



**PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, COMPOSTOS
VOLÁTEIS, CARBAMATO DE ETILA E
COMPOSTOS FENÓLICOS DE CACHAÇAS
ARMAZENADAS EM TONÉIS RECÉM-
CONFECCIONADOS DE CARVALHO E
MADEIRAS NATIVAS BRASILEIRAS**

WILDER DOUGLAS SANTIAGO

LAVRAS - MG

2016

WILDER DOUGLAS SANTIAGO

**PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, COMPOSTOS VOLÁTEIS, CARBAMATO
DE ETILA E COMPOSTOS FENÓLICOS DE CACHAÇAS
ARMAZENADAS EM TONÉIS RECÉM-CONFECCIONADOS DE
CARVALHO E MADEIRAS NATIVAS BRASILEIRAS**

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

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS - MG

2016

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

Santiago, Wilder Douglas.

Perfil físico-químico, compostos voláteis, carbamato de etila e compostos fenólicos de cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho e madeiras nativas brasileiras / Wilder Douglas Santiago. – Lavras : UFLA, 2016.

221 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Cachaça. 2. Perfil físico-químico. 3. Compostos voláteis. 4. Compostos fenólicos. 5. Carbamato de etila. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

WILDER DOUGLAS SANTIAGO

**PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, COMPOSTOS VOLÁTEIS, CARBAMATO
DE ETILA E COMPOSTOS FENÓLICOS DE CACHAÇAS
ARMAZENADAS EM TONÉIS RECÉM-CONFECCIONADOS DE
CARVALHO E MADEIRAS NATIVAS BRASILEIRAS**

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

APROVADA em 25 de fevereiro de 2016.

Dra. Adelir Aparecida Saczk	UFLA
Dra. Ana Maria de Resende Machado	CEFET/MG
Dra. Hélia Alves de Mendonça	MAPA
Dra. Márcia Justino Rossini Mutton	UNESP
Dr. Sérgio Scherrer Thomasi	UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

LAVRAS - MG

2016

A Deus, pela vida e por mais uma conquista;
À minha amada esposa, Juliana, por ser imprescindível na minha vida,
pelo incentivo, apoio, amor e vivência.
Aos meus pais, Lourival e Maria de Fátima, pela compreensão, apoio,
amor e motivação;
Aos meus irmãos, Luiz e Josley, pelo carinho, incentivo e amizade.
À minha querida orientadora e madrinha, pelos ensinamentos,
oportunidades e amizade

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

À minha amada esposa, Juliana, que tanto amo, pelo apoio, companheirismo e amor.

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

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

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

Aos Professores Márcio Pozzobon Pedroso (DQI-UFLA) e Whasley Ferreira Duarte (DBI-UFLA) pela gratificante contribuição no exame de qualificação. À minha amiga Lidiany Mendonça Zacaroni Lima (DQI-UFLA), pela dedicação em ajudar, pelos ensinamentos, amizade, carinho e contribuição no exame de qualificação.

Às professoras Adelir Aparecida Saczk, Ana Maria de Resende Machado, Hélia Alves de Mendonça e Márcia Justino Rossini Mutton, pela participação na banca avaliadora, conhecimentos compartilhados e amizade. Ao professor Sérgio Scherrer Thomasi, pela participação na banca avaliadora.

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

À 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.

Ao grande amigo, Marcos de Souza Gomes, pela amizade, companheirismo e valiosas contribuições. Ao grande Leonardo Milani, vulgo balada, pela amizade, ajuda e companheirismo. À querida amiga Maria Luisa Teixeira, pelas ajudas estatísticas, amizade e companheirismo.

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

Aos amigos e companheiros de trabalho, Rodolfo, Richard, Alan, Bruno, Alex, Gabriel, Lucas e Francielle. 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 - Óleos Essenciais: Luana, Karen, Lucilene, Danúbia, Anni, Rafaela Brandão, Rafaela Vieira, Mariana e Thaís. E àqueles que, atualmente, não estão no laboratório, mas deixaram muitas histórias e muito aprendizado: Milene, Cíntia, Juliana Valério, João, Sara, Rafaela Paula, Christiane, Felipe, Bruna, Paula, Vanessa, Jean e Leonardo Luna.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

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

RESUMO

Várias reações ocorrem em toda a cadeia produtiva da cachaça, desde a fermentação até o engarrafamento. Nessas reações, ocorrem a formação dos compostos secundários, contaminantes 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 e suas vias de formação não estarem bem elucidadas. O envelhecimento é a última etapa do processo de produção, mas não é obrigatória sua realização. Nessa etapa ocorrem diversas reações químicas entre os compostos extraídos da madeira e alguns compostos presentes na bebida. Os principais compostos extraídos da madeira pelos destilados são: compostos voláteis, compostos fenólicos, substâncias tânicas, açúcares, glicerol e ácidos orgânicos não voláteis. Os objetivos desse trabalho foram realizar um acompanhamento periódico dos parâmetros físico-químicos e do perfil cromatográfico, quanto aos teores de carbamato de etila, compostos voláteis e composição fenólica da cachaça no processo de produção e no armazenamento em tonéis recém-confeccionados de amburana, carvalho, bálsamo, jatobá e peroba. Os tonéis foram fabricados em uma tanoaria especializada e as amostras foram produzidas em uma unidade produtora. Foram realizadas análises físico-químicas e cromatográficas. As frações do destilado apresentaram, físico-quimicamente, valores distintos; as frações “cabeça” e “cauda” apresentaram valores inapropriados para os parâmetros grau alcoólico, aldeídos e butan-1-ol, a fração “coração”, tanto no processo de destilação e no envelhecimento, apresentou valores dentro do estabelecido pela legislação. Foi possível observar pelos resultados dos compostos voláteis analisados por GC-MS vários compostos importantes para o aroma e sabor das cachaças, sendo os álcoois, ácidos, ésteres e sesquiterpenos os principais grupos encontrados. De acordo com os resultados, foi observado um aumento progressivo e heterogeneidade da composição fenólicas em todas as madeiras utilizadas para o armazenamento. Pelo teste de correlação linear entre compostos fenólicos totais, extrato seco e intensidade de cor, constatou-se uma correlação muito forte. A concentração de carbamato de etila não foi detectada no caldo de cana e na etapa de fermentação, na destilação, os níveis de carbamato variaram de <math><LQ a 17,081 \mu\text{g L}^{-1}</math>. No armazenamento, constatou-se que os níveis de carbamato de etila aumentaram e apresentaram distintos quanto ao tipo de madeira. Nas bebidas estocadas em vidro, com presença ou ausência de luz, foi possível observar que o material e a luminosidade não afetaram na sua formação.

Palavras-chave: Cachaça. Perfil físico-químico. Compostos voláteis. Compostos fenólicos. Carbamato de etila.

ABSTRACT

Several reactions occur throughout the production chain of cachaça, from fermentation to bottling. The formation of secondary compounds, organic and inorganic contaminants, occur during these reactions. Among the organic contaminants, ethyl carbamate is a compound that has been the most extensively researched because it is a potentially toxic compound and pathways for its formation are not well elucidated. Aging is the last step of the production process, but its use is not mandatory. At this stage, several chemical reactions between compounds extracted from wood and some compounds present in the beverage occur. The main compounds extracted from wood by the distillates are volatile compounds, phenolic compounds, tannic substances, sugars, glycerol and nonvolatile organic acids. The objectives of this work were to conduct regular monitoring of physical-chemical parameters and the chromatographic profile, including the levels of ethyl carbamate, volatile compounds and the phenolic composition of cachaça in the production process and storage casks. The casks were recently constructed from amburana, oak, balsam, jatobá and peroba wood. The casks were constructed in a specialized cooperage. The samples were produced in a production unit. Physical and chemical analysis and chromatography was performed. The distilled fractions presented distinct physico-chemical values, and inappropriate values were found for the alcoholic content, aldehydes and butan-1-ol parameters in the "head" and "tail" fractions. The values observed for the "heart" fraction, both in the process distillation and aging, were within that established by the legislation. It was possible to observe the results of volatiles analyzed by GC-MS. Several major components responsible for the aroma and flavor of the cachaça, including alcohols, acids, esters and sesquiterpenes, were the main groups found. A progressive increase in heterogeneity and phenolic composition of the wood used for storage was observed. A linear correlation between total phenolic compounds, solids and color intensity was found. No ethyl carbamate was detected in sugar cane juice or in the fermentation step. Carbamate levels ranged from $<LQ\ 17.081\ \mu\text{g}\ \text{L}^{-1}$ in the distillation step. The ethyl carbamate levels increased during storage and showed differences with respect to the type of wood. When the beverages were stored in glass in the presence or absence of light, no effect of the material or the light on the formation of the carbamate was observed.

Keywords: Cachaça. Physicochemical profile. Volatile compounds. Phenolic compounds. Ethyl carbamate.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Fluxograma do processo de produção da cachaça de alambique.....	31
Figura 2	Equação simplificada da fermentação alcoólica.....	36
Figura 3	Fórmula estrutural do carbamato de etila.....	55
Figura 4	Estruturas conformacionais para o CE.....	56
Figura 5	Esquema geral dos precursores envolvidos no ciclo da ureia.....	62
Figura 6	Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas.....	72
Figura 7	Aspectos macroscópicos da madeira.....	85
Figura 8	Estrutura química da lignina.....	92
Figura 9	Conversão de alguns fenóis derivados da lignina.....	93
Figura 10	Principais compostos fenólicos incorporados à cachaça.....	94
ARTIGO 1		
Figura 1	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, quanto aos seus parâmetros físico-químicos.....	136
Figura 2	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores dos compostos voláteis analisados por SPME-GC-MS das cachaças.....	154
ARTIGO 2		
Figura 1	Evolução da composição fenólica total durante o período de armazenamento das cachaças.....	174

Figura 2	Evolução da intensidade da cor em função do tempo de armazenamento das cachaças nos diferentes tonéis em estudo.....	176
Figura 3	Cromatograma da solução-padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Concentração de cada padrão: $1,161 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	177
Figura 4	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores dos compostos fenólicos das cachaças armazenadas em tonéis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba.....	188
ARTIGO 3		
Figura 1	Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$	207

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Avaliações físico-químicas das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”.....	132
Tabela 2	Avaliação da graduação alcoólica e acidez volátil em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.....	138
Tabela 3	Avaliação de aldeídos e ésteres em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.....	142
Tabela 4	Avaliação de furfural e álcoois superiores em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.....	144
Tabela 5	Avaliação de butan-1-ol e propan-1-ol em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.....	146
Tabela 6	Avaliação de 2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.....	147
Tabela 7	Avaliação de extrato seco em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.....	148
Tabela 8	Identificação dos compostos orgânicos voláteis das frações da destilação e das cachaças armazenadas nos diferentes tonéis de madeira.....	151
Tabela 1	Avaliação do grau alcoólico e extrato seco total da fração “coração” e das bebidas armazenadas nos diferentes tonéis.....	173

Tabela 2	Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de amburana.....	180
Tabela 3	Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de bálsamo.....	181
Tabela 4	Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho.....	182
Tabela 5	Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de jatobá.....	183
Tabela 6	Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de peroba.....	184
ARTIGO 3		
Tabela 1	Avaliação da graduação alcoólica e cobre no processo de destilação e no armazenamento da cachaça nos tonéis em estudo.....	205
Tabela 2	Concentração de carbamato de etila do caldo de cana, na fermentação e das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”.....	209
Tabela 3	Concentração de carbamato de etila durante o processo de armazenamento da cachaça em tonéis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá, peroba e em vidro.....	213

LISTA DE QUADROS

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1	Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) exigida pela legislação brasileira.....	28
Quadro 2	Teores do carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida.....	59

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 História da origem das bebidas alcóolicas e da cachaça.....	24
2.2 Cachaça: Legislação e mercado.....	26
2.3 Etapas do processo produtivo.....	30
2.3.1 Matéria-prima e obtenção do caldo.....	32
2.3.2 Fermentação.....	35
2.3.3 Destilação.....	39
2.3.4 Envelhecimento.....	42
2.3.5 Engarrafamento.....	43
2.4 Compostos secundários e contaminantes presentes na cachaça.....	43
2.5 Carbamato de etila.....	55
2.5.1 Aspectos gerais e aplicações.....	56
2.5.2 Legislação do CE em bebidas.....	58
2.5.3 Mecanismos de formação em alimentos e bebidas.....	59
2.5.4 Técnicas aplicadas para a detecção, quantificação e ocorrência de CE em bebidas alcoólicas e alimentos.....	70
2.5.5 Propostas para eliminação de carbamato de etila em bebidas e alimentos.....	78
2.6 O envelhecimento da cachaça.....	80
2.6.1 Legislação para cachaças envelhecidas.....	81
2.6.2 Tratamentos, madeiras e recipientes de armazenamento.....	81
2.6.3 Condições ambientais para o envelhecimento.....	89
2.6.4 Reações, incorporação de compostos da madeira e pesquisas em cachaças envelhecidas.....	89
2.7 Análise multivariada.....	96

3 REFERÊNCIAS.....	99
SEGUNDA PARTE	
ARTIGO – 1: Perfil físico-químico e compostos voláteis por SPME-GC-MS de cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho (<i>Quercus</i> sp.), amburana (<i>Amburana cearensis</i>), jatobá (<i>Hymenaeae carbouril</i>), bálsamo (<i>Myroxylon peruiferum</i>) e peroba (<i>Paratecoma peroba</i>).....	122
Resumo.....	123
1 Introdução.....	125
2 Material e métodos.....	128
3 Resultados e discussão.....	131
4 Conclusão.....	155
5 Agradecimentos.....	155
6 Referências.....	156
ARTIGO – 2: Cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho (<i>Quercus</i> sp.), amburana (<i>Amburana cearensis</i>), jatobá (<i>Hymenaeae carbouril</i>), bálsamo (<i>Myroxylon peruiferum</i>) e peroba (<i>Paratecoma peroba</i>): composição fenólica, intensidade de cor, extrato seco e graduação alcoólica.....	162
Resumo.....	163
1 Introdução.....	165
2 Material e métodos.....	168
3 Resultados e discussão.....	172
4 Conclusão.....	189
5 Agradecimentos.....	189
6 Referências.....	190

ARTIGO – 3: Determinação de carbamato de etila em cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho (<i>Quercus</i> sp.), amburana (<i>Amburana cearensis</i>), jatobá (<i>Hymenaeae carbouril</i>), bálsamo (<i>Myroxylon peruiferum</i>), peroba (<i>Paratecoma peroba</i>) e recipiente de vidro.....	195
Resumo.....	196
1 Introdução.....	198
2 Material e métodos.....	201
3 Resultados e discussão.....	204
4 Conclusão.....	215
5 Agradecimentos.....	216
6 Referências.....	216

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

No período colonial, iniciou-se a produção de cachaça pelos negros acidentalmente. 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 (TRINDADE, 2006; CARDOSO, 2013).

Atualmente, várias marcas circulam no comércio brasileiro e em vários países. A cachaça é produzida praticamente em todos os estados brasileiros; entretanto, 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 1,4 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 (CARDOSO, 2013; SEBRAE, 2014).

Apesar do apoio que tem do governo e das associações de cachaça, a cadeia produtiva ainda não é homogênea. 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, metais pesados e outros, bem como a resolução de problemas ambientais, podem ser apontados como pontos integrantes de uma pauta mínima para o crescimento do setor.

O processo produtivo de aguardentes e cachaças é realizado industrialmente ou artesanalmente. O termo artesanal foi instituído pela Legislação brasileira, na qual ela foi renomeada como cachaça de alambique. A renomeação ocorreu por causa da escala de produção de pequenos produtores não ser tão pequena como aparentava. O processo de produção da cachaça de alambique pode ser dividido em quatro etapas fundamentais: obtenção do mosto, fermentação, destilação e envelhecimento (AQUARONE et al., 2005; CARDOSO, 2013).

A cachaça apresenta uma grande complexidade em sua composição. Várias reações ocorrem em toda a cadeia produtiva da cachaça, desde a fermentação até o engarrafamento. Nessas reações ocorrem a formação dos compostos secundários, contaminantes orgânicos e inorgânicos. Entre os compostos secundários, citam-se os álcoois, hidrocarbonetos e compostos carbonilados com três ou mais átomos de carbono, como aldeídos, ésteres e ácidos carboxílicos. Substâncias como cetonas, compostos fenólicos, aminas e compostos sulfurados também podem ser encontradas em pequenas proporções. Esses compostos são formados por rotas bioquímicas ou químicas durante e após a fermentação alcoólica. Observam-se ainda vários compostos voláteis que são responsáveis pelo sabor e aroma da bebida, conhecidos como majoritários. Diferente deles, existem os voláteis presentes em pequenas quantidades, na verdade traços desses compostos. Para que a bebida seja de qualidade, além de atender os parâmetros exigidos pela legislação quanto à sua composição química, deve também apresentar qualidades sensoriais capazes de satisfazer ou

mesmo ultrapassar as expectativas de seus consumidores (DATO; PIZAURO JÚNIOR; MUTTON, 2005; CARDOSO, 2013; BENTO et al., 2015).

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 210,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 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 (WEBER; SHARYPOV, 2009; MACHADO, 2010; BRASIL, 2014).

O envelhecimento é a última etapa do processo de produção, mas não é obrigatória sua realização. É uma etapa importante na fabricação de cachaça, pois possibilita ao produtor agregar valor à sua bebida. Nessa etapa 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 principais compostos extraídos da madeira pelos destilados são: óleos voláteis, compostos fenólicos, substâncias tânicas, açúcares, glicerol e ácidos orgânicos não voláteis. Entre esses, 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 (CARDOSO, 2013).

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 tonéis para o envelhecimento da cachaça, como a amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*) (AQUINO et al., 2006a; MORI; MENDES; MORI, 2013).

Para melhor avaliar a complexidade da composição química da cachaça, as análises estatísticas estão sendo utilizadas como uma ferramenta de grande utilidade. A análise multivariada está sendo a mais procurada e 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 (RENCHER, 2002; NUNES et al., 2012; ANDRADE et al., 2013).

Diante do exposto, no presente trabalho objetivou-se realizar um acompanhamento periódico dos parâmetros físico-químicos e do perfil cromatográfico, quanto aos teores de carbamato de etila, compostos voláteis e composição fenólica da cachaça no processo de produção e no armazenamento em tonéis recém-confecionados de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História da origem das bebidas alcóolicas e da cachaça

As bebidas alcóolicas se tornaram um hábito pré-histórico pelo fato de ser amplamente consumida. Há relatos arqueológicos da sua utilização em celebrações, ritos ou simples aglomerações de indivíduos. Com o processo civilizatório, o consumo de bebidas alcóolicas foi incorporado aos padrões sociais aceitáveis. No entanto, a associação do consumo de álcool com a dependência, comportamentos antissociais e violência deixou ao longo da história a percepção de que há um limite tênue entre o consumo aceitável e os seus efeitos psicotrópicos (ACSELRAD et al., 2012).

A fermentação vem 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).

O consumo do álcool na Antiguidade Clássica relata que gregos e romanos bebiam vinho à noite, depois das refeições como forma de estímulo à sociabilidade. Na época, beber antes do final do dia era considerado uma excentricidade. Os gregos misturavam vinho com água para que as bebidas se tornassem fracas para o consumo. Muitos bebiam vinho puro e eram considerados não cidadãos (ACSELRAD et al., 2012). As mulheres eram excluídas do banquete dos homens, não tomavam parte na embriaguez deles, mas, de vez em quando, podiam beber em espaços próprios. Voltadas para o trabalho doméstico, estavam próximas do celeiro onde se guardava o vinho, o que facilitava o consumo de forma discreta. Segundo o dito popular, seria

melhor uma mulher beber demais que ser adúltera ou criminosa. Entretanto, em Roma o consumo do vinho era proibido às mulheres pelo medo à sexualidade desabrida. Os escravos não eram privados do vinho, mas eram vigiados porque não sabiam se controlar. Os povos bárbaros não se beneficiavam da educação que tinham os homens livres, sendo o uso do álcool entre os primeiros geralmente associado à embriaguez violenta. Entre os homens livres, o consumo do álcool não era associado à violência. Tudo indica que na Antiguidade Clássica preservaram-se espaços de consumo, construíram-se limites aos excessos tidos como excepcionais, modestos, ao que parece numa recusa à autodestruição (ACSELRAD et al., 2012).

No Brasil, o consumo de bebidas alcoólicas antecede a chegada dos portugueses. Feita a partir da mandioca, do aipim, do milho, do caju, do abacaxi, da jabuticaba, entre tantas outras raízes e frutas, ora alimentava cristãos, ora conduzia ao estado de embriaguez. As jovens índias preparavam a bebida. Os homens não participavam do processo de produção. O cauim é uma bebida fermentada, o caldo extraído da mandioca era misturado à saliva, provocando sua fermentação. Esse procedimento, contrário às normas de higiene, acabou sendo aceito pela semelhança com o processo de produção do vinho quando os pés, nem sempre limpos, amassam as uvas (RAMINELLI, 2005). Com a colonização portuguesa e a disponibilidade da cana de açúcar, popularizou-se a cachaça, que é uma bebida destilada com teor alcoólico consideravelmente alto.

Os portugueses implantaram as primeiras plantações de cana-de-açúcar no Brasil em meados do século XVI, impulsionando a produção de cachaça, que é uma bebida fermento-destilada proveniente da cana. 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-azedada, 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 (MAIA; CAMPELO, 2006; TRINDADE, 2006; CARDOSO, 2013).

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, 2013).

2.2 Cachaça: Legislação e mercado

A cachaça é um produto bem consumido pelos brasileiros e por várias civilizações do mundo. Por esse motivo, tem-se a importância de se buscar um produto de melhor qualidade. Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de aprimorar tanto a qualidade da matéria-prima, variedades de cana de

açúcar, quanto os cuidados durante o processo de produção da bebida e controle de compostos contaminantes (CARDOSO, 2013).

De acordo com a 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; 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, prop-2-enal (acroleína), butan-2-ol (álcool sec-butílico), butan-1-ol(álcool butílico), chumbo e arsênio (BRASIL, 2005a; 2014). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece 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

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Gradação alcoólica (aguardente)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,0	54,0
Gradação alcoólica (cachaça)	% v/v de álcool etílico a 20°C	38,0	48,0
Acidez volátil, em ácido acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	150,0
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL de álcool anidro	-	200,0
Aldeídos, em aldeído acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	30,0
Furfural	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Álcoois superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360,0
Butan-2-ol (álcool sec-butílico)	mg/100 mL de álcool anidro	-	10,0
Butan-1-ol (álcool butílico)	mg/100 mL de álcool anidro	-	3,0
Congêneres**	mg/100 mL de álcool anidro	200,0	650,0
Álcool metílico	mg/100 mL de álcool anidro	-	20,0
Acroleína	mg/100 mL de álcool anidro	-	5,0
Carbamato de etila	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	210,0
Cobre	mg L^{-1}	-	5,0
Arsênio	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	100,0
Chumbo	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	200,0
Extrato seco	g L^{-1}	-	6,0

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

Fonte: Brasil (2005a; 2014).

O mercado de bebidas alcoólicas no Brasil é representado por bebidas destiladas (como 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 aguardente de cana ocupa a primeira posição no país em relação a bebidas destiladas (em volume) com mais de 87% do mercado. Seu consumo é quase 5 vezes maior do que o do whisky (348 milhões de litros) e da vodca (270 milhões de litros). No exterior, ela é destaque como o terceiro destilado mais consumido, e a caipirinha, como um dos oito drinks mais vendidos (SEBRAE, 2008; 2014).

A cachaça, largamente consumida no Brasil, é uma bebida produzida em todas as regiões do país. Estima-se uma produção anual de 1,4 bilhão de litros de cachaça. Atualmente, são registradas 4 mil marcas e aproximadamente 40 mil produtores legalizados e não legalizados. De acordo com a legislação, 90% são de pequeno produtor. No mercado nacional, a cachaça é encontrada em mais de 960 mil pontos de vendas, entre bares, supermercados e restaurantes, gerando cerca de 600 mil empregos diretos, além de um faturamento anual de mais de US\$600 milhões. Estima-se um consumo médio anual de 11,5 litros por habitante. 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 (SEBRAE, 2008; 2014).

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.

2.3 Etapas do processo produtivo

Embora a legislação não estabeleça distinção entre os produtos finais das destilarias industriais e dos alambiques, existem, na prática, muitas diferenças entre cachaça de alambique e cachaça de coluna. As cachaças industriais são controladas por empresas e a cana-de-açúcar é cultivada em grandes áreas, enquanto a cachaça de alambique é produzida em pequena escala por pequenos produtores, em sua maioria utilizando mão de obra familiar.

A cachaça de coluna é destilada em colunas de aço inox, com produção em larga escala, e a de alambique, 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 de coluna é o aroma e o flavour característicos (AQUARONE et al., 2005; CARDOSO, 2013).

A cachaça de alambique é produzida com cuidados e, na maioria das vezes, com muitos detalhes. Fazer cachaça é, ao mesmo tempo, ciência, arte,

paixão e sabedoria. Apesar de feita exclusivamente do caldo de cana, sem a adição de produtos químicos, cada cachaça carrega características de seu produtor (o alambiqueiro). Cada um tem seu segredo, que normalmente é transmitido de pai para filho. Os detalhes especiais estão espalhados por todo o processo, desde a escolha da variedade de cana, passando pela época certa da colheita, o tempo de moagem, os ingredientes, tempo de fermentação, forma de destilação, tonéis para o envelhecimento até o engarrafamento.

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.

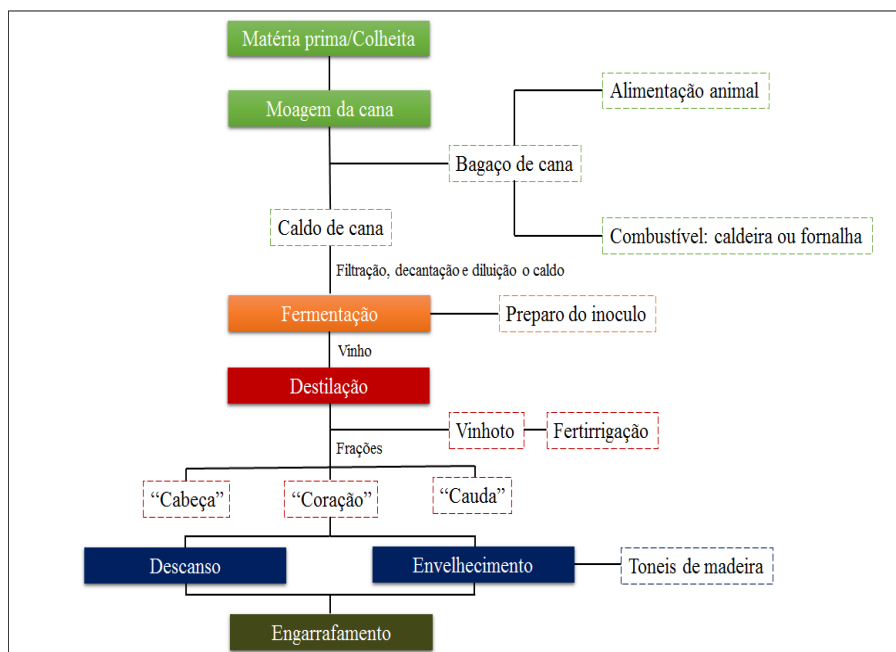


Figura 1 Fluxograma do processo de produção da cachaça de alambique
Fonte: Cardoso (2013).

2.3.1 Matéria-prima e obtenção do caldo

A primeira etapa do processo consiste na colheita da cana. A matéria-prima 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. 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. O Brasil, considerado o maior produtor de cana de açúcar do mundo, tem uma área plantada de aproximadamente 8,95 milhões de hectares. Para a produção da cachaça, estima-se que no país sejam produzidas mais de 15 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano, sendo o estado de Minas Gerais o terceiro produtor nacional de cana (788,88 mil hectares) (GALINARO, 2006; ANDRADE, 2013; CONAB, 2015). 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 77 toneladas por hectare. O rendimento industrial médio é que a cada tonelada de cana são produzidos 120 litros de cachaça (AQUARONE et al., 2005; CONAB, 2015).

A cana ao ser colhida deve estar perfeitamente madura, sadia, recém-cortada, livre de matéria estranha e não ser queimada, para ser considerada como uma boa matéria-prima para a produção da cachaça (ANDRADE, 2013). O colmo é parte essencial da cana na produção de álcool e cachaça. Eles são constituídos de duas partes: a sólida e a líquida. A sólida é um complexo formado por celulose, hemicelulose, lignina e pentosanas, sendo referida habitualmente de fibra. Já a líquida é geralmente referida como sendo o caldo e é uma solução aquosa que contém uma variedade de substâncias orgânicas, sendo

a sacarose a mais representativa, com quase 90% do total (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005; ANDRADE, 2013).

Na produção de cachaça, vários fatores podem influenciar no rendimento da cadeia produtiva, tais como o conteúdo de sólidos solúveis, a concentração de açúcares, a variedade de cana, o planejamento agrícola, a produtividade, o controle de pragas e doenças, o estado de maturação, a colheita, o tipo de carregamento, assim como transporte, são fatores que têm influência direta na produtividade e na qualidade final do produto. A cana para produção de aguardente não deve ser queimada e deve ser processada no mesmo dia. Esse é um critério a ter em conta, pois a cana quando é queimada sofre uma alteração não só na fisiologia do colmo, como também existe uma perda de açúcares que pode atingir 14,5%, devido à exsudação após a queima e a consequente inversão gradativa dos açúcares pelas enzimas hidrolíticas, o que favorece a contaminação microbiana pela multiplicação dos micro-organismos no líquido extraído (YOKOYA, 1995; CARDOSO, 2013).

No Brasil existem duas épocas de colheita, a “primeira” começa nas regiões do nordeste brasileiro, onde a safra se inicia nos meses de agosto/setembro e dura até março/abril. Já nos estados centro-sul brasileiros, a safra inicia-se em maio e termina nos meses de novembro/dezembro. O período anual da produção de aguardente normalmente coincide com o período de maior maturação da cana (SILVA; CESAR; SILVA; 2003; ANDRADE, 2013).

A época de colheita é importante, tendo em conta alguns fatores, pois eles irão inferir no produto final. Entre eles, citam-se: as folhas apresentam um verde-amarelado, e que por vezes estão até totalmente secas e que até se desprendem do colmo (significa que a cana está madura); presença de impurezas pode condicionar o processo fermentativo e, por sua vez, o rendimento em aguardente e algumas dessas são ponteiros de cana, restos de folhas, material vegetal de outros tipos, matérias minerais como terra e pedras; o estado sanitário

do colmo é também importante, porque excesso de podridão-vermelha pode reduzir substancialmente o teor de açúcar e introduzir outros agentes fermentativos, e por consequência, afetar a fermentação; os colmos devem ser moídos com um prazo não superior a 48 horas depois do corte (ANDRADE, 2013).

Novaes (1997) e Andrade (2013) 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.

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 (TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007; ANDRADE, 2013).

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.

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 levemente ácido (4,8-6,0), o que favorece o desenvolvimento de micro-organismos (SCHWAN et al., 2013).

Posterior 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 (CARDOSO, 2013).

2.3.2 Fermentação

A cachaça é produzida através da fermentação do caldo de cana, diferenciando-se de outras aguardentes de cana, como o rum, que é produzido pela fermentação do melão, subproduto da produção de açúcar.

