu alto

potencial carcinogênico, sendo sua quantificação exigida pela legislação a partir de 2010 (Brasil, 2005a). No entanto, sua origem e formação ainda não estão bem elucidadas. Alguns autores acreditam que se originam da degradação de aminoácidos; outros que venha de reações entre o etanol e o ácido cianídrico catalisado pelo cobre ou pela auto-oxidação de compostos insaturados induzidos pela radiação ultravioleta (CARDOSO; LIMA-NETO; FRANCO, 2003; CARDOSO, 2006; ANJOS et al., 2011a).

O metanol é um álcool indesejado na bebida, devido à sua alta toxicidade. Sua ingestão, mesmo em quantidades reduzidas, por longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira ou mesmo a morte (BADOLATO; DURAN, 2000). Para Cardoso (2006), a oxidação do metanol origina o ácido fórmico, o dióxido de carbono e a água. Tanto o ácido fórmico quanto o dióxido de carbono apresentam características ácidas e, assim, promovem a acidose no sangue e, como consequência, distúrbios no sistema respiratório, levando até o coma. Os problemas visuais são os sintomas comuns da intoxicação; 15 mL de metanol provoca cegueira, e a ingestão de 10,0 a 100,0 mL pode ser fatal. Sua formação advém 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 a presença de bagacilhos no caldo da cana a ser fermentado.

Fernandes et al. (2007) estudaram a qualidade físico-química de 17 cachaças produzidas no sul de Minas Gerais e observaram que as concentrações de metanol nas amostras analisadas apresentaram-se em níveis relativamente baixos e abaixo da concentração máxima estabelecida pela legislação.

O furfural e o hidroximetilfurfural são contaminantes orgânicos em cachaças e não devem estar presentes, por serem considerados nocivos à saúde. A legislação define teores máximos em conjunto de 5 mg por 100 mL de álcool

anidro na bebida para esses compostos. Esses compostos são provenientes da desidratação de açúcares, pentoses e hexoses, durante as etapas do processo de produção (CARDOSO, 2006). A queima provoca a desidratação parcial de uma pequena fração dos açúcares presentes na cana-de-açúcar, tornando-se, assim, um excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas, e posteriormente, para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural e hidroximetilfurfural, chegando ao produto final. Quando, nesse processo, estão envolvidas as pentoses, há a formação do 2-furfural (furfural), e quando estão envolvidas as hexoses, forma-se o 5-hidroximetil-2-furfural (hidroximetilfurfural) (PEREIRA et al., 2003; MASSON et al., 2007).

Masson et al. (2007) quantificaram o furfural em amostras de cachaças produzidas com cana queimada e não queimada. Eles verificaram que a queima do palhiço da cana-de-açúcar proporcionou um aumento significativo na concentração de furfural nas amostras analisadas. Barcelos et al. (2007) analisaram diversos compostos em cachaças produzidas de cana não queimada em três diferentes regiões de Minas Gerais. Os autores verificaram que todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de furfural dentro do limite estabelecido pelo MAPA.

O propenal-2, também conhecido como acroleína, é um composto extremamente tóxico por todas as vias de exposição; no entanto, o mecanismo de formação ainda não é bem conhecido. Apresenta características mutagênicas e a exposição prolongada provoca irritação no sistema respiratório de animais e humanos. Além disso, sabe-se que o composto causa reações cruzadas no DNA, inibindo a atividade de algumas enzimas (incluindo o citocromo P450 e a glutatona-S-transferase) *in vitro*, reagindo com os grupos sulfidrilo dos locais ativos. Suas características físicas e químicas são: líquido amarelo com sabor

amargo e odor picante; temperatura de ebulição 52,5°C; temperatura de fusão - 88°C; massa molar 56,06 g/mol; pouco solúvel em água (MERCK INDEX, 2001; MASSON, 2009; ZACARONI et al., 2011a).

Segundo Cardoso (2006) e Azevêdo et al. (2007), a formação de acroleína ocorre durante o processo de fermentação, por meio da desidratação do glicerol associado a bactérias termofermentativas. Acredita-se que o aroma penetrante e apimentado em bebidas destiladas novas, uísques, conhaques ou rum é causado pela presença de acroleína.

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 MAPA (CARDOSO, 2006).

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

O único metal que deve obedecer aos limites especificados pela legislação brasileira é o cobre, que pode ter um teor máximo de 5 mg L⁻¹ (BRASIL, 2005a). 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 em que não está presente esse metal, tal como aço inox. De um 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).

Vários estudos sobre a presença de cobre em aguardentes têm sido realizados com o objetivo de encontrar um bom material adsorvente para a remoção desse metal, quando ele se encontra em excesso. Lima et al. (2006), simulando a utilização de carvão ativado para a remoção de cobre em aguardentes, verificaram que esse adsorvente mostrou-se eficiente na remoção desse metal na bebida. Contudo, há a remoção, além do cobre, de importantes compostos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida, levando a uma depreciação da qualidade. Posteriormente, Lima et al. (2009), empregando carvão ativado, resina de troca iônica e composto carvão ativado/óxido de ferro na remoção de cobre em cachaças com excesso desse metal, constataram que a resina de troca iônica mostrou-se melhor para o tratamento de cachaça com excesso de cobre, por ser mais específica na troca de íons como o cobre e adsorver menos os compostos orgânicos essenciais à qualidade da bebida.

2.5 Carbamato de etila

Entre os contaminantes orgânicos, o carbamato de etila vem sendo largamente estudado. Conhecido também como uretana ou etiluretana, apresenta a fórmula estrutural conforme apresentado na Figura 3. É o éster do ácido carbâmico e se apresenta na forma de cristal incolor, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo. Apresenta temperatura de fusão entre 48°C e 50°C, temperatura de ebulição entre 182°C e 184°C, sendo sua massa molar 89,09 g mol⁻¹ (MERCK INDEX, 2001; WEBER; SHARYPOV, 2009).

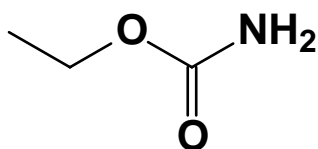


Figura 3 Fórmula estrutural do carbamato de etila

O carbamato de etila pode ser encontrado em vários alimentos e bebidas fermentadas, como vinhos, saquê, uísques, aguardentes, pães, azeitonas, iogurtes, entre outros. A presença desse composto é uma preocupação para os produtores na atualidade, pois é potencialmente carcinogênico, com período de latência curto (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA, 2007; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, IARC, 2010; ANJOS et al., 2011a; ZACARONI et al., 2011a).

Foram relatados níveis desse composto em concentrações que variam de 0 a 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em queijos, chás, iogurtes e cidras; já em pães e nas bebidas do malte, a concentração variou na faixa de 0 a 13,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; em molhos de soja, de 0 a 84,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LACHENMEIER; NERLICH; KUBALLA., 2006; BARCELOS et al., 2007; PARK et al., 2007).

Em roedores, doses orais de 100 a 2000 mg de carbamato de etila/kg de peso corporal tem se mostrado indutor de tumores. Nesses animais, o carbamato de etila causa adenomas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos, hepatomas, carcinomas mamários, tumores de ovários, hemangiomas hepáticos e tumores melanóticos de pele e de íris. Em humanos, a exposição desse composto a partir do consumo de alimentos e bebidas não alcoólicas foi estimada em 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/dia, exposição que se eleva a 5 $\mu\text{g}/\text{pessoa}/\text{dia}$, quando

considerados cenários de elevado consumo de bebidas alcoólicas. Nestes casos, as margens de exposição (MOEs) correspondentes são de 16.600 e 3.125, respectivamente, representando sério risco a tais consumidores (SCHLATTER; DINOVI; SETZER, 2010).

O carbamato de etila pode ser absorvido rapidamente e quase completamente a partir do trato gastrointestinal e da pele. Dentro do organismo, ele é distribuído uniformemente pelo corpo e rapidamente eliminado. Mais de 90% do que é metabolizado é excretado em 24 horas como CO₂, NH₃ e H₂O em humanos (IARC, 2010).

2.5.1 Ocorrência em bebidas alcoólicas

No Brasil, a grande preocupação é com a cachaça e a aguardente de cana que, mediante alguns estudos, evidenciaram teores de carbamato de etila acima do limite estabelecido pela legislação vigente. Esse fato pode representar uma barreira para as exportações do produto para vários países, principalmente os localizados na Europa e América do Norte. Sendo assim, se faz necessário aprofundar os estudos sobre a formação do carbamato de etila em cachaça e aguardente de cana, uma vez que essas pesquisas ainda se encontram insuficientes. A qualidade dessas bebidas deve sempre ser monitorada, tendo em vista que a legislação e os consumidores estão cada vez mais exigentes (LIMANETO; FRANCO, 1994; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002).

As preocupações com o carbamato de etila, em bebidas alcoólicas, surgiram em 2002, quando uma concentração média de 770 µg L⁻¹ foi reportada com base em uma ampla pesquisa em cachaças brasileiras (ANDRADE SOBRINHO et al., 2002). Outros autores, estudando a sua ocorrência em cachaças produzidas em Minas Gerais, também registraram teores médios

elevados: 1.206 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BAFFA JÚNIOR et al., 2007), 243 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BARCELOS et al., 2007) e 893 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008).

Diante dos possíveis malefícios que o carbamato de etila pode trazer à saúde humana, Andrade-Sobrinho et al. (2002) relatam que, em 1985, o Canadá estabeleceu limites máximos para o carbamato de etila em diferentes bebidas alcoólicas (Quadro 3). A comparação entre os teores de carbamato de etila em bebidas alcoólicas brasileiras com aqueles limites estabelecidos pelo Canadá é inevitável, em razão de ser esse o único país, até o momento, a possuir legislação sobre o assunto e ser considerado como referencial. Com isso, o MAPA estipulou, por meio da Instrução Normativa nº 13 de 2005, que o limite máximo permitido para esse composto em aguardente e cachaça seja de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Quadro 3 Limites estabelecidos pelo Canadá para teores de carbamato de etila em bebidas alcoólicas.

Bebida	Limite máximo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Vinhos	30,0
Vinhos fortificados	100,0
Bebidas destiladas	150,0
Destilados de frutas e licores	400,0

Em estudos realizados por Battaglia, Conacher e Page (1990), foram encontrados valores elevados de carbamato de etila em aguardentes de frutas, como cereja, damasco ou ameixa, variando de 0,1 a 12,0 mg L^{-1} .

Nóbrega et al. (2009) detectaram concentrações de carbamato de etila variando entre 55 a 700 $\mu\text{g L}^{-1}$, com média de 220 $\mu\text{g L}^{-1}$, em 25 marcas de cachaças de alambique produzidas na Paraíba. Posteriormente, Nóbrega et al.

(2011) quantificaram carbamato de etila em 13 marcas de cachaça de alambique e 20 de coluna. Os valores variaram de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ a $532,5 \mu\text{g L}^{-1}$, com média de $64 \mu\text{g L}^{-1}$, excedendo ao limite brasileiro de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Assim, em 18 das 33 marcas estudadas, os valores que excediam o limite máximo permitido eram oriundos das cachaças destiladas em coluna.

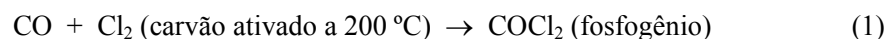
O risco de câncer da população brasileira diante da exposição do carbamato de etila presente na dieta, principalmente com relação à contaminação presente em cachaça e tiquira (aguardente de mandioca), foi avaliado por Lachenmeier et al. (2010). Foram encontrados valores médios de carbamato de etila de $380 \mu\text{g L}^{-1}$ para cachaças produzidas em alambique e $490 \mu\text{g L}^{-1}$ para cachaças de coluna. A faixa de exposição diária ao carbamato de etila pela população foi estimada em 0,1-0,2 μg por kg de massa corporal (mc), sendo a cachaça o principal fator contribuinte (0,06-0,07 $\mu\text{g/kg mc}$). Em relação à MOE, a média calculada foi de mil e trezentos, fato considerado preocupante, visto que o valor de baixo risco foi estimado em MOEs maiores ou iguais a dez mil, indicando um risco significativo de câncer da população brasileira consumidora de bebidas alcoólicas, em especial de cachaça. Em conclusão, os autores ressaltaram que se o nível médio de carbamato de etila nas cachaças estivesse em $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (nível máximo tolerado pelo MAPA), haveria aumentos da MOE para patamares seguros.

2.5.2 Mecanismos de formação

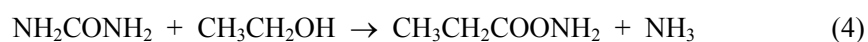
As vias de formação e os precursores de carbamato de etila em alimentos e bebidas dependem do tipo e do seu respectivo processamento.

Industrialmente, é produzido a partir do fosfogênio, da ureia ou da cianamida. Utilizando-se fosfogênio, que é um gás altamente tóxico, o processo

inicia-se com uma reação entre o monóxido de carbono e o cloro, conforme as reações 1, 2 e 3 (MORRISO; BOYD, 1992; BRUNO et al., 2007).



Segundo Aresta, Boscolo e Franco (2001), esse composto pode ser produzido pela reação da uréia com etanol, conforme a reação 4.



Nagato, Novaes e Penteado (2003) mostrou que o produto oriundo do fermentado aquecido tem seu nível de carbamato de etila aumentado ainda mais. Essa formação é dependente da concentração dos reagentes, temperaturas, pH, luz e tempo de envelhecimento. Assim, a formação de carbamato de etila de maneira natural, em bebidas destiladas, pode ocorrer antes, durante e após a etapa de destilação, pela reação do etanol com alguns compostos nitrogenados.

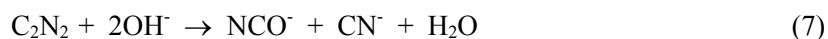
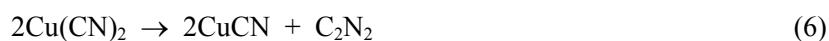
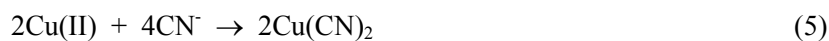
Devido aos altos teores de carbamato de etila encontrados em bebidas, muitos experimentos têm sido realizados em bebidas para se conhecer o mecanismo e a origem dos precursores para a formação desse composto. Estudos iniciais indicaram que o problema não está somente na fermentação ou durante a destilação, mas também no envelhecimento da bebida.

Alguns pesquisadores acreditam que a formação desse composto ocorre por meio da degradação enzimática da arginina em ureia, pelo metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo, a qual reage com etanol, produzindo o carbamato de etila. A formação desse é favorecida pela presença de precursores nitrogenados durante o processo de destilação e por altas

temperaturas, resultante do mau dimensionamento do sistema de destilação ou operação com níveis de refluxo impróprios (POLASTRO et al., 2001; BRUNO et al., 2007).

De acordo com Mackenzie, Clyne e Macdonald (1990), o ion cianeto tem sido apontado como o precursor mais importante na formação de carbamato de etila em destilados. Esse íon é formado pela ação enzimática e clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos (contém como princípio ativo o ácido cianídrico). A cana-de-açúcar é classificada como colheita cianogênica, sendo que essa fonte específica de cianeto ainda desconhecida (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). Existem mais de 2000 espécies de plantas que produzem glicosídeos cianogênicos, tais como mandioca, maracujá, pêssego, cana-de-açúcar, sorgo e cevada. Cianoglicosídeos são capazes de se decompor enzimaticamente em açúcar e cianohidrininas correspondentes, podendo, ainda esse último, por sua vez, degradar-se rapidamente em cianeto de hidrogênio e uma aldose ou cetose (HAQUE; BRADBURY, 2002).

Dois mecanismos químicos foram propostos como os mais prováveis para a formação de carbamato de etila a partir de cianeto. O primeiro é baseado na complexação do cianeto com o Cu (II), proveniente do aparelho destilador, seguida pela oxidação a cianogênio e com subsequente desproporcionamento a cianato. O cianato pode reagir com etanol para formar carbamato de etila. Tais reações estão apresentadas nas Equações 5 a 8. O cobre, provavelmente, é liberado a partir do aparelho de destilação, sobre a corrosão (MACKENZIE; CLYNE; MACDONALD, 1990).

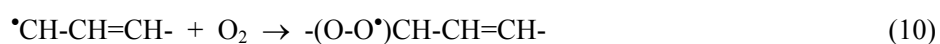


O segundo é baseado na auto-oxidação induzida por radiação ultravioleta de compostos insaturados presentes nas bebidas alcoólicas, os quais produzem radicais livres que catalisam a oxidação do cianeto a cianato, como descrito nas equações 9 a 17 (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

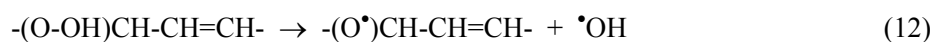
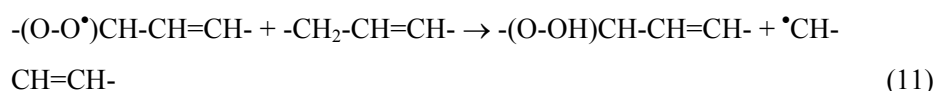
Iniciação



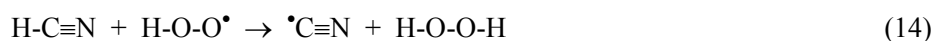
Propagação



Auto-oxidação



Formação de carbamato de etila



2.5.3 Métodos de análise para carbamato de etila

Diversas técnicas têm sido descritas na literatura para análise de carbamato de etila em bebidas alcoólicas. A cromatografia gasosa é a técnica mais empregada, utilizando-se colunas capilares e sistemas seletivos de detecção (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003). Todas envolvem, de alguma forma, o tratamento de extração e de concentração da amostra, pelo fato de que tal composto apresenta-se em baixas concentrações em bebidas

alcoólicas e da baixa sensibilidade de alguns detectores, seguido pela separação cromatográfica, tanto por detecção por ionização em chama (FID), ionização alcalina de chama (AFID), como pelos métodos eletrolíticos de detecção de condutividade (HECD) ou por detecção seletiva ou algum tipo de técnica de detecção espectrométrica de massas (MS). Também são utilizadas espectrometria de massas em tandem e as técnicas hífenadas, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) ou ainda a espectrometria de massas tandem (GC/MS/MS). Enfim, todas empregam a cromatografia gasosa com diferentes dispositivos de detecção (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002).

Apesar de as técnicas citadas anteriormente serem as mais utilizadas, alguns autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC- FLD) para a determinação de carbamato de etila em diferentes matrizes. Esse método tem se apresentado como uma alternativa, pois apresenta níveis de detecção similares, além de proporcionar maior rapidez na etapa de preparação das amostras, já que não necessita de etapas prévias de extração e concentração do analito. Esse método envolve, como preparação da amostra, apenas a derivação prévia do carbamato de etila (Figura 4), permitindo, assim, sua detecção, utilizando o detector de fluorescência (ABREU-LIMA; MAIA; OLIVEIRA, 2005; MADRERA; VALLES, 2009; ANJOS et al., 2011a; MACHADO et al, 2012).

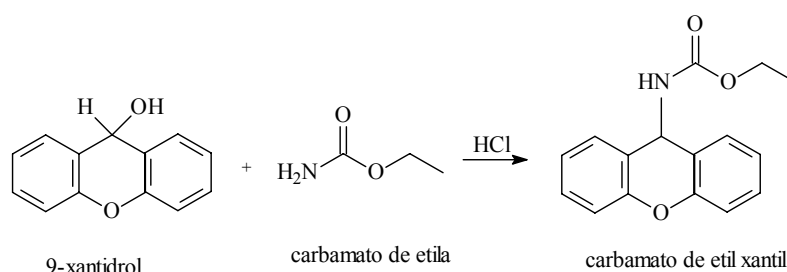


Figura 4 Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas (ANJOS, 2011a)

Abreu-Lima, Maia e Oliveira (2005) apresentaram os resultados de um estudo comparativo entre laboratórios na determinação do carbamato de etila em vinhos por HPLC com detector de fluorescência e GC/MS. Os resultados obtidos pelos laboratórios usando a HPLC foram comparáveis àqueles obtidos por GC/MS.

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

Anjos et al. (2011a), identificaram e quantificaram o carbamato de etila, utilizando a HPLC-FLD, em diferentes períodos de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. Pelos resultados,

observou-se que os parâmetros analíticos analisados apresentaram valores significativos, quando comparados com outras técnicas para determinação do carbamato de etila.

2.6 O envelhecimento da cachaça

O hábito de envelhecimento está se tornando uma prática comum entre os produtores, que buscam agregar valores ao seu produto, tornando-o mais competitivo no mercado (ANJOS et al., 2011b).

Por meio do envelhecimento, podem-se obter produtos com melhor qualidade sensorial, inclusive de bebidas provenientes de destiladores de aço inox. Dias, Maia e Nelson (2009) 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.

Para que a bebida seja considerada envelhecida, ela deve se enquadrar na denominação proposta pela legislação vigente. A **aguardente de cana / cachaça envelhecida** refere-se à bebida que contiver, no mínimo, 50% de aguardente de cana / cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano. Assim, aguardentes que contiverem um período inferior a um ano são denominadas armazenadas, estocadas ou amaciadas. No entanto, o desenvolvimento da composição fenólica em cachaça pode ser observado com apenas um mês de envelhecimento (BRASIL, 2005a, ANJOS et al., 2011b).

Cachaças envelhecidas podem receber várias denominações em relação ao tempo de envelhecimento. **Aguardente de cana / cachaça premium** refere-se à bebida que contiver 100% de aguardente de cana / cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano. **Aguardente de cana / cachaça extra premium**

refere-se à bebida que contiver 100% de aguardente de cana / cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a três anos (BRASIL, 2005a).

O envelhecimento é responsável por melhorias nas características organolépticas da cachaça, tornando seu sabor mais agradável e suave. Durante o envelhecimento, são incorporadas à bebida substâncias oriundas da madeira (ABREU-LIMA; MAIA, OLIVEIRA, 2005; ANJOS et al., 2011b).