O uso de leveduras selecionadas na produção de cachaça acelera o início do processo fermentativo, diminui o risco de contaminação por outros microrganismos, reduz a concentração de açúcares residuais, aumenta a produtividade do processo e melhora a padronização da fermentação, contribuindo para a qualidade da cachaça, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois superiores (CAMPOS et al., 2010; SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas sobre as linhagens para melhorias do processo fermentativo na produção de cachaça. Vicente, Fietto e Castro (2006) isolaram e caracterizaram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em dornas de fermentação e o seu potencial para fermentar, flocular e produzir compostos aromáticos; SOUZA et al. (2012) utilizaram técnicas genéticas no melhoramento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, visando a sua resistência aos compostos 5,5', 5''-trifluoro-D,L-leucina (TFL) e cerulenina para produção de cachaça com alta qualidade sensorial; Vidal et al. (2013) utilizaram fertilização nitrogenada com sulfato de amônio na fermentação do caldo de cana de açúcar e realizaram a análise do perfil aromático no processo de produção de cachaça industrial; Carvalho et al. (2015) estudaram a influência de uma cultura mista de *S. cerevisiae* e *L. lactis* na qualidade de cachaça e adicionalmente avaliaram a viabilidade do uso do suco de cana-de-açúcar para obter biomassa de leveduras e bactérias.

A composição química do mosto é outro aspecto importante na produção de cachaça. Para Ribeiro, Lopes e 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. As disponibilidades 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 (STELLA, 2010; SCHWAN et al., 2013). 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; MACHADO, 2010).

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).

2.3.3 Destilação

O processo de destilação consiste na etapa final da produção de cachaça. O processo de destilação é o responsável por separar as substâncias voláteis (água, álcool etílico, aldeídos, álcoois superiores, ácido acético, gás carbônico, etc.) das não voláteis (sólidos em suspensão, sais minerais ou oriundas da decomposição de células de leveduras ou bactérias, etc.). 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. Através do aquecimento do vinho no alambique, formam-se vapores ricos em etanol e demais substâncias voláteis, as quais são condensadas pelo resfriamento, retornando à forma líquida. De um vinho com 7 a 8° GL, chega-se a um destilado com 38 a 54° GL de etanol. O produto resultante, de composição diferente daquela do vinho (mistura hidroalcoólica), é a aguardente ou cachaça, cuja graduação alcoólica e composição dependem do tipo de aparelho utilizado na destilação e da extração das frações destiladas. A parte que permanece na panela do alambique, chamada de vinhaça, que recebe diversas denominações regionais, tais como vinhoto, garapão, restilo, entre outras, é o resíduo da destilação do vinho. Sua porcentagem alcoólica deve ser baixa, praticamente nula, acumulando-se todas as substâncias fixas do vinho, juntamente com parte das voláteis (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005; BRUNO et al., 2012; CARDOSO, 2013).

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, 2013).

Na destilação, empregam-se 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, 2013). 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 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; BRUNO et al., 2012).

A fração “cabeça” é esbranquiçada ou esverdeada, já a fração “cauda” é turva e a fração “coração” (cachaça propriamente dita) é incolor e também é a única que possui valor comercial. O melhor ponto para se fazer os cortes entre as frações é equacionar o perfil qualitativo e quantitativo dos álcoois, ésteres, ácidos graxos e aldeídos, com especial atenção para o conteúdo de metanol (tóxico) e butan-2-ol (responsável por sabores desagradáveis). Entretanto, o corte ainda é feito de forma totalmente empírica, baseado na experiência do mestre alambiqueiro, e sobre as concentrações de álcoois, avaliada por medidas de densidade. O corte entre as frações “cabeça” e “coração” é feito tipicamente entre 70 e 80°GL em etanol, enquanto que o corte entre as frações “coração” e “cauda” normalmente é feito entre 35 e 50°GL de etanol (SILVA; MACEDO; MALCATA, 2000; CARDOSO, 2013).

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, 2013).

2.3.4 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-distilada apresenta características sensoriais um pouco agressivas e forte sabor alcoólico, características que podem ser atenuadas pelo envelhecimento (BOZA; OETTERER, 1999; CARDOSO, 2013).

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. 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. Uma maior explicação sobre o processo de envelhecimento será abordada no decorrer desse estudo (AQUINO et al., 2006a).

2.3.5 Engarraamento

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

Várias reações ocorrem em todo o processo produtivo da cachaça, desde a fermentação até o engarraamento. Nessas reações, ocorrem a formação dos compostos secundários. Eles são constituídos de álcoois, hidrocarbonetos e compostos carbonilados com três ou mais átomos de carbono. Substâncias como cetonas, compostos fenólicos, aminas e compostos sulfurados também podem ser encontradas em pequenas proporções. Esses compostos são formados por rotas bioquímicas ou químicas durante e após a fermentação alcoólica. (DATO; JÚNIOR; MUTTON, 2005; CARDOSO, 2013).

Os compostos secundários devem ser formados em quantidades aceitáveis, para obter uma bebida com qualidade, e podem ocorrer também uma formação excessiva desses compostos. Essa formação excessiva pode estar relacionada a fatores edafoclimáticos, tais como solo, clima e altitude ou diferenças na metodologia empregada na elaboração da bebida como matéria-prima, micro-organismos utilizados, condições da fermentação (temperatura, pH, aeração, entre outras), maneira de destilar e no envelhecimento, como o tempo, tipo de madeira e volume do recipiente. 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, nesta etapa, como hidrólise, esterificação, acetilação, reações com o cobre e produção de furfural, entre outros (LEAUTÉ, 1990; SIEBALD; CANUTO; SILVA, 2009; CARDOSO, 2013).

Os aldeídos são formados durante a fermentação. 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 com o sistema nervoso central (PEREIRA et al., 2003; CARDOSO, 2013).

Alguns aldeídos são contaminantes orgânicos, tais como o furfural, hidroximetilfurfural e prop-2-enal. O furfural e o hidroximetilfurfural, aldeídos cuja presença são indesejáveis na bebida, resultam da decomposição química de pentoses e hexoses, respectivamente. São formados, principalmente, pela pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A legislação define teores máximos em conjunto de 5 mg por 100 mL de álcool anidro na bebida para esses compostos. A contaminação pode ser evitada quando o vinho a ser destilado estiver limpo e livre de matéria orgânica em suspensão. Um outro fator que ocasiona a contaminação por esses compostos é a queima do palhiço da cana-de-açúcar no ato da colheita, que, nos dias atuais, é proibida pela Legislação vigente. 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; CARDOSO, 2013).

Masson et al. (2007) quantificaram o furfural em amostras de cachaças produzidas com cana queimada e não queimada. Eles verificaram que a queima do palhço 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 prop-2-enal, também conhecido como acroleína, é um composto extremamente tóxico por todas as vias de exposição e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos. No entanto, o mecanismo de formação ainda não é bem conhecido. Além disso, sabe-se que o composto causa reações cruzadas no DNA, inibindo a atividade de algumas enzimas (incluindo o citocromo P450 e a glutathione-S-transferase) *in vitro*, reagindo com os grupos sulfidrilos dos locais ativos. A acroleína apresenta-se como um líquido amarelo com sabor e odor amargo picante. Tem como propriedades físico-químicas, temperatura de ebulição 52,5°C; temperatura de fusão -88°C; massa molar 56,06 g/mol; pouco solúvel em água. A World Health Organization (WHO), particularmente pela International Agency for Research on Cancer (IARC), vem se mostrando preocupada com os níveis desse composto e outros congêneres em bebidas,

considerando importante a sua identificação e quantificação pelo fato de serem carcinogênicos, mutagênicos ou tóxicos. Em aguardentes e cachaças, seus níveis foram fixados em 5 mg/100 mL de álcool anidro. (THE MERCK INDEX, 2001; MASSON, 2009; ZACARONI et al., 2011a).

Segundo Azevêdo et al. (2007) e Cardoso (2013), 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.

Zacaroni et al. (2011a) avaliaram a presença de contaminantes orgânicos em cachaça, entre eles a acroleína. Sua presença foi detectada em apenas uma amostra das dozes analisadas. A concentração desse contaminante variou de não detectado a 7,45 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Já Masson et al. (2012) encontraram valores que variaram de não detectado a 21,97 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro em 71 amostras analisadas, das quais 9,85% das amostras apresentaram concentrações acima do limite estabelecido. Santiago et al. (2012) avaliaram acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar armazenadas em diferentes madeiras. Pelos resultados, foi possível observar que os valores de concentração de acroleína variaram de não detectado até 6,57 mg/ 100 mL de álcool anidro. Das seis amostras analisadas, três apresentaram valores de acroleína e apenas uma apresentou valor acima do limite exigido pela Legislação.

Os álcoois constituem, quantitativamente, o maior grupo de substâncias voláteis nas bebidas destiladas. Álcoois superiores 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. Segundo Cardoso (2013), esses compostos são formados quando a cana é estocada, para depois ser moída. Outros fatores que contribuem para o

aumento da concentração de álcoois superiores em cachaça é a temperatura elevada durante o processo fermentativo e o pH muito ácido. Esses álcoois, assim como os ésteres, em quantidades normais, são responsáveis pelo aroma e sabor característico da bebida. Os principais álcoois superiores encontrados em aguardentes são os álcoois isoamílico (2-metilbutan-1-ol), amílico (pentan-1-ol), isobutílico (2-metilpropan-1-ol) e propílico (propan-1-ol) (VILELA et al., 2007). Alguns fatores influenciam a formação de álcoois superiores pelas leveduras, como a espécie e a linhagem, temperatura e composição do meio. Entretanto, alguns fatores podem reduzir sua formação excessiva, como não armazenar a cana por longo período após o corte, evitando a degradação de aminoácidos, e a posterior formação dos álcoois superiores; não utilizar cana bisada e lavar a cana após o corte, impedindo sua contaminação por bactérias, que podem interferir no desempenho das leveduras durante a fermentação (CARDOSO, 2013).

A Instrução Normativa de nº 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, butan-1-ol e butan-2-ol, mas que devem ser quantificadas separadamente e ainda estabeleceu limites permitidos para elas de 3 e 10 mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente. (BRASIL, 2005a).

De acordo com relatos, o butan-1-ol e butan-2-ol são formados na fermentação em decorrência da contaminação pela bactéria "*Clostridium acetobutylicum*" e que sua toxicidade é relativamente alta, quando comparada ao etanol. Essa contaminação pode ser reduzida, não deixando a cana-de-açúcar próxima a estábulos e locais de ordenha (MAIA; CAMPELO, 2006; CARDOSO, 2013).

Penteado e Masini (2009) analisaram 33 amostras de cachaça de alambique e industrial produzidas em quatro Estados do Brasil e observaram uma grande variação na concentração dos álcoois superiores dessas bebidas e com conseqüente heterogeneidade das características sensoriais. Parazzi et al.

(2008) avaliaram os efeitos da madeira sobre a composição química e na concentração de butan-1-ol da aguardente envelhecida em barris de carvalho, encontrando para o butan-1-ol a concentração média de 1,05 mg/100 mL de álcool anidro. Santiago et al. (2014a) compararam o perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana Cearensis*). Os autores observaram que todas as amostras apresentaram quantidades desejáveis de álcoois superiores, reportando que os teores se diferiram quanto à madeira utilizada.

Em aguardentes e cachaças, o metanol é um álcool indesejável, devido à sua toxicidade. Ele é formado pela degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar. A molécula de pectina é um composto formado pela associação de centenas de moléculas de ésteres ácidos galacturônicos, que possuem fragmentos de metoxila, as quais são liberadas durante o processo de fermentação. Sua ingestão, mesmo em quantidades reduzidas, por longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira ou mesmo a morte (BADOLATO; DURAN, 2000; CARDOSO, 2013). Para Cardoso (2013), a oxidação do metanol origina o ácido fórmico, o dióxido de carbono e a água. Tanto o ácido fórmico quanto o dióxido de carbono apresentam características ácidas e, assim, promovem a acidose no sangue e, como consequência, distúrbios no sistema respiratório, levando até o coma. 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.

A legislação brasileira definiu valores máximos de 20 mg/100 mL de álcool anidro para concentração de metanol em cachaça. Antes, o metanol apresentava uma grande preocupação por parte dos produtores e da fiscalização, por apresentar valores expressivos nas bebidas. Pesquisas recentes mostram que sua concentração não vêm apresentando valores acima do limite permitido.

Zacaroni et al. (2011a) caracterizaram e quantificaram diferentes contaminantes em aguardentes de cana e não foi detectada a presença de metanol. Da mesma forma, Santiago et al. (2014a) não obtiveram valores de metanol acima do limite permitido nas cachaças utilizadas em sua pesquisa.

O bouquet desejado em cachaça é ocasionado principalmente pelos ésteres, associados com os álcoois superiores, aldeídos e ácidos. A quantidade e a proporção dos diferentes ésteres influenciam a percepção de sabores e aromas, sendo essas características dependentes de fatores, como o tipo e quantidade de fermento, temperatura, aeração e agitação na fermentação e qualidade do caldo. 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; CARDOSO, 2013).

A formação dos ésteres ocorre no processo fermentativo, no metabolismo secundário intracelular das leveduras. O acetato de etila é o principal éster formado nessa etapa, normalmente ele representa aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça que, em baixas concentrações, proporciona um aroma agradável de frutas; porém, em quantidades elevadas, confere à bebida um sabor enjoativo e indesejado. Na destilação e envelhecimento, também ocorre sua produção, por meio das reações de esterificação entre os álcoois e os ácidos carboxílicos (PEREIRA et al., 2003; MIRANDA; HORII, J.; ALCARDE, 2006; PARAZZI et al., 2008). No processo de envelhecimento, os ésteres aromáticos são gerados pela interconversão dos compostos fenólicos e álcoois, como siringato de etila e vanilato de etila e os ésteres extraídos da madeira, como o homovanilato de metila e o siringato de metila (VICHI et al., 2007).

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; tendo a concentração desse composto praticamente triplicado durante o período. Santiago et al. (2014a) comparam o perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus sp*) e amburana (*Amburana Cearensis*) e detectaram um aumento gradativo em relação a concentração de ésteres ao longo do tempo de envelhecimento.

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, 2013). Santiago et al. (2014a), comparando o perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus sp*) e amburana (*Amburana Cearensis*) observaram que os valores de acidez volátil se diferiram de madeira para madeira, justificado pelos diferentes valores de compostos fenólicos encontrados no decorrer do processo de envelhecimento, sendo que compostos fenólicos apresentam caráter ácido.

A fração inorgânica da cachaça é constituída, principalmente, de íons metálicos que, possivelmente, são provenientes do processo de produção da bebida ou mesmo do solo, como o alumínio, cobre, chumbo, arsênio, cobalto, potássio, sódio, zinco, manganês, entre outros. A quantificação de metais em cachaças 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, 2013).

A contaminação da cachaça por arsênio e chumbo ocorre durante o processo de produção pelo contato com materiais das embalagens utilizadas, revestimentos cerâmicos, tintas e soldas de ligas metálicas nos equipamentos. 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.

Em doses orais de 3 a 30 mg/Kg de massa corpórea, o arsênio é considerado carcinogênico. Os sintomas de contaminação por arsênio são: irritação estomacal e intestinal, dor, náusea, vômito, diarreia, diminuição na produção de células brancas e vermelhas, fadiga, alteração de batimentos cardíacos e funções nervosas. Os efeitos carcinogênicos da intoxicação por arsênio estão associados à exposição crônica por vários anos. Com base em evidências toxicológicas, em 1993, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu, para a água, a concentração máxima de arsênio de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, valor estipulado também pela Legislação brasileira (BRASIL, 2001; CARDOSO, 2013).

A contaminação por chumbo se dá por inalação ou por ingestão, por complexos orgânicos do metal por via cutânea. Uma vez absorvido, o chumbo é distribuído para o sangue, no qual tem meia-vida de 37 dias; para os tecidos moles, a meia-vida é de 40 dias, e nos ossos, a meia-vida é de 27 anos, constituindo esse o maior depósito corporal do metal, armazenando de 90% a 95% do chumbo presente no corpo (MOREIRA; MOREIRA, 2004). Sua intoxicação afeta o sistema digestivo, o sistema nervoso central e o sistema hepático, pois ele acumula-se no fígado e nos rins (SIEBALD; CANUTO; SILVA, 2009).

A Legislação brasileira estabelece que o metal cobre não deve estar em concentração superior a 5 mg L^{-1} , em aguardentes e cachaças (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. Segundo Faria et al. (2003), a aguardente destilada em alambiques de inox possui um aroma desagradável, em razão da presença de compostos sulfurados. 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 cachaças 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. (2009b), 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. Duarte et al. (2014) avaliaram o uso de argilas naturais para remoção de cobre em cachaça. Os autores concluíram que as argilas apresentaram valores significativos de remoção de cobre e diferentes argilas apresentaram diferentes resultados na remoção. Zacaroni et al. (2015a) compararam o uso de argila natural e carvão ativado comercial para remoção de cobre. Pelos resultados, observaram eficiências de remoção do cobre por carvão ativado e argila de

98,3% e 68,7%, respectivamente. Concluíram que a argila é um adsorvente adequado para a remoção de cobre, uma vez que esse material é abundante, barato e tem propriedades físicas e químicas adequadas.

A cachaça apresenta uma grande complexidade em sua composição. Observam-se vários compostos voláteis que são responsáveis pelo sabor e aroma da bebida, sendo esses os compostos voláteis considerados majoritários. Diferente desses, existem os voláteis presentes em pequenas quantidades (traços).

Para que a bebida seja de qualidade, além de atender os parâmetros exigidos pela legislação quanto à sua composição química, deve também apresentar qualidades sensoriais capazes de satisfazer ou mesmo ultrapassar as expectativas de seus consumidores. A aguardente de cana e a cachaça são muito apreciadas por possuírem aroma e sabor característicos, muitas vezes modificados pela sua estocagem em recipientes de madeira, através de reações que transferem compostos existentes em sua estrutura à bebida, melhorando sua qualidade sensorial. Trabalhos vêm sendo realizados com intuito de caracterizar e identificar compostos voláteis (traços) que apresentam grande impacto no aroma da cachaça. Trabalhos já realizados sobre a composição da cachaça referem-se apenas aos componentes voláteis majoritários, determinados por injeção direta da amostra e descritos na Legislação, sem procurar estabelecer o papel que esses outros compostos exercem no aroma da bebida (MIRANDA et al., 2006; MORÉS, 2009; PINHEIRO, 2010; BENTO, et al., 2015).

O monitoramento desses compostos na bebida pode indicar diferentes práticas durante o processo de produção. A formação excessiva desses compostos voláteis pode estar relacionada a diversos fatores na cadeia produtiva. No entanto, devido à baixa concentração encontrada, sua detecção se torna difícil, exigindo técnicas cada vez mais sensíveis. Uma técnica eficiente para detecção desses compostos é a cromatografia em fase gasosa acoplada à

espectrometria de massas (GC-MS) junto com a microextração em fase sólida (SPME) (NONATO et al., 2001; CARDEAL; MARRIOTT, 2009; MORÉS, 2009).

Na área de bebidas, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos por GC-FID ou GC-MS para identificação desses compostos traços. NONATO et al. (2001) extraíram compostos voláteis do headspace da cachaça por SPME com fibra PA, analisaram por GC-MS e foram capazes de detectar um grande número de compostos. Dos 38 compostos identificados, 11 eram ésteres. NOBREGA (2003) identificou compostos voláteis relevantes ao aroma da cachaça. Usou um método de extração de voláteis nunca antes testado para cachaça, a saber: a concentração dinâmica dos compostos voláteis presentes no "headspace" da cachaça em armadilha, contendo o adsorvente Tenax-TA e a identificação e quantificação, foram realizadas por meio GC-MS. Pelos resultados, o método analítico empregado permitiu a identificação de importantes compostos voláteis na aguardente de cana, particularmente ésteres. No entanto, o método se mostrou pouco eficiente para reter compostos voláteis de baixo peso molecular, particularmente aqueles com número de carbonos menor do que 5. Castro et al. (2004) analisaram os compostos do headspace de vinho, por SPME e GC-FID, determinaram 36 compostos, dos quais 13 eram ésteres. Demyttenaere et al. (2003) determinou 21 compostos voláteis em uísque, utilizando a mesma técnica. Morés (2009) pré-concentrou compostos voláteis por SPME e identificou por GC-FID. Por meio das técnicas, foi possível identificar a grande maioria dos analitos que compõem as amostras das cachaças analisadas. Cerca de 70 compostos foram encontrados com maior frequência e maiores concentrações; desses 15 são ésteres, que são os maiores responsáveis pelo aroma. O número de trabalhos vem aumentando, pois existe um grande interesse na identificação e também na quantificação desses compostos, para que seja possível uma padronização e, assim, evitar adulterações, além de que o

conhecimento dos voláteis presentes em bebidas e alimentos pode auxiliar na identificação daqueles que favorecem ou prejudicam a sua qualidade.

2.5 Carbamato de etila

Entre os componentes secundários, o carbamato de etila (CE) vem sendo largamente estudado. Esse é um composto carcinogênico encontrado naturalmente em baixas concentrações em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002). Porém, devido à sua natureza tóxica e à sua presença constante em bebidas alcoólicas, tornou-se importante a sua caracterização e quantificação; por isso, faz-se necessário o conhecimento dos níveis de sua ocorrência, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, sua presença em concentrações elevadas constitui também uma barreira para exportação (LIMA-NETO, 1994; CARDOSO, 2013).

O CE, também conhecido como uretana ou etiluretana (CAS nº 51-79-6), é um éster etílico do ácido carbâmico, massa molar de 89,09 g mol⁻¹, cuja estrutura química está representada na Figura 3. Apresenta alta solubilidade em água, etanol, éter, cetonas, ésteres e solventes clorados, temperatura de ebulição e fusão que variam de 182 a 184°C e de 48 a 50°C, respectivamente. Encontra-se na forma de cristal incolor, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo. Essas propriedades conferem ao CE alta polaridade e baixa volatilidade, além de se decompor à baixa temperatura (THE MERCK INDEX, 2001).

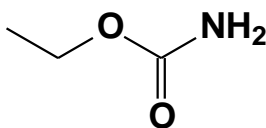


Figura 3 Fórmula estrutural do carbamato de etila

2.5.1 Aspectos gerais e aplicações

Cálculos quânticos para o CE demonstraram a existência de dois isômeros conformacionais na fase gasosa (Figura 4). Foi estimado que o confôrmero I é ligeiramente mais estável que o II em cerca de +0,33kJ/mol (GOUBET et al., 2009).

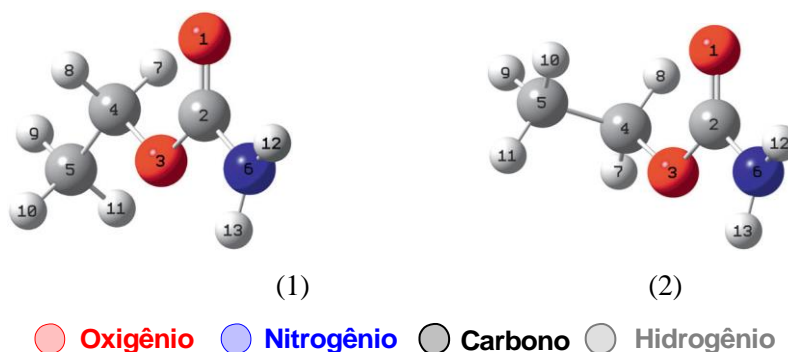


Figura 4 Estruturas conformacionais para o CE

Fonte: Machado (2010)

Na década de 40, o CE era usado como hipnótico em seres humanos e como anestésico em animais. Em 1943, descobriu que ele era carcinogênico em animais. Três anos depois, foi descrita a sua atividade contra leucemia em humanos. Em 1948, já se conhecia sua mutagenicidade em *Drosophila melanogaster* (ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991; BELAND et al. 2005).

Já na década de 70, foi utilizado como agente antineoplásico para o tratamento de varicoses, leucemia crônica e mieloma múltiplo. Na área medicinal atual, a utilização de CE vem sendo limitada, em razão dos efeitos pós-operatórios adversos observados em animais e suspeita de risco à saúde em

seres humanos. Na química, o CE tem sido empregado como intermediário em síntese orgânica, na produção de amino-resinas, como co-solvente na preparação de pesticidas, cosméticos e como substância intermediária na preparação de um produto utilizado na lavagem e desgaste de tecidos (BELAND et al., 2005; WEBER; SHARYPOV, 2009).

O CE é genotóxico e cancerígeno em várias espécies animais, incluindo ratos, ratazanas, hamsters e macacos (BELAND et al., 2005). O CE é absorvido rapidamente e quase completamente a partir do trato gastro-intestinal e da pele e o seu metabolismo envolve três vias principais: hidrólise, N-hidroxilação ou C-hidroxilação e oxidação da cadeia lateral. (CHA et al., 2000; EFSA, 2007; WEBER; SHARYPOV, 2009).

De acordo com dados epidemiológicos, o CE foi classificado inicialmente como um possível carcinógeno humano (Grupo 2B) pela International Agency for Research on Cancer (IARC) e como um provável carcinógeno humano pela United States Environmental Agency Protection (US EPA). Em 2007, a IARC, reclassificou o CE como pertencente ao Grupo 2A (provável cancerígeno para seres humanos) (ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991; BELAND et al., 2005; BAAN et al., 2007).

Nenhum problema à saúde humana foi atribuído à exposição direta ao CE. A dose limite (Benchmark Dose Lower Limit - BMDL 10) estabelecida durante o encontro da FAO/WHO Food Standards Programme (Food and Agriculture Organization World Health Organization) para a uretana é de 0,3 mg/kg de massa corporal por dia. Já o consumo médio do CE, quando presente em alimentos, deve ser aproximadamente de 15 ng/kg de massa corporal por dia. Esses valores foram baseados em alimentos fermentados, incluindo pães, produtos lácteos e molho de soja. Para bebidas alcoólicas, o consumo médio estimado é de, no máximo, 80 ng/kg de massa corporal por dia

(LACHENMEIER; NERLICH; KUBALLA, 2006; EFSA, 2007; WEBER; SHARYPOV, 2009).

2.5.2 Legislação do CE em bebidas

Em 1986, o Canadá foi o primeiro país a introduzir limites máximos para a presença do CE em bebidas alcoólicas. Os limites máximos estabelecidos em bebidas foram de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ para vinho, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para vinho fortificado, $150 \mu\text{g L}^{-1}$ para conhaque e uísque e $400 \mu\text{g L}^{-1}$ para aguardentes de fruta e licor. Esses limites estabelecidos pela legislação canadense têm sido utilizados como referência em outros países. Países como os Estados Unidos, República Tcheca, França, Alemanha e a Suíça resolveram controlar a presença de CE. Assim, cada país passou a estabelecer seus próprios regulamentos, estabelecendo limites para esse contaminante, quando da produção e importação de bebidas alcoólicas (EFSA, 2007; WEBER; SHARYPOV, 2009). O Quadro 2 apresenta os limites para CE estabelecidos por alguns países para cada tipo de destilado.

A comparação entre os teores de CE em bebidas alcoólicas brasileiras com aqueles limites estabelecidos pelo Canadá é inevitável, em função de esse país possuir legislação sobre o assunto e ser considerado como referência. Com isso, o MAPA estipulou por meio da Instrução Normativa n. 13, de 29/06/2005, que o limite máximo permitido para este composto em aguardente e cachaça foi de 150 para $210 \mu\text{g L}^{-1}$. (BRASIL, 2005a; 2014).

QUADRO 2 Teores do carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida.

País	Vinho	*Vinho fortificado	Uísque	Saque	Brandy	Aguardente/ Cachaça
Canadá	30	100	150	200	400	-
EUA	15	60	-	-	-	-
República Tcheca	30	100	150	200	400	-
França	-	-	150	-	1000	-
Alemanha	-	-	-	-	800	-
Suíça	-	-	-	-	1000	-
Brasil	-	-	-	-	-	210

*Vinho que teve seu teor alcoólico aumentado por meio da adição de etanol.

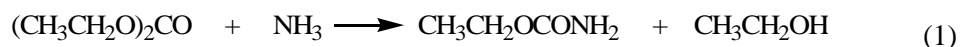
Fonte: Weber; Sharypov (2009); Brasil (2014).

2.5.3 Mecanismos de formação em alimentos e bebidas

As vias de formação e os precursores de CE em alimentos e bebidas dependem do tipo e do seu respectivo processamento. Ele é produzido em níveis baixos (ng L^{-1} ou ng kg^{-1} até mg L^{-1}) em alimentos fermentados, alimentos assados e bebidas alcoólicas por meio de vários precursores, tais como ácido cianídrico, ureia, citrulina e aminoácidos N-carbamil (incluindo fosfato de carbamila por reação com etanol). (DENNIS et al., 1986; VAHL, 1993; BELAND et al., 2005; BRUNO et al., 2007).

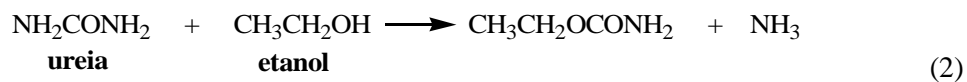
Na literatura, os primeiros relatos sobre a presença de CE iniciaram-se na década de 70, quando o pirocarbonato de dietila (DEP) ou carbonato de

dietila foi identificado, como o precursor do CE, ao reagir com amônia em pH neutro ou alcalino, conforme equação 1. Com isso, a utilização do DEP como antimicrobiano em alimentos e principalmente na fabricação de vinhos foi proibida (JAGERDEO et al., 2002).



De acordo com Labanca, Gloria e Afonso (2008), a formação de CE em destilados ocorre antes e após o processo de destilação. Em algumas bebidas alcoólicas, as vias de formação de CE não estão bem esclarecidas. Entretanto, para o vinho, a sua via de formação já está bem consolidada, e ela se tornou um parâmetro para estudos em cachaça.

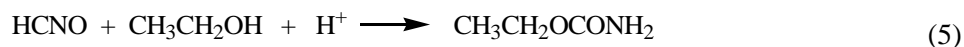
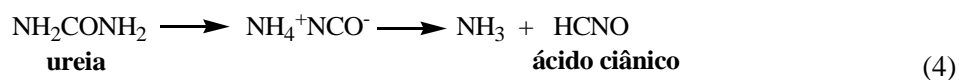
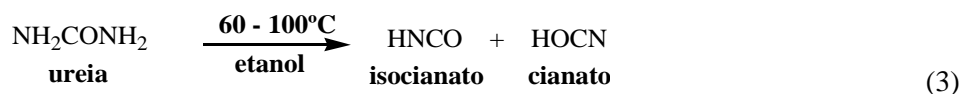
No processo fermentativo do vinho, a via metabólica proposta passa pelos aminoácidos arginina, ornitina, citrulina e fosfato de carbamila; porém, a ureia e seus derivados são os compostos principais na reação com etanol para formar o CE. A rota mais comum de produção de CE na fermentação é a reação da ureia com etanol, em meio ácido, que é acelerada exponencialmente em temperaturas elevadas, conforme equação 2 (JAGERDEO et al., 2002; SCHABER et al., 2004; WANG et al., 2007).