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 ocorre dependendo das condições de umidade relativa e da temperatura do local de envelhecimento. As perdas ao longo do ano dependem de vários outros fatores tais como dilatação e contração da cachaça dentro do tonel, vazamentos e expulsão de cachaça por frestas e consequente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, devido à inadequação de instalações e de ambientes, além do modo de envelhecimento (ZACARONI, 2009; ANJOS et al., 2011b). Assim, para se 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 nas 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. A bebida terá um aroma mais fino e agradável, se a mesma for envelhecida em ambientes cuja temperatura varie de 9 a 15°C e a umidade relativa a 73% (CARDOSO, 2006).

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%. Entretanto, 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.

No processo de envelhecimento, o tratamento térmico é o mais comum e o mais utilizado. Esse termotratamento 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 aparecimento de novas substâncias aromáticas (ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos, fenóis, etc), que conferem um sabor diferenciado às bebidas envelhecidas (LEÃO, 2006; ZACARONI, 2009). Campos et al. (2004) citam que o tratamento térmico realizado para facilitar o manuseio da madeira na confecção dos barris e tonéis pode proporcionar uma melhor extração de componentes da hemicelulose e lignina durante o envelhecimento da bebida, apesar de afetar sua coloração.

Uma técnica promissora que visa a acelerar ou melhorar o processo tradicional de envelhecimento ou maturação da cachaça em barris de madeira é o uso das radiações ionizantes (MOSEDALE; PUECH, 1998; WALDER et al., 2004). Miranda, Horii e Alcarde (2006), mostraram que a irradiação da cachaça e do tonel não exercia influência sobre a composição dos componentes voláteis; no entanto, observaram alterações no teor de aldeídos, taninos e cobre e no parâmetro cor. A aceleração do processo de envelhecimento foi confirmada por meio da análise sensorial.

Além das alterações de cor, sabor, aroma e teor alcoólico durante o envelhecimento, o teor de extrato seco sofre aumento significativo, 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 (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006).

No Brasil, a maior parte dos produtores de cachaça são de pequeno porte, implicando, assim, uma variedade de madeiras que possam estar sendo utilizadas para o envelhecimento da cachaça (AQUINO et al., 2006a).

A madeira tradicionalmente usada para o envelhecimento da cachaça e outras bebidas destiladas no Brasil é o carvalho (*Quercus* sp). De acordo com Corrêa (1984), o carvalho é uma dicotiledônea pertencente à classe das Angiospermas, família Fagacea e gênero *Quercus*. Sua utilização e escolha estão relacionadas à sua disponibilidade em várias partes do mundo, especialmente na Europa. Além das características físicas benéficas dessa madeira (tais como densidade, cor, permeabilidade, resistência mecânica e durabilidade, além da facilidade no manuseio), é capaz de modificar favoravelmente as características organolépticas de vinhos e aguardentes submetidos sob maturação (LEÃO, 2006; DIAS; MAIA; NELSON, 2009).

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

A ampla composição química da madeira do carvalho (Figura 5) pode ser classificada em razão de sua capacidade de liberação de compostos, como os compostos solúveis (cumarinas, ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos, elagitaninos e cátions e ânions), substâncias extrativas (polissacarídeos e as ligninas) e substâncias fixas (formas oxidadas e condensadas dos elagitaninos, dos polissacarídeos e das ligninas) (LEÃO, 2006).

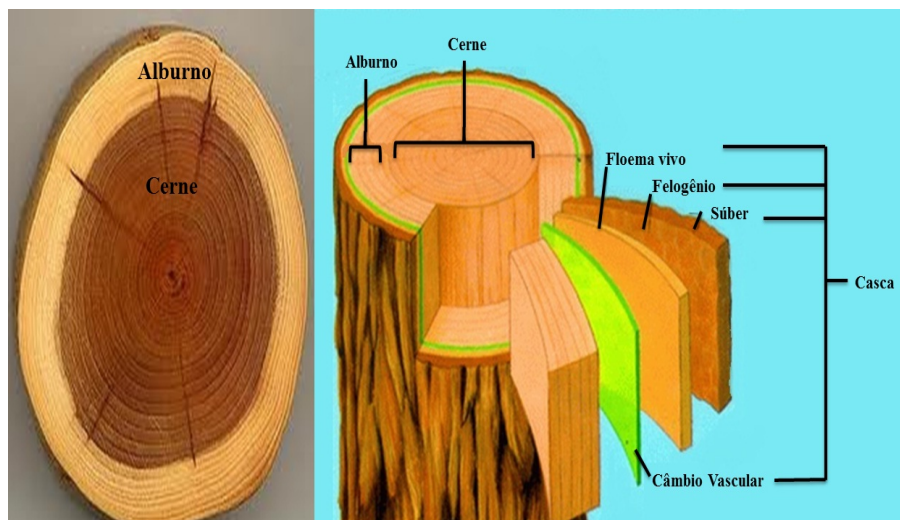


Figura 5 Aspectos macroscópicos da madeira

Embora a madeira tradicionalmente utilizada para o envelhecimento de bebidas alcoólicas seja o carvalho (*Quercus* sp), várias madeiras de origem nativa brasileira têm sido utilizadas na confecção de barris e tonéis para o envelhecimento da aguardente, como amendoim (*Pterogyne nitens*), amburana (*Amburana cearensis*), cedro (*Cedrela fissilis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), ipê (*Tabebuia* sp), freijó (*Cordia goeldiana*), garapa (*Apuleia leiocarpa*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), vinhático amarelo (*Plathynemia foliosa*) e jequitibá (*Carinian legalis*) (Mori et al., 2006). Esse fato tem sido observado pelo alto custo do carvalho, que é uma madeira típica do Hemisfério Norte (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; AQUINO et al., 2006a; 2006b).

Entre as várias madeiras de origem nativa brasileira, uma das espécies que tem sido muito estudada quanto ao envelhecimento de cachaça é a amburana (*Amburana cearensis*), pertencente à família Leguminosae Papilionoideae

(Fabaceae) e popularmente conhecida como amburana, imburana-de-cheiro e cumaru (MAIA, 2004). Embora considerada nativa do sertão nordestino, a ocorrência de *A. cearensis* pode ser observada em praticamente toda a América do Sul (do Peru à Argentina), apresentando-se como uma árvore frondosa, podendo atingir até 15m de altura, com flores brancas, vagem achatada e casca do caule vermelho-pardacenta, cujo odor agradável é conferido pelas cumarinas presentes. Suas sementes são pretas, aladas e exalam forte cheiro de cumarina (semelhante à baunilha). No Nordeste, o período de floração ocorre no início da estação seca, entre maio e julho, e a frutificação se dá de agosto a outubro (CANUTO; SILVEIRA, 2006).

As principais reações que ocorrem no processo de envelhecimento de cachaça são as reações entre os compostos secundários provenientes da destilação, as extrações diretas dos componentes da madeira, as decomposições de macromoléculas da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) e a subsequente incorporação desses compostos à bebida. Além dessas, podem ocorrer reações entre os compostos da madeira e os compostos originais do destilado (SHEREV; BRINK, 1980; CARDOSO, 2006).

Os principais compostos extraídos da madeira pelos destilados são: óleos voláteis, compostos fenólicos, substâncias tânicas, açúcares, glicerol e ácidos orgânicos não voláteis. Entre eles, destaca-se a importância do estudo de compostos fenólicos em cachaça envelhecida, devido à importância de compostos antioxidantes para a vida e a saúde humana (CARDELLO; FARIA, 2000; RAKIC et al., 2007).

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam um ou mais anel aromático com uma ou mais hidroxilas, nas formas simples ou de polímeros, que confere a eles o poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais, podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007).

Ribéreau-Gayon (1968) classificou esses compostos em três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza. Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, encontra-se um número bem reduzido, embora com certa frequência. Nesse grupo, estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a essa família os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina. Os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais; essa família engloba os taninos e as ligninas. Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza, estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal. Esse grupo pode-se dividir em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING; YOUNG, 1999; SOARES, 2002; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Entre esses compostos, os taninos e os derivados da lignina são considerados os mais importantes. A lignina, que é formada por monômeros aromáticos (Figura 6), tem estreita relação com o desenvolvimento de aroma e sabor nos destilados envelhecidos, pois libera para a bebida aldeídos aromáticos durante o período de maturação (DIAS; MAIA; NELSON, 2009).

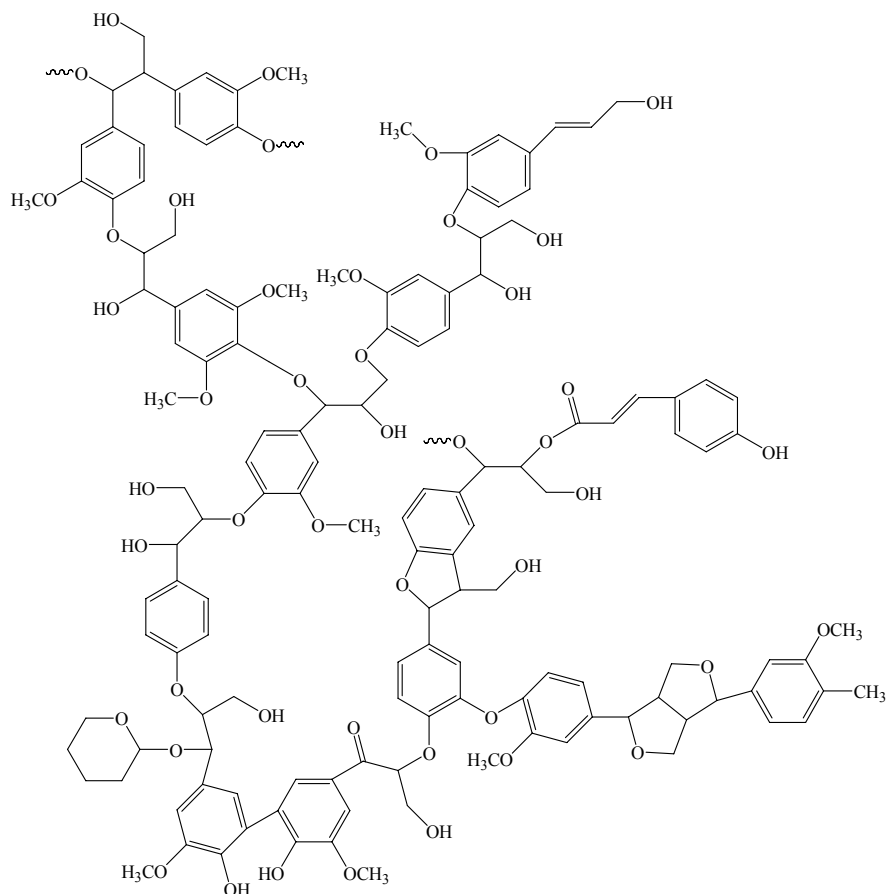


Figura 6 Estrutura química da lignina

Dias, Maia, Nelson (2009) citam que alguns autores (PUECH, 1981; PUECH et al., 1984), propuseram um modelo de degradação da lignina, o qual evidencia a influência do oxigênio na formação dos produtos fenólicos incorporados à bebida (Figura 7).

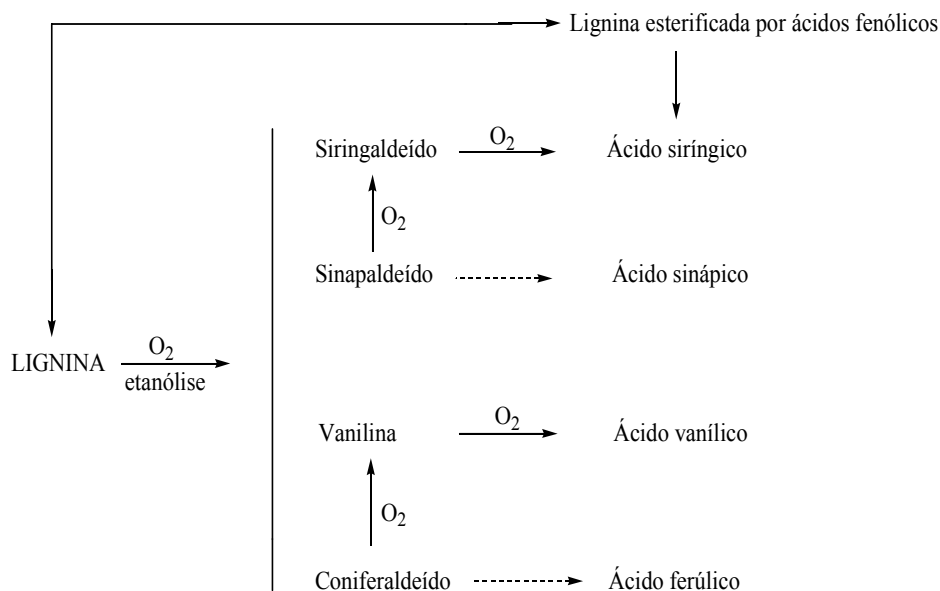


Figura 7 Conversão de alguns fenóis derivados da lignina

Baseado nessas substâncias, diversos estudos têm surgido com o objetivo de avaliar a qualidade química e sensorial das bebidas envelhecidas. Já foram identificados em destilados alcoólicos envelhecidos em tonéis de carvalho numerosos aldeídos e ácidos fenólicos, tais como a vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído, os quais são aparentemente provenientes da alcoólise ácida, a temperatura ambiente da lignina. Outros ácidos fenólicos identificados são o ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido siríngico e ácido vanílico (ZACARONI, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de UV-Vis é extensamente citada na literatura para a detecção de compostos fenólicos em bebidas (GOLDEBERG et al., 1999; FARIA et al., 2003; MORALES;

BENITIZ; TRONCOSO, 2004; ANJOS et al., 2011b; SANTIAGO et al., 2012). Além da HPLC, outras técnicas são usadas, como a cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar (CE), detecção ultravioleta, eletroquímica, fluorescente e espectrométrica de massas (GRUZ; NOVÁK; STRNAD, 2008).

Os principais compostos fenólicos já estudados incorporados à cachaça no processo de envelhecimento estão apresentados na Figura 8.

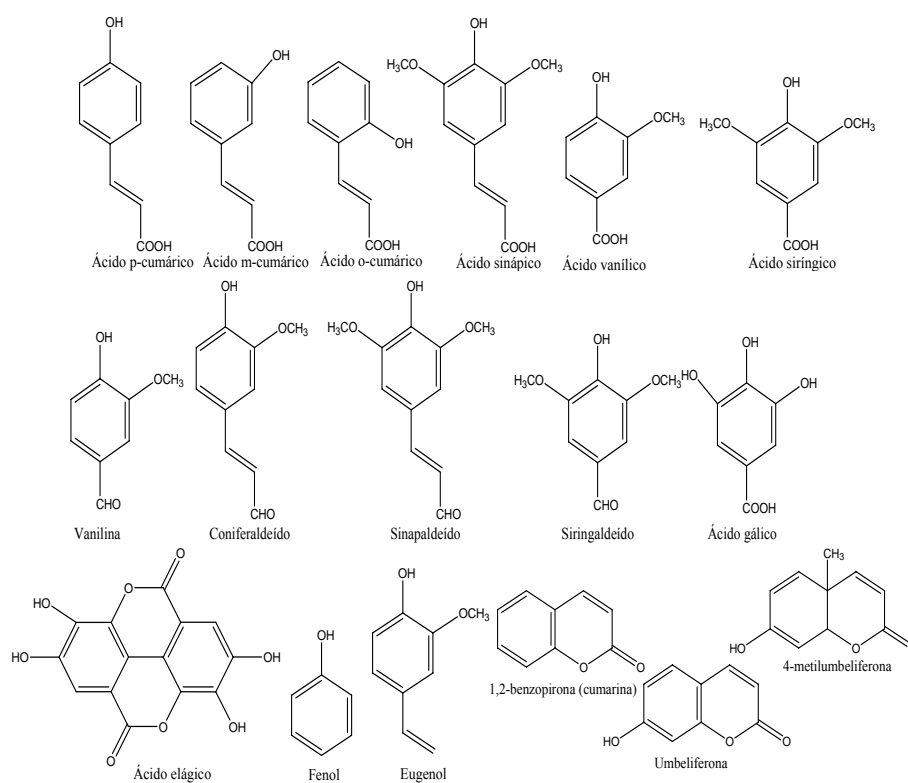


Figura 8 Principais compostos fenólicos incorporados à cachaça

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

Em relação à composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira, Zacaroni et al. (2011b) encontraram e quantificaram 16 diferentes compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Entre estes, citam-se ácido gálico, ácido siríngico, ácido vanílico, siringaldeído, vanilina, cumarina, entre outros.

Anjos et al. (2011b), analisando cachaça armazenada em barril de carvalho durante o período de um ano, encontraram o ácido gálico e siringaldeído como compostos majoritários. Os mesmos autores observaram também alterações em relação ao cheiro e à cor, devido ao armazenamento.

Recentemente, Santiago et al. (2012) avaliaram 13 compostos fenólicos em aguardentes de cana envelhecidas em carvalho (*Quercus* sp), louro-canela (*Aniba parviflora*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), castanheira (*Bertholletia excelsa*) e amburana (*Amburana cearensis*). Pelos resultados, verificou-se uma heterogeneidade em relação aos compostos fenólicos analisados para cada madeira em estudo.

2.7 Análise multivariada

A análise multivariada tem sido empregada nos últimos anos para caracterização de diversos produtos alimentares, como a cachaça e outras bebidas alcoólicas. É uma ferramenta matemática e estatística cujo objetivo é

correlacionar os resultados analíticos entre amostras (objetos) por meio de análises químicas (quimiometria). Entre os métodos empregados, destaca-se a Análise de Componentes Principais (ACP), que permite transformar um conjunto de variáveis originais intercorrelacionadas em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas de componentes principais. O objetivo principal da análise de componentes principais é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação contida nas variáveis originais. A ACP é considerada um método fatorial, pois a redução do número de variáveis não se faz por uma simples seleção de algumas variáveis, mas pela construção de novas variáveis sintéticas, obtidas pela combinação linear das variáveis iniciais, por meio dos fatores. Os componentes principais descrevem, por ordem decrescente, a maior parte da variação entre objetos e são calculados de forma que sejam ortogonais entre si. Por isso, cada componente principal pode ser interpretado independentemente. Esse fato permite uma visão geral da estrutura dos dados nomeadamente, eventuais relacionamentos entre objetos e detecção de objetos anómalos (BOUROCHE; SAPORTA, 1982; MOITANETO; MOITA, 1998; LAVINE, 2000; RENCHER, 2002; NIEUWOUTD et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 9 representa resumidamente as atividades e análises realizadas nesta pesquisa.

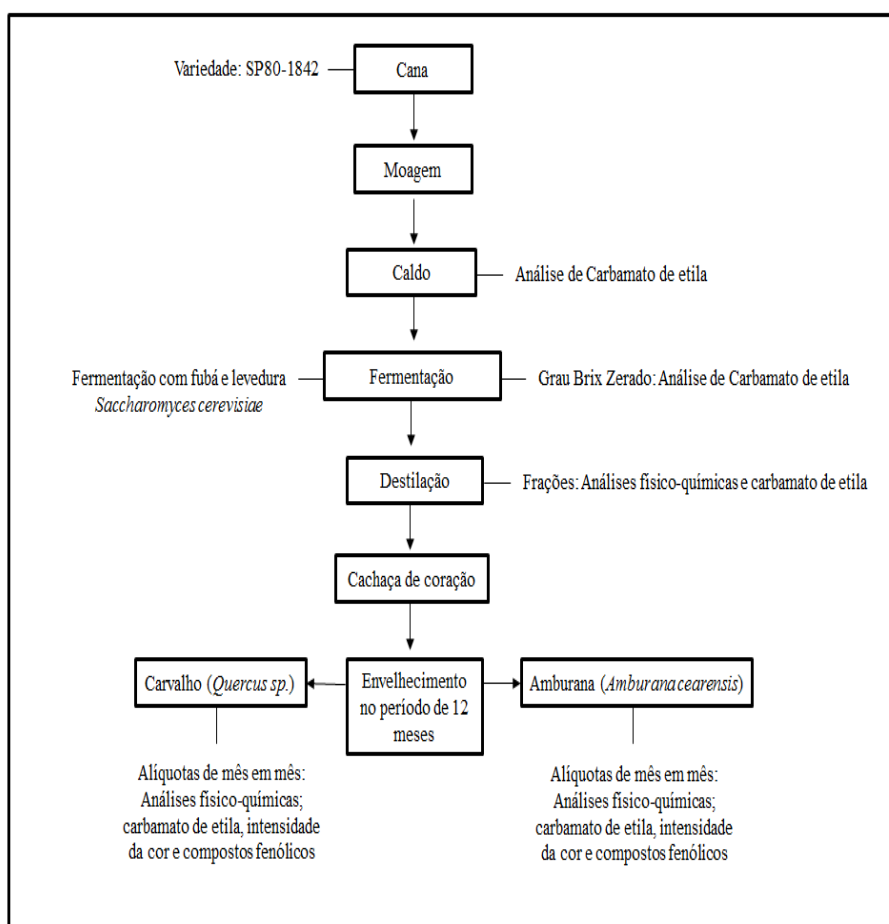


Figura 9 Atividades e análises realizadas

3.1 Produção e obtenção das amostras

As amostras utilizadas foram produzidas no alambique da empresa Cachaça Artesanal João Mendes (JM), situada no município de Perdões/MG, no período da safra de 2011. A variedade de cana empregada foi a SP80-1842 e o processo de fermentação foi realizado com fubá e, como micro-organismo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. De início, foram coletadas frações do caldo de cana e do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) para análise de carbamato de etila. Após o processo de destilação do mosto fermentado, foi coletada parte das frações “cabeça”, “coração” (denominada de cachaça nova) e “cauda” do destilado para as análises físico-químicas e do carbamato de etila.

A fração “coração” foi envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*), ambos de 200 litros, nos quais foram estocados 130 litros da bebida em cada tonel. Os tonéis foram mantidos em galpão fechado com temperatura e umidade do ar não controladas, colocados na posição horizontal para possibilitar o maior contato da bebida com a madeira e distanciados de outros tonéis para possibilitar as trocas gasosas.

Alíquotas de 2 litros foram coletadas a cada mês por um período de 12 meses e encaminhadas para a realização das análises físico-químicas, carbamato de etila, intensidade da cor e compostos fenólicos.

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardentes do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas periodicamente, em triplicata, de acordo com as especificações estabelecidas pela Instrução

Normativa nº 24, de 08/09/2005, do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005b). Os parâmetros analisados foram o grau alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural, metanol, cobre e extrato seco. As metodologias empregadas para as análises estão especificadas a seguir.

3.2.1 Grau alcoólico

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

3.2.2 Acidez volátil

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

3.2.3 Determinação dos ésteres

A determinação dos ésteres foi realizada por meio da titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas amostras. A quantificação dos ésteres foi feita com base na hidrólise alcalina deles, presentes na cachaça, seguida da titulação dos ácidos liberados com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. As quantidades

encontradas foram expressas em miligramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro. As reações que ocorrem durante a análise dos ésteres estão representadas na Figura 10.

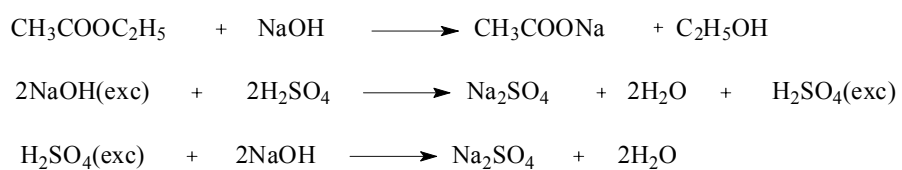
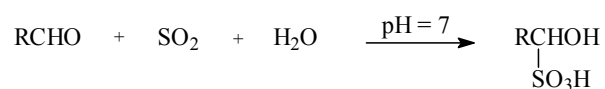


Figura 10 Reações químicas envolvidas na análise dos ésteres

3.2.4 Determinação de aldeídos

A determinação da concentração de aldeídos foi realizada por meio de métodos iodométricos, titulando-se o SO_2 produzido durante a sequência de reações envolvidas nesse tipo de análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro. As reações referentes a esse processo estão representadas na Figura 11.



o SO_2 , em excesso, reage com I_2 , em meio ácido:



em meio alcalino, o aldeído é então determinado:

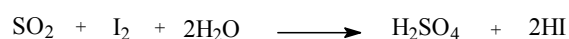


Figura 11 Reações químicas envolvidas na análise de aldeídos

3.2.5 Álcoois superiores

Os álcoois superiores foram determinados pela adição de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e posterior acidificação das amostras com ácido sulfúrico concentrado. A quantidade total foi determinada por meio de medidas espectrofotométricas efetuadas a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. As quantidades desse composto foram determinadas mediante a construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1(v/v). A quantidade total desses compostos foi expressa em miligrama por 100 mL de álcool anidro. As reações ocorridas nesse processo estão descritas na Figura 12.

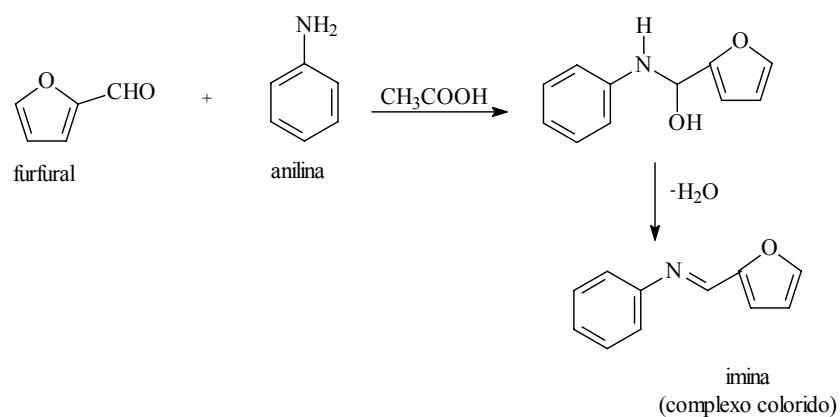


Figura 13 Reações químicas envolvidas na análise de furfural

3.2.7 Determinação de metanol

O metanol foi determinado por meio de medidas espectrofotométricas efetuadas a 575 nm utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, após adição de permanganato de potássio 3% e posterior resfriamento das amostras. Sua determinação baseia-se na sua oxidação a formaldeído, o qual reage com o ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico concentrado, formando um composto colorido (Figura 14). As quantidades foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol.

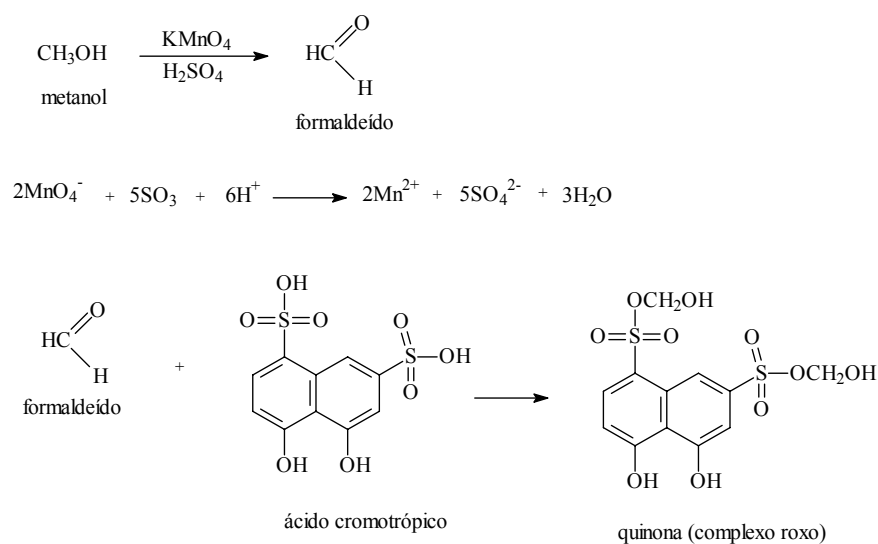


Figura 14 Reações químicas envolvidas na análise de metanol

3.2.8 Determinação de cobre

A quantificação do cobre foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro (Shimadzu UV-1601 PC) a 546 nm, comparando a valores de absorbância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando-se sulfato de cobre como padrão primário. A análise de cobre ocorre após redução do Cu^{2+} presente na bebida a Cu^+ , formando posteriormente um complexo colorido com a solução de 2,2-diquinolilo em álcool isoamílico, como representado na Figura 15.

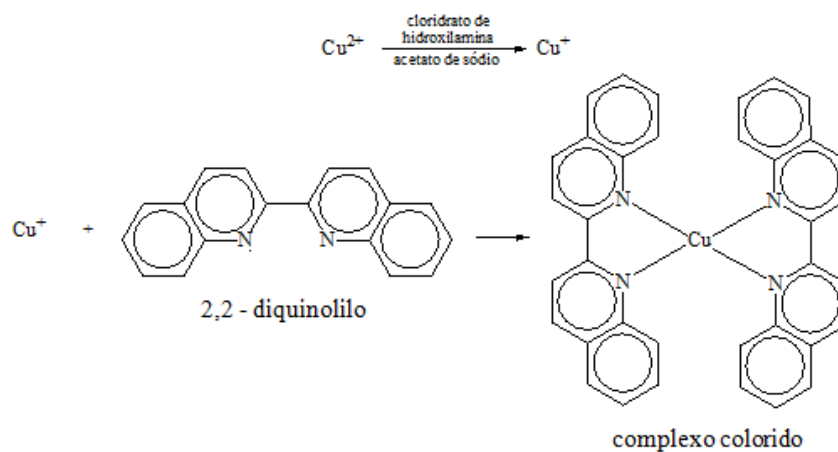


Figura 15 Reações químicas envolvidas na análise de cobre

3.2.9 Análise de extrato seco

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

3.3 Compostos fenólicos totais

A composição fenólica total das amostras envelhecidas foi determinada utilizando o método de Folin-Ciocalteu modificado (SINGLETON; ROSSI, 1965; LIN et al., 2005; ANJOS et al., 2011b).

A 1 mL da amostra, foram adicionados 1 mL de etanol 40% e 5 mL de água destilada. Agitou-se, adicionou-se 0,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 50% e, após 5 minutos, 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 5% foi adicionado à mistura reacional. Após agitação, os tubos foram deixados em repouso por 60 minutos. Decorrido esse tempo, realizaram-se leituras espectrofotométricas a 725 nm (Shimadzu UV-1601 PC). As concentrações foram determinadas por meio da construção de uma curva analítica utilizando diferentes concentrações de ácido gálico em etanol 40% (10-200 mg L⁻¹). A concentração de polifenóis totais foi expressa em mg equivalente de ácido gálico por litro.

Na Figura 16 verifica-se a desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual, segundo Singleton e Rossi (1965) e Lin et al. (2005), o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e em meio reacional muda de coloração amarela para azul.

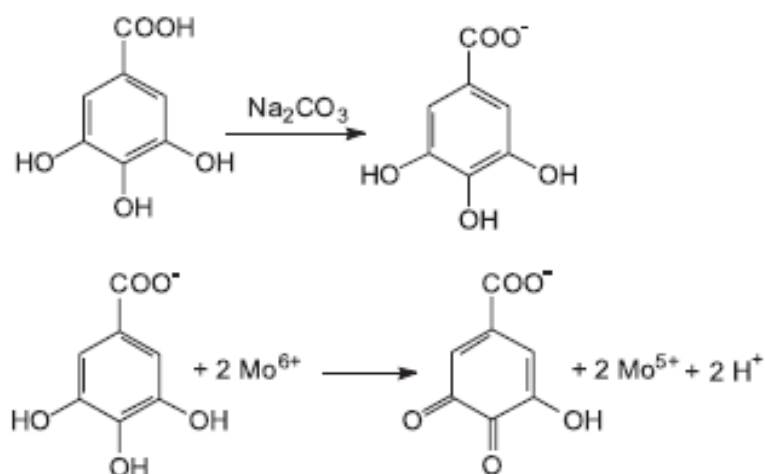


Figura 16 Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu

3.4 Intensidade da cor

A determinação da intensidade de cor das cachaças foi feita por meio de leituras espectrofotométricas a 420 nm (comprimento com maior resposta na varredura), utilizando-se cubetas de quartzo, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC (FARIA et al., 2003; MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006; ANJOS et al., 2011b). A cachaça nova, sem envelhecimento nos tonéis, foi considerada como o branco na realização das leituras. Não foi realizado tratamento prévio das amostras para a realização dessa análise, sendo, portanto, efetuadas leituras diretas da bebida.

3.5 Análises cromatográficas das cachaças

A determinação dos 12 compostos fenólicos e carbamato de etila foram realizadas utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão, modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3, interface modelo CBM-20A e injetor automático modelo SIL-10AF.

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação dos métodos.

3.5.1 Compostos fenólicos

A metodologia utilizada para a análise dos 12 compostos fenólicos nas cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anjos et al., (2011b), para a análise dessas substâncias.

Os compostos fenólicos quantificados foram o ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, cumarina, 4-metilumbeliferona e ácido *o*-cumárico. Os padrões desses compostos descritos anteriormente foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou da Acros Organics. Os compostos referentes à fase móvel foram de grau analítico para HPLC: metanol (Merck) e ácido acético glacial (J.T.Baker) e água tipo I obtida de um sistema Milli-Q.

3.5.1.1 Preparação dos padrões e amostras

Para cada um dos padrões de compostos fenólicos, foram preparadas soluções-estoque com concentração de 1000 mg L^{-1} , solubilizados em álcool etílico 50%.

O método utilizado para a quantificação dos compostos foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições de uma solução intermediária, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo essa obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas. Na solução intermediária, os padrões encontravam-se nas seguintes concentrações: ácido gálico ($6,80 \text{ mg L}^{-1}$), catequina ($11,61 \text{ mg L}^{-1}$), ácido vanílico ($6,73 \text{ mg L}^{-1}$), fenol ($3,76 \text{ mg L}^{-1}$), ácido siringico ($7,93 \text{ mg L}^{-1}$), vanilina ($6,08 \text{ mg L}^{-1}$), siringaldeído ($7,29 \text{ mg L}^{-1}$), ácido *p*-cumárico ($6,56 \text{ mg L}^{-1}$), ácido sinápico ($8,97 \text{ mg L}^{-1}$), cumarina ($5,85 \text{ mg L}^{-1}$), 4-metilumbeliferona ($7,05 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido *o*-cumárico ($6,56 \text{ mg L}^{-1}$). 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.

As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. As injeções das amostras e dos padrões foram realizadas em triplicata, a identidade dos analitos foi confirmada pelo tempo de retenção e o perfil dos picos da amostra comparado aos dos padrões.

3.5.1.2 Condições cromatográficas

As análises dos 12 compostos fenólicos foram realizadas em um cromatógrafo, como citado anteriormente. A coluna utilizada para as separações

foi a Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 μ m) e o detector utilizado foi o de arranjo de diodos (DAD).

Os solventes utilizados como fase móvel foram: solução de ácido acético 2% em água (Solvente A) e metanol:água:ácido acético (70:28:2% v/v/v) (Solvente B). As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente apresentado na Tabela 1. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 μ L. A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões. A construção das curvas analíticas foi realizada por meio da diluição da solução intermediária previamente preparada, obtendo-se soluções com as respectivas faixas de concentração para os padrões: ácido gálico (0,068 - 1,565 mg L⁻¹), catequina (0,116 - 2,322 mg L⁻¹), ácido vanílico (0,067 - 1,345 mg L⁻¹), fenol (0,038 - 0,979 mg L⁻¹), ácido siríngico (0,079 - 1,823 mg L⁻¹), vanilina (0,060 - 1,216 mg L⁻¹), siringaldeído (0,073 - 2,113 mg L⁻¹), ácido *p*-cumárico (0,066 - 0,852 mg L⁻¹), ácido sinápico (0,089 - 2,331 mg L⁻¹), cumarina (0,058 - 1,344 mg L⁻¹), 4-metilumbeliferona (0,070 - 1,832 mg L⁻¹) e ácido *o*-cumárico (0,065 - 1,508 mg L⁻¹).

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

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

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

3.5.2 Carbamato de etila

As análises para identificação e quantificação do carbamato de etila foram realizadas a partir do caldo de cana até o envelhecimento, em diferentes períodos nos tonéis de carvalho e Amburana.

A metodologia utilizada para a análise do carbamato de etila nas frações do caldo de cana, da fermentação e das cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anjos et al. (2011a), que consiste na derivação prévia da amostra para a análise desta substância.

Os reagentes empregados para análise foram: padrão de carbamato de etila (Acros Organics), etanol, propanol, hexano, ácido clorídrico (HCl), acetato

de etila, acetato de sódio, acetonitrila grau HPLC (Merck), água tipo I e 9-xantidrol (Acros Organics).

3.5.2.1 Derivação do padrão de carbamato de etila

A reação química envolvida na etapa de derivação do carbamato de etila na presença de 9-xantidrol está demonstrada na Figura 4.

Em frasco âmbar, preparou-se uma solução de 9-xantidrol ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em propanol; no mesmo frasco, foram adicionados 20 mL de uma solução padrão de carbamato de etila ($4,0 \text{ g L}^{-1}$), preparada em etanol 40%. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de HCl ($5,5 \text{ mol L}^{-1}$) e, então, a mistura reacional foi mantida sob agitação por aproximadamente 1 minuto; após agitação, foi mantida em repouso por 60 minutos. Os cristais obtidos foram filtrados e recristalizados em hexano.

Para a análise quantitativa, preparou-se uma solução-estoque do carbamato de etila derivado, em uma concentração de 10 mg L^{-1} , em acetato de etila. Para a construção da curva analítica, foram realizadas diluições em etanol 50% a partir da solução-estoque previamente preparada, sendo preparadas soluções de trabalho em concentrações que variaram de $5,0$ a $160,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.5.2.2 Derivação das amostras

Em frasco âmbar, adicionaram-se 4,0 mL de cachaça, seguidos de 0,8 mL de solução de xantidrol ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) (preparada em propanol). Após agitação, adicionou-se 0,4 mL de HCl ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$), mantendo a mistura reacional sob agitação por 1 minuto. Em seguida, ela foi mantida em repouso por 60 minutos e, posteriormente, filtrada em membranas de polietileno $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ (Millipore) e injetadas no cromatógrafo.

As amostras brutas do caldo de cana e do mosto fermentado passaram por um processo de coluna aberta (coluna C18), para retirar possíveis interferentes. Tal processo foi realizado devido às condições físicas, químicas e ao receio de empacotar a coluna do cromatógrafo. Foi feito um teste para observar se a coluna estava funcionando perfeitamente. O teste foi realizado adicionando carbamato de etila em uma amostra do mosto fermentado e, logo após a passagem pela coluna aberta, foi coletado o eluente (amostra). Após a passagem, a coluna foi eluída com acetonitrila para observar se o carbamato não estava retido nela. Posteriormente, a amostra foi derivada para análise, como já explicado anteriormente. O teste mostrou-se eficiente e observou-se que não ocorreu perda do analito na passagem pela coluna aberta. Tal teste pode ser observado nos cromatogramas em anexo (Figuras 2A, 3A e 4A).

3.5.2.3 Condições cromatográficas

As análises do carbamato de etila foram realizadas no mesmo cromatógrafo citado anteriormente. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 5 μ m) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 μ m) e a detecção foi utilizado um detector de fluorescência (DF).

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 foi de 0,75 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 μ L. As amostras e os padrões foram injetados em triplicata. 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 mmol L⁻¹
Solvente B: acetonitrila

3.5.3 Validação analítica

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al., 2004).

Portanto, para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação dos métodos utilizados, sendo avaliados os seguintes parâmetros: seletividade (exceto para carbamato de etila), linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

3.5.3.1 Seletividade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem apresentar ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes, ocasionando-se uma coeluição com a substância de interesse. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008).

Para fazer o teste de seletividade, podem ser utilizados diversos testes, dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito, matriz adicionada com analito (padrão), comparando o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, utilizando-se detectores modernos; por meio do método de adição-padrão; coletando o composto de interesse e realizando nova análise por outro método ou técnica que são específicos para a estrutura da substância de interesse (RIBANI et al., 2004; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007; HARRIS, 2008).

A seletividade foi realizada empregando a cachaça nova (coração), pois ela não apresenta substâncias interferentes nos tempos de retenção dos compostos fenólicos analisados. Inicialmente, realizou-se uma corrida com a

cachaça nova, isenta de fenólicos, a qual foi fortificada com os padrões dos compostos analisados, em uma concentração de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para cada composto, atestando, assim, a seletividade do método analítico.

3.5.3.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (faixa de aplicação). A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática (equação da regressão linear) usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (RIBANI et al., 2004).

A relação matemática entre o sinal e a concentração das espécies de interesse foi expressa por meio da equação da reta (curvas analíticas) e os respectivos coeficientes de determinação (R^2). Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,9900 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008).

3.5.3.3 Limite de detecção

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada; porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. São três maneiras diferentes de se calcular o LD: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

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

$$\mathbf{LD = 3 \times (s/S)}$$

em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008).

3.5.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada (quantificada) com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os mesmos critérios adotados para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, porém, utiliza-se a relação 10:1 (RIBANI et al., 2004).

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

$$\mathbf{LD = 10 \times (s/S)}$$

em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008).

3.5.3.5 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e esse valor é indeterminado por natureza (RIBANI et al., 2004).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição-padrão.

A recuperação é a mais utilizada entre os processos de avaliar a exatidão, sendo definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material-teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008).

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

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

3.6 Análise estatística

3.6.1 Análise de variância

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema de parcelas subdivididas no espaço. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Schott Knott ao nível de 95% de confiança, usando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003).

3.6.2 Análise das Componentes Principais

A análise das componentes principais (ACP) foi utilizada para averiguar e compreender a similaridade entre as amostras quanto aos parâmetros analisados ao longo do processo de produção da bebida. Os resultados foram centrados em médias, para posterior análise. A análise foi realizada utilizando o programa CHEMOFACE (NUNES et al., 2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação físico-química

Na Tabela 3 estão representados os resultados obtidos para as avaliações físico-químicas das frações do destilado (“cabeça”, “coração” e “cauda”).

Tabela 3 Avaliações físico-químicas das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”*

Análises	“Cabeça”	“Coração”	“Cauda”	Limites permitidos**
Grau alcoólico ¹	58,885 ± 0,045(a)	45,341 ± 0,060(b)	23,971 ± 0,531(c)	38,0 – 48,0 38,0 – 54,0
Acidez volátil ²	24,912 ± 0,019(c)	38,826 ± 0,051(b)	110,216 ± 2,437(a)	150,0
Ésteres ²	81,847 ± 0,062(a)	18,981 ± 0,025(c)	25,145 ± 0,555(b)	200,0
Aldeídos ²	80,888 ± 0,061(a)	20,766 ± 0,271(b)	2,774 ± 0,061(c)	30,0
Álcoois superiores ²	416,698 ± 0,072(a)	224,193 ± 1,891(b)	36,237 ± 2,007(c)	360,0
Cobre ³	1,641 ± 0,006(a)	0,148 ± 0,006(c)	0,341 ± 0,006(b)	5,0
Metanol ²	7,940 ± 0,461(b)	8,403 ± 0,011(a)	5,482 ± 0,122(c)	20,0
Furfural ²	0,043 ± 0,001(c)	0,338 ± 0,005(b)	0,739 ± 0,012(a)	5,0
Extrato seco ⁴	0,1425 ± 0,013(b)	0,015 ± 0,005(c)	0,1565 ± 0,005(a)	6,0

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

Pelos dados da Tabela 3, observa-se que as médias das frações do destilado em estudo apresentaram resultados diferenciados quanto à composição química. Assim, compostos mais voláteis e com maior afinidade com álcool/água tendem a estar presentes em maior quantidade nas primeiras frações da destilação, principalmente na fração “cabeça”.