Aresta, Boscolo e Franco (2001) correlacionaram a concentração de ureia e aumento de temperatura, mostrando que a produção de CE a partir de ureia e etanol é moderada à temperatura ambiente. A ureia produzida no vinho vem da degradação de arginina via atividade catabólica da arginase que, por sua

vez, produz compostos intermediários que também reagem com etanol, levando à formação de CE.

Uma outra via relacionando a ureia na formação de CE ocorre pelo fato de a ureia decompor termicamente em amônia (NH₃) e ácido isociânico (HCNO), e esse reage com o etanol, levando à formação de CE. A decomposição da ureia em isocianato e cianato em solução de etanol/água, a temperaturas entre 60 e 100 °C, também pode produzir CE (Equações 3, 4 e 5). (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; SCHABER et al., 2004; BRUNO et al., 2007; LACHENMEIER et al., 2009).



Polastro et al. (2001) e Bruno et al. (2007) descrevem sobre o mecanismo principal de formação do CE, que provavelmente ocorre por meio do metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo, em que há a degradação enzimática da arginina em ureia e outros compostos nitrogenados, como citrulina, ornitina e fosfato de carbamila (FC) (FIGURA 5).

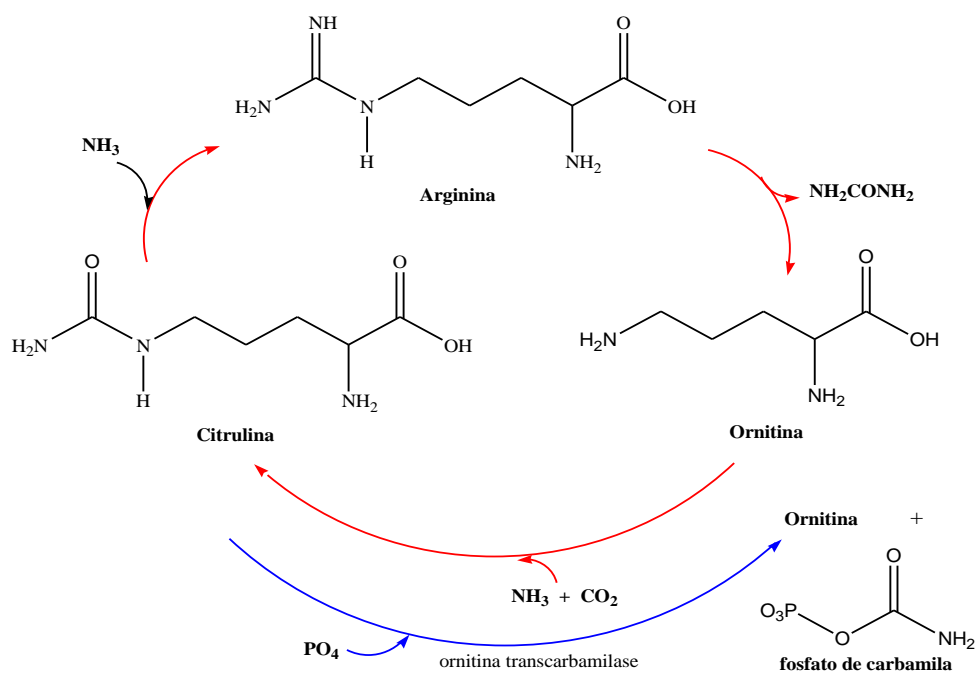
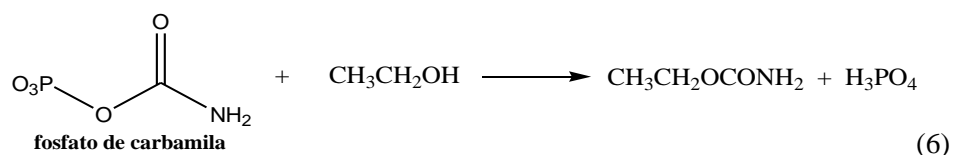


Figura 5 Esquema geral dos precursores envolvidos no ciclo da ureia

A etanólise desses precursores leva à produção de CE, na qual o FC reage com etanol para formar o CE (equação 6). Da mesma forma, a citrulina reage espontaneamente com o etanol para formar o CE (TONON; LONVAUD-FUNEL, 2002; UTHURRY et al., 2006). Essa reação de formação do contaminante pode ser favorecida pela presença de compostos nitrogenados durante a destilação, altas temperaturas sob condições ácidas e longo período de armazenamento do produto (POLASTRO et al., 2001; JAGEDO et al., 2002; IIDA et al., 2006; BRUNO et al., 2007; MACHADO, 2010).



A influência do tempo e da temperatura na concentração de CE, em vinho, foi demonstrada por Hasnip et al. (2004), que monitoraram a variação da concentração de CE, etanol, ureia e de citrulina, observando diminuição na concentração de ureia e de citrulina e aumento na concentração de CE. Uthurry et al. (2004) em trabalho similar, observaram a influência do tempo na concentração de CE em vinhos. Nesse estudo, constataram-se que os vinhos mais velhos apresentaram concentrações de CE superiores aos mais novos. Já Machado (2010) quantificou o CE em amostras de cachaça procedentes de cana adubada com ureia e nitrato de amônio. Pelos resultados encontrados, o autor concluiu que a adubação realizada não interferiu na formação de CE.

Outra fonte natural de formação de CE ocorre via íon cianeto (CN^-) (RIFFKIN, et al., 1989; ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991; EFSA, 2007; BELAND et al., 2005; UTHURRY et al., 2004; WEBER; SHARYPOV, 2009). Existem mais de 2000 espécies vegetais que produzem glicosídeos cianogênicos, presentes na cevada, arroz, maçã, manga, malte, mandioca e cana-de-açúcar. Esses glicosídeos são degradados enzimaticamente, gerando açúcar e cianoidrina [$\text{R}_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$], que se decompõe rapidamente a íons CN^- . Os íons cianeto podem ser oxidados a íons cianato (OCN^-) e esses reagem com o etanol para formar o CE. Embora até o presente momento não esteja descrito na literatura qual o glicosídeo cianogênico presente na cana-de-açúcar; é bem razoável admitir a sua existência nesse vegetal.

Segundo Galinaro e Franco (2011), para bebidas destiladas como uísque, rum e destilados de frutas com caroço, apenas uma pequena concentração de CE presente no mosto fermentado é incorporado ao destilado

final, sendo o íon cianeto relatado como o principal precursor de CE. Aresta, Boscolo e Franco (2001) mencionam que a cana-de-açúcar é classificada como uma cultura cianogênica, mas a sua fonte de cianeto ainda é desconhecida.

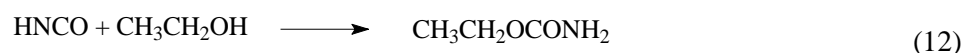
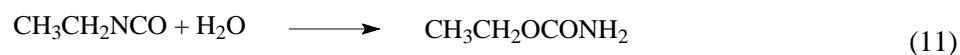
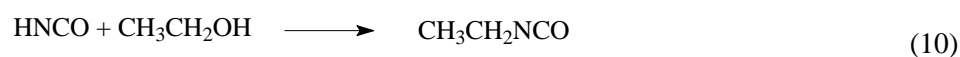
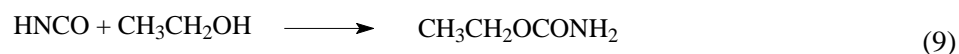
Por apresentar temperatura de ebulição elevada (182 - 184°C), acredita-se que apenas uma pequena parte de CE em solução (fase líquida) é arrastada durante um processo de destilação, em que a temperatura não ultrapassa a 92°C. O CE pode ser transportado em uma nuvem de aerossol através do condensador e estima-se que cerca de 80% do CE encontrado nos destilados seja formado durante o processo de destilação (RIFFIKIN et al., 1989; ARESTA, BOSCOLO; FRANCO, 2001; BRUNO et al., 2007; FOX; STACHOWIAK, 2007; WEBER; SHARYPOV, 2009). No último caso, o papel de precursores do CE em fase gasosa é crucial. Na destilação, HCN, HNCO e/ou HOCN presentes ou formados durante o processo são possíveis precursores da CE. Devido à sua baixa temperatura de ebulição (< 30° C), esses ácidos são vaporizados e podem produzir CE em fase gasosa e/ou por reações heterogêneas (gás/sólido), principalmente por ação catalítica do cobre, que é o material utilizado na confecção dos alambiques (CARLEY; CHINN; PARKINSON, 2003). Esses autores demonstraram a oxidação de HCN para HNCO (ou HOCN) sobre a superfície de cobre a 300 K (equação 7).



Andrade-Sobrinho et al. (2009) avaliaram a estabilidade do CE em 15 aguardentes de cana no período de 36 meses e sem incidência de luz. De acordo com os resultados, os autores observaram uma pequena variação na concentração do CE com o tempo, sugerindo que esse composto é estável após a sua formação. Logo em seguida, Anjos et al. (2011a) avaliaram teores de CE em

cachaça envelhecida em tonel de carvalho e em vidros, com e sem incidência de luz. Os autores observaram um aumento considerável na concentração de CE tanto no tonel como nos recipientes de vidro.

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



Dijkstra et al. (2007) propuseram uma nova rota para a formação do ácido carbâmico e do CE envolvendo a reação do CO_2 com aminas. Essa proposta requer mais estudos; no entanto, é uma rota possível para a formação de CE em alimentos e bebidas, nos quais são encontrados CO_2 , proveniente da fermentação e aminas oriundas ou presentes nas matérias-primas.

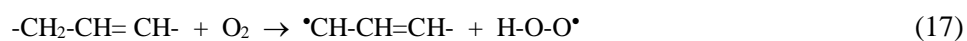
Os mecanismos que operam via cianeto ou cianato para a formação de CE ocorrem durante a destilação da bebida. Provavelmente, esses ocorrem na presença de catalisadores. Assim, duas rotas sintéticas foram propostas para a formação do carbamato de etila a partir do cianeto. A primeira baseia-se na complexação do cianeto com o cobre (II), metal proveniente do alambique (equação 13) e, em seguida, a sua oxidação para cianogênio (equação 14). O cianogênio em meio básico sofre uma reação de desproporcionamento a cianato e cianeto (equação 15). O cianato pode reagir com etanol, em meio ácido, para

formar carbamato de etila (equação 16) (BRUNO et al., 2007; MACHADO, 2010; GALINARO et al., 2015).



A segunda rota é baseada 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 17 a 25 (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; MACHADO, 2010).

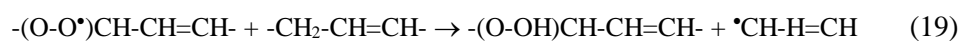
Iniciação



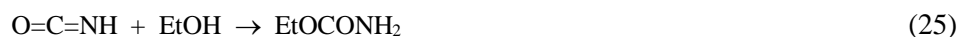
Propagação



Auto-oxidação

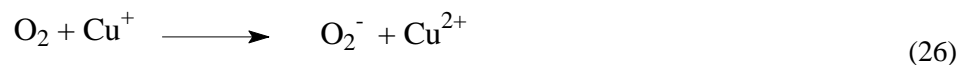


Formação de carbamato de etila



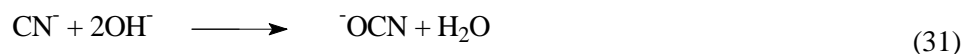
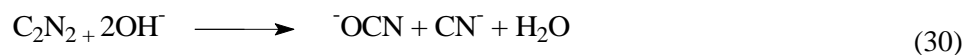
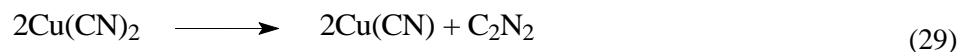
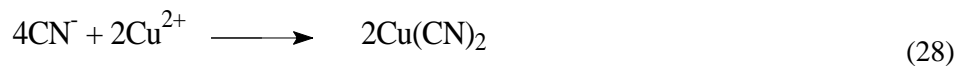
As variáveis pH, luz, concentração de etanol, temperatura, natureza dos grupos carbonilas nas moléculas orgânicas e a concentração dos íons metálicos (Cu (II) ou Fe (III)) são fatores que influenciam a formação de CE a partir do cianeto em bebidas. Além disso, um efeito sinérgico entre a concentração do íon metálico e a irradiação já foi observado. Esses mecanismos não são restritamente fotoquímicos e não só ocorrem após a destilação, podendo ocorrer também em diferentes etapas do processo de produção. Admite-se também que mecanismos radiculares possam ocorrer na fase gasosa durante a destilação, produzindo precursores do CE (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; TAKY et al., 1992; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; WEBER; SHARYPOV, 2009).

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



É proposto que a reação envolvendo o íon cianeto possa ocorrer principalmente na presença dos íons cobre (Cu II) e/ou ferro (Fe II), que atuam como catalisadores. Em solução, os íons de cobre (II) complexam-se com os íons cianeto, podendo ocorrer a oxidação a cianogênio, e uma reação de

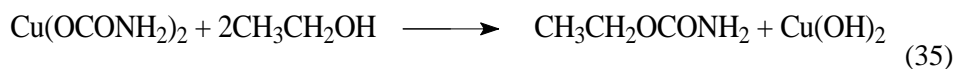
desproporcionamento de cianogênio a cianato e a cianeto. O cianato, em meio ácido, pode reagir com o etanol, formando o CE (equações 27 a 31).



Segundo os autores, o cianato complexa-se com o cobre (II) e a coordenação com o metal se faz pelo nitrogênio, tornando o átomo de carbono mais positivo e facilitando o ataque nucleofílico do etanol ou da água; portanto, duas rotas foram propostas. Na primeira envolveria o ataque do ciano complexo de cobre ao etanol, formando uma unidade carbâmica (Equações 32 e 33) que posteriormente sofreria o ataque de uma molécula de água para formar o CE.



A outra via seria a formação de um ciano complexo de cobre (II) em solução aquosa, por meio da coordenação do ânion cianato com o centro metálico e o átomo de nitrogênio. Uma vez que o átomo de carbono encontra-se mais eletropositivo, devido à coordenação ao centro metálico, esse favoreceria o ataque nucleofílico do etanol, levando à formação do CE (Equações 34, 35 e 36).



A presença de cianeto durante a destilação foi comprovada em estudos de Mackenzie, Clyne e Macdonald (1990), que aplicando técnicas como cromatografia iônica, difração de raios X e espectrometria de massa aos sólidos formados naturalmente dentro dos destiladores, identificaram espécies tais como CuCN, CuCNO, Cu₂O, Cu₂S, CuS e Cu-NC⁻, cluster iônicos, como CuCN, Cu(CN)²⁻, Cu₂(CN)³⁻, and Cu₃(CN)⁴⁻ e uma mistura de espécies Cu(CN)₂S⁻, CuSCN⁻, e CuCNO⁺, demonstrando que reações catalíticas de complexos de superfície ocorrem durante a destilação. Segundo os autores, quando cobre é empregado na parte ascendente do fluxo, como ocorre nos alambiques, é esperado que ocorra uma fixação de cianeto, diminuindo a concentração desse no destilado, reduzindo, conseqüentemente o teor de CE. Taky et al. (1992), estudaram a adição de sais de cianeto [KCN, Ni(CN)₂.2KCN, CuCN], cianato (KCNO) e tiocianato (KCNS) em saquê, licor e soluções modelo de etanol. Os autores observaram que os sais conduziram para formação de CE, sendo a concentração dependente do teor alcoólico e da quantidade (dosagem) do sal adicionado. Já em 2014, Mendonça (2014) avaliou os níveis de CE no processo produtivo de uma cachaça, usando diferentes tipos de fermentação, em que alguns fermentos apresentavam nitrogênio em sua composição. O autor concluiu que a cana utilizada não influenciou a formação de CE e que os valores encontrados estão de acordo com a Legislação vigente. Entretanto, os maiores níveis de CE encontrado no estudo foram caracterizados pelas cachaças produzidas com fermento rico em nitrogênio em sua composição.

2.5.4 Técnicas aplicadas para a detecção, quantificação e ocorrência de CE em bebidas alcoólicas e alimentos

Diversas técnicas têm sido descritas na literatura para análise de CE em bebidas alcoólicas. Instrumentalmente, a determinação de CE em bebidas e alimentos é limitada em função dos baixos teores desse analito e também pelos possíveis interferentes presentes na matriz. Assim, o CE pode ser determinado diretamente ou após pré-tratamento (clean up e/ou concentração) via extração com solvente, extração em fase sólida (solid phase extraction – SPE) ou por microextração em fase sólida (solid phase micro-extraction – SPME) (LACHENMEIER, et al., 2005; WEBER; SHARYPOV, 2009; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009; ANJOS et al., 2011a; MACHADO, et al., 2012).

A cromatografia em fase gasosa é a técnica mais empregada, utilizando-se colunas capilares e sistemas seletivos de detecção (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003; ANJOS et al., 2011a). 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 tandem e as técnicas hifenadas, 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; 2009; MACHADO, et al., 2012).

Na GC/MS, a quantificação do CE é realizada fazendo o monitoramento seletivo dos íons (modo SIM), característicos do espectro de massa para esse composto. São selecionados os seguintes íons de razão massa carga: m/z 89, 74, 62 e 44 e outros íons de alguns isótopos quando esses são utilizados como padrão interno (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003). Os padrões internos mais utilizados na quantificação de CE em alimentos e bebidas são os carbamatos de metila, propila, isopropila, butila e o de etila deuterado, ^{13}C ou ^{15}N , sendo os dois últimos mais indicados por proporcionarem recuperação mais precisa e por evitar coeluição (HASNIP et al., 2007).

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 CE 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 6), permitindo, assim, sua detecção, utilizando o detector de fluorescência (ABREU-LIMA; MAIA; OLIVEIRA, 2005; MADRERA; VALLES, 2009; ANJOS et al., 2011a; MACHADO et al., 2013; SANTIAGO, et al., 2014b).

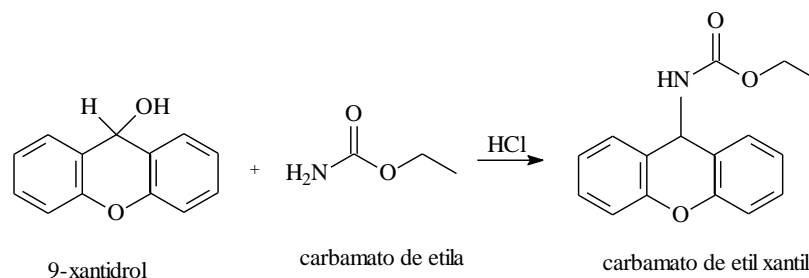


Figura 6 Formação do carbamato de etil xantil por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas

Fonte: 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-FLD 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.

As análises cromatográficas são essenciais para determinação e quantificação de CE em bebidas e alimentos. Entretanto, metodologias de extração têm sido de grande valia para realização de pesquisas envolvendo o CE, tanto em bebidas como em alimentos. Diferentes metodologias de extração têm sido testadas, tais como extração líquido-líquido (FAUHL; WITTKOWSKI, 1992), extração em fase sólida (BUMLEY et al., 1988; JAGERDEO et al., 2002; HASNIP et al., 2007), combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Outra técnica que vem sendo empregada sem o uso de solventes é a microextração em fase sólida (SPME) (WHITON; ZOECKLEIN, 2002; LACHENMEIER; NERLICH; KUBALLA, 2006; ZHANG; ZHANG, 2008; MACHADO et al., 2012). Essa metodologia apresenta várias vantagens quando comparada com os procedimentos convencionais de extração por solvente. A SPME é rápida, fácil de manusear, isenta de solventes, sensível e não requer qualquer procedimento de concentração prévia do analito, evitando, assim, a produção de subprodutos. No entanto, é uma técnica relativamente onerosa. Além da importância da extração, outras técnicas sofisticadas estão sendo utilizadas para determinação de CE. Perestrelo et al. (2010) utilizaram a cromatografia em fase gasosa bidimensional com a espectrometria de massas em tempo de voo para a quantificação de CE em amostras de vinhos fortificados e previamente tratadas por microextração em fase sólida combinada ao headspace.

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; CARDOSO, 2013).

O carbamato de etila se tornou notório em estudos com cachaça no ano de 2002, quando uma concentração média de $770 \mu\text{g L}^{-1}$ 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).

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

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 o 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 margem de exposição (MOE), a média calculada foi de 1300, 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.

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

Galinaro e Franco (2011) avaliaram os efeitos de uma redestilação simples na redução da concentração de carbamato de etila em aguardentes. Os autores concluíram que carbamato de etila não foi completamente eliminado pelo processo de redestilação, que apresentou uma redução de até 92,5% da sua concentração original.

Baffa Júnior et al. (2011) investigaram a presença de CE durante o processo de fermentação e nas frações durante o processo de destilação, bem como na vinhaça. A concentração de CE foi crescente durante a fermentação com teor médio de 122 mg L^{-1} . Na fração cabeça o teor médio encontrado foi de $59,70 \text{ mg L}^{-1}$; para a fração coração, $52,00 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; e para a fração cauda, $1,57 \text{ mg L}^{-1}$. Para a vinhaça o teor encontrado foi de $53,17 \text{ mg L}^{-1}$. Os autores atribuem a formação de CE na fermentação durante o metabolismo das leveduras, uma vez que nenhum nutriente foi adicionado ao tanque de fermentação. Quanto ao processo de destilação, os autores atribuem a possibilidade de ele ser arrastado durante todo o processo e pode estar presente na fração cabeça devido a interações moleculares entre o etanol e outros compostos químicos presentes no meio.

Machado et al. (2012) validaram um método analítico por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (GC / MS) com o tratamento de amostra por microextração em fase sólida (SPME). O método se mostrou bastante eficaz para determinação desse composto, no qual se observaram valores expressivos dos parâmetros analíticos avaliados e as amostras analisadas apresentaram valores bem abaixo dos limites estabelecidos pela Legislação. Posteriormente, Machado e colaboradores (2013) determinaram e validaram um método analítico para carbamato de etila em cachaças produzidas em alambiques de cobre por HPLC. Os resultados do método analítico mostraram-se precisos e reprodutíveis. Assim como Machado et al. (2013), usando HPLC-FLD, Anjos et al. (2011a) identificaram e quantificaram o carbamato de etila em diferentes períodos de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. Pelos resultados, observaram que os parâmetros analíticos analisados apresentaram valores significativos, quando comparados com outras técnicas para determinação do carbamato de etila.

Utilizando-se ainda cromatografia líquida, Santiago et al (2014b) avaliaram carbamato de etila por HPLC-FLD no processo de produção e no envelhecimento de cachaças armazenadas em tonéis de Carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana Cearensis*), no período de 12 meses. 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 CE, pois o mesmo não foi detectado. Já nas etapas de fermentação, destilação e envelhecimento, o carbamato, mesmo em quantidades baixas, foi detectado, mas não quantificado. Zacaroni et al. (2015b) estudaram a influência da luz natural na concentração de carbamato de etila em cachaças envelhecidas em barris de madeira e armazenadas em garrafas de vidro por um período de 6 meses. Todas as amostras apresentaram uma concentração CE abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira. A maior concentração encontrada foi de 79,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 70% das amostras exibiram uma influência da luz ou da ausência de luz na concentração desse composto. Com isso, inferiram que a luz pode influenciar a formação desse composto.

Diferente de Santiago et al. (2014b) e Zacaroni et al. (2015b), Masson et al. (2014) avaliaram aguardentes de cana da região norte e sul do estado de Minas Gerais por cromatografia gasosa acoplada a espectrométrica de massas (CG-MS). De acordo com os resultados, a concentração encontrada de carbamato de etila para as cachaças estudadas variaram de 22,60 a 980 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 63,63% das amostras do Norte de Minas Gerais obtiveram valores acima do permitido pela Legislação.

Lelis et al. (2014) verificaram a ocorrência de CE, em cachaças e aguardentes de cana produzidas por produtores dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Ceará. Atentaram também pelo sistema de produção (destilador de cobre ou coluna de aço inoxidável) e se os produtores são registrados ou não. Os valores obtidos das 75 amostras para o carbamato de

etila variaram de 20 a 948 $\mu\text{g/L}$, apresentando um teor médio de 378, 25 $\mu\text{g/L}$. Somente 10 das 75 bebidas apresentaram teores de carbamato de etila abaixo do limite estabelecido. Em relação ao material do destilador, os autores concluíram que as bebidas obtidas em alambique de cobre e coluna de aço inox apresentaram valores médios de 400,94 e 295,79 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CE, respectivamente. Por esses resultados, Minas Gerais e os produtores não registrados apresentaram maior média na concentração de carbamato de etila.

2.5.5 Propostas para eliminação de carbamato de etila em bebidas e alimentos

Como mencionado, em função dos vários precursores (ureia, arginina, citrulina e n-carbamil fosfatos, cianeto, cianato e glicosídeos cianogênicos), dos diferentes e complexos mecanismos envolvidos na sua formação e de fatores (temperatura, pH e iluminação) que podem influenciar a sua formação, não existe uma metodologia adotada universalmente para prevenir e/ou reduzir os teores de CE em alimentos e bebidas (ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991; WEBER; SHARYPOV, 2009).

Apesar da não existência oficial para redução de CE, algumas ações preventivas têm sido propostas para evitar a formação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas, tais como: medidas de boas práticas de fabricação (uso de matérias-primas de boa qualidade, higienização adequada durante a fermentação e o armazenamento e controle das condições de destilação), controle da irradiação da luz e redução do tempo de armazenamento, buscando evitar a liberação de cianeto (LACHENMEIER, 2005; CARDOSO, 2013).

Em alimentos fermentados, uma solução para a redução nos teores de CE encontrada foi diminuir a concentração dos seus possíveis precursores (citrulina, arginina, entre outros), por meio da utilização de cepas de leveduras

selecionadas que produziriam baixas concentrações de ureia durante a fermentação (SCHEHL et al., 2005; WEBER; SHARYPOV, 2009).

Outra estratégia é a utilização de enzimas que são empregadas para diminuir a concentração de carbamato de etila. A enzima urease é utilizada para reduzir concentrações de ureia, que é um dos precursores na formação de carbamato de etila. Sabe-se, entretanto, que a maioria das ureases são inativas em meio ácido, mas atualmente existe no mercado ureases de *Lactobacillus fermentum* que são resistentes ao meio ácido e que são utilizadas na produção de bebidas fermentadas (MIYAGAWA et al., 1999; FIDALEO; ESTI; MORESI, 2006; WEBER; SHARYPOV, 2009). Taky et al. (1992) adicionaram urease ácida em extrato bruto de saque japonês (20% v/v de etanol), que continha inicialmente cerca de 35 mg/L de ureia. Os autores observaram uma redução significativa de 95% da concentração inicial de ureia. Entretanto, nos dias atuais, a utilização da enzima urease ácida tem se mostrado desfavorável, em função dos custos envolvidos na sua obtenção.

A eliminação de íons cianeto presentes na matéria-prima e no processo de destilação é uma das propostas para redução de CE em aguardentes, assim como a eliminação e/ou diminuição de cobre do mesmo processo. A eliminação dos íons cianeto pode ocorrer utilizando a enzima rodanase (tiosulfatocianeto sulfotransferase). Nesse caso, pode ser utilizada para a detoxificação de íons cianeto, originando compostos menos tóxicos, como sulfito e o tiocianato (TAKY et al., 1992; CIPOLLONE et al., 2006; WEBER; SHARYPOV, 2009;). Dados da literatura apontam que a utilização da enzima rodonase em soluções modelo ($\approx 30\%$ v/v de etanol) fortificadas com o íon cianeto apresentaram uma redução de 80% do teor de CE formado após o tratamento dessas soluções com a enzima (TAKY et al., 1992).

A remoção de cobre é uma prática comum entre os produtores de cachaça. Como o cobre (II) é considerado um possível catalisador na formação

do carbamato de etila, existem diversas propostas para a sua remoção em bebidas após a destilação. A utilização de procedimentos, como a percolação do destilado por resinas de troca iônica (NEVES et al., 2007; IMA et al., 2009; LIMA et al., 2009b), carvão ativado (LIMA et al., 2009b; SOUZA et al., 2009), carvão vegetal (PARK et al., 2009), argilas naturais (DUARTE et al., 2014; ZACARONI et al., 2015a), quitosana (JANEGITZ et al., 2010), pela bidestilação (BIZELLI; RIBEIRO; NOVAES, 2000) ou por meio do tratamento com CaCO_3 ou MgCO_3 (NEVES et al., 2007). A bidestilação também tem sido um procedimento muito comum para remover carbamato de etila de bebidas alcoólicas destiladas, em virtude de sua baixa volatilidade em soluções alcoólicas (RIFFKIN et al., 1989; GALINARO; FRANCO, 2011). No entanto, esses procedimentos, como os utilizados para remoção de cobre, levam a perdas no rendimento em etanol e no aroma.

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; SANTIAGO et al., 2014c). 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.

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, observando-se também uma redução no seu teor alcoólico (ABREU-LIMA; MAIA, OLIVEIRA, 2005; ANJOS et al., 2011b; CARDOSO, 2013).

2.6.1 Legislação para cachaças envelhecidas

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).

2.6.2 Tratamentos, madeiras e recipientes de armazenamento

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 em função das condições de umidade relativa e da temperatura do local de armazenamento. No entanto, as perdas ao longo do ano dependem de vários outros fatores, tais como dilatação e contração da aguardente de cana dentro do tonel, vazamentos e expulsão de

aguardente por frestas e conseqüente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, devido à inadequação de instalações e de ambientes, além do modo de armazenamento (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 as interações entre a bebida e a madeira. Quando a bebida é envelhecida em temperaturas mais elevadas e em recipientes menores, há uma maior extração e, conseqüentemente, uma maior concentração de componentes da madeira. A bebida terá um aroma mais fino e agradável, se for envelhecida em ambientes cuja temperatura varie de 9 a 15°C e a umidade relativa a 73% (CARDOSO, 2013).

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). Santiago et al. (2014c) correlacionaram extrato seco total, composição fenólica total e intensidade de cor de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*) em um período de 12 meses e observaram um aumento significativo desses parâmetros analisados. Nesse trabalho, os autores concluíram que o aumento de um parâmetro acarretou o aumento do outro.

No Brasil, a maior parte dos produtores de cachaça é de pequeno porte, implicando assim em uma variedade de madeiras que possam estar sendo utilizadas para o envelhecimento de aguardente de cana. Por isso, a necessidade de estudos sistemáticos na caracterização de compostos extraídos de diferentes madeiras durante o processo de envelhecimento da bebida (AQUINO et al., 2006a; CARDOSO, 2013).

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, e da facilidade no manuseio), ela é capaz de modificar favoravelmente as características organolépticas de vinhos e aguardentes submetidos sob maturação (LEÃO, 2006; DIAS; MAIA; NELSON, 2009; CARDOSO, 2013).

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 7) 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).

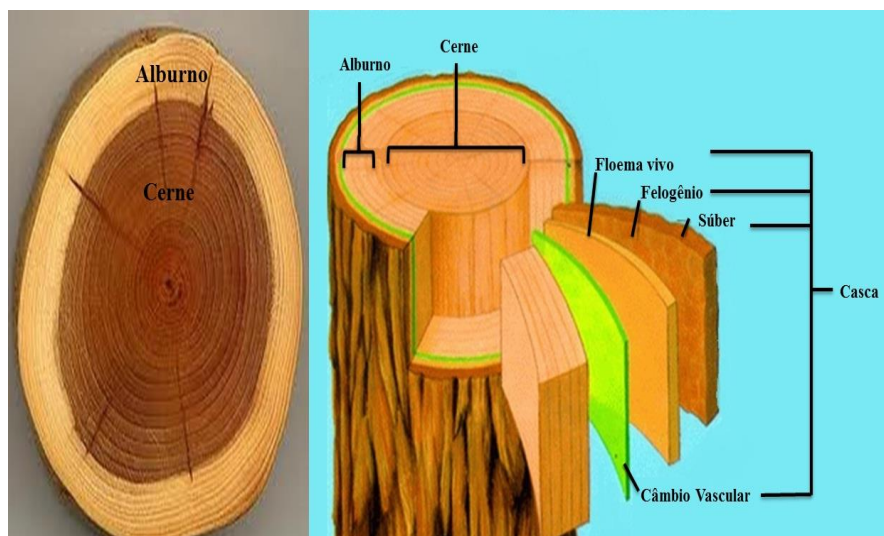


Figura 7 Aspectos macroscópicos da madeira

Fonte: Leão (2006); Mori, Mendes e Mori (2013).

Embora a madeira tradicionalmente utilizada para o envelhecimento de bebidas alcoólicas seja o carvalho (*Quercus* sp.), várias madeiras de origem brasileira têm sido utilizadas na confecção de barris e tonéis para o envelhecimento da aguardente, como amendoim (*Pterogyne nitens*), cerejeira (*Amburana cearensis*), cedro (*Cedrela fissilis*), jatobá (*Hymenaea carbouril*), ipê (*Tabebuia* sp), freijó (*Cordia goeldiana*), garapa (*Apuleia leiocarpa*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), vinhático-amarelo (*Plathynemia foliosa*), peroba (*Paratecoma peroba*) e jequitibá (*Carinian legalis*) (ANJOS et al., 2011b; MORI; MENDES; MORI, 2013). Esse fato tem sido observado devido ao alto custo do carvalho, que é uma madeira típica do Hemisfério Norte. Porém, ainda há grande carência de estudos sistemáticos para caracterização dos compostos extraídos de cada tipo de madeira durante o envelhecimento da bebida (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; AQUINO et al., 2006a; b).

Alcarde, Souza e Belluco (2010), estudando o envelhecimento de bebidas em barris de madeira brasileira em comparação com o carvalho, verificaram similaridade na composição físico-química global das aguardentes envelhecidas nos barris das diferentes madeiras. A aguardente envelhecida na madeira de carvalho foi a que apresentou a melhor aceitação sensorial. Entre as madeiras nacionais, ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*), amendoim (*Pterogyne nitens*), cabreúva (*Mycrocarpus frondosus*), amburana (*Amburana cearensis*) e pereira (*Platycyamus regnelli*) foram aquelas que propiciaram as melhores qualidades sensoriais à aguardente.

Entre as várias madeiras de origem brasileira, as espécies que vêm sendo estudadas quanto ao envelhecimento de cachaça são a amburana (*Amburana cearensis*) e bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) (CASTRO, 2012). A amburana pertencente à família Leguminosae Papilionoideae (Fabaceae) é 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). O bálsamo também pertence à família Fabaceae, popularmente é conhecida como bálsamo-da-américa, bálsamo-de-cartagena, bálsamo-de-cheiro-eterno, bálsamo-de-tolu, bálsamo-do-peru, coroiba, óleo-bálsamo, óleo-vermelho, pau-bálsamo e outros. É uma planta decídua, heliófita, de 10 a 20 metros de altura, com folhas compostas pinadas de ocorrência em quase todo o território brasileiro, inclusive no Espírito Santo. O bálsamo é usado

há séculos como fragrância em perfumaria, balas e gomas de mascar. Hoje, continua sendo usado em preparações farmacêuticas, como xarope, expectorante e veículo para outros compostos. O bálsamo faz parte da Farmacopeia Americana desde 1820, com uso documentado em bronquite, laringite, dismenorrea, diarreia, disenteria e leucorreia. Hoje é muito usado em produtos para tratamento de feridas, úlceras, escabiose, tônicos capilares, anticaspas, desodorantes íntimos e fragrância em sabonetes, detergentes, cremes, loções e perfumes (LORENZI, 2014).

Em estudos de Santiago et al (2014d), nos quais se comparou e quantificou compostos fenólicos em aguardentes armazenadas em tonéis de Carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana Cearensis*) foi constatado que ao passar do tempo de armazenamento, os teores dos 12 compostos fenólicos analisados aumentaram expressivamente, tendo as madeiras analisadas apresentado compostos majoritários diferentes.

Outras duas madeiras que vêm ganhando significância no envelhecimento de cachaça são as madeiras jatobá e peroba. O jatobá pertence à família Leguminosae - Caesalpinioideae e popularmente tem os nomes vulgares de jutaí, jutaí-açu, jutaí-bravo, jutaí-grande, jataí, jataí-açu, jataúba, jatioba, copal, entre outros. A madeira apresenta alta densidade básica, cerne vermelho a castanho-avermelhado, alburno brancoacinzentado, grã-regular a irregular e textura média a grossa, sendo empregada em construção civil, marcenaria, peças torneadas, instrumentos musicais, laminados e é utilizada na área alimentícia. Sua ocorrência vai desde o sul do México até grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia; no Brasil, ocorre do norte até o sudeste. É encontrada em altitudes de até 900 metros acima do nível do mar, em solos arenosos e argilosos bem drenados de terra firme e em várzeas altas, mas raramente em campos

abertos. Cresce bem em zonas úmidas com precipitação anual entre 1.500 e 3.000mm (FERREIRA; SAMPAIO, 2000; LORENZI, 2014).

Faria et al. (2003) estudaram o efeito de oito madeiras brasileiras (ipê-amarelo, amendoim, bálsamo, jatobá, louro, pau-d'arco, pau-d'oleo e pereiro) e compararam com o carvalho no envelhecimento da cachaça. Os resultados demonstraram que amendoim, pereiro e jatobá são madeiras muito boas para substituir o carvalho. Testes sensoriais sugeriram que o amendoim pode substituir o carvalho nos barris, sem mudanças significativas na aceitabilidade do consumidor.

Zacaroni et al. (2011b) determinaram a concentração de compostos fenólicos em cachaças armazenadas em diferentes barris de madeira. Os autores observaram que as concentrações dos principais compostos extraídos variaram de acordo com as espécies de madeira analisada. Analisando-se os resultados das bebidas em tonel de jatobá, ao se comparar com carvalho, os autores concluíram que as concentrações de compostos fenólicos totais variaram de 0,08 mg L⁻¹ para uma amostra armazenada em barril de jatobá de 4000 litros em um período de seis meses para 40,9 mg L⁻¹ de uma amostra envelhecida em um barril de carvalho 50000 litros por um período de 48 meses.

A peroba (*Paratecoma peroba*), pertence à família das Bignoniaceae - Bignoniaceae. A peroba tem diferentes nomeações populares, sendo que em diferentes estados brasileiros ela recebe uma nomeação. Ela é conhecida como peroba de campos, peroba-amarela (ES), ipê (BA), peroba-tremida, ipê-claro, peroba-branca (ES), perobinha (MG), peroba-manchada, peroba-tigrina, ipê-proba, ipê-rajado (MG). A *Paratecoma peroba* (Bignoniaceae) é uma espécie arbórea nativa de grande interesse econômico e ecológico, estando em risco de extinção pela exploração seletiva e ilegal de árvores com diâmetro com casca à altura do peito (DAP) > 20 cm. Tem como características principais: a altura de 20-40m, tronco de 40-80 cm de diâmetro; folhas compostas 5-digitadas e é

anemocórica. Sua madeira é dura e apresenta boa resistência, muito explorada comercialmente. As árvores são típicas no sul da Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (vale do Rio Doce) e norte do estado do Rio de Janeiro, na floresta pluvial atlântica (LINS; NASCIMENTO, 2007; LORENZI, 2014).

2.6.3 Condições ambientais para o envelhecimento

De acordo com Cardoso (2013), a qualidade da bebida envelhecida depende do tipo de madeira empregada, tempo de envelhecimento, qualidade inicial e teor alcoólico do destilado, bem como a temperatura e a umidade relativa do ambiente de envelhecimento.

A temperatura do local influencia a taxa de variação dos componentes da bebida. Cardoso (2013) relatou que as reações ocorridas durante a maturação aumentam com a temperatura, existindo um ponto ótimo para a produção.

Considera-se que, para conseguir o ambiente ideal para o envelhecimento da aguardente, devem-se observar as seguintes condições: não deve haver vibrações; umidade relativa deve ser alta e constante; temperatura do ambiente deverá ser constante, em torno de 22°C, para evitar grandes perdas por evaporação; baixa luminosidade; ausência de ventilação e uma boa vedação dos tonéis.

2.6.4 Reações, incorporação de compostos da madeira e pesquisas em cachaças envelhecidas

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, 2013).

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).

De acordo com Angelo e Jorge (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.

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 o 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).

Os taninos e os derivados da lignina são considerados os mais importantes. A lignina, que é formada por monômeros aromáticos (Figura 8), 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). Os taninos são compostos de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência, e classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica, constituídas basicamente de unidades fenilpropano. Sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico, apresentando estreita relação com o desenvolvimento de aroma e sabor nos destilados envelhecidos (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006).

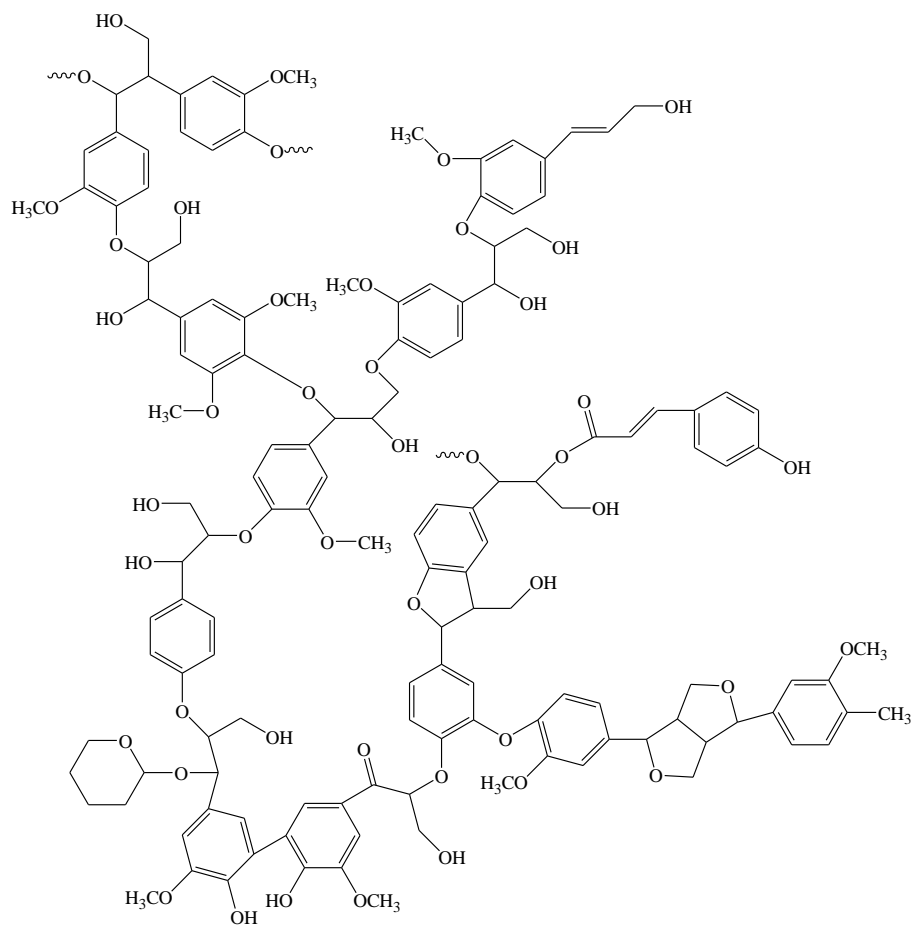


Figura 8 Estrutura química da lignina

Dias, Maia e 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 9).

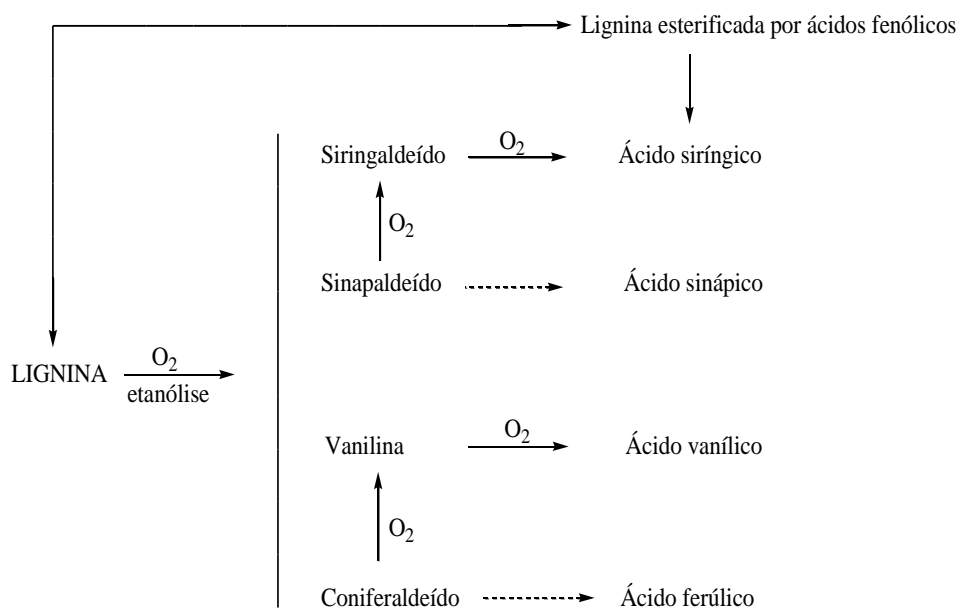


Figura 9 Conversão de alguns fenóis derivados da lignina

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, à 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 (FIRME, 2003; ZACARONI et al., 2011b).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 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; ZACARONI et al., 2011b; ANJOS

et al., 2011b; SANTIAGO et al., 2012; SANTIAGO et al., 2014d). Além da HPLC, outras técnicas são usadas, como a cromatografia em fase gasosa (GC), eletroforese capilar (CE), detecção ultravioleta, eletroquímica, fluorescente e espectrométrica de massas (MS) (GRUZ; NOVÁK; STRNAD, 2008).

Os principais compostos fenólicos já estudados incorporados à cachaça no processo de envelhecimento estão apresentados na Figura 10.

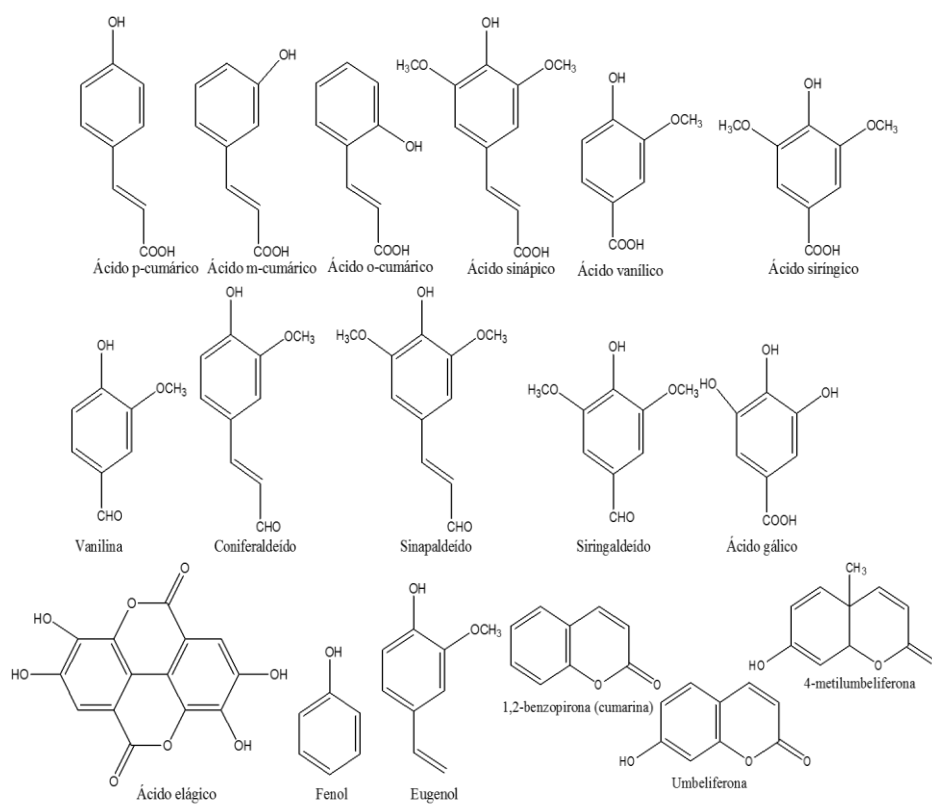


Figura 10 Principais compostos fenólicos incorporados à cachaça

Dias, Maia e Nelson (1998; 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.

Zacaroni et al. (2011b), em estudos com relação à composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira encontraram e quantificaram 16 diferentes compostos fenólicos por 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.

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 uma heterogeneidade em relação aos compostos fenólicos extraídos para cada madeira em estudo. Posteriormente, Santiago et al. (2014d), compararam e quantificaram compostos fenólicos em aguardentes armazenadas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana Cearensis*). Os autores constataram que ao passar do tempo de envelhecimento, os teores dos 12 compostos fenólicos analisados aumentaram expressivamente, tendo as madeiras analisadas apresentaram compostos majoritários diferentes.

Zacaroni et al. (2014), utilizaram a análise das componentes principais (ACP) para avaliar a composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira. Os resultados indicaram que a cachaça envelhecida

em castanheira (36 meses), carvalho (48 meses) e louro-canela diferiram das demais, por possuírem um elevado teor de ácido gálico, ácido elágico e eugenol, respectivamente. As amostras envelhecidas em amburana (48 meses), bálsamo (36 e 48 meses), jequitibá, carvalho (24 e 36 meses) e jatobá apresentaram características semelhantes entre si, destacando a importância da ACP para mostrar o efeito do tipo de madeira sobre a composição fenólica de cachaça envelhecida.

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 ACP 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 (LAVINE, 2000; RENCHER, 2002).

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; NIEUWOUDT et al., 2004; ANDRADE et al., 2008; ANDRADE et al., 2013).

O uso da análise multivariada pode ser reportada em diferentes estudos. Com essa ideia, Nunes et al. (2012) desenvolveram um software (Chemoface) com o objetivo de oferecer uma ferramenta computacional livre com interface gráfica amigável para pesquisadores, professores e estudantes com interesse em quimiometria. Em seu trabalho, as principais funcionalidades do Chemoface são exploradas usando estudos de caso reportados na literatura, tais como otimização de adsorção de corante índigo em quitosana usando planejamento fatorial completo, análise exploratória de amostras de própolis caracterizadas por ESI-MS (espectrometria de massas com ionização electrospray) usando PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise hierárquica de agrupamentos), modelagem MIA-QSAR (análise multivariada de imagem aplicada à relações quantitativas estrutura-atividade) para predição de parâmetro cinético relacionado a atividade de peptídeos contra dengue usando PLS (método de quadrados mínimos parciais), e classificação de amostras de vinho de diferentes variedades usando PLS-DA (PLS para análise discriminante). A partir desses resultados, pode-se observar a grande importância dessa ferramenta no uso científico.

Anteriormente, Reche e Franco (2009) avaliaram a distinção entre cachaças produzidas em alambique de cobre e em colunas inox usando a quimiometria. Pelos resultados, observaram que, entre os 35 compostos analisados, alguns apresentam faixas de concentração diferentes para as amostras destiladas em alambiques e colunas. Os que apresentaram diferenças mais acentuadas foram carbamato de etila, benzaldeído, ácido acético e cobre.

Silva e colaboradores (2012) usaram a análise multivariada e espectro eletrônico de absorção para identificar extratos etanólicos de madeira. Tais autores concluíram que os dados cromatográficos explorados por ACP, embora apresentando uma menor eficiência na explicação dos dados de variância, permitem através do tratamento quimiométrico identificar quais compostos são os mais prováveis candidatos a marcadores químicos, fato esse relevante para o conhecimento da química de bebidas envelhecidas.

Posteriormente, Zacaroni et al. (2014) utilizaram a análise multivariada na composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira. De acordo com os resultados apresentados, pode-se inferir que a ACP permitiu evidenciar o efeito da madeira na composição fenólica das cachaças envelhecidas, diferindo daquelas envelhecidas em castanheira (36 meses), carvalho (48 meses) e louro-canela, pela presença de ácido gálico, ácido elágico e eugenol, respectivamente, das demais amostras analisadas. Ressalta-se que essa é uma técnica relevante para o conhecimento da química de bebidas envelhecidas juntamente com as técnicas cromatográficas, buscando identificar compostos denominados como marcadores químicos.

Santiago et al. (2015) utilizaram a ACP para avaliar e traçar um perfil físico-químico de cachaças produzidas em alambique de cobre provenientes de diferentes cidades do Estado de Minas Gerais/Brasil, nos anos de 2006 a 2011. Neste trabalho foram avaliadas 396 amostras coletadas em diferentes cidades do Estado de Minas Gerais. Pelos resultados da ACP, pode-se inferir que a cadeia produtiva das cachaças de alambique produzidas em Minas Gerais, entre os anos de 2006 a 2011 apresentou uma possível homogeneidade.

Serafim, Pereira-Filho e Franco (2015) tentaram classificar a cachaça de acordo com sua região geográfica de origem. Foram avaliados 24 analitos em 50 cachaças por regiões, São Paulo (15), Minas Gerais (11), Rio de Janeiro (11), Paraíba (9) e Ceará (4). A análise multivariada foi aplicada aos resultados

analíticos, e os recursos preditivos de diferentes métodos de classificação foram avaliados. A ACP identificou cinco grupos, e foram observadas semelhanças químicas entre amostras de MG e SP e entre as amostras RJ e PB. Com esses resultados, os autores concluíram que a abordagem proposta com base em dados químicos previu satisfatoriamente origens geográficas das Cachaças.

3 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, jul./dez. 2005.

ACSELRAD, G. et al. **Consumo de bebidas alcoólicas no Brasil**: estudo com base em fontes secundárias. Rio de Janeiro: FLACSO Brasil, 2012. 162 p.

ALCARDE, A. R.; MONTEIRO, B. M. S.; BELLUCO, A. E. S. Composição química e aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1612-1618, jul. 2012.

ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BELLUCO, A. E. S. Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, Suppl. 1, p. 226-232, maio 2010.

ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana de açúcar. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

ANDRADE, M. F. et al. Análise multivariada de parâmetros físico-químicos em amostras de vinhos tintos comercializados na região metropolitana do Recife. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 296-300, 2008.

ANDRADE, R. H. S. et al. Anthocyanic composition of brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions. **Microchemical Journal**, New York, v. 110, p. 256-262, Sept. 2013.

ANDRADE SOBRINHO, L. G. et al. 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 do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

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

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

AQUARONE, E. et al. **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 Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, June 2001.

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, 2007.

BAAN, R. et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. **The Lancet Oncology**, London, v. 8, n. 4, p. 292-293, Apr. 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. 1-5, 2000.

BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography – mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 4, p. 1383-1387, Dec. 2011.

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**, Marília, 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, jul./ago. 2007.

BATTAGLIA, R.; CONACHER, H. B. S.; PAGE, B. D. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 7, n. 4, p. 477-496, July/Aug. 1990.

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

BENTO, W. A. S. et al. Controle de qualidade e distinção da região de produção das cachaças no estado de Pernambuco. **Revista Analytica: a revista da instrumentação e controle de qualidade**, São Paulo, n. 76, p. 61-68, abr./maio 2015.

BERNARDI, A. C. C. et al. Crescimento e nutrição mineral do porta-enxerto limoeiro 'Cravo' cultivado em substrato com zeólita enriquecida com NPK. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 794-800, Sept. 2008.

BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.

BOGUSZ JUNIOR, S. et al. Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 793-798, out. dez. 2006.

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

BOZA, Y.; OETTERER, M. Envelhecimento de aguardente de cana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 8-15, jan./jun. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] União** de 30 jun. 2005, Seção 1, Página 3. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. 2005a. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

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. **Diário Oficial [da] União de 20 set. 2005**, Seção 1, Página 11. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13576>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 28, de 08 de agosto de 2014. Altera o subitem 5.1.2 do Anexo da Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. 2014. **Diário Oficial [da] União** de 11 ago. 2014, nº 152, Seção 1, pág. 7. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_25819224_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_28_DE_8_DE_AGOSTO_DE_2014.aspx>. Acesso em: 10 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2001. 32 p. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_1469-00.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2015.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto n° 4851 de 02 de outubro de 2003**. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto n° 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://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4851.htm>. Acesso em: 10 dez. 2015.

BRUNO, S. N. F. Destilação – distillation of brazilian sugar cane spirits (cachaças). **Revista Internacional do Conhecimento Online**, v. 3, n. 5, 2012. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/33759.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

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, n. 4, p. 1345-1352, 2007.

BUMLEY, W. C. et al. Quantitation of ethyl carbamate in whiskey, sherry, port, and wine by gas chromatography/tandem mass spectrometry using a triple quadrupole mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, n. 10, p. 975-978, May 1988.

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

CAMPOS, C. R. et al. Features of *saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, June 2010.

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, n. 2, p. 179-185, Apr. 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, jan./fev. 2009.

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

CARDEAL, Z. L.; MARRIOTT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 3, p. 747-755, 2009.

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, abr. 2000.

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, abr. 2003.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

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

CARVALHO, F. P. et al. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis* in the fermentation and quality of artisanal cachaça. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 1, p. 51-60, 2015.

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.

CASTRO, J. P. **Análises química e física de madeiras amazônicas visando o armazenamento de bebida destilada**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CASTRO, R. et al. Comparative analysis of volatile compounds of 'fino' sherry wine by rotatory and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, n. 513, n. 1, p. 141-150, June 2004.

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

CIPOLLONE, R. et al. Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. **Chemosphere: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, Oxford, v. 63, n. 6, p. 942-949, May 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra de cana-de-açúcar - safra 2015/16**: segundo levantamento. Brasília, 2015. v. 2, n. 2.

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

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

DEMYTTENAERE, J. C. R. et al. Analysis of volatile of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 985, n. 1-2, p. 221-232, Jan. 2003.

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

DIAS, S. M. B. C.; MAIA, A. B. R. A.; NELSON, D. L. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 331-334, 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.

DIJKSTRA, Z. J. et al. Formation of carbamic acid in organic solvents and in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 41, n. 1, p. 109-114, May 2007.

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

DUARTE, F. C. et al. Removal of copper in cachaças using clays. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 4, p. 382-389, jun. 2014.

EFSA – European Food Safety Authority. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. **European Food Safety Authority**, Parma, v. 551, p. 1–44, Oct. 2007.

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

FAUHL, C.; WITTKOWSKI, R. Determination of ethyl carbamate in wine by GC-SIM-MS after continuous extraction with diethyl ether. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 15, n. 3, p. 203–205, Mar. 1992.

FERREIRA, C. A. C.; SAMPAIO, P. T. B. Jatobá (*Hymenaea courbaril*). In: CLAY, J. W. et al. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: PDET, 2000. p. 216-225.

FIDALEO, M.; ESTI, M.; MORESI, M. Assessment of urea degradation rate in model wine solutions by acid urease from *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 17, p. 6226-6235, Aug. 2006.

FIRME, L. F. V. **Utilização de madeiras de eucalipto para envelhecimento de cachaça**. 2003. 29 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FOX, N. J.; STACHOWIAK, G. W. Vegetable oil-based lubricants: a review of oxidation. **Tribology International: the practice & technology of lubrication, wear prevention & friction control**, Surrey, v. 40, n. 7, p. 1035–1046, June 2007.

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.

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

GALINARO, C.A. et al. Cyanate as an active precursor of ethyl carbamate formation in sugar cane spirit. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 63, n. 33, p. 7415-7420, Aug. 2015.

GOLDEBERG, D.M. et al. Phenolic constituents, furans, and total antioxidants status of distilled spirits. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 10, p. 3978-3985, Oct. 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, jan./fev. 2009.

GOUBET, M. et al. Influence of the geometry of a hydrogen bond on conformational stability: a theoretical and experimental study of ethyl carbamate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 11, p. 1719-1728, Jan. 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, Dec. 2008.

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

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

IIDA, Y. et al. Novel determination system for ureain alcoholic beverages by using an FIA system with an acid urease column. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 22, n. 1, 173-176, Jan. 2006.

IMA, 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, fev. 2009.

JAGERDEO, E. et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 21, p. 5797-5802, Oct. 2002.

JANEGITZ, B. C. et al. Removal of copper (II) from sugar-cane spirits employing chitosan. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 458-460, 2010.

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.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 99, n. 2, p. 213-218, Feb. 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, n. 266, p. 1-15, June 2010.

LACHENMEIER, D. W. et al. Ethyl carbamate in alcoholic beverages from Mexico (tequila, mescal, bacanora, stool) and Guatemala (cuxa): market survey and risk assessment. **International Journal Research and Public Health**, Basel, v. 6, n. 1, p. 349-360, Jan. 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, n. 1, p. 116–120, Mar. 2006.

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

LAVINE, B. K. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, Washington, 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.

LELIS, V. G. et al. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças de alambique e em aguardentes industriais. **Revista Ceres**, Viçosa (MG), v. 61, n. 4, p. 467-474, jul./ago. 2014.

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, A. K. V. de O. et al. Tratamento térmico do caldo de cana para o processo de fermentação alcoólica: o estado da arte. **Revista Educação Agrícola Superior**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2009a.

LIMA, A. 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, 2009b.

LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. A aguardente e o controle químico de sua qualidade. **O Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 4, n. 33, p. 5-8, 1994.

LINS, B. L. A.; NASCIMENTO, M. T. Efeito do corte seletivo na fenologia de *Paratecoma Peroba* (Record) Kuhl. (Bignoniaceae) em uma mata de tabuleiro na Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, São Francisco de Itabapoana, RJ. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007, Caxambu. **Anais**. Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 6. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014, v. 1, 384 p.

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

MACHADO, A. M. R. et al. Experimental design methodology to optimize the solid phase microextraction procedure prior to GC/MS determination of ethyl carbamate in samples of homemade cachaça. **Analytical Letters**, New York, v. 45, n. 10, p. 1143-1155, Apr. 2012.

MACKENZIE, W. M.; CLYNE, A. H.; MACDONALD, L. S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II: The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in scotch grain whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, n. 4, p. 223-232, July 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, Dec. 2003.

MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 139-143, Feb. 2009.

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

MAIA, A. B. R. A.; NELSON, D. L. Comparative study of soy and flowers on the of alcoholic fermentation in successive batches. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, 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. Determination of acrolein, ethanol, volatile acidity, and copper in different samples of sugarcane spirits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 3, p. 569-572, July/Sept. 2012.

MASSON, J. et al. GC-MS analysis of ethyl carbamate in distilled sugar cane spirits from the northern and southern regions of Minas Gerais. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 120, n. 4, p. 516-520, Sept. 2014.