De acordo com os resultados, as frações “cabeça” e “cauda” apresentaram quantidades inadequadas e fora dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para alguns dos componentes analisados, não sendo, portanto, recomendado o seu consumo. Observa-se que a “cauda” apresentou graduação alcoólica abaixo dos limites estabelecidos pelo MAPA. Para a “cabeça”, constatou-se um excesso na graduação alcoólica, aldeídos e álcoois superiores.

Segundo Dias (2006) e Cardoso (2006), o processo de destilação é importante para separar os componentes voláteis (água, etanol, metanol, álcoois superiores, ácido acético, ésteres, aldeídos, gás carbônico, etc.) dos componentes fixos ou não voláteis, que são sólidos do mosto, células de leveduras, minerais, ácidos orgânicos e inorgânicos. Esses compostos se destilam pela temperatura de ebulição, afinidade com álcool/água e teor alcoólico no vapor da destilação, os quais favorecem a diferenciação da composição química de cada fração coletada durante a destilação da bebida.

Yokoya (1995) acrescenta ainda que o comportamento dos compostos secundários na destilação depende das suas propriedades termodinâmicas. Os diversos compostos secundários no vinho podem ser agrupados em três categorias: compostos mais voláteis que o álcool, representados por ésteres e muitos aldeídos, são mais frequentes na fração “cabeça”; compostos menos voláteis que o álcool, representados por compostos fenólicos e muitos ácidos orgânicos, são mais abundantes na fração “cauda”, e compostos que são mais

voláteis que o álcool nas soluções alcoólicas de baixa concentração e menos voláteis nas soluções alcoólicas concentradas.

Para se obter aguardente de boa qualidade, recomenda-se a adoção da seguinte prática: a fração “cabeça” é separada quando o alcoômetro marcar 80 a 85° GL; em seguida, destila o “coração” de 80 a 85° GL a 45° GL, originando um produto com uma riqueza alcoólica média de 55 a 65° GL e, finalmente, a “cauda”, sendo os produtos extremos adicionados na destilação posterior (MAIA; CAMPELO, 2006 ; CARDOSO, 2006). Portanto, neste trabalho pode-se observar uma preocupação quanto aos cortes das frações, pois a fração “coração” apresentou todos os parâmetros dentro da normalidade.

O acetaldeído e o acetato de etila, principais componentes dos aldeídos e dos ésteres, respectivamente, em destilados alcoólicos, são solúveis em álcool e têm temperaturas de ebulição relativamente baixas, 21°C e 77°C, respectivamente. Isso faz com que a concentração desses compostos seja elevada na fração “cabeça” e no início da fração “coração” (LEAUTÉ, 1990; CARDOSO, 2006; ANJOS, 2010). Esse fato foi constatado pelos resultados obtidos, já que as maiores concentrações dessas substâncias foram obtidas para a fração “cabeça”.

A alta concentração de álcoois superiores, na fração “cabeça” (416,698 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro acima do permitido), pode se explicar pelo arraste dos mesmos por vapores hidroalcoólicos durante o processo de destilação (CARDOSO, 2006). Segundo Janzanti (2004), a quantidade de álcoois superiores em aguardentes é influenciada pela composição do meio, temperatura, nível de aeração e, também, pela linhagem da levedura, sendo a síntese de álcoois superiores estimulada pelo oxigênio e diretamente relacionada com a taxa de crescimento da levedura. Além disso, Cardoso, Lima-Neto e Franco (2003), verificando a influência do material do destilador na composição química das aguardentes, comprovaram que o teor de álcoois superiores diminui

na seguinte ordem, dependendo da composição do material empregado na destilação: porcelana > aço inox > cobre > alumínio.

De acordo com Boza e Horii (1998) e Cardoso (2006), a acidez é maior nas primeiras porções do destilado, diminuindo na parte intermediária e voltando a se elevar na metade final do “coração” e na “cauda”. Já para Reche & Franco (2009), o ácido acético encontra-se em maior quantidade nas frações finais da destilação, pois sua destilação inicia-se durante a destilação da fração “coração”, em razão de sua solubilidade em água e por sua temperatura de ebulição ser maior que a da água. Esse fato corrobora com os resultados obtidos para a avaliação físico-química dessa fração, já que as maiores concentrações dessa substância foram encontradas para o destilado de “cauda” (110,216 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro).

A expressão água fraca é um sinônimo muito utilizado pelos produtores para fração “cauda”, por apresentar baixo teor alcoólico. Tal sinônimo pode ser justificado pelo resultado, 23,971 % (v/v), encontrado nesta pesquisa para graduação alcoólica dessa fração. Segundo Vilela (2005), além da baixa graduação alcoólica, essa fração é rica em compostos indesejáveis, como é o caso da maior concentração de furfural, conforme pode-se observar nos dados da Tabela 3.

Para averiguar e comparar os resultados da avaliação físico-química das frações do destilado (Tabela 3), aplicou-se a ACP. Na Figura 17 representa-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, em que se relaciona os parâmetros físico-químicos de cada fração do destilado em estudo.

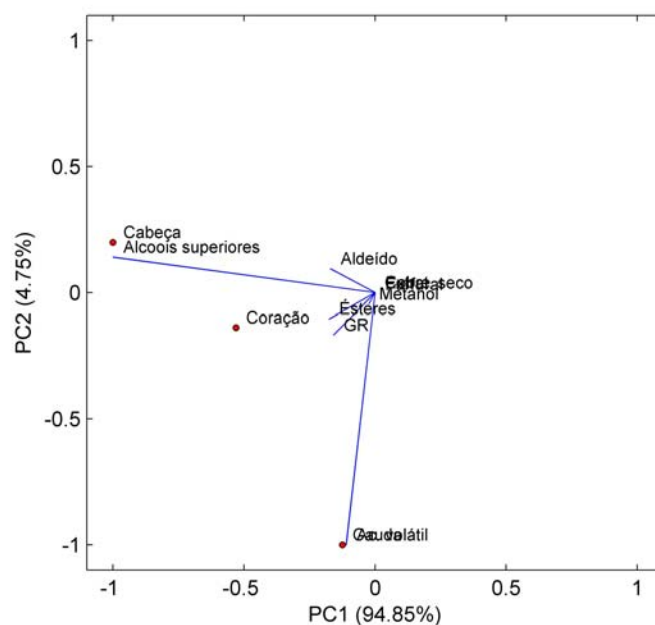


Figura 17 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, quanto aos seus parâmetros físico-químicos

A ACP mostrou que, com a primeira componente e a segunda componente principal, foi possível descrever 99,6% dos dados, sendo 94,85% da variância total descrita pela primeira componente principal. Observando-se a Figura 17, pode constatar que as frações “cabeça” e “cauda” diferiram da fração “coração” nos parâmetros álcoois superiores e acidez volátil, respectivamente. Esses resultados corroboram a análise de variância aplicada anteriormente (Tabela 3), pois tais parâmetros apresentaram valores superiores, quando comparados com a fração “coração”.

Concordando com Souza (2006) e Cardoso (2006), os destilados de “cabeça” e “cauda” podem prejudicar o sabor e aroma da cachaça, podendo ser

prejudicial à saúde do consumidor quando incorporadas à bebida, devido à presença de substância em concentrações indesejáveis.

Os resultados das análises físico-químicas, obtidos para as amostras de cachaça durante o período de envelhecimento em tonéis de carvalho e amburana, estão apresentados nas Figuras 18 a 26. Os resultados foram centrados em médias para construção dos gráficos.

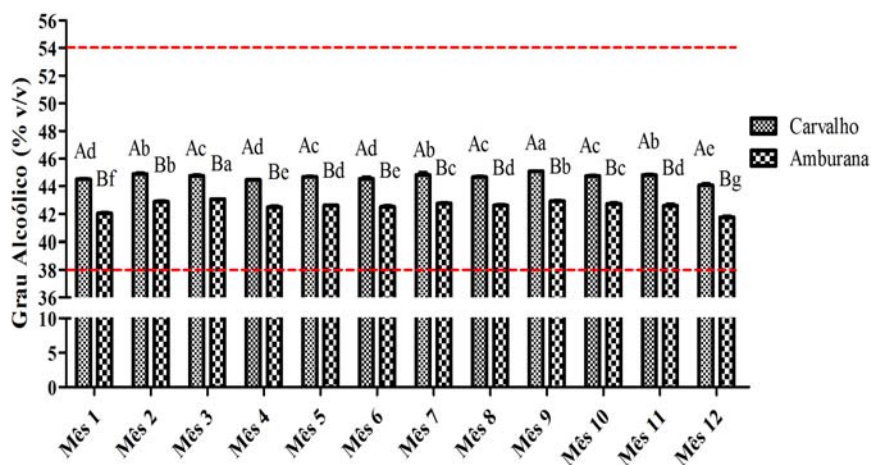


Figura 18 Avaliação da graduação alcoólica em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

Sabe-se que a diminuição da graduação alcoólica de cachaças, ao longo do envelhecimento, ocorre por causa da perda de álcool pelos poros da madeira do tonel e pela reação do etanol com outras substâncias características da bebida. Vários parâmetros físico-químicos das cachaças têm suas concentrações modificadas durante o envelhecimento, devido à evaporação parcial do etanol e

da água, sendo comuns perdas de álcool em torno de 3 a 4% ao ano (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006; PARAZZI et al., 2008; ANJOS, 2010). Pelos resultados encontrados, pode-se observar diferença quanto à graduação alcoólica nas cachaças envelhecidas em ambas as madeiras em estudo.

Pelos resultados, não foi constatada uma redução significativa da perda da graduação alcoólica das cachaças ao longo dos 12 meses de envelhecimento nos tonéis de carvalho e amburana. Tais resultados mostram que as condições do galpão estavam adequadas, quanto a fatores climáticos e físicos, e os tonéis utilizados foram bons recipientes de envelhecimento. Segundo Miranda, Horii e Alcarde (2006), as perdas durante o ano dependem, além das variações climáticas, de outros fatores, como a dilatação e contração da cachaça dentro do tonel, vazamentos e expulsão de cachaça por frestas e consequente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, e também do modo de armazenamento. Miranda et al. (2008) estudaram o perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho por um período de 390 dias de envelhecimento e não detectaram diferença estatística significativa quanto à graduação alcoólica. No entanto, observaram que há uma tendência de aumento do grau alcoólico, indicando que a evaporação de água do destilado foi maior que a de etanol durante esse período. Para Nicol (2003), adegas cuja umidade é muito alta favorecem a redução no teor alcoólico da bebida, já adegas nas quais a umidade é muito baixa favorecem a perda de água do produto.

A acidez elevada pode conferir paladar desagradável à bebida, pois o gosto e o aroma ácidos podem se tornar muito marcantes. Verifica-se na Figura 19 que a acidez volátil apresentou diferenças significativas quanto ao tipo de madeira utilizada no envelhecimento e a bebida envelhecida em amburana apresentou valores acima do permitido pela legislação vigente. A maior acidez encontrada na madeira amburana pode ser explicada pela reação de oxidação do etanol e por alguns compostos extraídos da madeira, os quais contribuem para a

formação de acetaldeído que, por sua vez, leva à formação de ácido acético (CARDOSO, 2006). De acordo com Parazzi et al. (2008), a incorporação de alguns compostos da madeira, tais como ácidos orgânicos não voláteis, componentes secundários, taninos e compostos fenólicos favorecem o aumento da acidez em cachaças submetidas ao processo de envelhecimento. A diferença do teor de acidez volátil nas bebidas envelhecidas em carvalho e amburana no mês 12 foi de 236,161 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro.

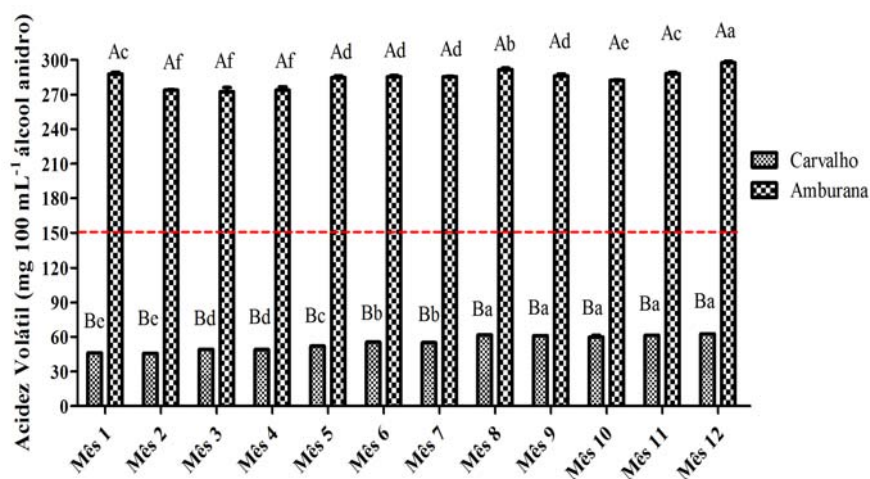


Figura 19 Avaliação da acidez volátil em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

Alguns dos compostos analisados podem ser formados durante o período de envelhecimento da cachaça. Destacam-se os ésteres, que são formados por meio da reação entre os álcoois e os ácidos orgânicos presentes na bebida. Tais compostos, juntamente com os álcoois superiores, aldeídos e ácidos, são

responsáveis pela formação do sabor e do aroma composto, assim, o chamado “*flavour*” ou “*bouquet*” da cachaça (PEREIRA et al., 2003). De acordo com Cardoso (2006) e Miranda et al. (2008), além das reações de esterificação entre os álcoois e ácidos da bebida, os ésteres são um dos principais compostos extraídos da madeira pelos destilados. O acetato de etila é o componente majoritário desse grupo de substâncias, sendo responsável pelo odor agradável das bebidas envelhecidas (FARIA et al., 2003; CARDOSO, 2006; PARAZZI et al., 2008).

Pelos resultados de ésteres (Figura 20), foi constatada uma significativa variação em sua concentração ao longo do tempo de envelhecimento da cachaça no tonel de amburana, ocorrendo um aumento expressivo de 51,241 a 101,031 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro. Já no tonel de carvalho não foi possível observar um aumento significativo ao longo do período de envelhecimento, tendo os teores de ésteres variado de 34,828 a 42,269 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro. Anjos (2010) avaliou teores de ésteres em cachaças envelhecidas em carvalho no período de 12 meses e observou um aumento expressivo, sendo esse aumento observado principalmente a partir do sétimo mês; tal resultado encontrado pelo autor não corroboram aos encontrados nesta pesquisa.

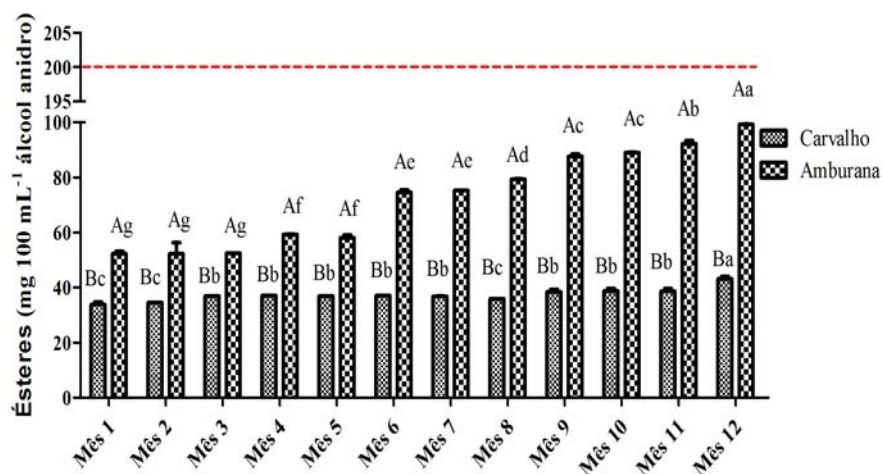


Figura 20 Avaliação de ésteres em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

A maior concentração de ésteres, presentes na cachaça envelhecida em amburana, pode ser explicada pela alta concentração de acidez volátil. Segundo Silva (2006), o aumento na concentração de acetato de etila ao longo do envelhecimento de cachaça pode ser atribuído ao aumento na acidez da bebida, havendo deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação, favorecendo a formação desse éster.

As concentrações de aldeídos, encontradas neste trabalho, estão de acordo com a legislação vigente, que é de 30 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro (BRASIL, 2005a). De maneira geral, a concentração de aldeídos apresentou pequena variação durante o período de análise das bebidas, apesar de ter sido constatada uma redução pouco significativa na concentração deles ao longo do tempo de envelhecimento. Pelos resultados, pode-se observar que nos meses 1, 3, 4, 5, 6, 8 e 11 não houve diferenças significativas quanto ao tipo de madeira

utilizada para o envelhecimento (Figura 21). As concentrações variaram de 21,388 a 22,898 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro e 20,821 a 22,475 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro em carvalho e amburana, respectivamente.

As reações químicas mais importantes durante a maturação/armazenamento/envelhecimento de bebidas são a oxidação (que, a partir dos aldeídos, leva à formação dos ácidos orgânicos) e a formação de acetal. Os equilíbrios entre acetal e aldeídos são particularmente importantes para um aroma específico, pois aldeídos frequentemente têm odor desagradável e pungente, enquanto os acetais são agradáveis e frutados (PIGGOT; CONNER, 2003; MIRANDA et al., 2008; ANJOS, 2010).

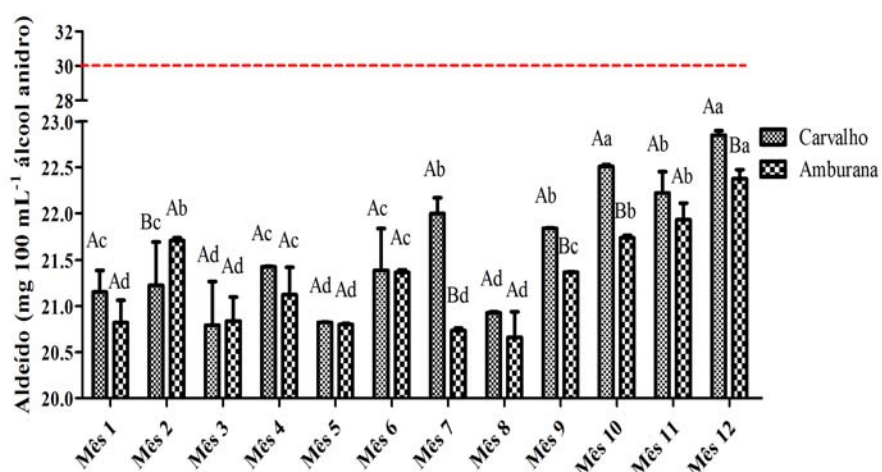


Figura 21 Avaliação de aldeídos em função do tempo de envelhecimento da cachaca em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

Na Figura 22 estão representados os resultados de álcoois superiores das amostras envelhecidas nos tonéis de carvalho e amburana. De acordo com os resultados, todas as amostras apresentaram quantidades desejáveis de álcoois superiores; para a legislação, a quantidade máxima para esses compostos é de 360 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005a). São compostos formados durante o processo oxidativo ou são provenientes das transformações dos aminoácidos durante o processo de fermentação, devido à baixa atividade das leveduras, às altas temperaturas e ao baixo pH do mosto. Esses compostos, juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo *flavour* da cachaça (VILELA et al., 2007). A baixa concentração de álcoois superiores pode estar relacionada com os cuidados no corte da cana, assim como no tempo de espera para a moagem e fermentação. Ao longo do tempo de envelhecimento, pode-se observar uma variação dos álcoois superiores; a partir do mês 9, a quantidade deles não se diferiu quanto a madeira utilizada.

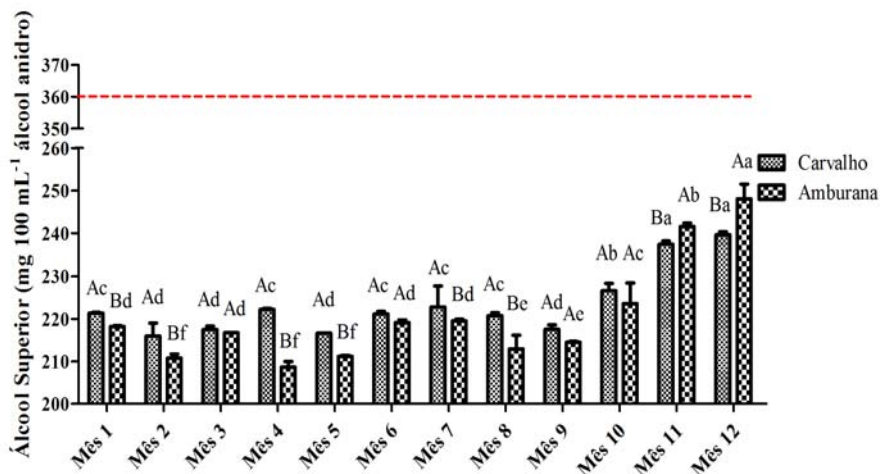


Figura 22 Avaliação de álcoois superiores em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

A partir do mês 11, a quantidade de álcoois superiores na bebida envelhecida em amburana apresentou diferença quando comparada com a bebida envelhecida em carvalho. Tal fato pode ser explicado pela hidrólise de ésteres, visto que a cachaça envelhecida em amburana apresentou valores mais elevados de ésteres; os principais ésteres encontrados são ésteres de álcoois superiores, o que acarreta esse processo inverso (PARAZZI et al., 2008).

Um problema comum que preocupa os produtores de cachaça do Estado de Minas Gerais é o excesso de cobre nas bebidas. A presença desse metal se deve principalmente à 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 pode ser evitada fazendo uma cuidadosa higienização dos alambiques nas safras e entressafras, utilizando-se água e limão na primeira destilação ou utilizando filtros com adsorventes, como o carvão ativado e as resinas de troca iônica (LIMA et al., 2006; 2009).

Apesar dessa preocupação, as amostras analisadas apresentaram valores abaixo do limite estabelecido pela legislação, que é de 5 mg L^{-1} (Figura 23).

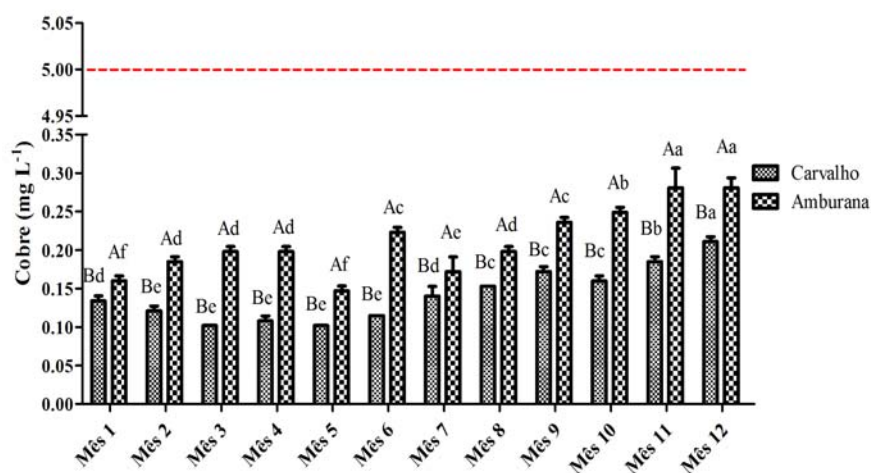


Figura 23 Avaliação de cobre em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

Cavalheiro et al. (2003) mostraram que o envelhecimento pode reduzir significativamente o teor desse metal na bebida, representando uma possível alternativa para o controle do excesso desse contaminante na cachaça, fato que não corroboram aos resultados encontrados nesta pesquisa. Uma provável explicação para a ocorrência desse fato seria a possibilidade de interação dos íons cobre com compostos presentes nas madeiras utilizadas para o envelhecimento da bebida (SANTIAGO et al., 2012).

Os teores de metanol (Figura 24) obtidos nas cachaças não ultrapassaram o limite permitido pela legislação, que é de $20,0 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool anidro (BRASIL, 2005a). Esses resultados são condizentes com aqueles apresentados por Santiago et al. (2012), que avaliaram os parâmetros exigidos pela legislação em cachaças artesanais envelhecidas da região do sul de Minas

Gerais; assim, observaram que o metanol encontrava-se dentro dos limites estabelecidos, variando de não detectado a 11,341 mg L⁻¹.

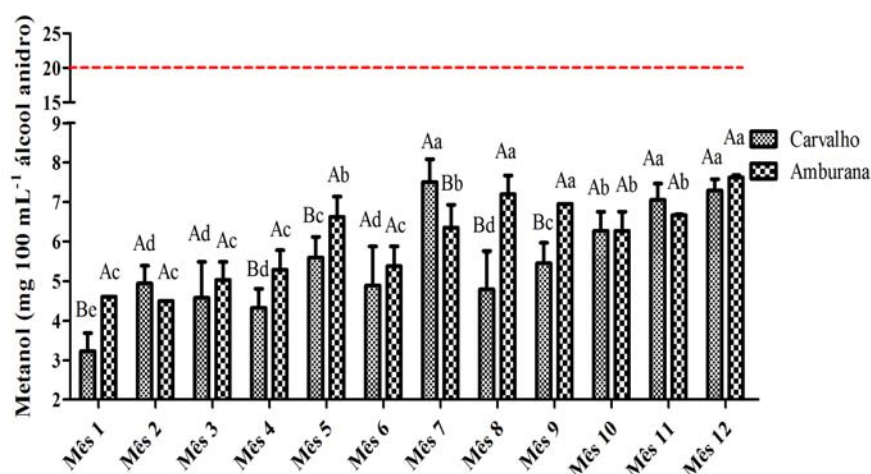


Figura 24 Avaliação de metanol em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

A presença do metanol é indesejável na cachaça, devido às características de toxicidade, mesmo em baixas concentrações. A origem desse álcool está associada à presença de bagacilhos no processo fermentativo, uma vez que ocorrerá a degradação da pectina presente na cana-de-açúcar (CARDOSO, 2006).

Nos meses 10, 11 e 12, a quantidade de metanol não se diferiu estatisticamente quanto à madeira utilizada para o envelhecimento. Ao longo do período de envelhecimento, pode-se notar um aumento gradativo de metanol. A explicação para esse fato está relacionada à degradação de macromoléculas da

madeira (como a lignina), as quais apresentam diversos grupos metílicos em sua estrutura, podendo ser liberados para a bebida durante o processo de envelhecimento. Além disso, o tratamento térmico da madeira promove a liberação de substâncias, nas quais o metanol pode estar associado, como é o caso do ácido pirolenhoso (uma mistura de água, metanol, acetona, ácido acético, entre outros), que é obtido da madeira quando ela é submetida a uma temperatura de 250°C, levando, então, à contaminação da bebida por esse contaminante (SILVA, 2006; ANJOS, 2010).

O furfural é um composto que não deve estar presente na cachaça, por ser considerado nocivo à saúde. A Figura 25 representa o resultado encontrado para furfural nas cachaças envelhecidas. Pelos resultados, todas as amostras apresentaram valores aceitáveis pela legislação para esse composto, em que o limite máximo é de 5 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro. De acordo com os dados da Figura 25, observa-se que ele apresentou um aumento significativo durante o envelhecimento em ambas as madeiras. A presença desse composto na bebida é indesejável devido à toxicidade que apresenta ao organismo humano.

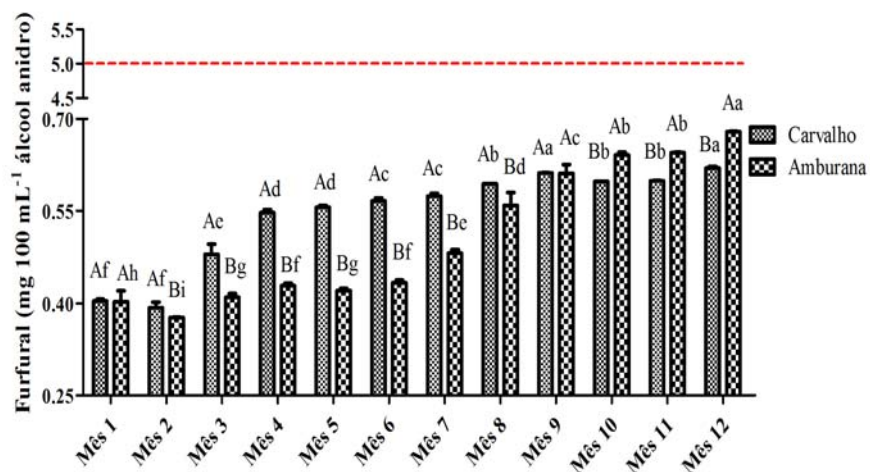


Figura 25 Avaliação de furfural em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

A concentração de furfural variou de 0,401 a 0,622 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro no envelhecimento em carvalho e 0,421 a 0,677 mg mL⁻¹ álcool anidro em tonel de amburana. O furfural é formado durante a destilação do vinho, mas no envelhecimento, sua concentração aumenta devido à degradação de pentoses e seus polímeros (hemicelulose) da madeira do tonel (PEREIRA et al., 2003; MIRANDA; HORRI; ALCARDE, 2006; MIRANDA et al., 2008). Santiago et al. (2012) avaliaram a presença de furfural em cachaças de alambique envelhecidas, encontrando concentrações de 2,47; 1,07 e 0,56 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro em cachaças envelhecidas em tonel de carvalho (96 meses), carvalho (8 meses) e amburana (4 meses), respectivamente. A diferença dessas concentrações, em relação às encontradas nesta pesquisa, pode ser explicada

pelo tempo de envelhecimento; quanto maior o tempo de envelhecimento, maior a extração dos compostos da madeira.

Quanto ao extrato seco, ainda não há limites estabelecidos na legislação. Neste estudo, os extratos secos das amostras de cachaça (Figura 26) variaram de 0,066 a 0,193 g L⁻¹ e de 0,308 a 1,226 g L⁻¹ nas cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana, respectivamente.

De acordo com Dias, Maia e Neslon (1998) e Mori et al. (2003), quanto maior o tempo de estocagem, maior a extração direta dos componentes da madeira, aumentando, conseqüentemente, o teor de extrato seco. Tal teoria pode ser observada neste estudo, pois a concentração de extrato seco aumentou com o aumento do tempo de envelhecimento. Miranda et al. (2008) explicam que esse aumento ocorre pela degradação da lignina pelo etanol em compostos aromáticos, levando à incorporação deles à bebida. Acredita-se que esses compostos aromáticos são os taninos e os compostos fenólicos, que representam até 40% (MENDES; MORI; TRUGILHO, 2009). Assim, espera-se que a evolução do extrato seco na bebida seja proporcional à extração de compostos fenólicos e, conseqüentemente, à intensidade da sua cor.

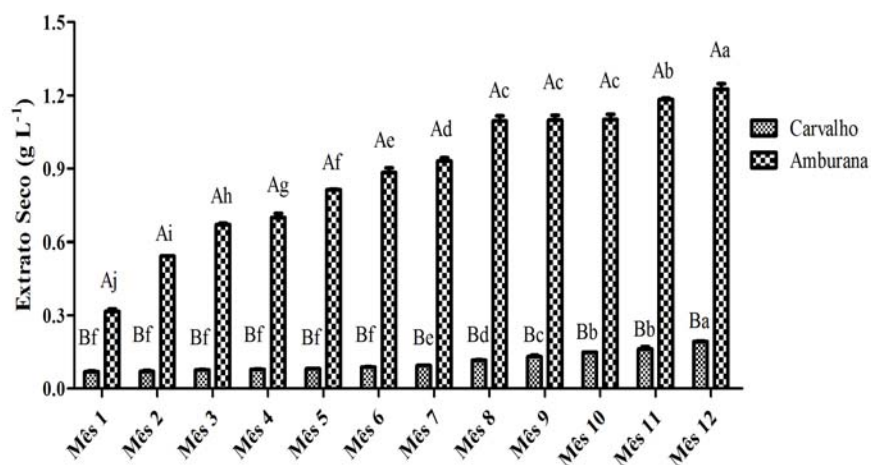


Figura 26 Avaliação de extrato seco em função do tempo de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana. Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula nas colunas são consideradas iguais pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 5\%$)

Como nas frações dos destilados, a ACP foi aplicada nos parâmetros físico-químicos das amostras envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana. Sua utilização foi para compreender melhor a distinção das amostras de cachaças quanto ao tempo de envelhecimento e ao tipo de madeira utilizada. Na Figura 27 representa-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, no qual se relacionam os parâmetros físico-químicos das cachaças envelhecidas.

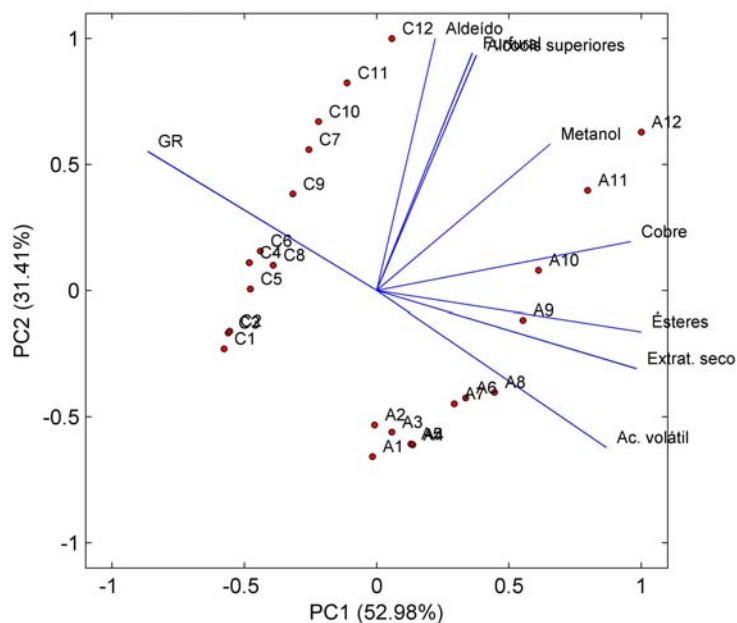


Figura 27 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana, quanto aos seus parâmetros físico-químicos

Pelos resultados da Figura 27, a ACP mostrou que, com a primeira e a segunda componente principal, foi possível descrever 84,39% dos dados, sendo 52,98% da variância total descritos pela primeira componente principal. Pela análise aplicada, pode-se constatar que as amostras se diferiram totalmente quando comparadas com o tipo de madeira utilizada no estudo. As amostras envelhecidas em tonel de carvalho (C1 a C12, em que o número representa o mês de envelhecimento) diferiram-se principalmente nos parâmetros aldeído, furfural e álcoois superiores, enquanto as amostras em tonel de amburana (A1 a

A12, em que o número representa o mês de envelhecimento) diferiram-se nos parâmetros cobre, ésteres, extrato seco e acidez volátil.

4.2 Compostos fenólicos totais e intensidade da cor

Os resultados obtidos para o acompanhamento da composição fenólica total das cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana estão apresentados na Figura 28.

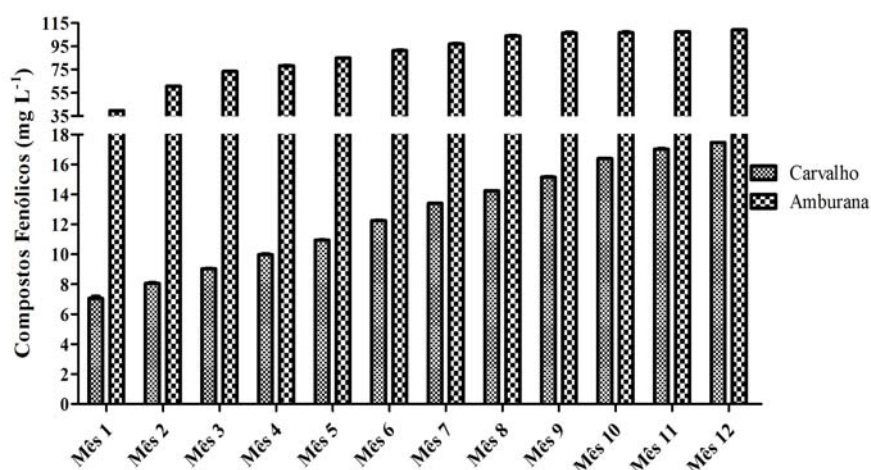


Figura 28 Evolução da composição fenólica total durante o período de envelhecimento das cachaças

Pelos dos resultados obtidos, foi possível constatar um aumento progressivo, em ambas as madeiras, na composição fenólica total ao longo do período de envelhecimento das cachaças. As composições fenólicas totais nas madeiras carvalho e amburana variaram de 7,04 a 17,46 mg L⁻¹ e 39,55 a 108,96

mg L⁻¹, respectivamente. Portanto, pode-se observar uma evolução fenólica (em vezes) de 2,48 na madeira carvalho e 2,45 na amburana.

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

Foi realizada também a avaliação da intensidade da cor nas cachaças envelhecidas nos tonéis em estudo (Figura 29), para melhor validar os resultados. Assim como na avaliação da composição fenólica total, verificou-se um aumento progressivo durante o período de envelhecimento da bebida nos respectivos tonéis de madeira, sendo possível observar a evolução da coloração amarelo-clara para carvalho e um amarelo mais intenso para amburana, ao longo do período de envelhecimento. De acordo com Miranda et al. (2008), os principais responsáveis pelo progressivo escurecimento ou intensificação da cor amarelo-alaranjada em bebidas sob maturação em madeiras são os taninos e seus produtos de oxidação.

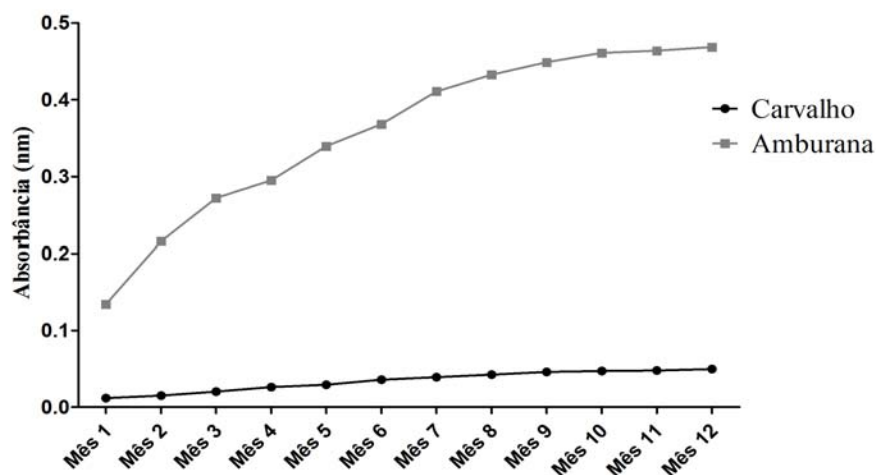


Figura 29 Evolução da intensidade da cor em função do tempo de envelhecimento

Com o intuito de averiguar alguma relação entre os parâmetros, foi aplicado o teste de correlação linear (ρ) entre os parâmetros extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade de cor nas amostras envelhecidas em cada tipo de madeira em estudo (Tabelas 4 e 5).

Segundo Callegari-Jacques (2003), o coeficiente de correlação pode ser avaliado qualitativamente da seguinte forma: se $0 < \rho < 0,3$ (há fraca correlação); se $0,3 < \rho < 0,6$ (há moderada correlação); se $0,6 < \rho < 0,9$ (há forte correlação) e se $0,90 < \rho < 1,0$ (há correlação muito forte).

De acordo com os resultados das Tabelas 4 e 5, foi possível constatar uma correlação linear positiva muito forte entre os parâmetros compostos fenólicos totais, extrato seco e a intensidade da cor nas amostras envelhecidas em tonel de amburana ($\rho = 0,991$ a $1,000$) e uma correlação forte para as envelhecidas em tonel de carvalho ($\rho = 0,865$ a $1,000$). Pelos resultados, verifica-se que as variações ocorridas no aumento de um dos parâmetros acarreta um aumento em outro, ao longo do envelhecimento da bebida.

Tabela 4 Coeficientes de correlação entre o extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade da cor nas amostras envelhecidas no tonel de carvalho.

Parâmetros	Extrato seco	Compostos fenólicos totais	Intensidade da cor
Extrato seco	1,000	0,926	0,865
Compostos fenólicos totais	0,926	1,000	0,987
Intensidade da cor	0,865	0,987	1,000

Tabela 5 Coeficientes de correlação entre o extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade da cor nas amostras envelhecidas no tonel de amburana.

Parâmetros	Extrato seco	Compostos fenólicos totais	Intensidade da cor
Extrato seco	1,000	0,986	0,991
Compostos fenólicos totais	0,996	1,000	0,996
Intensidade da cor	0,991	0,996	1,000

4.3 Análises cromatográficas

4.3.1 Compostos fenólicos

A Figura 31 ilustra o cromatograma da solução-padrão dos 12 compostos fenólicos por detecção espectrofotométrica, obtido após injeção de 20 μL no HPLC. Pode-se observar que os compostos em análise foram bem separados nas condições cromatográficas empregadas.

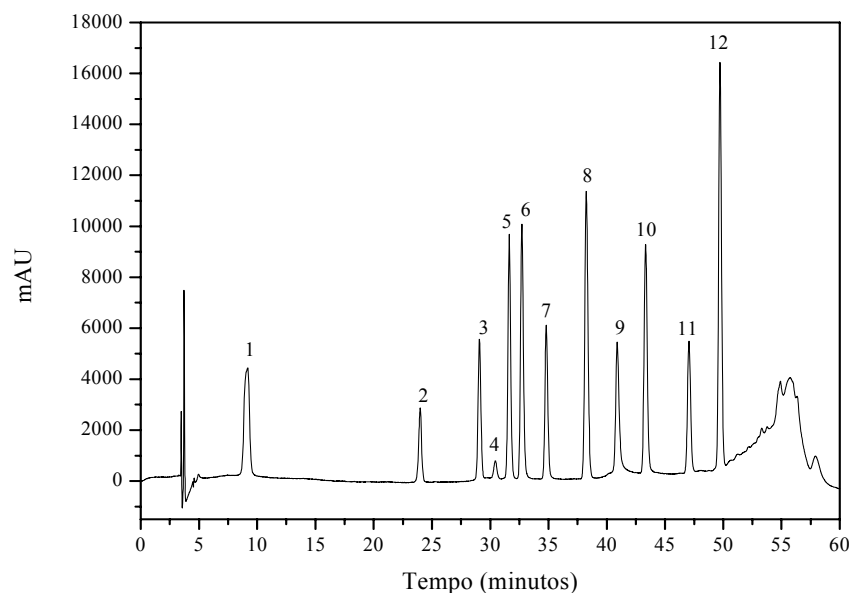


Figura 30 Cromatograma da solução-padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido *p*-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona e (12) ácido *o*-cumárico. Concentração de cada padrão: $1,161 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Os tempos médios de retenção obtidos para cada composto analisado foram ácido gálico ($8,754 \pm 0,433$ min), catequina ($23,961 \pm 0,107$ min), ácido vanílico ($29,021 \pm 0,119$ min), fenol ($29,607 \pm 0,457$ min), ácido siríngico ($31,571 \pm 0,105$ min), vanilina ($32,647 \pm 0,104$ min), siringaldeído ($34,721 \pm 0,135$ min), ácido *p*-cumárico ($38,085 \pm 0,349$ min), ácido sinápico ($40,743 \pm 0,212$ min), cumarina ($42,294 \pm 0,962$ min), 4-metilumbeliferona ($46,843 \pm 0,126$ min) e ácido *o*-cumárico ($49,501 \pm 0,128$ min). Os valores encontrados para tempo de retenção corroboram com os encontrados por Anjos et al. (2011b). No final da corrida, constatou-se uma elevação da linha base, que pode ser explicada pela presença de oligômeros e polímeros. Na literatura, trabalhos que correlacionam teor de fenóis com a utilização de cromatografia líquida de fase reversa relatam que a presença de muitos dos oligômeros e polímeros da flavan-3-ol implicam somente alterações na linha base dos cromatogramas (KAMEYAMA et al., 1997; QUIDEAU et al., 2005).