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

MENDONÇA, J. G. P. **Análise do carbamato de etila em cachaças de alambique produzidas por leveduras selecionada e fermentação espontânea**. 2014. 127 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, 2014.

MIRANDA, M. B. et al. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, Supl., p. 84-89, dez. 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, out./dez. 2006.

MIYAGAWA, K. et al. Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 68, n. 2-3, p. 227-236, Feb. 1999.

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

MORALES, M. L.; BENITIZ, B.; TRONCOSO, A. M. Accelerated of wine vinegars with oak chips: evaluation of wood flavour compounds. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 2, p. 305-315, Nov. 2004.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 167-181, 2004.

MORÉS, S. **Determinação de compostos voláteis em cachaça por microextração em fase sólida**. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MORI, F. A.; MENDES, L. M.; MORI, C. L. S. O. Influência da madeira no envelhecimento da cachaça. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

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

NAGATO, L. A. F.; NOVAES, F. V.; PENTEADO, M. de V. C. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. **Boletim SBCTA**, 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, 1998.

NEVES, E. A. et al. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 33–36, 2007.

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**, Easton, v. 52, n. 12, p. 3726-3735, May 2004.

NOBREGA, I. C. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 210-216, maio/ago. 2003.

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, n. 3, p. 1243–1247, Aug. 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.

NONATO, E. A. et al. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 8, p. 3533-3539, July 2001.

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, n. 5, p. 460-466, Aug. 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**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012.

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, jan./mar. 2008.

PARK, S. R. et al. Exposure to ethyl carbamate in alcohol-drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 10, p. 946-952, Sept. 2009.

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, out. 2003.

PERESTRELO, R. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction as a powerful tool for quantification of ethyl carbamate in fortified wines. The case study of Madeira wine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 20, p. 3441-3445, May 2010.

PINHEIRO, S. H. M. **Avaliação sensorial das bebidas aguardente industrial de cana-de-açúcar e cachaça de alambique**: uma contribuição para o desenvolvimento de um protocolo de análise. 2010. 123 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

POLASTRO, L. R. et al. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 78-81, jan./abr. 2001.

PUECH, J. L. Extraction and evolution of lignin products in armagnac natured in oak. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, n. 2, p. 111-114, 1981.

PUECH, J. L. et al. 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.

RAKIC, S. et al. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 2, p. 830-834, Jan. 2007.

RAMINELLI, R. Da etiqueta canibal: comer antes de beber. In: VENÂNCIO, R. P.; CARNEIRO, H. **Álcool e drogas na história do Brasil**. Belo Horizonte: Editora PUCMinas, 2005. p. 29-46.

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, n. 16, p. 6603-6608, Aug. 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.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 105, n. 1, p. 26- 30, 1987.

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

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

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.

SANTIAGO, W. D. et al. Comparação do perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 17-29, 2014a.

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

SANTIAGO, W. D. et al. Correlação entre extrato seco total, composição fenólica total e intensidade de cor de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*) em um período de 12 meses. **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 9-15, 2014c.

SANTIAGO, W. D. et al. Comparison and quantification of the development of phenolic compounds during the aging of cachaça in oak (*Quercus* sp) and amburana (*Amburana Cearensis*) barrels. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 21, p. 3140-3150, Oct. 2014d.

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

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

SANTIAGO, W. D. et al. Comparação do perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 7, p. 17-29, 2014b.

SCHABER, P. M. et al. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 424, n. 1-2, p. 131–142, Dec. 2004.

SCHEHL, B. et al. Effect of the stone content on the quality of plum and cherry spirits produced from mash fermentations with commercial and laboratory yeast strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 21, p. 8230-8238, Oct. 2005.

SCHWAN, R. F. et al. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

SERAFIM, F. A. T.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FRANCO, D. W. Chemical data as markers of the geographical origins of sugarcane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 196, p. 196-203, Apr. 2015.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Evolução histórica do mercado de cachaça**. 2008. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Potencial da cachaça brasileira**. 2014. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

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

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

SILVA, F. C.; CESAR, M. A. A.; SILVA, C. A. B. **Pequenas indústrias rurais de cana de açúcar**: melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasília: EMBRAPA, 2003. 155 p.

SILVA, M. L.; MACEDO, A. C., MALCATA, F. X. Review: steam distilled spirits from fermented grape pomace. **Food Science and Technology International**, London, v. 6, n. 4, p. 285-300, Jan. 2000.

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

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

SOARES, T. L.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Acompanhamento do processo de fermentação para a produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1 p. 184-187, jan./mar. 2011.

SOUZA, A. P. G. et al. Strategies to select starters cultures for production of flavor compounds in cachaça fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 379-392, Feb. 2012.

SOUZA, P. P. et al. Determination of volatile compounds in Brazilian distilled cachaça by using comprehensive two-dimensional gas chromatography and effects of production pathways. **Journal of Chromatography**, A, Amsterdam, v. 1216, n. 14, p. 2881–2890, Apr. 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**, London, v. 85, n. 3, p. 149-156, May/June 1979.

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

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.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, NJ: Merck, 2001.

- TONON, T.; LONVAUD-FUNEL, A. Arginine metabolism by wine Lactobacilli isolated from wine. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 5, p. 451-461, Oct. 2002.
- TRINDADE, A. G. **Cachaça um amor brasileiro**. São Paulo: Editora Melhoramentos, 2006.
- UTHURRY, C. A. et al. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 3, p. 329-336, Dec. 2004.
- UTHURRY, C. A. et al. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 2, p. 262-270, Jan. 2006.
- VAHL, M. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 10, n. 5, p. 585-592, Sept./Oct. 1993.
- VICENTE, M. A.; FIETTO, L. G.; CASTRO, I. M. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 51- 59, Apr. 2006.
- VICHI, S. et al. Volatile and semi-volatile components of oak wood chips analysed by accelerated solvent extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 4, p. 1260-1269, Jan. 2007.
- VIDAL, E. E. et al. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/ esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food Chemistry**, London, v. 138, n. 1, p. 701-708, May 2013.
- VILELA, F. J. V. et al. Determinação das composições físico-químicas de cachaça do Sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, jul./ago. 2007.
- WANG, D. et al. Synthesis of diethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 8, p. 807-812, Aug. 2007.
- WALDER, J. M. M. et al. Aging of sugar cane spirit using gamma radiation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 9., 2004, Montpellier. **Proceeding...** Montpellier, 2004. CD-ROM.

WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg, v. 7, n. 3, p. 233-247, Sept. 2009.

WHITE, J. **Yeast technology**. London: Chapman & Hall, 1954. 135 p.

WHITON, R. S.; ZOECKLEIN, B. W. Determination of ethyl carbamate in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 53, n. 1, p. 60-63, Jan. 2002.

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. Avaliação multivariada da composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira. **Científica**, Jaboticabal, v. 42, n. 2, p. 101-107, 2014.

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 spiritaged in different species of wood. **Analytical Letters**, New York, v. 44, n. 12, p. 2061-2073, Aug. 2011b.

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

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

ZHANG, Y.; ZHANG, J. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages using a

face-centered cube central composite design. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 627, n. 2, p. 212-218, Oct. 2008.

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 259, n. 3-4, p. 325-350, Mar./Apr. 1991.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Perfil físico-químico e determinação de compostos voláteis por SPME-GC-MS de cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*)

Resumo

O conhecimento da composição química de cachaças é extremamente importante, visto que os estudos dos compostos potencialmente tóxicos têm sido um fator determinante no controle de qualidade. 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. Os objetivos deste trabalho foram realizar um acompanhamento periódico da qualidade físico-química quanto aos teores de grau alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural, metanol, extrato seco, cobre e compostos voláteis por SPME-GC-MS da cachaça no processo de produção (frações da destilação) e no armazenamento em tonéis recém-confeccionados de carvalho (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*). Os tonéis foram fabricados em uma tanoaria especializada e as cachaças obtidas de uma unidade produtora na região sul de Minas Gerais. As frações do destilado apresentaram, físico-quimicamente, valores distintos, tendo as frações “cabeça” e “cauda” apresentado valores inapropriados para os parâmetros grau alcoólico, aldeídos e butan-1-ol; a fração “coração”, tanto no processo de destilação e no envelhecimento, apresentou valores dentro do estabelecido pela Legislação, sendo, portanto, apropriada para o consumo. Pelos resultados dos compostos voláteis analisados por GC-MS, foi possível observar vários compostos importantes para o aroma e sabor das cachaças, sendo os álcoois, ácidos, ésteres e sesquiterpenos os principais grupos encontrados. Por meio das análises de variância e das componentes principais, foram observadas importantes alterações químicas nas bebidas.

Palavras-chave: compostos secundários, contaminantes orgânicos, bebida alcoólica.

Abstract

Knowledge of the chemical composition of cachaça is extremely important, because the studies of potentially toxic compounds have been a determining factor in quality control. The practice of aging is becoming a common practice among producers seeking to increase the value of their products.. Native woods have been used for aging, replacing the traditional oak wood. The objective of this work was to conduct a periodic monitoring of the physical and chemical quality as the alcohol content levels, volatile acidity, esters, aldehydes, higher alcohols, furfural, methanol, dry extract, copper and volatile compounds by SPME-GC-MS in the cachaça during the production process (distillation fractions) and storage in newly made oak (*Quercus sp.*), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaeae carbouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and mahogany (*Paratecoma peroba*) casks. The casks were made in a specialized cooperage, and cachaça was obtained from a production unit in the southern region of Minas Gerais. Distillate fractions presented distinct physico-chemical values, and "head" and "tail" fractions had inappropriate values for the alcohol, aldehyde and butan-1-ol concentrations. The "heart" fraction, both during the distillation process and aging, contained concentrations within those established by law and is, therefore, suitable for consumption. Several important contributors for the aroma and flavor of the cachaça, principally alcohols, acids, esters and sesquiterpenes, were found. Through analysis of variance and principal component analysis, important chemical changes were observed in the beverages.

Keywords: secondary compounds, organic contaminants, alcohol.

1 Introdução

A cachaça é um produto bem consumido pelos brasileiros e por várias civilizações do mundo. Por esse motivo, tem-se a importância de se buscar um produto de melhor qualidade. Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de aprimorar tanto a qualidade da matéria-prima, variedades de cana de açúcar, quanto os cuidados durante o processo de produção da bebida, assim como o controle de compostos contaminantes (CARDOSO, 2013).

De acordo com a Instrução Normativa 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, 2005a).

No cenário econômico nacional, estima-se uma produção anual de 1,4 bilhão de litros de cachaça. São registradas 4 mil marcas e aproximadamente 40 mil produtores legalizados e não legalizados. De acordo com a legislação, 90% são de pequeno produtor. No mercado, a cachaça é encontrada em mais de 960 mil pontos de vendas, entre bares, supermercados e restaurantes, gerando cerca de 600 mil empregos diretos, além de um faturamento anual de mais de U\$600 milhões. Estima-se um consumo médio anual de 11,5 litros por habitante. 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 (SEBRAE, 2008; 2014). Portanto, para a cachaça se destacar no mercado mundial, sua produção deve superar alguns entraves. A padronização do produto, como o controle de contaminantes orgânicos 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 (RECHE; FRANCO, 2009).

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 (CARDOSO, 2013). Diferentemente desses, existem os voláteis, presentes em pequenas quantidades que, na maioria das vezes, são os responsáveis pelo aroma e sabor da bebida. Trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de caracterizar e identificar compostos voláteis (traços) que apresentam grande impacto no aroma da cachaça. Alguns trabalhos referentes à composição da cachaça abordam apenas os componentes voláteis majoritários, por injeção direta da amostra e descritos na Legislação, sem procurar estabelecer o papel que esses compostos exercem no aroma da bebida (MIRANDA; HORII; ALCARDE, 2006; ANJOS et al., 2011; SANTIAGO et al., 2012; 2015).

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. 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., 2011). 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.

De acordo com a Legislação vigente, para que a bebida seja considerada envelhecida, ela deve se enquadrar na denominação proposta. 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 (BRASIL, 2005a).

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 (SANTIAGO et al., 2012; ANJOS et al., 2011).

A madeira tradicionalmente usada para o envelhecimento da cachaça e outras bebidas destiladas no Brasil é o carvalho (*Quercus* sp). Entretanto, várias madeiras de origem nativa brasileira têm sido utilizadas na confecção de barris e tonéis para o envelhecimento de cachaça. Entre essas, citam-se a amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*). (AQUINO et al., 2006a; 2006b; ANJOS et al., 2011; CARDOSO, 2013; SANTIAGO et al., 2014a).

No presente trabalho, objetivou-se realizar um acompanhamento periódico da qualidade físico-química, quanto aos teores de grau alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural, metanol, extrato seco, cobre e compostos voláteis por SPME-GC-MS, da cachaça no processo produção (frações do destilado) e no armazenamento em tonéis recém-confeccionados de carvalho (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*).

2 Material e métodos

Confecção dos tonéis

Os tonéis foram confeccionados no município de Ponte Nova-MG, situado na região Zona da Mata Mineira. As madeiras amburana, bálsamo, carvalho, jatobá, e peroba foram adquiridas pela tanoaria encarregada na fabricação dos tonéis. A confecção foi realizada com madeira nova ou virgem, exceto a de carvalho. A madeira de carvalho foi obtida de um tonel de carvalho europeu de 200 litros, o qual foi desmontado e lixado para sua obtenção. Esse procedimento foi realizado por não ser uma madeira nativa brasileira, já as demais foram adquiridas de madeireiras especializadas.

Todos os tonéis utilizados no estudo apresentavam um volume final de 20 litros cada um. Eles foram confeccionados nas seguintes dimensões: 40 cm de comprimento, 30 cm de altura, 102 cm de raio central e 1,8 cm de espessura da madeira.

Após a confecção, os tonéis foram curtidos com água destilada, a qual foi trocada a cada 5 dias até completar 30 dias.

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 2014. A variedade de cana empregada foi a RB86-7515, o processo de fermentação foi realizado com fubá e, como micro-organismo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O preparo do fermento foi realizado por 5 dias e a fermentação do mosto de cana teve duração de 18 horas, em que o grau Brix inicial era 20°. Após o Brix zerar, o vinho foi destilado em alambique de cobre de 1000 litros. Na destilação obtiveram 15 litros para fração “cabeça”, 180 litros para “coração” e 144 litros para “cauda”.

A fração “coração” foi transferida para os tonéis de carvalho, amburana, balsamo, jatobá e peroba, nos quais foram estocados 20 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.

A cada dois meses, por um período de 12 meses, foram coletadas amostras de 2 litros e encaminhadas para a realização das análises físico-químicas e análises cromatográficas. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardentes e na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Análises físico-químicas e cromatográficas

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 (MAPA) (BRASIL, 2005b). Os parâmetros analisados foram grau alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural metanol, cobre e extrato seco.

A determinação dos álcoois superiores foi realizada utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa (GC-FID). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso (GC-2010) Shimadzu com injetor automático modelo AOC-20i. Utilizou-se a metodologia proposta por Vilela et al. (2007), com modificações. A separação foi realizada em uma coluna DB Wax (30mx0,25mm,0,25µm), Split 1:10. A temperatura do injetor e detector foram de 150°C e 170°C, respectivamente. A rampa de aquecimento empregada foi de 1°C min⁻¹ de 55°C até 70°C, totalizando 17 min. Utilizou-se como gás de arraste

Hélio (5.0) com fluxo de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$. A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões e a quantificação foi realizada por padronização externa.

As análises dos compostos voláteis das frações do destilado e das bebidas armazenadas após 12 meses em diferentes madeiras foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan), injetor split/splitless e coluna SLB™ (5% fenil- 95% dimetilsiloxano) $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$. A programação da temperatura do forno foi de 35°C até 240°C , com uma rampa de aquecimento de 4°C min^{-1} . O gás de arraste utilizado foi He 5.0, com um fluxo de $1,78 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura do injetor foi mantida a 270°C e operado no modo split 1:4. Os compostos foram detectados por espectrometria de massas por impacto de elétrons a 70 eV, no modo scan (29 a 600 Da). A temperatura da interface do detector e da fonte de íons permaneceram a 240°C e 200°C , respectivamente. O filamento foi ligado em 1,75 min.

As extrações dos voláteis foram realizadas utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) por headspace. As amostras foram diluídas a uma concentração de 10%. Após a diluição, alíquotas de 4 mL das amostras foram adicionadas em vial de 20 mL, com temperatura de extração de 45°C , tempo de extração de 50 minutos e tempo de dessorção de 3 minutos. A extração foi realizada utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene, Carboxen, and Polydimethylsiloxane) com 50-30 μm de espessura de filme da marca Supelco. Essa fibra foi previamente condicionada por 1h a 270°C , conforme especificações.

Os compostos foram identificados por comparação do espectro de massas obtidos com a biblioteca espectral do GC-MS (Wiley 8 e FFNSC 1.2).

Foram calculados os índices de retenção experimentais, os quais foram comparados com índices relatados na literatura (ADAMS, 2007; NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, NIST, 2013). Para a comparação, foram consideradas similaridades acima de 70% e os índices experimentais foram calculados utilizando uma série homóloga de alcanos.

Delineamento estatístico

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema de parcelas subdivididas no espaço. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Schott Knott ao nível de 95% de confiança, usando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Aplicou-se também, a análise das componentes principais (ACP) para averiguar e compreender a similaridade entre as amostras quanto aos parâmetros analisados ao longo do processo de destilação e envelhecimento da bebida. A ACP dos compostos voláteis foi realizada utilizando as áreas dos picos cromatográficos. Os resultados foram centrados em médias, para posterior análise. A análise foi realizada utilizando o programa CHEMOFACE (NUNES et al., 2012).

3 Resultados e discussão

Na Tabela 1, estão representados os resultados obtidos para as avaliações físico-químicas das frações do destilado (“cabeça”, “coração” e “cauda”).

Tabela 1 Avaliações físico-químicas das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”*.

Análises	“Cabeça”	“Coração”	“Cauda”	Limites permitidos**
Grau alcoólico ¹	57,000 ± 0,020 (a)	46,530 ± 0,110 (b)	19,555 ± 0,405 (c)	38,0 – 48,0 38,0 – 54,0
Acidez volátil ²	21,578 ± 0,008 (c)	29,738 ± 0,070 (b)	62,926 ± 1,303 (a)	150,0
Ésteres ²	80,232 ± 0,028 (a)	9,635 ± 0,023 (b)	9,175 ± 0,190 (c)	200,0
Aldeídos ²	69,422 ± 0,066 (a)	15,608 ± 0,278 (b)	2,051 ± 0,001 (c)	30,0
Butan-1-ol ²	3,071 ± 0,026 (b)	2,617 ± 0,008 (c)	3,386 ± 0,164 (a)	3,0
Butan-2-ol ²	1,113 ± 0,001 (a)	ND (b)	ND (b)	10,0
Álcoois superiores ²	275,267 ± 2,538 (a)	155,407 ± 1,126 (b)	52,912 ± 1,282 (c)	360,0
Propan-1-ol	54,447 ± 0,487 (a)	44,149 ± 0,064 (b)	29,856 ± 0,861 (c)	-
2-metilpropan-1-ol	56,339 ± 0,540 (a)	28,809 ± 0,228 (b)	7,951 ± 0,004 (c)	-
3-metilbutan-1-ol	164,478 ± 1,510 (a)	82,448 ± 1,289 (b)	15,103 ± 0,418 (c)	-
Cobre ³	0,686 ± 0,003 (a)	0,253 ± 0,001 (b)	ND (c)	5,0
Metanol ²	2,597 ± 0,018 (a)	0,124 ± 0,022 (c)	2,491 ± 0,142 (b)	20,0
Furfural ²	0,040 ± 0,002 (c)	0,586 ± 0,004 (b)	2,808 ± 0,133 (a)	5,0
Extrato seco ⁴	0,036 ± 0,004 (a)	0,016 ± 0,005 (b)	0,014 ± 0,002 (b)	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⁻¹ álcool anidro (a.a.); ³ mg L⁻¹; ⁴ g L⁻¹; ND = não detectado; ** Brasil, 2005a.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 1, pode-se observar que as frações do destilado apresentaram diferenciação na composição química; os compostos voláteis com uma afinidade maior com álcool/água tendem a estar presentes nas frações “cabeça” e “coração”, como os álcoois superiores, esteres e aldeídos.

A fração “cabeça” e “cauda” apresentaram valores inadequados e fora dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e

Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2005a). Para a fração “cabeça”, constataram-se valores elevados na graduação alcoólica, aldeídos e butan-1-ol, enquanto a “cauda” apresentou valores elevados de butan-1-ol e baixos valores para graduação alcoólica, não sendo, portanto, recomendado o seu consumo. Avaliando esses resultados, observa-se a grande importância no momento de se fazer os cortes das frações para evitar contaminação da fração “coração” por excesso de alguns compostos e contaminantes orgânicos que são maléficos à saúde humana. Segundo Cardoso (2013), 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.

De acordo com Aquarone et al. (2005) e Cardoso (2013), uma boa prática para se obter uma bebida com qualidade e fazer os cortes da seguinte maneira: 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. Portanto, neste trabalho pode-se observar uma preocupação quanto aos cortes das frações, pois a fração “coração” apresentou todos os parâmetros dentro da normalidade.

Anjos (2010) e Santiago et al. (2014b) avaliaram físico-quimicamente as frações do destilado da cachaça em suas pesquisas. Anjos (2011) observou valores elevados dos compostos, como aldeídos, álcoois superiores e cobre para fração “cabeça” e, na fração “cauda”, valores inadequados de acidez volátil e

gradação alcoólica. Posteriormente, Santiago et al. (2014b), encontraram valores inadequados para a fração “cabeça”, quanto aos teores de grau alcoólico, aldeídos e álcoois superiores e, na fração cauda, apenas a gradação alcoólica. Comparando esses resultados com os dessa pesquisa, apenas a gradação alcoólica e aldeídos apresentaram valores semelhantes, visto que o butan-1-ol não foi avaliado pelos autores.

O metanol e aldeídos são compostos característicos da fração cabeça, pois são substâncias que apresentam volatilidade significativa alta (ALCARDE; SOUZA; BELLUCO, 2010; CARDOSO, 2013). Esse fato foi constatado neste estudo, visto que as maiores concentrações desses compostos apareceram na fração cabeça, estando a concentração de aldeído ($69,422 \text{ mg } 100\text{ml}^{-1} \text{ a.a.}$) acima do limite estabelecido pela Legislação.

Apesar de estar no limite permitido pela legislação, os álcoois superiores, na fração “cabeça” ($275,267 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1} \text{ a.a.}$) apresentaram valores expressivos. Sua formação pode ser explicada pelo seu arraste por vapores hidroalcoólicos durante o processo de destilação. A quantidade de álcoois superiores em cachaças 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. Isso explica a alta concentração de butan-1-ol encontrada, este um álcool superior, mas classificado como um contaminante orgânico e é formado por bactérias acetobutílicas (MAIA; CAMPELO, 2006; CARDOSO, 2013). Além disso, Cardoso, Lima-Neto e Franco (2003), verificando a influência do material do destilador na composição química das cachaças, 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 Bizelli, Ribeiro e Novaes (2000), Alcarde; Souza; Belluco (2010) e Cardoso (2013), 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 e Franco (2009), o ácido acético encontra-se em maior quantidade nas frações finais da destilação, pois sua destilação inicia 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 os resultados obtidos para a avaliação físico-química dessa fração, já que as maiores concentrações dessa substância foram encontradas para o destilado da “cauda” (62,926 mg 100 mL⁻¹ a.a.).

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, 19,555 % (v/v), encontrado para graduação alcoólica dessa fração. Segundo Cardoso (2013) e Santiago et al. (2014b), além da baixa graduação alcoólica, essa fração é rica em compostos indesejáveis, como é o caso da maior concentração de furfural encontrada.

Para averiguar e comparar os resultados da avaliação físico-química das frações do destilado, aplicou-se a ACP. Na Figura 1 mostra-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, em que se relacionam os parâmetros físico-químicos de cada fração do destilado em estudo.

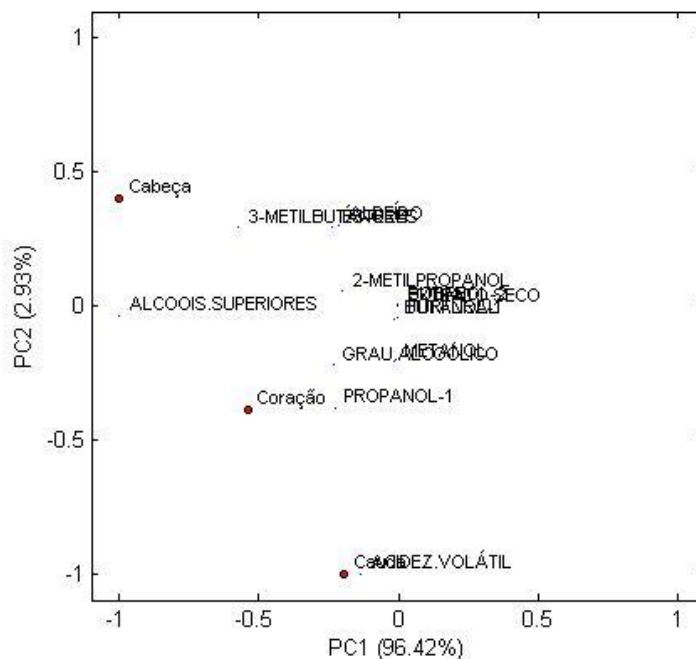


Figura 1 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, quanto aos seus parâmetros físico-químicos

A ACP mostrou que, com a primeira componente e a segunda componente principal, foi possível descrever 99,6% dos dados, sendo 96,42% da variância total descrita pela primeira componente principal. Observando-se a Figura 1, pode-se constatar que a fração “cabeça” diferiu da fração “coração” nos parâmetros álcoois superiores, aldeídos e 3-metilbutan-1-ol. A fração “cauda” diferiu da fração “coração” no parâmetro acidez volátil. Esses resultados corroboram com a análise de variância aplicada anteriormente (Tabela 1), pois tais parâmetros apresentaram valores superiores, quando comparados com a fração “coração”. Santiago et al. (2014b) usaram a ACP nos resultados das análises físico-químicas das frações do destilado em seu trabalho.

Os autores concluíram que a ACP descreveu 99,6% dos dados e que as frações “cabeça” e “cauda” diferiram da fração “coração” nos parâmetros álcoois superiores e acidez volátil, respectivamente, corroborando os resultados encontrados neste trabalho.

Concordando com Cardoso (2013), 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 substâncias em concentrações indesejáveis.

Os resultados das análises físico-químicas e álcoois superiores analisados por GC-FID, obtidos para as amostras de cachaça durante o período de armazenamento nos tonéis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba estão apresentados nas Tabelas 2 a 7.

Tabela 2 Avaliação da graduação alcoólica e acidez volátil em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.

Tonel	Grau alcoólico (% v/v)					
	Coração (tempo zero): 46,530±0,110					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	44,745 aA	43,815 aC	44,145 aB	43,335 aD	43,110 aE	42,880 aF
B	44,335 bA	42,990 cB	42,700 eC	41,190 dD	40,250 eE	39,745 eF
C	44,245 bA	43,160 bC	43,300 dB	42,380 cD	41,650 cE	41,490 cF
J	44,775 aA	43,120 bC	43,470 cB	42,355 cD	41,420 dE	41,315 dF
P	44,670 aA	43,730 aB	43,675 bB	42,780 bC	42,180 bE	42,305 bD
Tonel	Acidez volátil (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 29,738±0,070					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	27,194 cF	31,581 eE	37,713 dC	38,417 dB	34,899 eD	38,594 eA
B	24,014 eF	32,187 dD	31,900 eE	33,069 eC	37,378 dB	41,638 dA
C	34,376 aF	39,185 aD	38,448 aE	42,855 aC	46,959 aB	50,766 aA
J	27,175 dF	35,656 cE	38,298 bD	39,307 bC	39,955 cB	43,698 bA
P	34,049 bF	38,674 bD	38,119 cE	38,916 cC	42,802 bA	42,675 cB

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas (em relação a cada parâmetro), não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba).

De acordo com os resultados, todas as amostras apresentaram valores dentro do limite máximo permitido pela Legislação brasileira. Sabe-se que a diminuição da graduação alcoólica de cachaças, ao longo do armazenamento, ocorre por fatores, como a 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 armazenamento, 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; SANTIAGO et al., 2014b). Pelos resultados apresentados na Tabela 2, é possível observar que, após 12 meses, as cachaças armazenadas nas diferentes madeiras apresentaram valores distintos quanto à sua graduação alcoólica.

Pode-se observar que, ao longo do armazenamento, ocorreu uma diminuição significativa da graduação alcoólica nas cachaças em estudo. No armazenamento, é comum a diminuição de 3 a 4% na graduação alcoólica; porém, neste estudo, a perda chegou aproximadamente a 7% na cachaça armazenada em bálsamo, 5% em carvalho e jatobá, 4% em amburana e peroba. Tais resultados podem estar relacionados com as condições do galpão, fatores climáticos e físicos, além disso, os tonéis confeccionados podem estar com frestas inadequadas. 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 pelo 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 diferenças estatísticas significativas 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. Santiago et al. (2014b) avaliaram físico-quimicamente cachaças armazenadas em carvalho e amburana por um período de 12 meses. Os autores observaram que a graduação alcoólica não diminuiu ao longo dos 12 meses de armazenamento. 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.

De acordo com os dados descritos na Tabela 2, a acidez volátil apresentou diferenças significativas quanto ao tipo de madeira e o tempo de armazenamento. Pode-se observar que a cachaça envelhecida em carvalho apresentou maior acidez (50,766 mg 100 mL⁻¹ a.a.), seguida das madeiras jatobá, peroba, bálsamo e amburana. A cachaça com acidez elevada é sensorialmente desagradável; porém, a presença desses compostos ácidos em pequena quantidade é de grande importância para a qualidade da bebida, uma vez que, durante sua produção, os ácidos reagem com os álcoois presentes, aumentando a formação de ésteres. A acidez ocorre 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, 2013). 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 pode estar relacionada com os compostos extraídos de cada tipo de madeira.

Alguns compostos secundários podem ter sua concentração aumentada no processo de envelhecimento. Entre eles, 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, compondo, assim, o chamado “*flavour*” ou “*bouquet*” da cachaça (PEREIRA et al., 2003; ALCARDE; SOUZA; BELLUCO, 2010; CARDOSO, 2013). De acordo com Cardoso (2013) 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; PARAZZI et al., 2008).

Pelos resultados apresentados na Tabela 3, foi constatada uma significativa variação na concentração de ésteres ao longo do tempo de armazenamento e da madeira utilizada. A cachaça armazenada em amburana teve um aumento de 65% na concentração de ésteres, 59% (bálsamo), 53% (carvalho), 46% (jatobá) e 52% (peroba). Anjos (2010) avaliou teores de ésteres em cachaças envelhecidas em carvalho no período de 12 meses e observou um aumento expressivo, principalmente a partir do sétimo mês. Santiago et al. (2014b) avaliaram concentrações de ésteres em cachaças armazenadas em amburana e carvalho. Os autores constataram uma significativa variação em sua concentração ao longo do tempo de armazenamento da cachaça no tonel de amburana, ocorrendo um aumento expressivo de 51,241 a 101,031 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro e, no tonel de carvalho, aumento significativo variado de 34,828 a 42,269 mg 100 mL⁻¹ a.a., dados que corroboram com os encontrados neste estudo.