4.3.1.1 Certificação do método analítico para compostos fenólicos

Os parâmetros avaliados na validação do método proposto foram seletividade, linearidade, limites de detecção, limite de quantificação e exatidão (expressa em recuperação).

A seletividade dos métodos empregados foi realizada com o procedimento de comparação da matriz isenta das substâncias de interesse (compostos fenólicos) e a matriz adicionada com os padrões dos analitos (Figura 32). Pode-se observar pelo cromatograma uma seletividade positiva, pois ele apresentou uma boa separação dos compostos analisados.

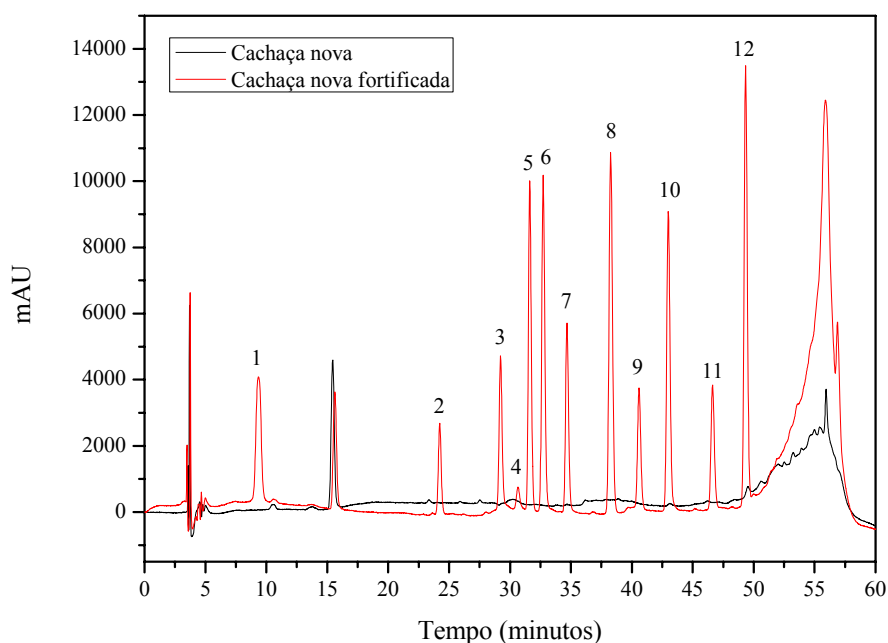


Figura 31 Cromatograma da cachaça nova e da cachaça nova fortificada com os padrões de compostos fenólicos numa concentração de $1,04 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido *p*-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido *o*-cumárico

Foram obtidos coeficientes de correlação que variaram de 0,9994 a 0,9999, mostrando a forte correlação linear entre a concentração dos compostos analisados e as áreas dos picos, com valores acima de 0,99 para o coeficiente de correlação, conforme recomendado na literatura (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; HARRIS, 2008). Os coeficientes de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método analítico empregado estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Parâmetros, coeficientes de correlação (r^2) das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)*.

Compostos	b	a	r^2	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido gálico	68463,23	-3035,01	0,9998	0,044	0,146
Catequina	16893,41	-671,57	0,9999	0,057	0,190
Ácido vanílico	44512,01	-1041,40	0,9995	0,035	0,116
Fenol	12042,23	-403,83	0,9994	0,032	0,107
Ácido siríngico	74757,71	-1607,86	0,9997	0,035	0,117
Vanilina	96068,54	-2649,16	0,9996	0,027	0,091
Siringaldeído	49814,62	-2113,48	0,9998	0,034	0,116
Ácido <i>p</i> -cumárico	116451,88	-1282,22	0,9994	0,025	0,084
Ácido sinápico	31456,89	-2638,53	0,9996	0,046	0,155
Cumarina	108863,21	-2863,04	0,9998	0,026	0,087
4-metilumbeliferona	32840,07	1089,44	0,9996	0,043	0,147
Ácido <i>o</i> -cumárico	149391,38	-3430,66	0,9997	0,033	0,113

*Regressão linear: $y = bx + a$

Os limites de detecção e quantificação encontrados para os compostos fenólicos variaram de 0,025 a 0,057 mg L⁻¹ e de 0,084 a 0,190 mg L⁻¹, respectivamente. Os valores obtidos apresentaram-se inferiores aos encontrados por Aquino et al. (2006b) e Santiago et al. (2012) e próximos aos encontrados por Anjos et al. (2011b) e Zacaroni et al. (2011b). Anjos et al. (2011b) encontraram valores que variaram 0,016 a 0,131 mg L⁻¹ e de 0,055 a 0,437 mg L⁻¹ para limite de detecção e quantificação, respectivamente. Santiago et al. (2012) encontraram para os limites de detecção e quantificação valores que variaram 0,031 a 0,168 mg L⁻¹ e 0,104 a 0,677 mg L⁻¹, respectivamente. Portanto, pode-se

observar, com os resultados encontrados, uma boa sensibilidade do método para a análise dos compostos fenólicos em cachaça envelhecida em tonel de madeira. As diferenças encontradas nesses parâmetros podem ser provenientes de diferenças nas condições cromatográficas, como na aparelhagem e/ou metodologias adotadas para a quantificação dos compostos (RIBANI et al., 2004; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007).

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em que a concentração dos compostos fenólicos foi calculada pelo aumento das áreas dos picos, obtida após a adição de uma quantidade conhecida dos padrões a 3 amostras escolhidas aleatoriamente (ANJOS et al., 2011b). Os resultados referentes à porcentagem de recuperação estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Resultados de exatidão (expressos em recuperação) dos compostos fenólicos nas amostras de cachaça envelhecidas.

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			Recuperação (%)	CV** (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Ácido gálico	0,213	0,272	0,440	91	0,78
	0,213	0,686	0,774	86	
	0,213	1,088	1,209	93	
	0,720	0,272	0,971	98	0,49
	0,720	0,686	1,277	91	
	0,720	1,088	1,710	94	
	0,326	0,272	0,574	96	0,35
	0,326	0,686	0,894	88	
	0,326	1,088	1,313	93	
			Média**	92	0,54
Catequina	<LQ	0,464	0,470	84	3,53
	<LQ	1,161	1,256	81	
	<LQ	1,857	1,952	85	
	<LQ	0,464	0,451	75	1,28
	<LQ	1,161	1,091	84	
	<LQ	1,857	1,625	82	
	<LQ	0,464	0,425	76	1,30
	<LQ	1,161	1,012	81	
	<LQ	1,857	1,680	86	
			Média**	82	2,03
Ácido vanílico	<LQ	0,269	0,331	104	1,74
	<LQ	0,672	0,670	93	
	<LQ	1,076	1,037	92	
	<LQ	0,269	0,379	100	1,95
	<LQ	0,672	0,680	88	
	<LQ	1,076	1,083	91	
	1,095	0,269	1,339	98	1,95
	1,095	0,672	1,684	95	
	1,095	1,076	2,036	94	
			Média**	95	1,84

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação. **Média e CV = coeficiente de variação (n = 27). ...continua...

Tabela 7, continuação

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			Recuperação (%)	CV** (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Fenol	ND	0,150	0,128	85	4,33
	ND	0,376	0,350	93	
	ND	0,602	0,495	82	
	ND	0,150	0,139	92	1,79
	ND	0,376	0,301	81	
	ND	0,602	0,606	100	
	0,112	0,150	0,249	95	1,80
	0,112	0,376	0,456	94	
	0,112	0,602	0,617	87	
			Média**	90	2,64
Ácido siríngico	<LQ	0,317	0,382	96	2,19
	<LQ	0,792	0,788	90	
	<LQ	1,268	1,247	92	
	0,346	0,317	0,621	94	7,87
	0,346	0,792	1,039	91	
	0,346	1,268	1,376	86	
	0,869	0,317	1,126	95	0,84
	0,869	0,792	1,502	90	
	0,869	1,268	1,982	93	
			Média**	92	3,63
Vanilina	<LQ	0,243	0,296	96	1,30
	<LQ	0,600	0,621	93	
	<LQ	0,973	0,984	95	
	0,201	0,243	0,420	95	2,40
	0,201	0,600	0,768	96	
	0,201	0,973	1,113	95	
	0,098	0,243	0,326	95	1,32
	0,098	0,600	0,704	101	
	0,098	0,973	1,078	101	
			Média**	96	1,67

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação. **Média e CV = coeficiente de variação (n = 27). ...continua...

Tabela 7, continuação

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			Recuperação (%)	CV** (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Siringaldeído	0,118	0,291	0,362	89	3,13
	0,118	0,728	0,721	85	
	0,118	1,165	1,198	93	
	0,346	0,291	0,593	93	1,14
	0,346	0,728	0,976	91	
	0,346	1,165	1,415	94	
	0,805	0,291	1,072	98	1,17
	0,805	0,728	1,418	92	
	0,805	1,165	1,946	99	
		Média**	93	1,81	
Ácido <i>p</i> -cumárico	<LQ	0,262	0,273	97	1,38
	<LQ	0,656	0,638	95	
	<LQ	1,049	1,016	95	
	<LQ	0,262	0,271	87	2,59
	<LQ	0,656	0,685	97	
	<LQ	1,049	1,054	96	
	0,119	0,262	0,347	91	3,04
	0,119	0,656	0,706	91	
	0,119	1,049	1,158	99	
		Média**	94	2,33	
Ácido sinápico	<LQ	0,358	0,412	88	2,19
	<LQ	0,896	0,980	98	
	<LQ	1,434	1,423	93	
	0,157	0,358	0,440	85	7,87
	0,157	0,896	1,012	96	
	0,157	1,434	1,513	95	
	0,255	0,358	0,488	89	0,84
	0,255	0,896	0,924	80	
	0,255	1,434	1,536	91	
		Média**	91	3,63	

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação. **Média e CV = coeficiente de variação (n = 27). ...continua...

Tabela 7, continuação

Compostos fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)*			Recuperação (%)	CV** (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Cumarina	<LQ	0,233	0,302	109	
	<LQ	0,584	0,618	99	1,80
	<LQ	0,935	0,945	97	
	<LQ	0,233	0,304	102	
	<LQ	0,584	0,601	93	2,30
	<LQ	0,935	0,943	94	
	<LQ	0,233	0,264	95	
	<LQ	0,584	0,510	81	3,08
	<LQ	0,935	0,858	88	
		Média**	95	2,39	
4-metilumbeliferona	ND	0,281	0,295	105	
	ND	0,704	0,678	96	2,36
	ND	1,127	1,150	102	
	ND	0,281	0,310	110	
	ND	0,704	0,783	111	2,82
	ND	1,127	1,211	107	
	<LQ	0,281	0,265	77	
	<LQ	0,704	0,604	78	2,87
	<LQ	1,127	0,953	80	
		Média**	96	2,68	
Ácido <i>o</i> -cumárico	<LQ	0,262	0,239	81	
	<LQ	0,656	0,540	78	3,85
	<LQ	1,049	0,962	88	
	<LQ	0,262	0,274	86	
	<LQ	0,656	0,602	84	2,21
	<LQ	1,049	0,973	88	
	<LQ	0,262	0,276	82	
	<LQ	0,656	0,646	89	1,37
	<LQ	1,049	1,053	94	
		Média**	86	2,47	

*ND = não detectado; <LD = menor que o limite de detecção; <LQ = menor que o limite de quantificação. **Média e CV = coeficiente de variação (n = 27).

De acordo com Ribani et al. (2004) e Collins, Braga, Bonato (2007), os valores aceitáveis de recuperação para análise estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$. Assim, pelos resultados encontrados nesta pesquisa quanto aos valores de recuperação para os 12 compostos fenólicos estudados, constata-se que o método aplicado apresentou boa recuperação para os mesmos. Os valores médios variaram de 82 a 96%, sendo os valores individuais para o ácido gálico (92%), catequina (82%), ácido vanílico (95%), fenol (90%), ácido siríngico (92%), vanilina (96%), siringaldeído (93%), ácido *p*-cumárico (94%), ácido sinápico (91%), cumarina (95%), 4-metilumbeliferona (96%) e, ácido *o*-cumárico (86%). Foram relatados na literatura trabalhos com valores de recuperação próximos ao encontrado nesta pesquisa, como o trabalho de Aquino et al. (2006b), Anjos et al (2011b) e Zacaroni et al. (2011b).

4.3.1.2 Quantificação dos compostos fenólicos nas amostras envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana

Os resultados obtidos para a quantificação dos 12 compostos fenólicos ao longo do período de envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L⁻¹) ao longo do período de envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho.

Tempo de envelhecimento (meses)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Somatório
	Compostos													
Ácido gálico	ND	0,213 ± 0,001	0,269 ± 0,003	0,317 ± 0,003	0,367 ± 0,004	0,417 ± 0,001	0,477 ± 0,003	0,522 ± 0,004	0,567 ± 0,001	0,606 ± 0,001	0,652 ± 0,007	0,691 ± 0,003	0,720 ± 0,003	5,341
Catequina	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-
Ácido vanílico	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-
Fenol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Ácido siríngico	ND	<LQ	<LQ	0,138 ± 0,001	0,169 ± 0,001	0,190 ± 0,001	0,221 ± 0,001	0,245 ± 0,001	0,272 ± 0,003	0,294 ± 0,001	0,315 ± 0,001	0,332 ± 0,001	0,346 ± 0,009	2,522
Vanilina	ND	<LQ	<LQ	0,097 ± 0,001	0,113 ± 0,001	0,119 ± 0,006	0,134 ± 0,002	0,142 ± 0,003	0,153 ± 0,001	0,158 ± 0,001	0,174 ± 0,007	0,194 ± 0,002	0,201 ± 0,004	1,485
Siringaldeído	ND	0,118 ± 0,002	0,135 ± 0,002	<LQ	0,177 ± 0,005	0,210 ± 0,006	0,231 ± 0,004	0,250 ± 0,001	0,279 ± 0,002	0,301 ± 0,001	0,323 ± 0,001	0,334 ± 0,001	0,346 ± 0,012	2,704
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,045 ± 0,003	0,048 ± 0,009	<LQ	0,093
Ácido sinápico	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,157 ± 0,003	0,157 ± 0,009	0,157 ± 0,015	0,471
Cumarina	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-

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

Tabela 8, continuação

Tempo de envelhecimento (meses)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Somatório
	Compostos													
4- metilumbeliferona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Ácido <i>o</i> -cumárico	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-
Somatório dos compostos fenólicos (em cada mês)	ND	0,331	0,404	0,552	0,826	0,936	1,063	1,159	1,271	1,359	1,666	1,747	1,770	-

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

Tabela 9 Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L⁻¹) ao longo do período de envelhecimento da cachaça em tonel de amburana.

Compostos	Tempo de envelhecimento (meses)													Somatório
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ácido gálico	ND	0,326 ± 0,006	0,405 ± 0,004	0,510 ± 0,006	0,646 ± 0,006	0,829 ± 0,002	1,007 ± 0,008	1,188 ± 0,004	1,372 ± 0,005	1,528 ± 0,002	1,661 ± 0,008**	1,757 ± 0,002**	1,865 ± 0,005**	13,094
Catequina	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,209 ± 0,010	0,217 ± 0,004	0,231 ± 0,003	0,229 ± 0,003	0,230 ± 0,010	0,244 ± 0,010	1,360
Ácido vanílico	ND	1,095 ± 0,009**	2,975 ± 0,006**	4,089 ± 0,004**	4,741 ± 0,007**	5,451 ± 0,050**	6,101 ± 0,009**	6,574 ± 0,046**	7,111 ± 0,068**	7,512 ± 0,028**	7,857 ± 0,023**	8,023 ± 0,002**	8,355 ± 0,032**	69,884
Fenol	ND	0,112 ± 0,004	0,226 ± 0,003	0,255 ± 0,012	0,333 ± 0,001	0,389 ± 0,014	0,451 ± 0,002	0,470 ± 0,015	0,462 ± 0,001	0,493 ± 0,003	0,489 ± 0,013	0,550 ± 0,034	0,785 ± 0,078	5,015
Ácido siríngico	ND	0,869 ± 0,011	0,789 ± 0,002	0,790 ± 0,002	0,846 ± 0,001	0,921 ± 0,007	0,988 ± 0,016	1,042 ± 0,001	1,092 ± 0,001	1,118 ± 0,006	1,135 ± 0,006	1,159 ± 0,013	1,254 ± 0,005	12,003
Vanilina	ND	0,098 ± 0,001	0,090 ± 0,006	0,084 ± 0,003	0,081 ± 0,001	0,103 ± 0,003	0,113 ± 0,002	0,125 ± 0,002	0,140 ± 0,005	0,147 ± 0,001	0,155 ± 0,001	0,157 ± 0,001	0,156 ± 0,004	1,449
Siringaldeído	ND	0,805 ± 0,004	0,744 ± 0,002	0,806 ± 0,005	0,927 ± 0,005	1,092 ± 0,002	1,304 ± 0,006	1,490 ± 0,018	1,667 ± 0,015	1,799 ± 0,040	1,957 ± 0,003**	2,024 ± 0,020**	2,226 ± 0,002**	16,841
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	0,119 ± 0,007	0,147 ± 0,001	0,166 ± 0,001	0,183 ± 0,023	0,350 ± 0,001	0,393 ± 0,003	0,433 ± 0,001	0,470 ± 0,004	0,508 ± 0,001	0,525 ± 0,005	0,556 ± 0,006	0,601 ± 0,003	4,451

*ND = não detectado, <LD = menor que limite de detecção, <LQ = menor que limite de quantificação; ** Amostra diluída (10 vezes) em álcool etílico 40% para quantificação.

Tabela 9 continuação

Tempo de envelhecimento (meses)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Somatório
	Compostos													
Ácido sinápico	ND	0,255 ± 0,001	0,634± 0,004	0,881 ± 0,003	0,947 ± 0,052	1,088 ± 0,015	1,206 ± 0,040	1,262 ± 0,036	1,384 ± 0,029	1,498 ± 0,034	1,806 ± 0,026	1,761 ± 0,050	2,577 ± 0,040**	15,299
Cumarina	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-
4- metilumbeliferona	ND	<LQ	<LQ	0,254 ± 0,015	0,334 ± 0,012	0,503 ± 0,005	0,511 ± 0,019	0,707 ± 0,059	1,076 ± 0,010	1,263 ± 0,002	1,363 ± 0,025	1,566 ± 0,020	1,727 ± 0,018	9,304
Ácido <i>o</i> -cumárico	ND	<LQ	0,145 ± 0,015	0,167 ± 0,003	0,172 ± 0,006	0,173 ± 0,001	0,180 ± 0,007	0,185 ± 0,006	0,203 ± 0,003	0,229 ± 0,010	0,238 ± 0,008	0,267 ± 0,002	0,256 ± 0,017	2,215
Somatório dos compostos fenólicos (em cada mês)	ND	3,679	6,155	8,002	9,210	10,899	12,324	13,685	15,194	16,326	17,415	18,050	20,049	-

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

Pelos resultados obtidos em ambas as madeiras, foi possível constatar a evolução na concentração dos compostos analisados ao longo do período de envelhecimento da cachaça, sendo avaliado pelo aumento progressivo na concentração de cada composto fenólico analisado. Essa evolução pode ser observada por meio do somatório da concentração dos compostos fenólicos, que apresentou valores que variaram de 0,331 a 1,770 mg L⁻¹ (para a cachaça com 1 a 12 meses de envelhecimento em tonel de carvalho) e 3,679 a 20,049 mg L⁻¹ (para a cachaça com 1 a 12 meses de envelhecimento em tonel de amburana). Pelos resultados, ficou evidente que a cachaça envelhecida em tonel de amburana apresentou uma maior concentração fenólica. Essa maior concentração pode ser explicada pelas diferenças morfológicas, tempo de uso e pré-tratamento do tonel de cada madeira utilizada (CARDOSO, 2006; MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006).

Na cachaça envelhecida em tonel de carvalho, foi observada a predominância de ácido gálico, ácido siríngico e siringaldeído, resultado que corroboram aos encontrados por Anjos et al. (2011b) e Zacaroni et al. (2011b). Já na cachaça envelhecida em tonel amburana, foi constatada a predominância de ácido gálico, ácido vanílico, siringaldeído e ácido sinápico. Tal resultado difere-se do encontrado por Santiago et al. (2012), que ao avaliarem uma cachaça armazenada em tonel de amburana por 4 meses, encontraram como compostos majoritários catequina, siringaldeído e 4-metilumbiferona.

Além das Tabelas 8 e 9, a diferença da composição fenólica pode ser constatada pelos cromatogramas (Figuras 33 e 34) da cachaça envelhecida em tonéis de carvalho e amburana.

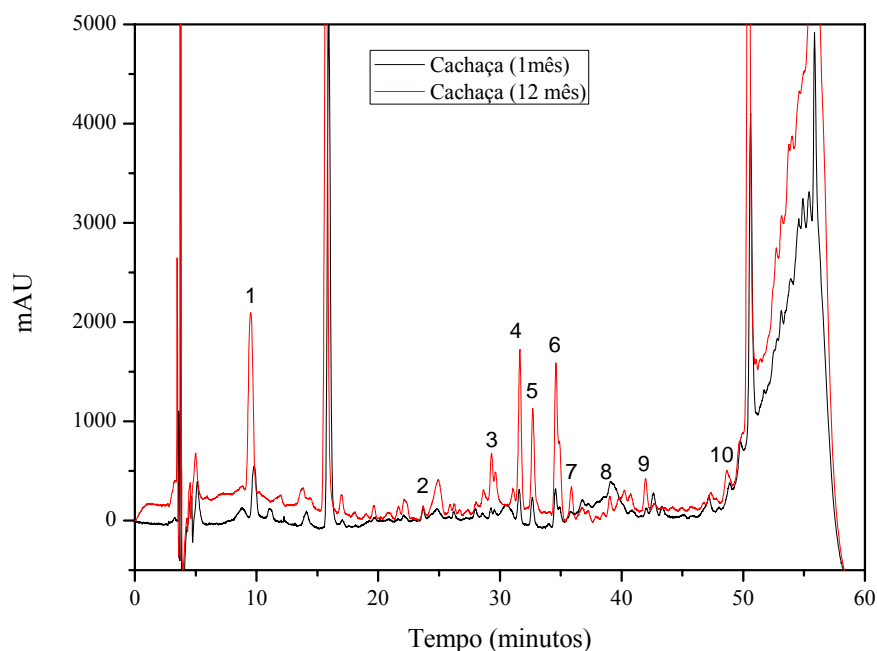


Figura 32 Cromatograma da cachaça envelhecida no primeiro e décimo segundo mês em tonel de carvalho. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) ácido siríngico; (5) vanilina; (6) siringaldeído; (7) ácido *p*-cumárico; (8) ácido sinápico; (9) cumarina; (10) ácido *o*-cumárico

De modo geral, o tempo de estocagem acarreta elevação progressiva das concentrações de compostos fenólicos na cachaça estocada em diferentes barris; apesar de complexo, o mecanismo do aumento gradativo nos teores de ácidos e aldeídos parece seguir o seguinte esquema: aldeídos cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído), aldeídos benzoicos (vanilina e siringaldeído) e ácidos benzoicos (ácido vanílico e ácido siríngico) (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; ANJOS et al., 2011b).

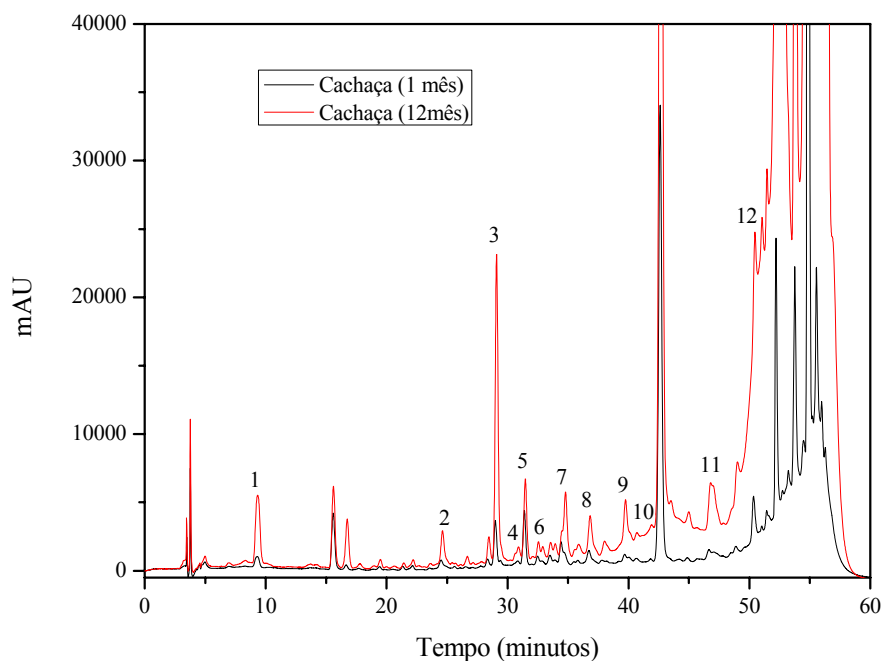


Figura 33 Cromatograma da cachaça envelhecida no primeiro e décimo segundo mês em tonel de amburana. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido *p*-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona; (12) ácido *o*-cumárico

Por meio dos dados obtidos para os compostos fenólicos totais (método espectrofotométrico) e o somatório dos compostos fenólicos analisados por cromatografia, observa-se nas Figuras 34 e 35 a evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça em ambas as madeiras em estudo.

Comparando-se ambas as técnicas de análise dos compostos fenólicos, foi possível observar que a soma dos compostos fenólicos obtidos por cromatografia representou, em média, 11% e 18% do valor total obtido para os compostos fenólicos totais nas cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e

amburana, respectivamente. Tal resultado demonstra que muito ainda se tem para estudar com relação à composição fenólica da cachaça envelhecida (ANJOS et al., 2011b).

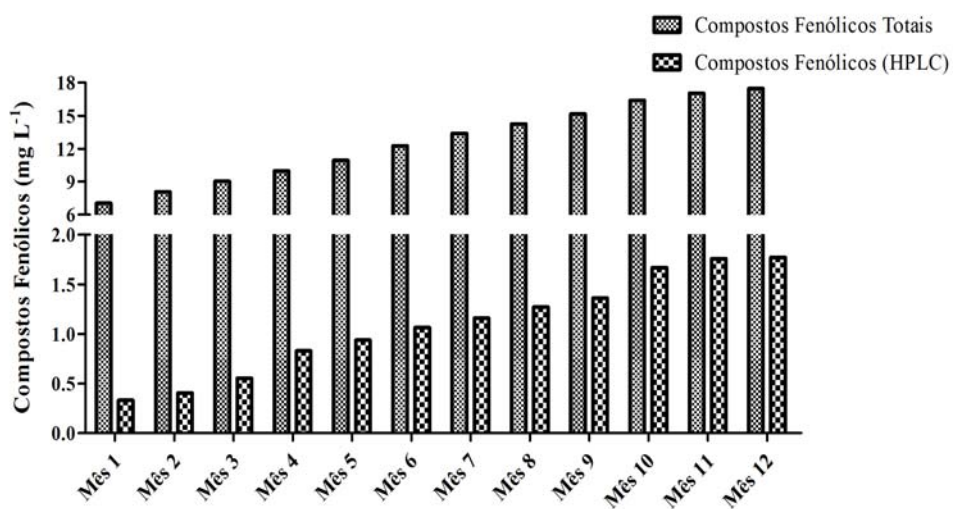


Figura 34 Evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho utilizando as técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência

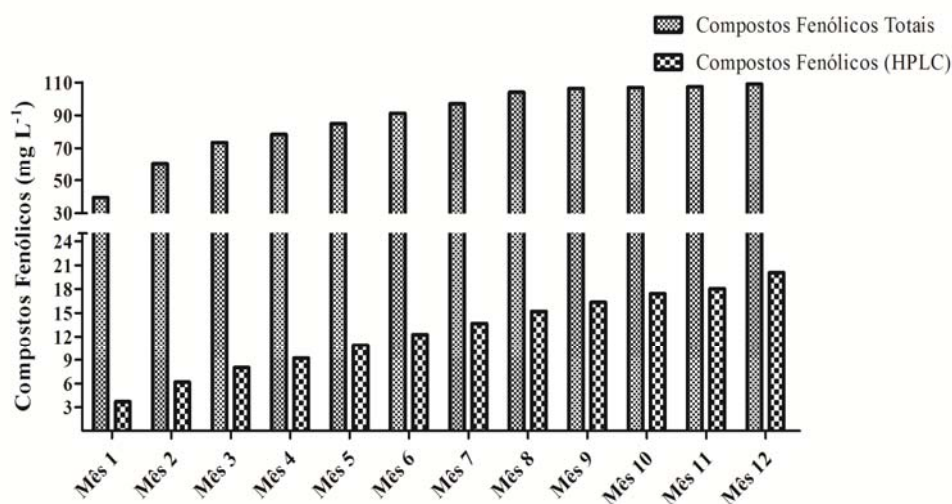


Figura 35 Evolução da composição fenólica durante o período de envelhecimento da cachaça em tonel de amburana utilizando as técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência

A grande diferença dos resultados obtidos pelo teste espectrofotométrico e cromatográfico pode ser explicada pelo fato de que o reagente Folin-Ciocalteu, popularmente conhecido como o teste para medir o conteúdo total de fenóis, mede a capacidade redutora das amostras; sendo assim, não é expresso apenas em fenóis. Outro ponto fraco do método é que ocorre superestimação do conteúdo fenólico, em larga extensão; portanto, vários interferentes não fenólicos são conhecidos, entre eles a vitamina C, compostos com grupo hidroxila, açúcares, proteínas e outros (ESCARPAS; GONZÁLEZ, 2001; OLIVEIRA et al., 2009a; b).

Assim como nas análises físico-químicas, a ACP foi aplicada nos compostos fenólicos (HPLC) das amostras envelhecidas em tonéis de carvalho e

4.3.2 Carbamato de etila

Na Figura 37 verifica-se o cromatograma obtido para o padrão de carbamato de etila.

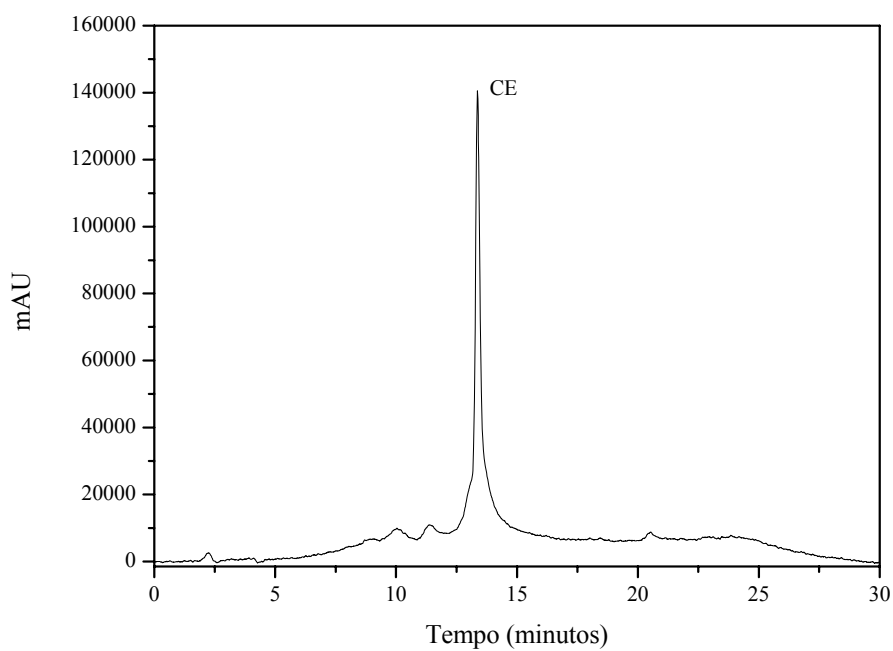


Figura 37 Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$

4.3.2.1 Certificação do método analítico para carbamato de etila

Os parâmetros avaliados na validação do método proposto foram linearidade, limites de detecção, limite de quantificação e exatidão (expressa em recuperação). A seletividade não foi avaliada como no método para compostos fenólicos porque não foi possível encontrar uma matriz de cachaça isenta de carbamato de etila.

O tempo médio de retenção obtido para o composto analisado foi de $13,34 \pm 0,040$ minutos. Anjos et al. (2011a) avaliaram carbamato de etila durante o armazenamento de cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro e encontraram como tempo de retenção médio 13,1 minutos para esse composto. Já Zacaroni et al. (2011a) determinaram contaminantes orgânicos em aguardentes de cana, entre eles o carbamato de etila e obtiveram como nesta pesquisa valores próximos para o tempo de retenção.

A curva analítica foi obtida pela regressão linear ($y = 10653,6x - 15761,8$), plotando a área de pico versus concentração, sendo o coeficiente de correlação linear igual a 0,9998 e valores de 3,24 e $10,83 \mu\text{g L}^{-1}$ para os limites de detecção e quantificação, respectivamente.

O valor obtido para o limite de detecção foi inferior aos relatados por Herbert et al. (2002) ($4,2 \mu\text{g L}^{-1}$); Park et al. (2007) ($20,0 \mu\text{g L}^{-1}$); Anjos et al. (2011a) e Zacaroni et al. (2011a) ($3,93$ e $15,7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). Já o limite de quantificação foi aproximadamente duas vezes maior que o relatado por Madrera e Valles (2009), cujos limites de detecção e quantificação foram $1,64$ e $3,56 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em que a concentração do carbamato de etila foi calculada pelo aumento das áreas dos picos, obtida após a adição de uma quantidade conhecida

dos padrões a 3 amostras escolhidas. Os resultados referentes à porcentagem de recuperação estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 Resultado de exatidão (expressos em recuperação) de carbamato de etila nas amostras de cachaça envelhecidas.

Composto	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)*			Recuperação (%)	CV** (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado		
Carbamato de etila	<LQ	5,0	14,286	108	3,01
	<LQ	45,0	50,716	95	
	<LQ	100,0	94,474	87	
	<LQ	5,0	12,384	91	3,02
	<LQ	45,0	50,383	94	
	<LQ	100,0	98,946	91	
	<LQ	5,0	14,212	100	3,14
	<LQ	45,0	49,555	91	
	<LQ	100,0	99,484	91	
			Média**	94	2,39

* <LQ = menor que o limite de quantificação. **Media e CV = coeficiente de variação (n = 27).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para alguns tipos de análise estão geralmente compreendidos entre 70,0 e 120,0%, com precisão de $\pm 20\%$. Porém, em amostras mais complexas, como o vinho, essa faixa pode ser ampliada para 50,0 a 120,0%, com precisão de $\pm 15\%$ (RIBANI et al., 2004). Com base nessas informações, conclui-se que o método apresentou boa recuperação para o carbamato de etila, pois os valores estão compreendidos entre a faixa aceitável.

A faixa de recuperação encontrada neste trabalho está entre 87 a 108%. Esses resultados estão próximos daqueles apresentados por Madrera e Valles (2009), que determinaram carbamato de etila em cidras por HPLC e encontraram

uma faixa de recuperação entre 94,0 a 98,0% e Machado et al. (2012), que encontraram valores de 84 a 102%.

4.3.2.2 Quantificação do carbamato de etila no caldo de cana, no mosto fermentado, nas frações do destilado e nas amostras envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana

Os resultados obtidos para a quantificação do carbamato de etilas nas amostras caldo de cana, mosto fermentado e nas frações “cabeça”, “coração” e “cauda” estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 Concentração de carbamato de etila do caldo de cana, na fermentação e das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”.

Amostras	Carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$)*
Caldo de cana	ND
Mosto fermentado	<LQ
“Cabeça”	<LQ
“Coração”	<LQ
“Cauda”	<LQ

*ND = Não detectado; <LQ = menor que o limite de quantificação.

Poucas são as referências que estabelecem uma relação entre os níveis de carbamato de etila nas cachaças brasileiras e seus sistemas de produção. De acordo com Aresta, Boscolo, Franco (2001), entre os vários fatores de produção que afetam o nível de carbamato de etila, o processo de destilação tem notável importância.

De acordo com os resultados obtidos, a cana utilizada para produção da cachaça, assim como o processo de obtenção do caldo, não interferiram para a formação de carbamato de etila, pois não se detectou esse composto. Já nas etapas de fermentação e destilação, o carbamato, mesmo em quantidades baixas foi detectado, mas não quantificado, visto que o limite de quantificação do método utilizado é de $10,83 \mu\text{g L}^{-1}$. Para alguns autores a presença de carbamato de etila ocorre principalmente na seguinte ordem do processo de destilação, “cabeça” > “coração” > “cauda”, devido à sua maior solubilidade em álcool do que em água (ANDRADE SOBRINHO et al., 2009; ANJOS, 2010). Por esse fato, torna-se previsível que a “cabeça” apresente uma maior concentração de carbamato de etila, já que apresenta uma maior graduação alcoólica, conforme resultados apresentados na Tabela 3. Porém, os resultados encontrados não justificam essa teoria, pois todas as frações apresentaram valores abaixo do limite de quantificação. Na literatura foi relatado apenas um trabalho sobre a determinação de carbamato de etila, nas diferentes etapas da produção de cachaça. Baffa Júnior et al. (2011) quantificou a formação do carbamato de etila no processo de fermentação do caldo de cana (mosto fermentado), nas frações do destilado e na vinhaça, durante a produção de cachaça. Os resultados médios encontrados pelos autores foram de $122 \mu\text{g L}^{-1}$ no mosto fermentado; $59,7 \mu\text{g L}^{-1}$ na fração cabeça; $52 \mu\text{g L}^{-1}$ na fração coração; $1,57 \mu\text{g L}^{-1}$ na fração cauda e $53,1 \mu\text{g L}^{-1}$ na vinhaça. Os resultados indicaram que o carbamato de etila é formado durante a fermentação e sua concentração é aumentada durante a destilação, dados que corroboram com aqueles encontrados no presente trabalho, aonde foi possível observar que a formação do carbamato de etila provavelmente ocorre no processo de fermentação.

Para Nascimento et al. (1998), Aresta, Boscolo e Franco (2001), Andrade Sobrinho et al. (2002), Cardoso, Lima-Neto e Franco (2003), Bruno et al. (2007), Lachenmeier et al. (2009) e Reche e Franco (2009), na etapa de

destilação, os alambiques contínuos (inox) e descontínuos (cobre) apresentam diferenças quanto aos teores de carbamato de etila em cachaças. Nos alambiques de cobre, acredita-se que o metal cobre atue como catalisador nas reações de formação desse contaminante. Já nos alambiques contínuos, ocorre por causa da não separação das frações do destilado (NOVAES, 1997; ALMEIDA-LIMA, 1999; CARDOSO, 2006). Porém, em alguns estudos realizados recentemente, como os de Barcelos et al. (2007), Masson (2009) e Zacaroni et al. (2011a) demonstrou-se que não há correlação entre as concentrações de cobre e carbamato de etila em cachaça.

Após avaliação de carbamato de etila nas etapas de obtenção do caldo de cana, fermentação e destilação, foi realizada a determinação de carbamato de etila nas amostras envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana. Os resultados referentes a essa etapa estão representados na Tabela 12.

Tabela 12 Concentração de carbamato de etila durante o envelhecimento da cachaça em tonéis de carvalho e amburana.

Tempo de envelhecimento (meses)	Carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	
	Tonel	
	Carvalho	Amburana
1	<LQ	<LQ
2	<LQ	<LQ
3	<LQ	<LQ
4	<LQ	<LQ
5	<LQ	<LQ
6	<LQ	<LQ
7	<LQ	<LQ
8	<LQ	<LQ
9	<LQ	<LQ
10	<LQ	<LQ
11	<LQ	<LQ
12	<LQ	<LQ

* <LQ = menor que o limite de quantificação.

Pelos resultados obtidos, pode-se constatar que a concentração de carbamato de etila nas amostras de cachaça analisadas não sofre alteração na etapa de envelhecimento nos toneis de madeira em estudo. Para a legislação, a quantidade máxima permitida para esse composto é de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Em diversos trabalhos realizados com cachaça, tem sido demonstrado que muitas das amostras analisadas apresentaram concentrações de carbamato de etila acima do limite máximo estabelecido pela legislação (BARCELOS et al., 2007; MASSON, 2009; ZACARONI et al., 2011a).

A baixa concentração encontrada nesta pesquisa pode ser observada também pelos cromatogramas (Figuras 38 e 39), em que se compararam o 1º e o 12º mês de envelhecimento em tonéis de carvalho e amburana. A comparação demonstra que a concentração de carbamato de etila em ambas as madeiras, não apresentou (visualmente) diferença na intensidade do pico dos cromatogramas, quando comparados com o 1º e o 12º mês de envelhecimento nos toneis.