Tabela 3 Avaliação de aldeídos e ésteres em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.

Tonel	Aldeídos (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 15,608±0,278					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	15,089 cF	15,627 bE	16,011 cD	16,180 cC	16,346 dB	16,434 dA
B	15,228 bF	15,413 cE	15,518 eD	15,959 eC	16,413 cB	17,176 bA
C	15,259 bF	15,864 aE	16,833 aD	17,579 aC	17,976 aB	18,576 aA
J	15,581 aF	15,879 aD	15,751 dE	16,037 dC	16,481 bB	16,523 cA
P	15,114 cE	15,657 bD	16,183 bB	16,390 bA	16,184 eB	16,136 eC
Tonel	Ésteres (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 9,635±0,023					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	7,937 dF	12,158 dE	14,079 eD	16,391 eC	18,536 eB	22,777 cA
B	10,013 bF	12,392 cE	14,555 cD	17,245 bC	19,853 aB	24,574 bA
C	10,033 bF	14,400 aE	16,404 aD	18,856 aC	19,186 cB	21,400 dA
J	11,898 aF	14,414 aD	14,297 dE	16,770 cC	19,293 bB	25,789 aA
P	9,938 cF	14,213 bE	16,264 bD	16,604 dC	18,945 dB	20,988 eA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas (em relação a cada parâmetro) não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba).

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 armazenamento. 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 à 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).

Os valores de furfural estão apresentados na Tabela 4. O furfural é um contaminante orgânico dispensável em cachaças e bebidas alcoólicas. Esse composto é resultante da decomposição química de carboidratos e pode ser formado em diferentes etapas do processo de produção da cachaça, como a pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques ou mesmo durante o envelhecimento da bebida por meio da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), que podem estar presentes nos recipientes de madeira utilizados no armazenamento (MASSON et al., 2007; AZEVÊDO et al., 2007; ZACARONI et al., 2011). Pelos resultados da Tabela 4, 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. Estatisticamente, as amostras armazenadas nas diferentes madeiras ao longo dos 12 meses, apresentaram valores distintos, sendo as bebidas em carvalho e peroba julgadas semelhantes.

Tabela 4 Avaliação de furfural e álcoois superiores em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.

Tonel	Furfural (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 0,586±0,004					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	0,534 cC	0,792 bA	0,761 bB	0,810 cA	0,815 cA	0,752 dB
B	0,475 dD	0,525 dC	0,536 cC	0,555 eC	0,723 dB	0,879 cA
C	0,308 eD	0,638 cC	0,751 bB	0,747 dB	0,953 bA	0,937 bA
J	1,132 aE	1,642 aD	1,989 aC	2,194 aB	2,643 aA	2,216 aB
P	0,639 bC	0,773 bB	0,764 bB	0,910 bA	0,943 bA	0,919 bA
Tonel	Álcoois superiores totais (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 155,407±1,126					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	155,330 cA	154,557 cA	163,645 aB	155,111 cC	159,990 bD	167,213 aC
B	155,273 dA	157,785 dA	173,513 cA	172,551 cB	179,857 bA	185,197 aA
C	153,062 dA	157,718 cA	166,961 bB	158,027 cC	171,731 aC	172,769 aB
J	157,704 cA	158,173 cA	171,238 bA	157,999 cC	170,933 bC	176,057 aB
P	155,088 cA	157,602 cA	167,457 bB	166,001 bB	176,515 aB	174,721 aB

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas (em relação a cada parâmetro) não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba).

Miranda, Horii e Alcarde (2006) avaliaram cachaças armazenadas em tonéis de madeira submetidos ao tratamento de irradiação por período de 390 dias e não observou influência do processo de envelhecimento na formação de furfural. Barcelos et al. (2007), analisando cachaças produzidas a partir de cana não queimada proveniente de três regiões do Estado de Minas Gerais, verificaram concentrações de furfural dentro do limite estabelecido pelo MAPA. Os autores atribuíram a formação do furfural a falhas durante o processo

fermentativo. Masson et al. (2007) quantificaram furfural em amostras de cachaças produzidas com cana queimada e não queimada e verificaram que a queima do palhço da cana-de-açúcar proporcionou um aumento significativo na concentração de furfural nas amostras analisadas. Zacaroni et al. (2011) avaliaram a presença de contaminantes orgânicos, entre eles furfural, de cachaça produzidas em Minas Gerais. Os autores encontraram teores de furfural que variaram de 4,28 a 39,78 mg 100⁻¹ mL de a.a, sendo atribuído sua contaminação ao processo de produção.

Os álcoois superiores totais e o mesmo fracionado (butan-1-ol, propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol) estão representados nas Tabelas 4 a 6. Após 12 meses de armazenamento, todas as amostras apresentaram similaridade quanto aos teores de álcoois superiores totais e não ultrapassaram do limite exigido pela Legislação. Em relação aos fracionados, eles apresentaram semelhanças com os resultados dos álcoois superiores totais, sendo semelhantes as amostras ao longo dos 12 meses de armazenamento. Sabe-se que esses compostos, juntamente com os ésteres, são os responsáveis pelo aroma da bebida; 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. A baixa concentração de álcoois superiores encontrados neste estudo pode estar relacionada com os cuidados no corte da cana, assim como no tempo de espera para a moagem e fermentação (CARDOSO, 2013).

Tabela 5 Avaliação de butan-1-ol e propan-1-ol em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.

Tonel	Butan-1-ol (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 2,617±0,008					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	2,678 aA	2,434 bB	2,103 dC	2,086 dC	2,040 bD	1,979 cE
B	2,698 aA	2,513 aB	2,218 aD	2,287 aC	2,164 aE	2,165 aE
C	2,721 aA	2,495 aB	1,897 eE	2,156 cC	2,071 bD	2,077 bD
J	2,707 aA	2,477 bB	2,178 bC	2,134 cD	2,179 aC	2,078 bE
P	2,697 aA	2,467 bB	2,150 cD	2,213 bC	2,070 bE	2,076 bE
Tonel	Propan-1-ol (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 44,149±0,064					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	49,732 aB	51,112 aB	51,713 aA	50,547 bB	51,869 cA	52,879 cA
B	49,904 aE	51,524 aD	53,450 aC	54,797 aB	55,968 aA	57,098 aA
C	49,285 aD	51,938 aB	52,177 aB	50,811 bC	54,300 bA	54,404 bA
J	50,142 aC	51,396 aC	52,578 aB	50,479 bC	54,188 bA	54,248 bA
P	49,772 aD	51,524 aC	52,549 aB	53,734 aA	54,461 bA	54,800 bA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas (em relação a cada parâmetro) não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba).

Tabela 6 Avaliação de 2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.

Tonel	2-metilpropan-1-ol (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 28,809±0,228					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	29,208 aC	28,981 aC	30,788 bB	29,057 eC	30,231 dB	31,556 cA
B	29,100 aD	29,808 aD	32,546 aC	32,786 aC	34,354 bB	35,706 aA
C	28,948 aD	29,635 aD	31,551 bB	30,448 cC	33,025 cA	33,348 bA
J	29,751 aC	29,535 aC	32,021 aB	30,045 dC	32,456 cB	33,684 bA
P	29,596 aD	29,361 aD	32,045 aC	31,424 bC	35,212 aA	33,519 bB
Tonel	3-metilbutan-1-ol (mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro)					
	Coração (tempo zero): 82,448±1,289					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	76,388 aB	74,462 aC	81,143 bA	75,504 cC	77,888 dB	82,776 dA
B	76,266 aE	76,451 aE	87,515 aC	84,966 aD	89,533 aB	92,392 aA
C	74,828 aB	76,143 aB	83,232 bA	76,768 cB	84,404 cA	85,015 cA
J	77,810 aC	77,241 aC	86,638 aA	77,474 cC	84,287 cB	88,127 bA
P	75,718 aD	76,717 aD	82,862 bB	80,841 bC	86,840 bA	86,401 bA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas (em relação a cada parâmetro) não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba).

Diferentemente dos propan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol, que são álcoois superiores responsáveis pelo aroma e sabor de bebidas alcoólicas, o butan-1-ol é um álcool superior caracterizado como contaminante orgânico em bebidas. Pelos resultados da Tabela 5, pode-se observar que sua concentração diminuiu em todas as amostras ao longo do armazenamento e não ultrapassou o limite máximo imposto pela Legislação (3 mg 100 mL⁻¹ a.a.). Essa diminuição pode estar relacionada a uma possível esterificação; segundo Parazzi

et al. (2008), durante o envelhecimento de bebidas, os principais ésteres encontrados são ésteres de álcoois superiores.

Na Tabela 7, estão representados os valores obtidos para o extrato seco total das amostras envelhecidas nos diferentes tonéis de madeiras.

Tabela 7 Avaliação de extrato seco em função do tempo de armazenamento da cachaça dos tonéis em estudo.

Tonel	Extrato seco (g L ⁻¹)					
	Coração (tempo zero): 0,016±0,005					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	0,507 aF	0,892 aE	1,266 aD	1,463 aC	1,516 aB	1,570 aA
B	0,482 bF	0,830 bE	1,092 bD	1,276 bC	1,320 bB	1,378 bA
C	0,358 cF	0,522 cE	0,704 cD	0,776 cC	0,798 cB	0,923 cA
J	0,160 dE	0,242 dD	0,364 dC	0,419 dB	0,420 dB	0,481 dA
P	0,110 eE	0,170 eD	0,181 eD	0,222 eC	0,250 eB	0,302 eA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba).

O limite estabelecido na Legislação para extrato seco total é de 6 g L⁻¹. Pelos resultados descritos na Tabela 7, pode-se observar um aumento gradativo em todo o processo de armazenamento e as amostras não apresentaram similaridade. De acordo com Dias, Maia e Neslon (1998), Mori et al. (2003) e Santiago et al. (2014c), quanto maior o tempo de estocagem, maior a extração direta dos componentes da madeira, aumentando, conseqüentemente, o teor de extrato seco. Esse fato pode ser observado 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.

Vale ressaltar que cobre, metanol e butan-2-ol não foram detectados ao longo do tempo de armazenamento. A contaminação por cobre é uma preocupação comum de produtores de cachaça de alambique, pois os destiladores são confeccionados por cobre e se eles não apresentarem boas condições e correta higienização, a bebida pode vir a ser contaminada pelo metal. 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 água e limão na primeira destilação ou utilizando filtros com adsorventes, como o carvão ativado, resinas de troca iônica e argilas naturais (CANTANHEDE et al., 2005; LIMA et al., 2006; NEVES et al., 2007; LIMA et al., 2009; CANTÃO et al., 2010; DUARTE et al., 2014; ZACARONI et al., 2015). No presente estudo, a não contaminação por cobre se dá pela boa higienização e boas práticas de fabricação proposta pela empresa onde o experimento foi realizado.

A ausência de contaminação por butan-2-ol pode ser decorrente do fato de que após o corte da cana, a moagem foi realizada e conseqüentemente o caldo filtrado encaminhado para as dornas de fermentação. Segundo Souza et al. (2010) e Cardoso (2013), a contaminação por butan-1-ol e butan-2-ol ocorre por bactérias acetobutílicas quando a cana fica estocada para depois, se moída.

O metanol presente em cachaça origina-se do metabolismo secundário das leveduras. Os fatores que propiciam sua formação são a queima da cana-de-açúcar no momento da colheita, o acréscimo de frutas ao caldo de cana durante a

fermentação e a presença de bagacilhos não filtrados após a moagem da cana. Os bagacilhos são ricos em substâncias pécticas, polímeros de ácido galacturônico com grau variável de metoxilação. A atuação de enzimas pécticas das leveduras libera o metanol. No organismo, o metanol é oxidado a ácido fórmico e, posteriormente, a CO_2 , provocando acidose (diminuição do pH sanguíneo) e afetando o sistema respiratório, podendo levar ao coma e até mesmo à morte (MAIA; CAMPELO, 2006; ALCARDE; SOUZA; BELLUCO, 2010; CARDOSO, 2013). Neste experimento, não houve contaminação das bebidas por metanol, devido à filtragem correta realizada após a moagem da cana.

Nos resultados das análises físico-químicas das cachaças armazenadas nos tonéis de amburana, balsamo, carvalho, jatobá e peroba, foram aplicados a ACP, pois eles não apresentaram valores significativos para esse tipo de análise.

Na Tabela 8, estão representados os compostos voláteis identificados por SPME-GC-MS e seus respectivos tempos de retenção. Pelos resultados, pode-se observar uma heterogeneidade nas amostras analisadas referente as frações do destilado e ao tipo de madeira utilizado para o armazenamento.

31	26,600	1-(hydroxymethyl)- 2,5,5,8a- tetramethyldecahydro- 2-naphthalenol	1467	-	82							X	X
32	27,000	Curcumene< γ >	1480	1481	94							X	
33	27,296	Bergamotene <alpha- trans->	1490	-	94							X	
34	27,444	Nerolidol, acetate	1495	-	82							X	
35	27,719	Farnesene	1504	1505	91							X	
36	27,839	α -Bisabolene	1508	1506	95							X	
37	28,522	Nerolidol A (cis or trans)	1531	1531	80							X	
38	28,811	α -Caryophyllene	1541	-	88							X	
39	29,398	Nerolidol	1560	1561	96	X					X	X	X
40	29,795	1,6,10-Dodecatrien-3- ol, 3,7,11-trimethyl-, [S-(Z)]-	1574	-	88							X	
41	30,350	Ethyl dodecanoate	1593	1593	89	X	X		X	X	X	X	X
42	31,324	Cubenol	1627	1627	83								X
43	31,777	Pentadecanoic acid, 3- methylbutyl ester	1643	-	87	X							
44	33,045	α -bisabolol	1689	1685	93							X	
45	33,109	Farnesol <2Z,6Z>	1691	1698	90							X	
46	33,853	Farnesol <2E,6Z>	1718	1714	90							X	
47	35,829	Ethyl tetradecanoate	1794	1795	93	X	X		X	X	X	X	X
48	36,051	6,10-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)- (.+-.)-	1801	-	86	X	X		X	X	X	X	X
49	36,882	Farnesyl acetate (E,Z)	1833	1821	94							X	
50	40,099	Naphthalene, 2,6- bis(1,1-dimethylethyl)-	1963	-	75							X	X
51	40,827	Ethyl hexadecanoate	1993	1992	93	X	X	X	X	X	X	X	X

(W1= “cabeça”, W2= “coração”, W3= “cauda”, A= amburana, B= bálsamo, C=carvalho, J= jatobá, P= peroba).

Foi possível constatar a presença de vários compostos voláteis importantes para o aroma das cachaças. Ao todo, foram identificados 51 compostos distintos, sendo identificados 24 na fração “cabeça”, 24 no “coração”, 19 na “cauda”, 20 em amburana, 14 em bálsamo, 21 em carvalho, 28 em jatobá e 22 em peroba. Os álcoois, ácidos, ésteres e sesquiterpenos foram os principais grupos encontrados neste estudo, sendo os compostos acetato de etila (1); 2-metilpropan-1-ol (2); 1,1-dietoxietano (3); 3-metilbutan-1-ol (4); 2-

metilbutan-1-ol (5), decanoato de etila (27) e hexadecanoato de etila (51) identificados em todas as amostras.

Nonato et al. (2001) extraíram compostos voláteis do headspace da cachaça por SPME com fibra PA e identificaram por GC-MS. Os autores detectaram 38 compostos, dos quais 11 eram ésteres. Nobrega (2003) identificou compostos voláteis relevantes ao aroma da cachaça. Utilizou um método de extração de voláteis nunca antes testado para cachaça, com a finalidade de se obter a concentração dinâmica dos compostos voláteis presentes no "headspace" da cachaça em armadilha, contendo o adsorvente Tenax-TA e a identificação e quantificação foram realizadas por meio GC-MS. Neste estudo, foram identificados cerca de 100 compostos, mas os autores acharam de suma importância apenas 22 compostos (ésteres e álcoois), pois eles são responsáveis pelo sabor e aroma das bebidas. Cardeal e Marriott (2009) avaliaram compostos voláteis em cachaças brasileiras utilizando a técnica GC-GC-MS bidimensional. Por ser uma técnica mais refinada, os autores conseguiram identificar cerca de 200 compostos nas bebidas. Bento et al. (2015) determinaram compostos voláteis utilizando a estratégia de headspace dinâmico a vácuo e identificação por GC-MS de cachaças produzidas no estado de Pernambuco. Os autores identificaram cerca de 30 compostos voláteis, sendo a maioria ésteres; também identificaram compostos que são tóxicos e carcinogênicos (tolueno e o-xileno), os quais podem ser originários da madeira utilizada na confecção do barril.

A ACP foi aplicada nos compostos voláteis (SPME-GC-MS) das frações da destilação e nas cachaças armazenadas nos respectivos tonéis em estudo. A Figura 2 representa o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores dos compostos voláteis analisados das cachaças armazenadas nos diferentes tonéis.

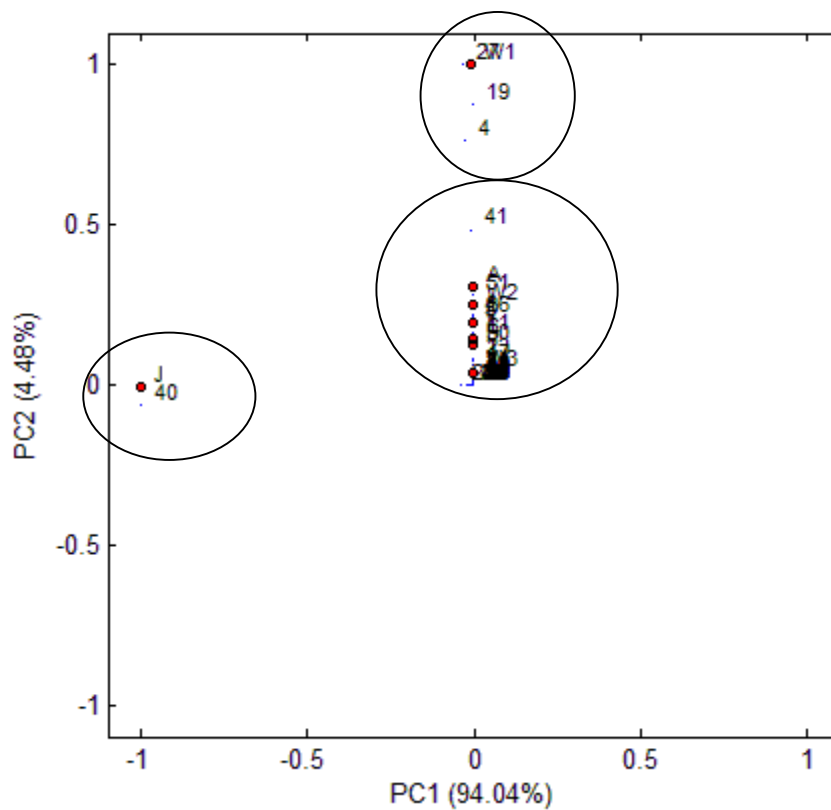


Figura 2 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores dos compostos voláteis analisados por SPME-GC-MS das cachaças

Pelos resultados da Figura 2, a ACP mostrou que, com a primeira e a segunda componente principal, foi possível descrever 98,52% dos dados, sendo 94,04% da variância total descrita pela primeira componente principal. Foi possível observar 3 agrupamentos; a cachaça envelhecida em jatobá foi diferenciada das demais pelo composto 40 (1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, [S-(Z)]-), a fração “cabeça” pelos compostos 4 (1-Butanol, 3-

methyl-), 19 (Ethyl octanoate) e 27 (Ethyl decanoate) e as demais amostras apresentaram similaridade pelos demais compostos.

4 Conclusão

Pelos resultados das análises físico-químicas, as frações do destilado apresentaram valores distintos, tendo a fração “cabeça” e “cauda” apresentado valores inapropriados quanto aos parâmetros grau alcoólico, aldeídos e butan-1-ol. A fração “coração” apresentou todos os parâmetros analisados dentro dos limites estabelecidos pela Legislação, sendo, portanto, apropriada para o consumo. A fração nobre, “coração”, durante o processo de armazenamento, apresentou valores dentro do limite máximo permitido pela Legislação, sendo os perfis físico-químicos se comportado diferentemente em relação a cada tipo de madeira utilizada, durante o período analisado de 12 meses.

Pela SPME-GC-MS, foi possível observar vários compostos voláteis importantes para o aroma das cachaças, sendo os álcoois, ácidos, ésteres e sesquiterpenos os principais compostos encontrados neste estudo, identificados ao todo 51 compostos. Pela ACP, a amostra envelhecida em jatobá se diferiu das demais pelo composto 40 (1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, [S-(Z)]-), a fração “cabeça” pelos compostos 4 (1-Butanol, 3-methyl-), 20 (Ethyl octanoate) e 28 (Ethyl decanoate), enquanto as demais amostras apresentaram similaridade com relação aos demais compostos.

5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES), pelo apoio financeiro e bolsa concedida. À Cachaça Artesanal João Mendes, pela valiosa contribuição e por ceder as amostras de cachaças.

6 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, jul./dez. 2005.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured, 2007.

ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BELLUCO, A. E. S. Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, Suppl. 1, p. 226-232, maio 2010.

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. Evolution of the concentration of phenolic compounds in cachaça during aging in an oak (*Quercus* sp.) Barrel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, p. 1307-1314, 2011.

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.

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, 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, jul./ago. 2007.

BENTO, W. A. S. et al. Controle de qualidade e distinção da região de produção das cachaças no estado de Pernambuco. **Revista Analytica: a revista da instrumentação e controle de qualidade**, São Paulo, n. 76, p. 61-68, abr./maio 2015.

BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 13, de 29 de junho de 2005a. **Diário Oficial [da] União** de 30 jun. 2005, Seção 1, Página 3. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

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. **Diário Oficial [da] União de 20 set. 2005**, Seção 1, Página 11. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13576>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

CANTANHEDE, L. B. et al. Uso de sílica e sílica-titânia organofuncionalizadas para a remoção de Cu (II) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 500-505, 2005.

CANTÃO, F. O. et al. Avaliação e remoção de cobre em aguardentes de cana pela utilização dos aluminossilicatos: zeólita e bentonita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1109-1115, 2010.

CARDEAL, Z. L.; MARRIOTT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in brazilian cachaça and selected spirits. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 3, p. 747-755, 2009.

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, abr. 2003.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

DIAS, S. M. B. C.; MAIA, A. B. R. A.; NELSON, D. L. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 331-334, ago. 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.

DUARTE, F. C. et al. Removal of copper in cachaças using clays. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 4, p. 382-389, jun. 2014.

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

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

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, A. 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.

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

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

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.

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, out./dez. 2006.

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

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

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Chemistry webook**. 2013. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

NEVES, E. A. et al. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 33-36, 2007.

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

NOBREGA, I. C. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 210-216, maio/ago. 2003.

NONATO, E. A. et al. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 8, p. 3533-3539, July 2001.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012.

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, jan./mar. 2008.

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, out. 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.

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.

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.

SANTIAGO, W. D. et al. Comparison and quantification of the development of phenolic compounds during the aging of cachaça in oak (*Quercus sp.*) and amburana (*Amburana Cearensis*) barrels. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 21, p. 3140-3150, Oct. 2014a.

SANTIAGO, W. D. et al. Comparação do perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*) e amburana (*Amburana cearensis*). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 17-29, 2014b.

SANTIAGO, W. D. et al. Correlação entre extrato seco total, composição fenólica total e intensidade de cor de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*) e amburana (*Amburana cearensis*) em um período de 12 meses. **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 9-15, 2014c.

SANTIAGO, W. D. et al. Multivariate analysis for the characterization of physico-chemical profile of cachaça produced in copper stills on period for six

years on Minas Gerais state. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 121, p. 244-250, 2015.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Evolução histórica do mercado de cachaça**. 2008. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Potencial da cachaça brasileira**. 2014. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SOUZA, L. M. et al. Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na região Norte Fluminense – Rio de Janeiro. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2304-2309, 2010.

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

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

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

ARTIGO 2

Cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaea carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*): composição fenólica, intensidade de cor, extrato seco e graduação alcoólica

Resumo

O envelhecimento é a última etapa do processo de produção de cachaça. 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 em função das condições de umidade relativa e da temperatura do local de armazenamento. A madeira tradicionalmente usada no Brasil é o carvalho. Embora o carvalho seja o mais utilizado, várias madeiras de origem nativa brasileira têm sido utilizadas na confecção de tonéis. Os principais compostos extraídos da madeira pelos destilados são: compostos voláteis, compostos fenólicos, substâncias tânicas, açúcares, glicerol e ácidos orgânicos não voláteis. Os objetivos deste trabalho foram avaliar e comparar o desenvolvimento fenólico em cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho, amburana, jatobá, bálsamo, peroba e, paralelo a isso, foram avaliados alguns parâmetros físico-químicos que são alterados ao longo do processo de armazenamento. Após os 12 meses de armazenamento, foi possível observar uma diminuição na graduação alcoólica e um aumento no extrato seco. Pelos resultados dos compostos fenólicos totais e intensidade de cor, foi constatado um aumento em ambos os parâmetros, e pelo teste de correlação linear entre compostos fenólicos totais, extrato seco e intensidade de cor, constatou-se uma correlação linear muito forte. De acordo com os resultados dos compostos fenólicos analisados por HPLC, foi possível observar um aumento progressivo em todos os compostos analisados e uma heterogeneidade em todas as madeiras utilizadas para o armazenamento das bebidas.

Palavras-chave: bebida alcoólica, armazenamento, compostos orgânicos, HPLC.

Abstract

Aging is the last stage of the cachaça production process. Containers used for aging are the wooden barrels and casks, which act as a semi-permeable membrane, allowing the passage of alcohol vapor and water vapor. This passage is a function of the relative humidity and the temperature of the storage location. The wood traditionally used in Brazil is oak. However, various native woods of Brazilian origin have been used in the manufacture of barrels. The principal compounds extracted from wood by the distillates are volatile compounds, phenolic compounds, tannic substances, sugars, glycerol and nonvolatile organic acids. The objectives of this study were to evaluate and compare the phenolic substances found in cachaça stored in recently constructed oak, amburana, Jatoba, balsam, and peroba casks. We evaluated some physicochemical parameters that changed during the storage process. After 12 months of storage, we observed a decrease in alcohol content and an increase in dry extract. An increase in total phenolic compounds and color intensity was observed, and there was a strong linear correlation between total phenolic compounds, solids and color intensity,. According to the results for the phenols analyzed by HPLC, a progressive increase in all the compounds and a heterogeneity in all woods used for the storage of beverages were observed.

Keywords: alcoholic beverage, storage, organic compounds, HPLC.

1 Introdução

A cachaça, largamente consumida no Brasil, é uma bebida produzida em todas as regiões do país. Estima-se uma produção anual de 1,4 bilhão de litros de cachaça. São registradas 4 mil marcas e aproximadamente 40 mil produtores legalizados e não legalizados. De acordo com a Legislação, 90% são de pequeno produtor. No mercado, a cachaça é encontrada em mais de 960 mil pontos de vendas, entre bares, supermercados e restaurantes, gerando cerca de 600 mil empregos diretos, além de um faturamento anual de mais de U\$600 milhões. Estima-se um consumo médio anual de 11,5 litros por habitante. 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 (SEBRAE, 2008; 2014).

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). 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 (CARDOSO, 2013).

De acordo com a legislação, para que a bebida seja considerada envelhecida, ela deve se enquadrar na denominação proposta, em que 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 (BRASIL, 2005a). Além de ser considerada envelhecida, com o decorrer dos anos de armazenamento, as cachaças envelhecidas recebem

algumas denominações. 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).

Os recipientes utilizados para o envelhecimento são os barris e tonéis de madeira, que atuam como uma membrana semipermeável, permitindo a passagem de vapores de álcool e água, que ocorrem em função das condições de umidade relativa e da temperatura do local de armazenamento. No entanto, as perdas ao longo do ano dependem de vários outros fatores, tais como dilatação e contração da aguardente de cana dentro do tonel, vazamentos e expulsão de aguardente por frestas e consequente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, devido à inadequação de instalações e de ambientes, além do modo de armazenamento (ANJOS et al., 2011).

O carvalho (*Quercus* sp) é a madeira tradicionalmente usada para o envelhecimento de cachaça e outras bebidas destiladas no Brasil. Mas várias madeiras nativas brasileiras estão sendo utilizadas na confecção de barris e tonéis para o envelhecimento de cachaça, como amendoim (*Pterogyne nitens*), cerejeira (*Amburana cearensis*), cedro (*Cedrela fissilis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), ipê (*Tabebuia* sp), freijó (*Cordia goeldiana*), garapa (*Apuleia leiocarpa*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), vinhático-amarelo (*Plathynemia foliosa*), peroba (*Paratecoma peroba*) e jequitibá (*Carinian legalis*) (ANJOS et al., 2011; MORI; MENDES; MORI, 2013). Esse fato tem sido observado devido ao alto custo do carvalho, que é uma madeira típica do Hemisfério Norte. Porém, ainda há grande carência de estudos sistemáticos para caracterização dos

compostos extraídos de cada tipo de madeira durante o envelhecimento da bebida (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; AQUINO et al., 2006a; 2006b).

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; AQUINO et al., 2006a; CARDOSO, 2013).

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).

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 et al., 2011; SANTIAGO et al., 2014a).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar e comparar o desenvolvimento fenólico em cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e peroba (*Paratecoma peroba*) e, paralelo a

isso, foram avaliados alguns parâmetros físico-químicos que são alterados ao longo do processo de envelhecimento.

2 Material e métodos

Confecção dos tonéis

Os tonéis foram confeccionados no município de Ponte Nova-MG, situado na região Zona da Mata Mineira. As madeiras amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba foram adquiridas pela tanoaria encarregada na fabricação dos tonéis. A confecção foi realizada com madeira nova ou virgem, exceto a de carvalho. A madeira de carvalho foi obtida de um tonel de carvalho europeu de 200 litros, o qual foi desmontado e lixado para sua obtenção. Esse procedimento foi realizado por não ser uma madeira nativa brasileira, já as demais foram adquiridas de madeireiras especializadas.

Todos os tonéis utilizados no estudo apresentavam um volume final de 20 litros cada um. Eles foram confeccionados nas seguintes dimensões: 40 cm de comprimento, 30 cm de altura, 102 cm de raio central e 1,8 cm de espessura da madeira.

Após a confecção, os tonéis foram curtidos com água destilada, a qual foi trocada a cada 5 dias até completar 30 dias.

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 2014. A variedade de cana empregada foi a RB86-7515, o processo de fermentação foi realizado com fubá e, como micro-organismo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O preparo do fermento foi realizado por 5 dias e a fermentação do mosto de cana teve duração de 18 horas, em que o grau Brix inicial era 20°. Após o Brix zerar, o vinho foi destilado em alambique de

cobre de 1000 litros. Na destilação obtiveram 15 litros para fração “cabeça”, 180 litros para “coração” e 144 litros para “cauda”.

A fração “coração” foi transferida para os tonéis de carvalho, amburana, bálsamo, jatobá e peroba, onde foram estocados 20 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.