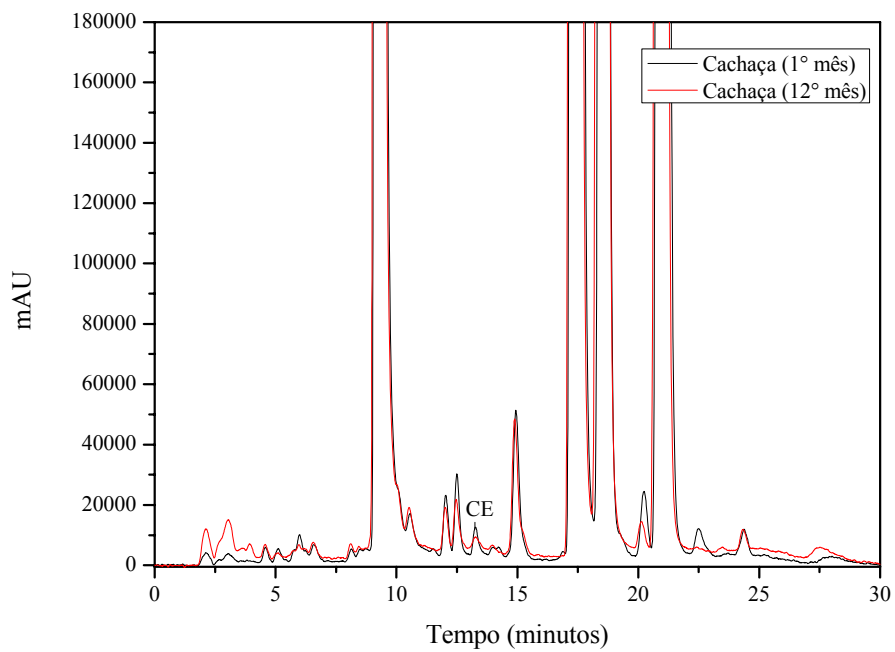


Figura 38 Cromatograma das amostras de cachaças (1º e 12º mês) envelhecidas em tonel de carvalho - comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

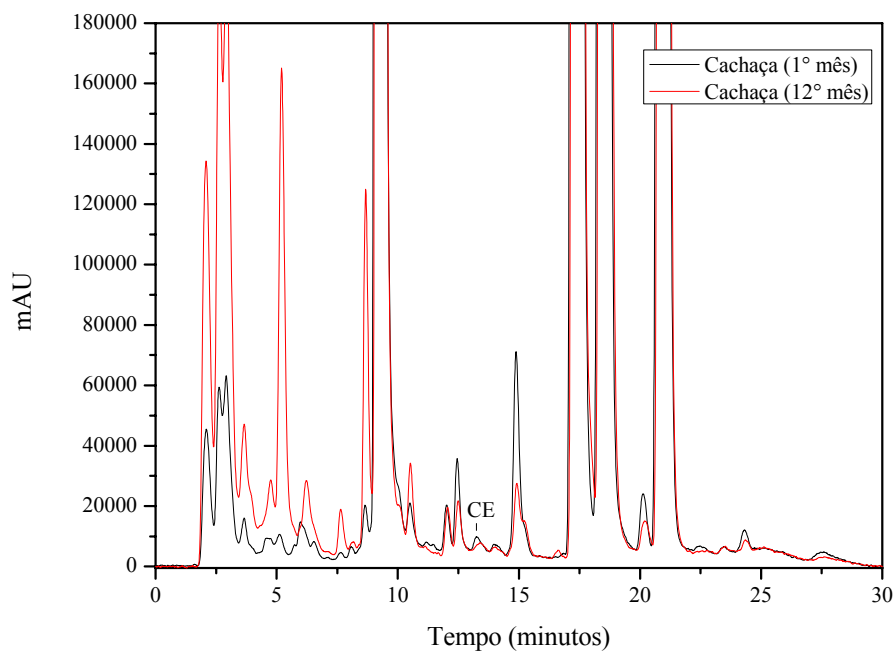


Figura 39 Cromatograma das amostras de cachaças (1º e 12º mês) envelhecidas em tonel de amburana - comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

Apesar da baixa concentração, nota-se uma tendência de estabilização na concentração do carbamato de etila para as cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e amburana. Esses resultados não corroboram aqueles obtidos por Anjos et al. (2011a), que avaliaram a concentração de carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro, observando uma diferença significativa na concentração de carbamato de etila para ambos os procedimentos, nos quais se observou um aumento mais expressivo na concentração desse composto para a cachaça armazenada em recipiente de vidro. Apesar disso, nota-se uma tendência de estabilização no 3º mês da concentração do carbamato de etila para a cachaça proveniente do

recipiente de vidro, ao passo que, para a cachaça envelhecida, o aumento na concentração de carbamato de etila tendeu a ser progressivo durante o período de estocagem da bebida. Anteriormente, Madrera e Valles (2009), avaliando carbamato de etila em outra matriz, apontaram um aumento progressivo na concentração desse em cidras submetidas a diferentes níveis de maturação.

De acordo com relatos da literatura, a formação de carbamato de etila em cachaças durante o envelhecimento em tonel de madeira ocorre de maneira gradativa, por meio da reação entre o etanol e a ureia formada pela degradação de precursores nitrogenados, intrínsecos do processo de produção da bebida, sendo os principais deles os aminoácidos arginina, ornitina e citrulina. Além desses, outros compostos nitrogenados têm sido estudados como possíveis precursores para a formação do carbamato de etila antes e após o processo de destilação, como é o caso do fosfato de carbamila e do íon cianeto (COOK et al., 1990). Machado (2010), com intuito de esclarecer a formação de carbamato de etila, trabalhou com adubação nitrogenada na cana, na expectativa do nitrogênio fornecido para a cultura da cana influenciar a composição dos compostos nitrogenados. Concluiu que as diferentes doses de ureia e nitrato de amônio não proporcionaram um aumento na concentração de carbamato de etila.

5 CONCLUSÃO

Os parâmetros físico-químicos apresentaram diferenças entre as frações “cabeça”, “coração” e “cauda” e mantiveram essa diferença ao longo do período de envelhecimento da cachaça em ambos os toneis de madeira em estudo.

Os parâmetros físico-químicos no envelhecimento em tonel de carvalho mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, e nas amostras envelhecidas em amburana, o parâmetro acidez volátil apresentou elevado a partir do 1º mês de envelhecimento.

Nos parâmetros extrato seco, intensidade de cor e compostos fenólicos totais, constatou-se uma correlação linear positiva satisfatória entre eles. As variações ocorridas no aumento de um dos parâmetros acarretam um aumento em outro ao longo do envelhecimento da bebida.

Os métodos cromatográficos propostos, para determinação dos 12 compostos fenólicos e carbamato de etila, apresentaram valores aceitáveis em todos os parâmetros analisados para validação.

Ocorreu um aumento progressivo na incorporação de compostos fenólicos à bebida durante o período de envelhecimento da cachaça em ambas as madeiras. Os compostos majoritários quantificados no tonel de carvalho foram ácido gálico, siringaldeído e ácido siríngico, e no tonel de amburana, o ácido vanílico, siringaldeído, ácido sinápico e ácido gálico.

A concentração de carbamato de etila não foi detectada no caldo de cana, significando que a variedade da cana e a moagem não influenciaram a formação desse composto. Nas etapas de fermentação, destilação e envelhecimento em toneis de carvalho e amburana, a concentração de carbamato de etila manteve-se estabilizada e menor que o limite máximo permitido pela legislação.

REFERÊNCIAS

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

AGÊNCIA DE PROMOÇÃO DE EXPORTAÇÕES E INVESTIMENTOS. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.apexbrasil.com.br/>>. Acesso em: 14 set. 2012.

ALMEIDA-LIMA, U. **Aguardente: fabricação em pequenas destilarias**. 1. ed. Piracicaba: FEALQ, 1999.

ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 25-67.

ANDRADE SOBRINHO, L. G. et al. Determinação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n.6B, p. 1074-1077, 2002.

ANDRADE SOBRINHO, L. G. 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 Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANJOS, J. P. **Compostos fenólicos e carbamato de etila: caracterização e quantificação em diferentes períodos do envelhecimento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp)**. 2010. 153 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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, 2011a.

ANJOS, J. P. et al. Evolution of the concentration of phenolic compounds in cachaça during aging in an oak (*Quercus* sp.) barrel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1307-1314, 2011b.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial**: na produção de alimentos. São Paulo: Editora Blucher, 2005. v. 4, 525 p.

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, 2006a.

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

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS. São Paulo, 2011. Disponível em: <www.abrabe.org.br/cachaça> Acesso em: 18 maio 2012.

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, p. 90-92, mar./abr. 2000.

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

BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças comerciais da região da Zona da Mata Mineira – MG. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 4, p. 371–373, 2007.

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.

BERNARDI, T. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 2705-2712, 2008.

BOUROCHE, J. M.; SAPORTA, G. **Análise de dados**. Rio de Janeiro: Zahar, 1982.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 391-396, 1998.

BOZA, Y.; OETTERER, M. Envelhecimento de aguardente de cana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 8-15, jan./jun. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 4851 de 02 de outubro de 2003**. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília, Disponível em: <<http://www6.senado.gov.br/legislacao/ListaTextoIntegral.action?id=224904>>. Acesso em: 10 jan. 2013

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 13, de 29 de junho de 2005a**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 10 jan. 2013

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005b**. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Disponível em: <<http://www.ivegetal.com.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Referenciada/IN%20N%C2%BA%2024%20de%2008%20de%20setembro%20de%202005.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

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.

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.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255 p.

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.

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.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1241-1243, 2006.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 32-36, 2000.

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.

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.

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

CASCUDO, L. C. **História da alimentação no Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia/EDUSP, 1983. v.1.

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.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2007. 453 p.

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.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 6, p. 1926-1978.

CORRÊA, S. **Cana-de-açúcar: comparativo de área, produção e produtividade**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2007. (Anuário Brasileiro da Cana-de-Açúcar).

DATO, M. C. F.; PIZAURO 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.

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

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

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

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

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, p. 119-127, 2001.

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.

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

FERNANDES, W. J. et al. Physicochemical quality of a blend of domestic cachaças from the South of Minas Gerais. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 257-261, 2007.

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

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

GOLDEBERG, D.M. et al. Phenolic constituents, furans, and total antioxidants status of distilled spirits. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p. 3978 - 3985, 1999.

GOMES, F. C. O. et al. Produção de cachaça de alambique utilizando linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 25-31, 2009.

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

HAQUE, M. R.; BRADBURY, J. H. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v. 77, p. 107–114, 2002.

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

HERBERT, P. et al. New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1616-1620, 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate (Urethane)**. Lyon, 2010. (Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 96).

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

JERONIMO, E. M. et al. Isolado protéico de soja como fonte de nitrogênio na fermentação alcoólica para produção de cachaça. **CEPPA: boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba v. 26, n. 1, p. 21-28, 2008.

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.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-218, 1999.

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. 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.

LACHENMEIER, D. W. et al. Ethyl carbamate analysis in german fruit spirits and brazilian sugarcane spirits (cachaça): improved sample cleanup with automated parallel evaporation. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 105, p. 507-512, 2009.

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.

LAVINE, B. K. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 91-97, 2000.

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. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.

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

LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. A aguardente e o controle químico de sua qualidade. **O Engarrafador Moderno**, n. 33, p. 5-8, 1994.

LIMA, U. A. **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: E. Blucher, 2001. Cap. 5, v. 4, p. 145-182,

LIN, Y. T. et al. Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 2059-2065, 2005.

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.

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

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

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

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.; NELSON, D. L. Comparative study of soy and flours on the of alcoholic fermentation in successive batches. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 59, p. 171-179, 1994.

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

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

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

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.

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.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

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.

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.

MORALES, M. L.; BENITIZ, B.; TRONCOSO, A. M. Accelerated of wine vinegars with oak chips: evaluation of wood flavour compounds. **Food Chemistry**, v. 88, p. 305-315, 2004.

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

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.

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.

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.

NICOL, D.A. Batch distillation. In: RUSSELL, I. **Whisky: technology, production and marketing**. London: Academic, 2003. p. 155-180.

NIEUWOUDT, H. H. et al. Principal component analysis applied to fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3726-3735, 2004.

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.

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

NOVA, M. X. V. et al. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 460-466, 2009.

NOVAES, F. V. Em nome da qualidade da aguardente de cana. **O Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 7, n. 46, p. 68-73, 1997.

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

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, n. 1, p. 84-96, 1986.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p.689-702, 2009a.

OLIVEIRA, A. C. et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, London, v.115, p. 469-475, 2009b.

OLIVEIRA, S. G.; MAGALHÃES, M. A.; BERGERAT, P. C. A luta da cachaça de alambique para se consolidar como fonte de riqueza em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 14-19, 2009.

PARAZZI, C. 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.

PARK, S. et al. Analysis of ethyl carbamate in Korean soy sauce using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection or tandem mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 975-982, 2007.

PATARO, C. et al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

PENTEADO, J. C. P.; MASINI, J. C. Heterogeneidade de álcoois secundários em aguardentes brasileiras de diversas origens e processos de fabricação. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1212-1215, 2009.

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

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

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

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

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

QUIDEAU, S. et al. The chemistry of wine Polyphenolic C-Glycosidic Ellagitannins targeting human Topoisomerase II. **Chemistry – A European Journal**, v.11, p. 6503 - 6513, 2005.

RAKIC, S. et al. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 830-834, 2007.

RECHE, R. V. et al. Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of brazilian cachaças. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 6603-6608, 2007.

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.

RENCHE, A. C. **Methods of multivariate analysis**. Nova Iorque: Wiley Interscience, 2002.

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

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 1, p. 26-30, 1987.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod, 1968.

SANTIAGO, W. D. et al. Perfil físico-químico e quantificação de compostos fenólicos e acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar armazenadas em tonéis de diferentes madeiras. **Revista Científica**, Jaboticabal, v. 40, n. 2, p. 189-197, 2012.

SCHLATTER, J.; DINOVI, M.; SETZER, W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic Example: Ethyl carbamate (CAS 51-79-6). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 63-68, 2010.

SCHWAN, R. F. et al. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. p. 101-135.

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.

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.

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.

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

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

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

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

SOUZA, P. P. et al. Brazilian cachaça: “Single shot” typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry**, London, v. 115, p. 1064-1068, 2009.

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

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 85, n. 3, p. 149-156, 1979.

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.

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

- VILELA, A. F. **Estudo da adequação de critérios de boas práticas de fabricação na avaliação de fábricas de cachaça de alambique**. 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- 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.
- WALDER, J. M. M. et al. Aging of sugar cane spirit using gamma radiation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 9., 2004, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: The International Society of Food Engineering, 2004. CD-ROM.
- WEBER, J. V.; SHARYPOV, V.I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, p. 233–247, 2009.
- WHITE, J. **Yeast technology**. Chapman & Hall: London, 1954. p. 135.
- YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 283 p.
- ZACARONI, L. M. **Compostos fenólicos e cumarinas: certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira**. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- 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, 2011a.
- 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, 2011b.

ANEXOS**ANEXO A**

Figura 1A	Cromatograma do caldo de cana na quantificação do carbamato de etila.....	165
Figura 2A	Cromatograma do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) na quantificação do carbamato de etila (CE).....	166
Figura 3A	Cromatograma do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) fortificado. Teste da coluna C18 aberta na quantificação do carbamato de etila (CE).....	167
Figura 4A	Cromatograma do segundo eluente da coluna C18 aberta após passagem do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) fortificado. A eluição foi feita com a fase móvel do método proposto para quantificação de carbamato de etila (CE).....	168

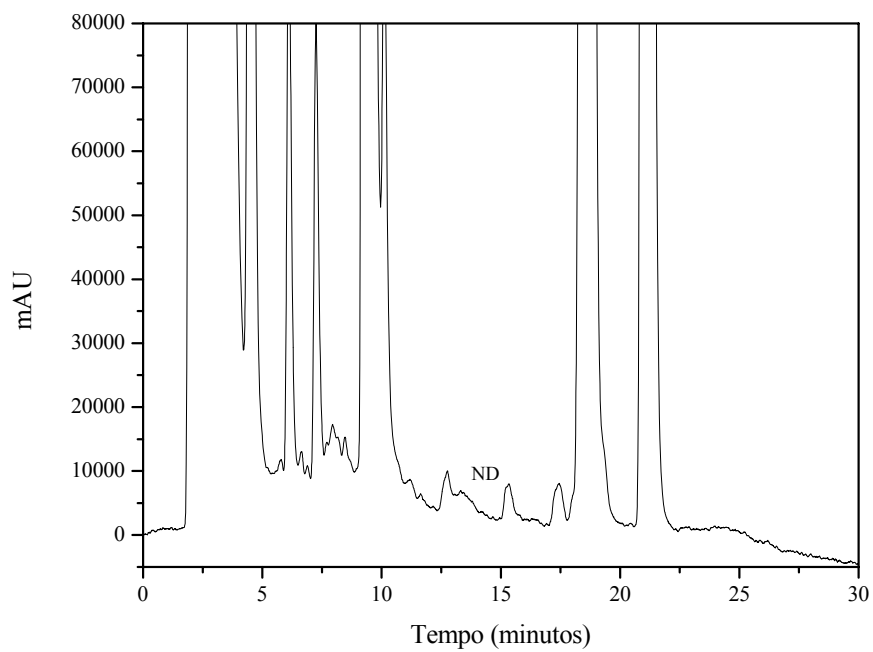


Figura 1A Cromatograma do caldo de cana na quantificação do carbamato de etila. ND = não detectado

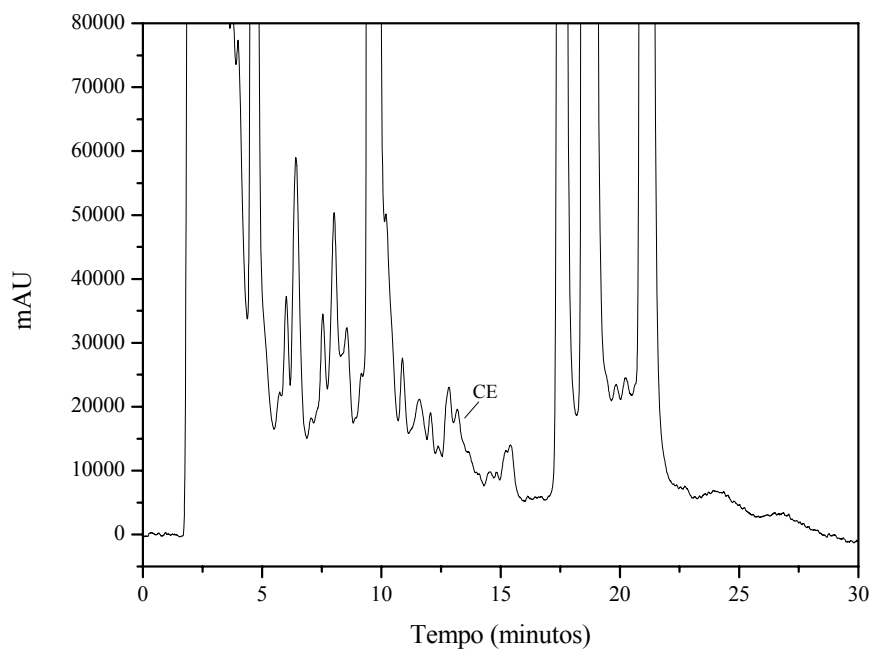


Figura 2A Cromatograma do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) na quantificação do carbamato de etila (CE)

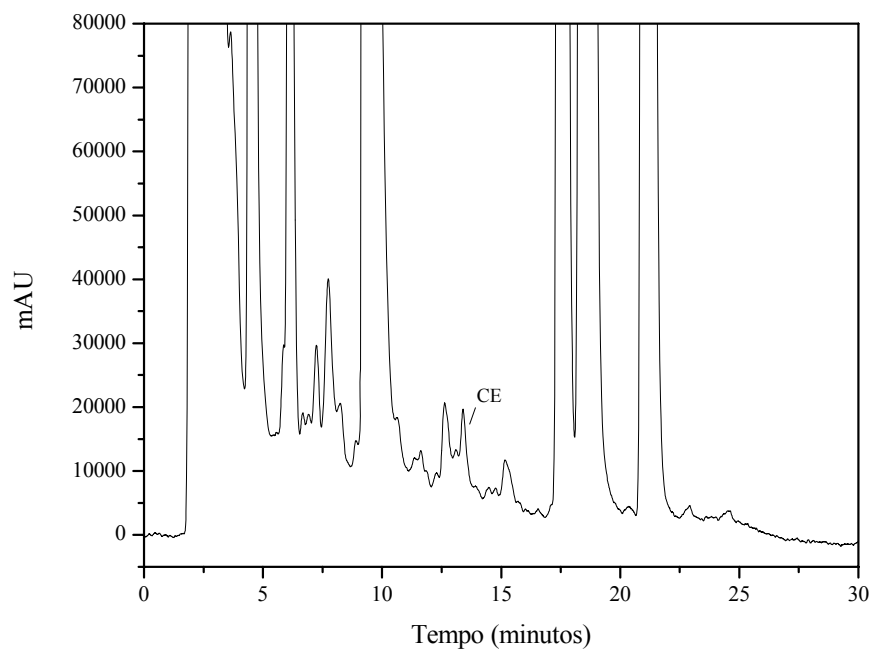


Figura 3A Cromatograma do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) fortificado. Teste da coluna C18 aberta na quantificação do carbamato de etila (CE). Concentração: $20 \mu\text{g L}^{-1}$

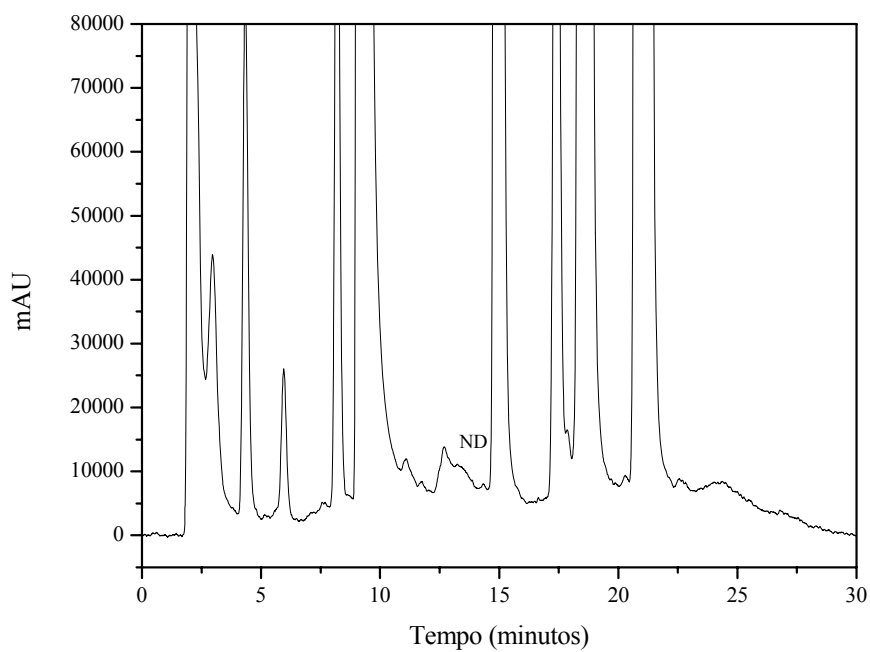


Figura 4A Cromatograma do segundo eluente da coluna C18 aberta após passagem do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) fortificado. A eluição foi feita com a fase móvel do método proposto para quantificação de carbamato de etila (CE). ND = Não detectado