A cada dois meses, por um período de 12 meses, foram coletadas amostras de 2 litros e encaminhadas para a realização das análises físico-químicas e análises cromatográficas, que foram realizadas no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardentes do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas e cromatográficas foram realizadas periodicamente, em triplicata. As análises de grau alcoólico e extrato seco foram realizadas de acordo com as especificações estabelecidas pela Instrução Normativa nº 24, de 08/09/2005, do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2005b).

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., 2011).

Compostos fenólicos totais

A análise foi determinada utilizando o método de Folin-Ciocalteu modificado (SINGLETON; ROSSI, 1965; LIN et al., 2005; ANJOS et al., 2011; SANTIAGO et al., 2014c).

Compostos fenólicos por HPLC

Os compostos fenólicos foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As análises foram realizadas em um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de arranjo de diodos (PDA). A coluna empregada foi uma Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent – Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 µm).

A metodologia utilizada para a análise dos 12 compostos fenólicos nas cachaças armazenadas em tonéis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anjos et al. (2011) e Santiago et al. (2014a).

Os compostos fenólicos analisados foram o ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido sirínico, vanilina, siringaldeído, ácido p-cumárico, ácido sinápico, cumarina, 4-metilumbeliferona e ácido o-cumárico. Os padrões desses compostos 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.

O método utilizado para a quantificação 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. Nesta

solução intermediária, os padrões encontravam-se nas seguintes concentrações: ácido gálico (6,80 mg L⁻¹), catequina (11,61 mg L⁻¹), ácido vanílico (6,73 mg L⁻¹), fenol (3,76 mg L⁻¹), ácido sirínico (7,93 mg L⁻¹), vanilina (6,08 mg L⁻¹), siringaldeído (7,29 mg L⁻¹), ácido *p*-cumárico (6,56 mg L⁻¹), ácido sinápico (8,97 mg L⁻¹), cumarina (5,85 mg L⁻¹), 4-metilumbeliferona (7,05 mg L⁻¹) e ácido *o*-cumárico (6,56 mg L⁻¹).

Foram utilizados como fase móvel para a eluição dos compostos analisados a solução de ácido acético a 2% em água (Solvente A) e metanol: água: ácido acético (70: 28: 2% v/v) (Solvente B). As amostras e os padrões foram eluídos de acordo com o gradiente de 0 a 25 min (00-40% B); 25-40 min (40-55% B); 40-50 min (55-100% B); 50-60 min (100-00% B). O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

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

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método utilizado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (ANJOS et al., 2011; SANTIAGO et al. 2014a).

Análise estatística

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

(FERREIRA, 2011). Aplicou-se a análise das componentes principais (ACP), para averiguar possíveis similaridades entre as madeiras em estudo frente aos compostos fenólicos. Os resultados foram centrados em médias, para posterior análise. A análise foi realizada utilizando o programa CHEMOFACE (NUNES et al., 2012).

3 Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão representados os resultados obtidos para as avaliações físico-químicas (Grau alcoólico e extrato seco total) da fração “coração” e das bebidas armazenadas nos diferentes tipos de tonéis.

Pelos resultados apresentados na Tabela 1, é possível observar que, após 12 meses de armazenamento, as cachaças armazenadas nas diferentes madeiras apresentaram valores distintos quanto à sua graduação alcoólica; em todos tonéis ocorreram diminuição significativa quando se comparado com o valor da fração “coração”. De acordo com Miranda, Horii e Alcarde (2006), Anjos et al. (2011) e Santiago et al. (2014a), a diminuição da graduação alcoólica de cachaças, ao longo do envelhecimento, ocorre pela decorrente 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.

Tabela 1 Avaliação do grau alcoólico e extrato seco total da fração “coração” e das bebidas armazenadas nos diferentes tonéis.

Tonel	Grau alcoólico (% v/v)					
	Coração (tempo zero): 46,530 ± 0,110					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	44,745 aA	43,815 aC	44,145 aB	43,335 aD	43,110 aE	42,880 aF
B	44,335 bA	42,990 cB	42,700 eC	41,190 dD	40,250 eE	39,745 eF
C	44,245 bA	43,160 bC	43,300 dB	42,380 cD	41,650 cE	41,490 cF
J	44,775 aA	43,120 bC	43,470 cB	42,355 cD	41,420 dE	41,315 dF
P	44,670 aA	43,730 aB	43,675 bB	42,780 bC	42,180 bE	42,305 bD
Tonel	Extrato seco (g L ⁻¹)					
	Coração (tempo zero): 0,016 ± 0,005					
	Tempo de armazenamento (meses)					
	2	4	6	8	10	12
A	0,507 aF	0,892 aE	1,266 aD	1,463 aC	1,516 aB	1,570 aA
B	0,482 bF	0,830 bE	1,092 bD	1,276 bC	1,320 bB	1,378 bA
C	0,358 cF	0,522 cE	0,704 cD	0,776 cC	0,798 cB	0,923 cA
J	0,160 dE	0,242 dD	0,364 dC	0,419 dB	0,420 dB	0,481 dA
P	0,110 eE	0,170 eD	0,181 eD	0,222 eC	0,250 eB	0,302 eA

(As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas (em relação a cada parâmetro) não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba).

Pelos resultados, pode-se observar um aumento gradativo em todo o processo de armazenamento, em que as amostras se comportaram distintas quanto à incorporação de compostos extraídos das madeiras. De acordo com Dias, Maia e Neslon (1998), Mori et al. (2003) e Santiago et al. (2014b), quanto maior o tempo de estocagem, maior a extração direta dos componentes da madeira, aumentando, conseqüentemente, o teor de extrato seco. Esse fato pode

ser observado neste estudo, pois a concentração de extrato seco aumentou com o aumento do tempo de envelhecimento em todos os tonéis em estudo. 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.

Os resultados obtidos para o acompanhamento da composição fenólica total das cachaças armazenadas nos respectivos tonéis em estudos estão representados na Figura 1.

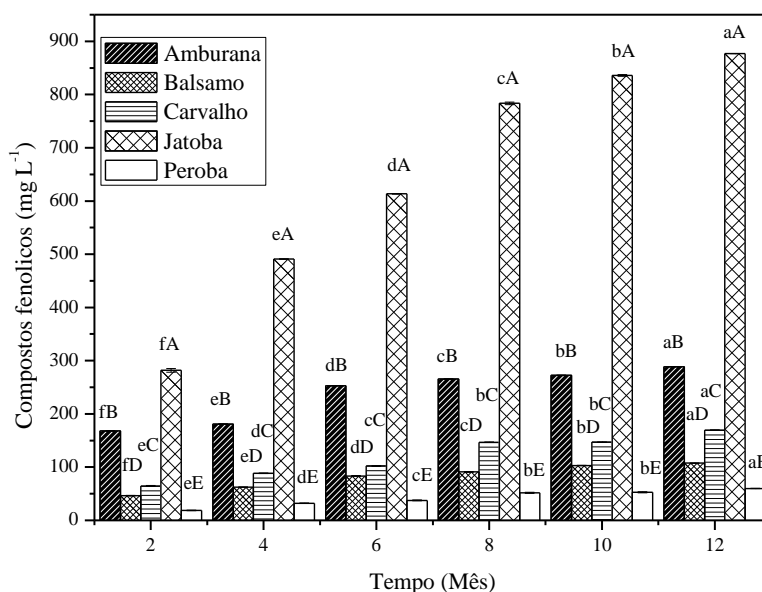


Figura 1 Evolução da composição fenólica total durante o período de armazenamento das cachaças

De acordo com os resultados, foi possível constatar um aumento progressivo, em todas as madeiras, na composição fenólica total ao longo do período de armazenamento das cachaças, não ocorrendo similaridade das madeiras quanto à composição fenólica. As composições fenólicas totais nas madeiras variaram de 167,96 a 288,60 mg L⁻¹ em amburana; 46,27 a 107,48 mg L⁻¹ em bálsamo; 64,69 a 169,57 mg L⁻¹ em carvalho; 281,85 a 876,98 mg L⁻¹ em jatobá e 18,86 a 59,92 mg L⁻¹ em peroba. Para Cardoso (2013) e Santiago et al. (2014b), 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. Mas, pelos resultados, essas hipóteses de extração não são muito válidas, pois todos os parâmetros citados foram semelhantes; portanto essa diferenciação na composição fenólica pode ser explicada pelas características químicas de cada madeira.

Os valores da intensidade da cor estão representados na Figura 2. Assim como na avaliação da composição fenólica total, verificou-se um aumento progressivo durante o período de armazenamento da bebida nos respectivos tonéis de madeira, sendo possível observar a evolução da coloração amarela para amburana, carvalho, jatobá e peroba e uma coloração avermelhada para bálsamo, 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.

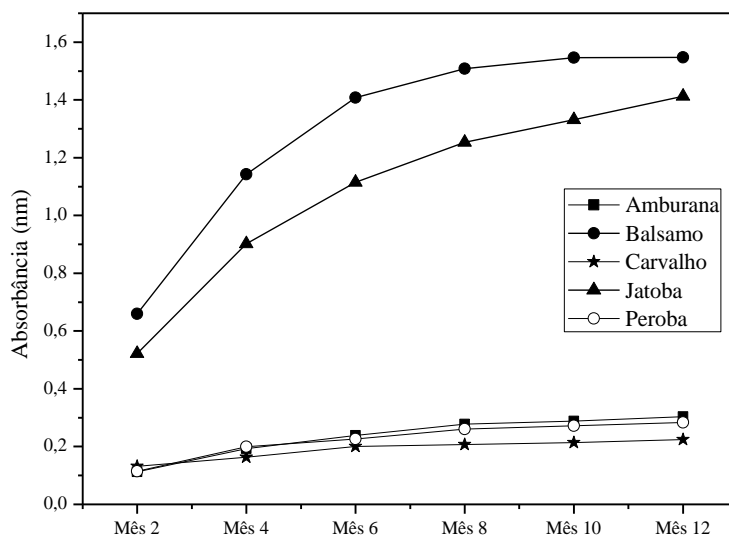


Figura 2 Evolução da intensidade da cor em função do tempo de armazenamento das cachaças nos diferentes tonéis em estudo

Pelos resultados de extrato seco, compostos fenólicos totais e intensidade de cor, foi aplicado o teste de correlação linear (ρ) para avaliar alguma relação entre eles nas amostras armazenadas em cada tipo de madeira em estudo. 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). Pelo teste, 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 todos os tonéis em estudo, onde os coeficientes variaram de 0,997 a 1,000 em amburana; 0,947 a 1,000 em balsamo; 0,929 a 1,000 em carvalho; 0,983 a

1,000 em jatobá e 0,936 a 1,000 em peroba. Verifica-se, pelos dados obtidos, que as variações ocorridas no aumento de um dos parâmetros acarretam um aumento em outro, ao longo do envelhecimento da bebida.

O cromatograma da solução-padrão dos 12 compostos fenólicos analisados por HPLC-DAD está representado na Figura 3. Pode-se observar que os compostos em análise foram bem separados nas condições cromatográficas empregadas.

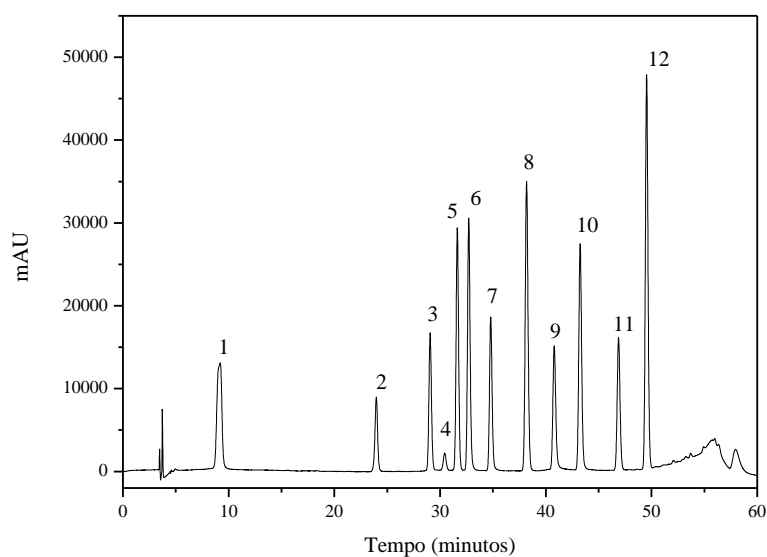


Figura 3 Cromatograma da solução-padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Concentração de cada padrão: $1,161 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Os tempos médios de retenção obtidos para cada composto analisado foram: (1) ácido gálico ($9,320 \pm 0,275 \text{ min}$), (2) catequina ($23,791 \pm 0,172 \text{ min}$), (3) ácido vanílico ($29,034 \pm 0,419 \text{ min}$), (4) fenol ($29,537 \pm 0,398 \text{ min}$), (5) ácido siríngico ($31,510 \pm 0,298 \text{ min}$), (6) vanilina ($32,557 \pm 0,164 \text{ min}$), (7) siringaldeído ($34,549 \pm 0,401 \text{ min}$), (8) ácido *p*-cumárico ($38,005 \pm 0,442 \text{ min}$),

(9) ácido sinápico ($40,495 \pm 0,129$ min), (10) cumarina ($42,815 \pm 0,882$ min), (11) 4-metilumbeliferona ($46,439 \pm 0,187$ min) e (12) ácido *o*-cumárico ($49,241 \pm 0,528$ min), valores que corroboram com aqueles encontrados por Anjos et al. (2011) e Santiago et al. (2014c). 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).

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de correlação (r^2). Foram obtidos coeficientes que variaram de 0,9998 a 0,9999. Tais valores demonstram a forte correlação linear entre a concentração dos compostos analisados e as áreas dos picos, e que valores acima de 0,99 é o recomendado pela literatura (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; HARRIS, 2008).

Os limites de detecção e quantificação foram estimados utilizando-se os parâmetros da curva analítica. Os valores encontrados para limite de detecção e quantificação dos compostos fenólicos variaram de 0,022 a 0,046 mg L⁻¹ e de 0,073 a 0,154 mg L⁻¹, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação dos 12 compostos fenólicos estão representados a seguir: ácido gálico (0,035 e 0,119 mg L⁻¹), catequina (0,046 e 0,154 mg L⁻¹), ácido vanílico (0,038 e 0,127 mg L⁻¹), fenol (0,029 e 0,098 mg L⁻¹), ácido siríngico (0,041 e 0,139 mg L⁻¹), vanilina (0,028 e 0,095 mg L⁻¹), siringaldeído (0,035 e 0,118 mg L⁻¹), ácido *p*-cumárico (0,027 e 0,093 mg L⁻¹), ácido sinápico (0,032 e 0,109 mg L⁻¹), cumarina (0,025 e 0,084 mg L⁻¹), 4-metilumbeliferona (0,034 e 0,114 mg L⁻¹) e ácido *o*-cumárico (0,022 e 0,073 mg L⁻¹). Os valores encontrados são inferiores aos encontrados por Aquino et al. (2006b) e Santiago et al. (2012). Entretanto, são próximos àqueles encontrados por Anjos et al. (2011), Zacaroni et al. (2011) e Santiago et al. (2014a). 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. Anjos et al. (2011) 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. Sanatiago et al. (2014a) encontraram valores de 0,025 a 0,057 mg L⁻¹ e 0,084 a 0,190 mg L⁻¹ para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Pelos resultados, pode-se observar uma boa sensibilidade do método empregado e de acordo com relatos literários; as diferenças encontradas nesses parâmetros podem ser provenientes das distintas condições cromatográficas (aparelhagem e/ou metodologias adotadas para a quantificação dos compostos) (RIBANI et al., 2004; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007).

Outro parâmetro analisado foi a exatidão, sendo ela expressa em ensaios de recuperação. Os resultados médios referentes à porcentagem de recuperação foram de 90% para ácido gálico, 86% para catequina, 101% para ácido vanílico, 82% para fenol, 93% para ácido siríngico, 99% para vanilina, 90% para siringaldeído, 98% para ácido *p*-cumárico, 81% para ácido sinápico, 104% para cumarina, 91% para 4-metilumbeliferona e 82% para ácido *o*-cumárico. Tais valores são aceitáveis (RIBANI et al., 2004; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007) e próximos dos encontrados por Aquino et al. (2006b), Anjos et al. (2011), Zacaroni et al. (2011) e Santiago et al. (2014a).

Os resultados obtidos para a quantificação dos 12 compostos fenólicos por HPLC-DAD, ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonéis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba, estão apresentados nas Tabelas 2 a 6, respectivamente.

Tabela 2 Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L⁻¹) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de amburana.

Tempo de armazenamento (meses)	“Coração”	2	4	6	8	10	12	Evolução (Veze)
Compostos								
Ácido gálico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Catequina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido vanílico	ND	6,884 ±0,053*	12,427 ±0,078*	16,944 ±0,115*	20,726 ±0,130*	22,597 ±0,041*	23,841 ±0,048*	3,463
Fenol	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido siríngico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Vanilina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Siringaldeído	ND	0,118 ±0,002	0,198 ±0,001	0,309 ±0,003	0,373 ±0,001	0,408 ±0,008	0,415 ±0,001	3,516
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	0,122 ±0,012	0,203 ±0,005	0,279 ±0,001	0,324 ±0,004	0,360 ±0,003	0,358 ±0,020	2,934
Ácido sinápico	ND	0,191 ±0,005	0,287 ±0,001	0,325 ±0,018	0,429 ±0,024	0,564 ±0,005	0,665 ±0,047	3,481
Cumarina	ND	16,094 ±0,034*	27,584 ±0,039*	36,839 ±0,071*	44,086 ±0,095*	47,244 ±0,371*	49,448 ±0,247*	3,027
4-metilumbeliferona	ND	6,990 ±0,041*	5,904 ±0,080*	10,640 ±0,012*	10,208 ±0,029*	12,891 ±0,016*	13,933 ±0,037*	1,993
Ácido <i>O</i> -cumárico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Somatório dos compostos fenólicos	-	30,402	46,605	65,336	76,146	84,044	88,660	2,916

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 3 Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L⁻¹) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de bálsamo.

Tempo de armazenamento (meses)	“Coração”	2	4	6	8	10	12	Evolução (Vezes)
Compostos								
Ácido gálico	ND	1,324 ±0,015	1,392 ±0,027	1,690 ±0,018	1,997 ±0,031	2,319 ±0,014	2,422 ±0,021	1,829
Catequina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido vanílico	ND	0,147 ±0,004	0,304 ±0,003	0,470 ±0,003	0,661 ±0,018	0,830 ±0,002	0,863 ±0,004	5,871
Fenol	ND	0,920 ±0,018	1,672 ±0,011	2,308 ±0,009	2,545 ±0,061	2,874 ±0,064	2,959 ±0,075	3,216
Ácido siríngico	ND	1,106 ±0,009	2,343 ±0,023	2,757 ±0,015	3,465 ±0,008	4,444 ±0,016	5,475 ±0,065	4,950
Vanilina	ND	0,968 ±0,014	1,078 ±0,012	1,122 ±0,007	1,242 ±0,020	1,457 ±0,009	1,715 ±0,007	1,771
Siringaldeído	ND	5,273 ±0,034	8,616 ±0,019*	11,260 ±0,001*	13,028 ±0,056*	13,584 ±0,139*	15,175 ±0,217*	2,877
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido sinápico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Cumarina	ND	0,504 ±0,004	0,919 ±0,008	1,173 ±0,007	1,225 ±0,010	1,570 ±0,011	1,743 ±0,019	3,458
4-metilumbeliferona	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido <i>O</i> -cumárico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Somatório dos compostos fenólicos	-	10,242	16,323	20,779	24,162	27,078	30,351	2,963

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

Tempo de armazenamento (meses)	"Coração"	2	4	6	8	10	12	Evolução (Veze)
Ácido gálico	ND	4,090 ±0,091	6,848 ±0,133*	8,815 ±0,025*	10,774 ±0,022*	11,366 ±0,016*	11,496 ±0,042*	2,810
Catequina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido vanílico	ND	7,535 ±0,291*	15,280 ±0,052*	20,074 ±0,161*	23,410 ±0,074*	23,910 ±0,085*	23,853 ±0,071*	3,165
Fenol	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido siríntrico	ND	0,855 ±0,006	1,097 ±0,015	1,210 ±0,029	1,319 ±0,005	1,372 ±0,011	1,406 ±0,003	1,644
Vanilina	ND	<LQ	0,100 ±0,001	0,107 ±0,002	0,129 ±0,001	0,127 ±0,001	0,144 ±0,002	1,440
Siringaldeído	ND	1,672 ±0,011	2,513 ±0,012	3,042 ±0,005	3,487 ±0,011	3,547 ±0,043	3,811 ±0,043	2,279
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	-
Ácido sinápico	ND	0,602 ±0,005	1,155 ±0,003	1,269 ±0,025	1,440 ±0,007	1,500 ±0,011	1,621 ±0,004	2,692
Cumarina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
4-metilumbeliferona	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido <i>O</i> -cumárico	ND	0,158 ±0,001	0,246 ±0,001	0,286 ±0,004	0,311 ±0,001	0,331 ±0,006	0,343 ±0,006	2,171
Somatório dos compostos fenólicos	-	14,913	27,240	34,804	40,869	42,155	42,674	2,861

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 5 Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de jatobá.

Tempo de armazenamento (meses)	"Coração"	2	4	6	8	10	12	Evolução (Veze)
Ácido gálico	ND	1,131 $\pm 0,004$	1,779 $\pm 0,002$	2,306 $\pm 0,006$	2,675 $\pm 0,032$	2,904 $\pm 0,036$	2,943 $\pm 0,016$	2,602
Catequina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido vanílico	ND	0,095 $\pm 0,001$	0,102 $\pm 0,006$	0,258 $\pm 0,015$	0,328 $\pm 0,014$	0,350 $\pm 0,001$	0,340 $\pm 0,012$	3,579
Fenol	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido siríntrico	ND	0,188 $\pm 0,003$	0,306 $\pm 0,001$	0,386 $\pm 0,003$	0,437 $\pm 0,001$	0,476 $\pm 0,003$	0,483 $\pm 0,010$	2,569
Vanilina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Siringaldeído	ND	2,121 $\pm 0,006$	3,650 $\pm 0,009$	4,743 $\pm 0,026$	5,416 $\pm 0,003$	5,722 $\pm 0,013^*$	6,082 $\pm 0,006^*$	2,867
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,103 $\pm 0,002$	1,000
Ácido sinápico	ND	0,157 $\pm 0,006$	0,361 $\pm 0,007$	0,480 $\pm 0,009$	0,605 $\pm 0,007$	0,705 $\pm 0,001$	0,860 $\pm 0,067$	5,477
Cumarina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
4-metilumbeliferona	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido <i>O</i> -cumárico	ND	0,078 $\pm 0,002$	0,079 $\pm 0,001$	0,109 $\pm 0,004$	0,126 $\pm 0,001$	0,131 $\pm 0,008$	0,129 $\pm 0,003$	1,653
Somatório dos compostos fenólicos	-	3,770	6,278	8,283	9,587	10,288	10,939	2,901

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 6 Concentração dos 12 compostos fenólicos (mg L^{-1}) ao longo do período de armazenamento da cachaça em tonel de peroba.

Tempo de armazenamento (meses)	“Coração”	2	4	6	8	10	12	Evolução (Veze)
Compostos								
Ácido gálico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Catequina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido vanílico	ND	19,835 $\pm 0,001^*$	35,253 $\pm 0,011^*$	35,381 $\pm 0,101^*$	55,205 $\pm 0,011^*$	55,241 $\pm 0,093^*$	55,343 $\pm 0,139^*$	2,790
Fenol	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido siríngico	ND	0,909 $\pm 0,005$	1,573 $\pm 0,002$	1,593 $\pm 0,017$	2,536 $\pm 0,024$	3,094 $\pm 0,008$	3,005 $\pm 0,007$	3,305
Vanilina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Siringaldeído	ND	0,166 $\pm 0,002$	0,256 $\pm 0,002$	0,365 $\pm 0,006$	0,407 $\pm 0,025$	0,446 $\pm 0,008$	0,530 $\pm 0,002$	3,192
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	<LQ	0,129 $\pm 0,006$	0,135 $\pm 0,006$	0,209 $\pm 0,002$	0,228 $\pm 0,001$	0,255 $\pm 0,008$	1,976
Ácido sinápico	ND	0,105 $\pm 0,001$	0,173 $\pm 0,004$	0,225 $\pm 0,007$	0,267 $\pm 0,020$	0,355 $\pm 0,006$	0,449 $\pm 0,017$	4,276
Cumarina	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
4-metilumbeliferona	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Ácido O-cumárico	ND	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	-
Somatório dos compostos fenólicos	-	21,015	37,384	37,699	58,624	59,363	59,582	2,835

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.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 2 a 6, foi observado um aumento progressivo da composição fenólicas em todas as madeiras utilizadas para o armazenamento das bebidas. Esse aumento pode ser observado por meio do somatório da concentração dos compostos fenólicos,

após os 12 meses de envelhecimento, que apresentou valores que variaram de 30,402 a 88,660 mg L⁻¹ (para tonel de amburana); 10,242 a 30,351 mg L⁻¹ (para tonel de bálsamo); 14,913 a 42,674 mg L⁻¹ (para tonel de carvalho); 3,770 a 10,939 mg L⁻¹ (para tonel de jatobá) e 21,015 a 59,582 mg L⁻¹ (para tonel de peroba). Observou-se que a cachaça armazenada em tonel de amburana apresentou uma maior concentração fenólica. Esse fato não é condizente com o resultado da análise da composição fenólica total, em que as bebidas armazenadas em jatobá apresentaram a maior concentração; essa diferença é explicada pelas diferentes técnicas utilizadas (espectrofotométrica e cromatográfica). Na análise espectrofotométrica, usou o teste de Folin-Ciocalteu, popularmente conhecido como o teste para medir o conteúdo total de fenóis, medindo 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; 2009b). Apesar de demonstrar valores distintos na concentração fenólica, as madeiras se comportaram de maneira semelhante na extração dos compostos fenólicos, quando se compara em vezes do 2º mês ao 12º mês de armazenamento. No tonel de amburana, houve um aumento na composição fenólica, em vezes, de 2,916; em balsamo de 2,963; em carvalho de 2,861; em jatobá de 2,901 e em peroba de 2,835.

Em relação a predominância dos compostos fenólicos em cada tipo de madeira, foi possível observar, nas bebidas armazenadas, uma predominância de ácido vanílico, cumarina e 4-metilumbeliferona no tonel de amburana; ácido gálico, fenol, ácido siríngico e siringaldeído no tonel de bálsamo; ácido gálico, ácido vanílico e siringaldeído no tonel de carvalho; ácido gálico e siringaldeído no tonel de jatobá e, no tonel de peroba, a predominância dos ácidos vanílico e

siríngico. Essas predominâncias corroboram e não corroboram com alguns estudos encontrados na literatura (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; ANJOS et al., 2011; SANTIAGO et al., 2012; 2014a; ZACARONI et al., 2011; 2014). Dias et al. (1998) demonstraram a predominância, ao longo de 6 meses de envelhecimento, de ácido elágico e ácido vanílico em barris de carvalho; vanilina e ácido elágico em barril de bálsamo; ácido vanílico e sinapaldeído em barril de amburana e coniferaldeído em barril de jatobá, resultados esses diferentes daqueles encontrados neste trabalho. Anjos et al. (2011) avaliaram a evolução da composição fenólica em cachaça armazenada em tonel de carvalho ao longo de 12 meses de envelhecimento, e neste estudo, foram encontrados os compostos siringaldeído e ácido gálico como predominantes. Já Zacaroni et al. (2011) avaliaram cachaças envelhecidas em diferentes madeiras e encontraram predominância de cumarina e eugenol em tonel de amburana; cumarina em tonel de jatobá; siringaldeído, ácido elágico, ácido p-cumárico em tonel de carvalho e ácidos siríngicos, elágico e eugenol em tonel de bálsamo. Santiago et al. (2014a) avaliaram a composição fenólica em cachaças envelhecidas em tonéis de amburana e carvalho e obtiveram como compostos majoritários ácido gálico, ácido vanílico, siringaldeído e ácido sinápico para amburana e ácido gálico, ácido siríngico e siringaldeído para carvalho. Foi possível observar uma similaridade quanto à presença de alguns compostos majoritários encontrados nesses estudos, ao passo que uma diferença na composição pode ser explicada pelo fato de terem sido utilizados tonéis novos no presente trabalho.

Os compostos ácido gálico e siringaldeído foram predominantes na maioria dos tonéis. O ácido gálico é um composto fenólico oriundo da degradação dos taninos condensados que perfazem, aproximadamente, a metade da matéria seca da casca de muitas árvores (BRUNETON, 1991). Segundo Queiroz, Morais e Nascimento (2002), estes taninos constituem a segunda fonte de polifenóis e são responsáveis pela adstringência e amargor nas bebidas, sendo

extraídos dos tonéis e gradativamente hidrolisados durante o processo de maturação. O siringaldeído é um dos principais marcadores de envelhecimento e é oriundo da lignina (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; AYLOTT; MACKENZIE, 2010). Composta por uma estrutura de blocos guaiacil e siringil, a lignina gera dois diferentes grupos de compostos, sendo um deles o sinapaldeído, o siringaldeído e o ácido siríntrico, originados da estrutura siringil. Os mecanismos que envolvem a extração de congêneres de envelhecimento a partir da lignina são propostos em duas possíveis vias, uma delas é a simples extração de compostos fenólicos presentes na madeira que são incorporados na bebida, outro é a partir da extração da lignina da madeira mediante ação do etanol (PUECH, 1981; MASSON et al., 1995).

Outro composto com destaque encontrado neste estudo foi a cumarina presente no tonel de amburana em concentrações elevadas. Ressalta-se que a presença desse composto não é desejada, devido ao grau de toxicidade observado em humanos, sendo proibida sua utilização como aromatizante na indústria de alimentos. Na Europa, a concentração máxima de cumarinas permitida em bebidas alcoólicas e em certos caramelos confeccionados é de 10mg/Kg (BRASIL, 1965; ZACARONI et al., 2011).

De modo geral, o tempo de estocagem acarreta elevação progressiva das concentrações de compostos fenólicos nas cachaças estocadas 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 siríntrico) (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; ANJOS et al., 2011; CARDOSO, 2013).

A Figura 4 representa o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, na qual se relacionam os compostos fenólicos das cachaças armazenadas nos diferentes tonéis em estudo.

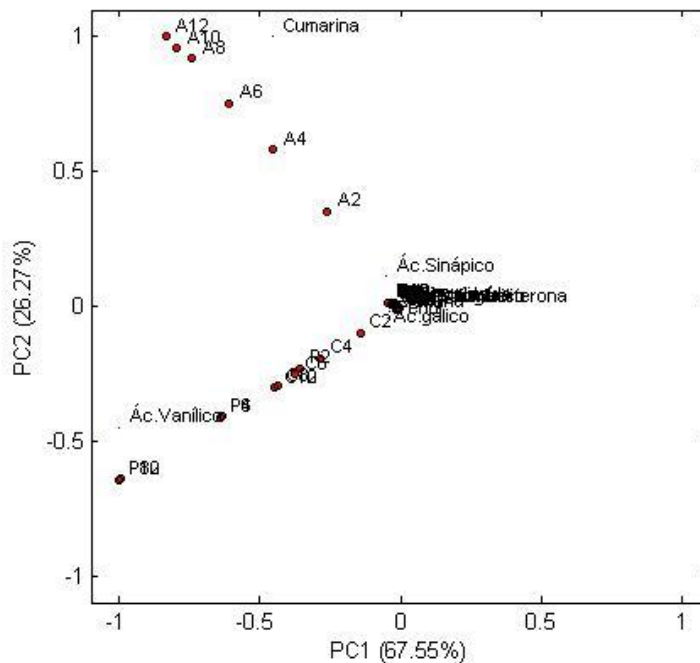


Figura 4 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores dos compostos fenólicos das cachaças armazenadas em tonéis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba

Pela ACP, foi possível descrever 93,82% dos dados, com a primeira e a segunda componente principal, sendo 67,55% da variância total descrita pela primeira componente principal. Na análise aplicada, pode-se constatar que o composto cumarina diferenciou as bebidas armazenadas em amburana e o composto ácido vanílico mostrou uma certa similaridade das amostras armazenadas em carvalho e peroba. As amostras armazenadas em jatobá e bálsamo apresentaram semelhança nos demais compostos.

4 Conclusão

Após 12 meses de armazenamento nas diferentes madeiras, as cachaças apresentaram valores distintos quanto a graduação alcoólica e o extrato seco. Em todos, os tonéis ocorreram diminuição significativa da graduação alcoólica e um aumento do extrato seco.

A composição fenólica total e intensidade de cor apresentaram aumento progressivo, em todas as madeiras, ao longo do período de armazenamento das cachaças. Pelo teste de correlação linear, constatou-se que extrato seco, intensidade de cor e compostos fenólicos totais apresentaram correlação muito forte e que variações ocorridas no aumento de um dos parâmetros acarretam um aumento em outro, ao longo do envelhecimento das bebidas.

Pelos resultados dos compostos fenólicos analisados por HPLC, foi possível observar um aumento progressivo em todas as madeiras utilizadas para o armazenamento das bebidas. O somatório da concentração dos compostos fenólicos apresentou valores que variaram de 30,402 a 88,660 mg L⁻¹ (para tonel de amburana); 10,242 a 30,351 mg L⁻¹ (para tonel de bálsamo); 14,913 a 42,674 mg L⁻¹ (para tonel de carvalho); 3,770 a 10,939 mg L⁻¹ (para tonel de jatobá) e 21,015 a 59,582 mg L⁻¹ (para tonel de peroba). Apesar de demonstrar valores distintos na concentração fenólica, as madeiras se comportaram de maneira semelhante na extração dos compostos fenólicos, quando se compara em vezes do 2º mês ao 12º mês de armazenamento.

5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e bolsa concedida. À Cachaça Artesanal João Mendes, pela valiosa contribuição e por ceder as amostras de cachaças.

6 Referências

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

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, n. 3, p. 569-574, Mar. 2006b.

AYLOTT, R. I.; MACKENZIE, W. M. Analytical strategies to confirm the generic authenticity of scotch whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 116, n. 3, p. 215-229, 2010.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprêgo de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial [da] União**; Poder Executivo. Brasília, 09 de abril de 1965. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/414d248047458a7d93f3d73fbc4c6735/DECRETO+N%C2%BA+55.871,+DE+26+DE+MAR%C3%87O+DE+1965.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] União** de 30 jun. 2005, Seção 1, Página 3. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005**. Aprova o Manual operacional de bebidas e vinagres. 2005b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13576>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

- BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Acribia: Zaragoza, 1991. 600 p.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artemed, 2003.
- 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, abr. 2000.
- CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2007. 453 p.
- DIAS, S. M. B. C.; MAIA, A. B. R. A.; NELSON, D. L. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 331-334, ago./out. 1998.
- ESCARPAS, 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**, Amsterdam, v. 427, n. 1, p. 119-127, Jan. 2001.
- FARIA, J. B. et al. Evaluation of brasilian woods as na alternative to oak for cachaças aging. **European Food Research and Technology**, New York, v. 218, n. 1, p. 83-87, Dec. 2003.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, 1039-1042, 2011.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868 p.
- 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, n. 1, p. 31-36, 1997.

- 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, n. 6, p. 2059-2065, Apr. 2005.
- MASSON, G. et al. Stereoisomers of betamethyl-gamma-octalactone. 2. Contests in the wood of French (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) and American (*Quercus alba*) oaks. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 4, p. 424-428, 1995.
- 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.
- 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.
- MIRANDA, M. B. et al. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, Supl., p. 84-89, dez. 2008.
- MORI, F. A. et al. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento de aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 396-400, set./dez. 2003.
- MORI, F. A.; MENDES, L. M.; MORI, C. L. S. O. Influência da madeira no envelhecimento da cachaça. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.
- NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012.
- 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, n. 2, p. 469-475, July 2009b.

PUECH, J. L. Extraction and evolution of lignin products in armagnac natured in oak. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, n. 2, p. 111-114, 1981.

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

QUIDEAU, S. et al. **The chemistry of wine polyphenolic c-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. Chemistry: a european journal**, v. 11, n. 22, p. 6503-6513, Nov. 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, n. 2, p. 830-834, Jan. 2007.

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

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.

SANTIAGO, W. D. et al. Comparison and quantification of the development of phenolic compounds during the aging of cachaça in oak (*Quercus* sp) and amburana (*Amburana Cearensis*) barrels. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 21, p. 3140-3150, Oct. 2014a.

SANTIAGO, W. D. et al. Correlação entre extrato seco total, composição fenólica total e intensidade de cor de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*) em um período de 12 meses. **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 9-15, 2014b.

SANTIAGO, W. D. et al. Comparação do perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 17-29, 2014c.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Evolução histórica do mercado de cachaça**. 2008. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS.

Potencial da cachaça brasileira. 2014. Disponível em:

<<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SHEREV, R. N.; BRINK, J. A. Indústria de fermentação. In: SHEREV, R. N.

Indústrias de processos químicos. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980. Cap. 31, p. 469-495.

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

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.

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

ZACARONI, L. M. et al. Avaliação Multivariada da composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira. **Científica**, Jaboticabal, v. 42, n. 2, p. 101-107, 2014.

ARTIGO 3

Determinação de carbamato de etila em cachaças armazenadas em tonéis recém-confeccionados de carvalho (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), peroba (*Paratecoma peroba*) e recipiente de vidro

Resumo

O conhecimento da composição química da cachaça é importante, visto que os estudos dos compostos potencialmente tóxicos têm sido um fator determinante no controle de qualidade. Entre vários compostos, destaca-se o carbamato de etila, por ser considerado um carcinógeno humano, sendo encontrado em muitos alimentos fermentados, especialmente em bebidas alcoólicas. As vias de formação e os precursores de carbamato de etila em alimentos e bebidas dependem do tipo e do seu respectivo processamento. Por não ser bem elucidada sua via de formação, alguns autores acreditam que ele venha do processo de fermentação, outros que sejam formados durante a destilação. No entanto, alguns estudos apontam possível formação de carbamato etila durante o envelhecimento em tonéis de madeira. Os objetivos deste trabalho foram identificar e quantificar o carbamato de etila em cachaças utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD), nas etapas do processo de produção, no armazenamento em diferentes tonéis de madeira e recipiente de vidro, sem e com ausência de luz. Nas análises físico-químicas, apenas as frações “cabeça” e “cauda” estão inadequadas a Legislação. A concentração de carbamato de etila não foi detectada no caldo de cana e na etapa de fermentação. Na destilação, os níveis de carbamato variaram de <LQ a $17,081 \mu\text{g L}^{-1}$ e, no armazenamento em tonéis de madeira, constatou-se que os níveis de carbamato de etila aumentaram e apresentaram distintos. Nas bebidas estocadas em vidro, com presença ou ausência de luz, foi possível observar que o material e a luminosidade não afetaram a sua formação.

Palavras-chave: bebida alcoólica, contaminante orgânico, cromatografia.

Abstract

Knowledge of the chemical composition of cachaça is important because the studies of potentially toxic compounds have been a determining factor in quality control. Among various compounds, ethyl carbamate stands out because it is considered to be a human carcinogen and it is found in many fermented foods, especially in alcoholic beverages. The process of formation of ethyl carbamate precursors in foods and beverages depends on the type and the respective processing. The route of formation has not been well elucidated. Some authors believe that it is formed during the fermentation process; others think it is formed during distillation. However, some studies indicate possible formation of ethyl carbamate during aging in wooden casks. The objectives of this study were to identify and quantify the ethyl carbamate in cachaça using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) in the various stages of the production process and storage in different types of wooden casks and glass containers, with and without the presence of light. According to the physicochemical analysis, only the "head" and "tail" fractions are inadequate.. The concentration of ethyl carbamate was detected in sugarcane juice and in the fermentation step. During distillation, carbamate levels ranged from <LOQ to 17.081 g L⁻¹, and the ethyl carbamate levels increased during storage in wooden casks and distinct levels were observed. The presence or absence of light did not affect the formation of the ethyl carbamate in cachaça stored in glass containers.

Keywords: alcohol, organic contaminant, chromatography.

1 Introdução

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 (CE), por ser considerado um carcinógeno humano e está sendo encontrado em muitos alimentos fermentados, especialmente em bebidas alcoólicas. (LACHENMEIER, 2005; EFSA, 2007; CARDOSO, 2013).

Entre as bebidas, a cachaça vem apresentando níveis elevados quanto aos teores de CE. Desde o início do século foram encontrados teores relativamente altos, acarretando uma preocupação no Ministério da Saúde Brasileira. Esses resultados foram agravados por um estudo de avaliação de risco, mostrando que CE representa um risco significativo de câncer para a população brasileira que consome bebidas alcoólicas, com maior exposição resultante da cachaça (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; LABANCA, GLÓRIA, E AFONSO, 2008; WEBER; SHARYPOV, 2009; LACHENMEIER et al., 2010; ZACARONI et al., 2011).

Em 1986, o Canadá foi o primeiro país a introduzir limites máximos para a presença do CE em bebidas alcoólicas. Os limites máximos estabelecidos em bebidas foram de 30,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para vinho, 100,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para vinho fortificado, 150,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para conhaque e uísque e 400,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para aguardentes de fruta e licor. Esses limites estabelecidos pela Legislação canadense têm sido utilizados como referência em outros países, como os Estados Unidos, República Tcheca, França, Alemanha e Suíça. Assim, cada país passou a estabelecer seus próprios regulamentos, estabelecendo limites para este contaminante em relação à produção e importação de bebidas alcoólicas (EFSA, 2007; WEBER; SHARYPOV, 2009). A comparação entre os teores de CE em

bebidas alcoólicas brasileiras com aqueles limites estabelecidos pelo Canadá foi inevitável, em função de esse país possuir legislação sobre o assunto e ser considerado como referência. Com isso, o MAPA estipulou por meio da Instrução Normativa n. 13, de 29/06/2005, que o limite máximo permitido para esse composto em aguardente e cachaça foi de $210 \mu\text{g L}^{-1}$. (BRASIL, 2005a; BRASIL, 2005c).

As vias de formação e os precursores de CE em alimentos e bebidas dependem do tipo e do seu respectivo processamento. Ele é produzido em níveis baixos (ng L^{-1} ou ng kg^{-1} até mg L^{-1}) em alimentos fermentados, alimentos assados e bebidas alcoólicas por meio de vários precursores, tais como ácido cianídrico, cianeto, ureia, citrulina e aminoácidos N-carbamil (incluindo fosfato de carbamila por reação com etanol). (DENNIS et al., 1986; VAHL, 1993; BELAND et al., 2005; BRUNO et al., 2007; EFSA, 2007; WEBER; SHARYPOV, 2009; GALINARO et al., 2015).

Por não ser bem elucidada sua via de formação alguns autores acreditam que ele venha do processo de fermentação, outros que sejam formados durante a destilação, atribuindo a esse processo forte evidências da relação entre o tipo de destilador (contínuo ou descontínuo), constituição de partes ascendentes e descendentes (cobre ou aço inoxidável), tipo de aquecimento (direto ou indireto), corte das frações (“cabeça”, “coração” e “cauda”) e taxa de refluxo durante o processo, aos níveis de CE encontrados. No entanto, alguns estudos apontam possível formação de CE durante o envelhecimento em tonéis de madeira (NÓBREGA et al., 2009; 2011). Anjos et al. (2011) identificaram e quantificaram o carbamato de etila em diferentes períodos de armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. Pelos resultados, observaram que CE apresentaram valores ascendente significativos ao longo do processo de envelhecimento e armazenamento em vidro.

Diversas técnicas têm sido descritas na literatura para análise de CE em bebidas alcoólicas. Instrumentalmente, a determinação de CE em bebidas e alimentos é limitada em função dos baixos teores desse analito e também pelos possíveis interferentes presentes na matriz. Assim, o CE pode ser determinado diretamente ou após pré-tratamento (clean up e/ou concentração) via extração com solvente, extração em fase sólida (solid phase extraction – SPE) ou por microextração em fase sólida (solid phase micro-extraction – SPME) (LACHENMEIER, 2005; WEBER; SHARYPOV, 2009; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009; ANJOS et al., 2011; MACHADO et al., 2012).

Apesar das inúmeras técnicas utilizadas para determinação de CE, vários autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC- FLD) para a sua determinação do mesmo em diferentes matrizes. Esse método tem se apresentado como uma alternativa, pois apresenta níveis de detecção baixos e 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 CE, permitindo, assim, sua detecção utilizando o detector de fluorescência (ABREU; ALVES; OLIVEIRA, 2005; MADRERA; VALLES, 2009; ANJOS et al., 2011; MACHADO et al., 2013; SANTIAGO et al., 2014a).

Os objetivos deste trabalho foram identificar e quantificar o CE, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD), nas etapas do processo de produção e no armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), peroba (*Paratecoma peroba*) e recipiente de vidro, sem e com ausência de luz.

2 Material e métodos

Confecção dos tonéis

Os tonéis foram confeccionados no município de Ponte Nova-MG, situado na região Zona da Mata Mineira. As madeiras amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba foram adquiridas pela tanoaria encarregada na fabricação dos tonéis. A confecção foi realizada com madeira nova ou virgem, exceto a de carvalho. A madeira de carvalho foi obtida de um tonel de carvalho europeu de 200 litros, o qual foi desmontado e lixado para sua obtenção. Esse procedimento foi realizado por não ser uma madeira nativa brasileira, já as demais foram adquiridas de madeireiras especializadas.

Todos os tonéis utilizados no estudo apresentavam um volume final de 20 litros cada um. Eles foram confeccionados nas seguintes dimensões: 40 cm de comprimento, 30 cm de altura, 102 cm de raio central e 1,8 cm de espessura da madeira.

Após a confecção, os tonéis foram curtidos com água destilada, sendo essa trocada a cada 5 dias até completar 30 dias.

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 2014. A variedade de cana empregada foi a RB86-7515, o processo de fermentação foi realizado com fubá e, como micro-organismo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O preparo do fermento foi realizado por 5 dias e a fermentação do mosto de cana teve duração de 18 horas, em que o grau Brix inicial era 20°. Após o Brix zerar, o vinho foi destilado em alambique de cobre de 1000 litros. Na destilação, obtiveram 15 litros para fração “cabeça”, 180 litros para “coração” e 144 litros para “cauda”. Inicialmente foram

coletadas frações do caldo de cana, do mosto fermentado (Grau °Brix zerado) para análise de CE.

Após a destilação, a fração “coração” foi transferida para os tonéis de carvalho, amburana, bálsamo, jatobá, peroba e recipiente de vidro incolor, sendo exposto em prateleira na presença de luz (claro) e envolto com papel alumínio (escuro). Nos tonéis foram estocados 20 litros e, nos vidros, 2 litros da bebida. 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.

A cada dois meses, por um período de 12 meses, foram coletadas amostras de 2 litros e encaminhadas para a realização das análises físico-químicas e análises cromatográficas, que foram realizadas no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardentes do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas e cromatográficas foram realizadas periodicamente, em triplicata. O grau alcoólico e cobre foram realizadas de acordo com as especificações estabelecidas pela Instrução Normativa nº 24, de 08/09/2005, do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2005b).

Determinação de carbamato de etila por HPLC-FLD

A metodologia utilizada para a análise do CE foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anjos et al. (2011), Machado et al. (2013) e Santiago et al. (2014a), que consiste na derivação prévia da amostra para a análise dessa substância. Os reagentes empregados para análise foram padrão de

CE (Acros Organics), etanol, propan-1-ol, hexano, ácido clorídrico (HCl), acetato de etila, acetato de sódio, acetonitrila grau HPLC (Merck), água tipo I e 9-xantidrol (Acros Organics). Portanto, para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método utilizado, sendo avaliados os parâmetros linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. Os parâmetros foram realizados de acordo com Ribani et al. (2004) e Santiago et al. (2014a).

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

A quantificação do CE foi realizada utilizando o método de padronização externa. Os comprimentos de onda de excitação e emissão empregados foram 233 e 600 nm, respectivamente. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,75 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema do tipo gradiente: 0 a 5 min (40-60% B); 5 a 10 min (60-70% B); 10 a 18 min (70-80% B); 18 a 19,5 min (80-90% B); 19,5 a 25 min (90-40% B); 25 a 30 min (40% B). A fase móvel foi composta por solução de acetato de sódio 20 mmol L⁻¹ (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B).

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método utilizado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (ANJOS et al., 2011; SANTIAGO et al., 2014a).

Análise estatística

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema de parcelas subdivididas no espaço. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Schott Knott ao nível de 95% de confiança, usando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 Resultados e discussão

Na Tabela 1, estão representados os valores das análises físico-químicas, grau alcoólico e cobre, no processo de produção (destilação) e do armazenamento das amostras.

Tabela 1 Avaliação da graduação alcoólica e cobre no processo de destilação e no armazenamento da cachaça nos tonéis em estudo.

Tonel	Grau alcoólico (% v/v)						
	Fração “Cabeça” = 57,000 ± 0,020a						
	Fração “Coração” = 46,530 ± 0,110b						
Fração “Cauda” = 19,555 ± 0,405c							
Tonel	Tempo de armazenamento (meses)						
	2	4	6	8	10	12	
A	44,745 aA	43,815 aC	44,145 aB	43,335 aD	43,110 aE	42,880 aF	
B	44,335 bA	42,990 cB	42,700 eC	41,190 dD	40,250 eE	39,745 eF	
C	44,245 bA	43,160 bC	43,300 dB	42,380 cD	41,650 cE	41,490 cF	
J	44,775 aA	43,120 bC	43,470 cB	42,355 cD	41,420 dE	41,315 dF	
P	44,670 aA	43,730 aB	43,675 bB	42,780 bC	42,180 bE	42,305 bD	
Tonel	Cobre (mg L ⁻¹)						
	Fração “Cabeça” = 0,686 ± 0,003a						
	Fração “Coração” = 0,253 ± 0,001b						
Fração “Cauda” = ND							
Tonel	Tempo de armazenamento (meses)						
	2	4	6	8	10	12	
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
J	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas (em relação a cada parâmetro) não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. (A= amburana, B= bálsamo, C= carvalho, J= jatobá, P= peroba). ND= não detectado.

Pela Legislação vigente, a graduação alcoólica para cachaça é de 38 a 48% v/v (BRASIL, 2005a). Observando os resultados descritos na Tabela 1, as

frações “cabeça” e “cauda” estão inadequadas, resultado já esperado, visto que ambas as frações não são adequadas para consumo. Após 12 meses de armazenamento nos tonéis em estudo, foi possível observar valores distintos quanto à sua graduação alcoólica e em todos tonéis ocorreram diminuição significativa quando comparado com o valor da fração “coração”. De acordo com Miranda, Horii e Alcarde (2006), Anjos et al. (2011) e Santiago et al. (2014b), a diminuição da graduação alcoólica de cachaças, ao longo do envelhecimento, ocorre por fator decorrente 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.

A contaminação por cobre é uma preocupação comum de produtores de cachaça de alambique, pois os destiladores são confeccionados por cobre e se eles não apresentarem boas condições e correta higienização, a bebida pode vir a ser contaminada pelo metal. 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 água e limão na primeira destilação ou utilizando filtros com adsorventes, como o carvão ativado, resinas de troca iônica e argilas naturais (LIMA et al., 2006; NEVES et al., 2007; LIMA et al., 2009; IMA et al., 2009; PARK et al., 2009; CANTÃO et al., 2010; JANEGITZ et al., 2010; CARDOSO, 2013; DUARTE et al., 2014; ZACARONI et al., 2015a). No presente estudo, a contaminação por cobre se deu apenas nas frações “cabeça” e “coração”, mas elas apresentaram valores dentro do limite exigido pela Legislação, que é de 5 mg L^{-1} .

Na Figura 1, está representado o cromatograma obtido do padrão de carbamato de etila após a injeção de 20 μL e detecção de fluorescência.

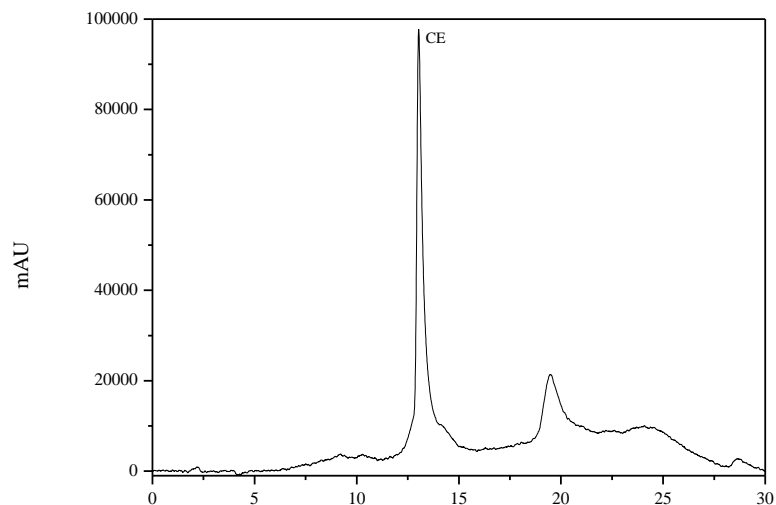


Figura 1 Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$

De acordo com a Figura 1, o tempo de retenção médio obtido para o CE foi de $13,026 \pm 0,193$ minutos, valor próximo àquele encontrado por Anjos et al. (2011), Zacaroni et al. (2011), Machado et al. (2013); Santiago et al. (2014a) e Zacaroni et al. (2015b). A quantificação do CE nas amostras de cachaça foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 11914,69x - 47197,63$), sendo o coeficiente de determinação (r^2) obtido de 0,99996. Portanto, esse valor demonstra a forte correlação linear entre a concentração de CE e a área do pico obtida, e que de acordo com a literatura,

valores acima de 0,99 são aceitáveis (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; HARRIS, 2008).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas: $LD = 3DP/m$ e $LQ = 10DP/m$ (em que, DP = estimativa do desvio-padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração). Para esses limites, foram encontrados os valores de 1,86 e 6,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Sendo esses valores de LD e LQ inferiores aos encontrados por Herbert et al. (2002) (4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LD); Park et al. (2007) (20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LD); Anjos et al. (2011) (3,93 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 13,09 $\mu\text{g L}^{-1}$), Zacaroni et al. (2011) (15,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 52,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), Machado et al. (2013) (6,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 21,32 $\mu\text{g L}^{-1}$); Santiago et al. (2014a) (3,24 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 10,83 $\mu\text{g L}^{-1}$); Zacaroni et al. (2015b) (3,81 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 11,53 $\mu\text{g L}^{-1}$) e próximo ao encontrado por Madrera e Valles (2009) (1,64 e 3,56 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Outro parâmetro avaliado foi a exatidão, que foi feita por ensaios de recuperação. A recuperação é a mais utilizada entre os processos de avaliar a exatidão, sendo definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material-teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004; HARRIS, 2008). A concentração do CE foi calculada pelo aumento das áreas dos picos, obtida após a adição de uma quantidade conhecida dos padrões (3 níveis de concentração) a 3 amostras escolhidas aleatoriamente. Os valores de recuperação encontrados neste estudo foram de 91% a 102%, sendo aceitáveis para esse tipo de análise (RIBANI et al., 2004). Esses resultados estão próximos aos encontrados por Herbert et al. (2002), que propuseram uma metodologia nova para determinação de CE por HPLC em diferentes tipos de vinho e obtiveram 96% de recuperação; Abreu et al. (2005), comparando diferentes métodos na determinação de CE, encontraram para técnica HPLC uma recuperação de 110%; Madrera e Valles

(2009), que determinaram CE em cidras por HPLC e encontraram uma faixa de recuperação entre 94 a 98%; Machado et al. (2013) encontraram valores médios de 94,88%, na validação de um método analítico para determinação de CE em cachaças armazenadas em vidro e recipiente de polietileno; Santiago et al. (2014a) determinaram CE nas etapas do processo de produção e no envelhecimento de cachaça em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*) e obtiveram valores de recuperação nas faixas de 87 a 108%. Além de próximos dos trabalhos citados, os valores estão próximos de outras pesquisas utilizando outra técnica, a GC-MS (HASNIP et al., 2007; JAGERDEO et al., 2002; LACHENMEIER, 2005; LABANCA; GLORIA; AFONSO, 2008; NÓBREGA et al., 2009; MACHADO et al., 2012; BORGES et al., 2014).

Os resultados obtidos para a quantificação do CE nas amostras caldo de cana, mosto fermentado e nas frações “cabeça”, “coração” e “cauda” estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 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”	17,081a
“Coração”	6,319b
“Cauda”	<LQ

<LQ = menor que o limite de quantificação. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Por meio dos resultados obtidos, pode-se observar que a concentração de CE no processo de produção variou de não detectado até $17,081 \mu\text{g L}^{-1}$, e ele apresentou abaixo do limite permitido pela Legislação. Na literatura, várias referências estabelecem relação entre os níveis de CE e seus sistemas de produção, e para alguns autores, o processo de destilação é o de maior importância (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; CARDOSO, 2013; ANJOS et al., 2011; SANTIAGO et al., 2014a).

A cana utilizada para produção da cachaça, assim como o processo de obtenção do caldo e fermentação, não interferiu para a formação de CE, pois ele não foi detectado e quantificado. De acordo com Andrade-Sobrinho et al. (2009), os níveis de CE segue a seguinte ordem, fração “cabeça” > “coração” > “cauda”, pelo fato de o carbamato ser mais solúvel em etanol ($1,2 \text{ g mL}^{-1}$) que em água ($0,10 \text{ g mL}^{-1}$). Por esse fato, torna-se previsível que a “cabeça” apresente uma maior concentração de CE, já que ela apresentou uma maior graduação alcoólica (57% v/v), tendendo o teor alcoólico da bebida a reduzir-se ao longo do processo de destilação; portanto, a separação eficiente das frações durante a destilação da cachaça de alambique pode ser uma alternativa na redução dos níveis de carbamato. Baffa Júnior et al. (2011) quantificaram a formação do CE no processo de fermentação do caldo de cana (mosto fermentado), nas frações do destilado e na vinhaça, durante a produção de cachaça. Os resultados médios encontrados pelos autores foram de 122 mg L^{-1} no mosto fermentado; $59,7 \text{ mg L}^{-1}$ na fração cabeça; $52 \mu\text{g L}^{-1}$ na fração coração; $1,57 \text{ mg L}^{-1}$ na fração cauda e $53,1 \text{ mg L}^{-1}$ na vinhaça. Os resultados indicaram que o CE é formado durante a fermentação e sua concentração é aumentada durante a destilação, dados que corroboram com aqueles encontrados no presente trabalho, no qual foi possível observar que a formação do carbamato de etila provavelmente ocorre no processo de fermentação.

Esses resultados também corroboram aos encontrados por Santiago et al. (2014a), Borges et al. (2014) e Mendonça et al. (2016). Santiago et al. (2014a) avaliaram níveis de CE no caldo de cana, mosto fermentado e nas frações da destilação. Os autores encontraram valores de não detectado para caldo de cana e valores abaixo do limite de quantificação no mosto fermentado e nas frações do destilado. Borges et al. (2014) avaliaram níveis de CE, em diferentes mostos fermentados e destilados, de cachaças produzidas com diferentes leveduras (espontânea e selecionada). Os autores concluíram que os níveis de CE foram reduzidos no processo fermentativo e na destilação quando se procede de maneira correta. Nas frações “cabeça”, foram constatados os maiores níveis de CE. Posteriormente, Mendonça et al. (2016) determinaram os níveis de CE em cachaças produzidas por diferentes tipos de fermentação e seguiram sua formação durante as etapas de produção. Os autores chegaram à conclusão de que as cachaças que continham farelo de arroz como nutriente durante a fase de fermentação apresentaram os maiores níveis de CE, tanto no processo fermentativo quanto no armazenamento, decorrente do fato de o farelo de arroz conter compostos nitrogenados.

Para alguns autores, o cobre proveniente do alambique pode contribuir para a formação do CE, já que há a possibilidade de esse metal atuar como catalisador nas reações de formação desse contaminante (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; CARDOSO; LIMA-NETO; FRANCO, 2003; BAFFA- JÚNIOR et al., 2011; LELIS et al., 2014). Baffa-Júnior et al. (2011) mostraram correlações existentes entre a concentração desse contaminante e parâmetros envolvidos durante o processo de destilação, tais como constituição de partes ascendentes e descendentes (cobre ou aço inoxidável), tipo de aquecimento (direto ou indireto), corte das frações (cabeça, coração e cauda) e taxa de refluxo durante o processo. Ainda considerando esse processo, acredita-se que os principais precursores sejam cianeto (CN). Aresta,

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

Estudos realizados por Barcelos et al. (2007), Andrade-Sobrinho et al. (2009), Zacaroni et al. (2011), Anjos et al. (2011) e Masson et al. (2014) demonstraram que não há correlação entre as concentrações de cobre e CE em cachaça. Portanto, devem ser investigados outros fatores e etapas do processo de produção que possam influenciar a formação do CE em bebidas, já que a presença de cobre não se mostrou relevante para a formação neste estudo. Machado et al. (2012), com intuito de esclarecer sobre a formação de CE, trabalharam com adubação nitrogenada na cana, na expectativa de o nitrogênio fornecido para a cultura da cana influenciar a composição dos compostos nitrogenados. Os autores concluíram que as diferentes doses de ureia e nitrato de amônio não proporcionaram um aumento na concentração de CE, mostrando que durante a plantação e crescimento da cana não ocorreu a formação do mesmo.

Os valores de CE no processo de armazenamento nos toneis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá e peroba e no armazenamento em vidro estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Concentração de carbamato de etila durante o processo de armazenamento da cachaça em tonéis de amburana, bálsamo, carvalho, jatobá, peroba e em vidro.

Tempo de envelhecimento (meses)	Carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
	Amburana	Bálsamo	Carvalho	Jatobá	Peroba	Vidro (com luz)	Vidro (sem luz)
2	<LQ	<LQ	<LQ	8,190 eA	7,520 fB	<LQ	<LQ
4	<LQ	<LQ	7,339 dB	9,222 dA	9,275 eA	<LQ	<LQ
6	6,489 cC	<LQ	8,186 cB	9,599 bA	9,574 dA	<LQ	<LQ
8	6,652 bD	<LQ	9,199 bC	9,458 cB	10,126 cA	<LQ	<LQ
10	9,540 aD	<LQ	9,940 aC	10,317 aB	10,775 bA	<LQ	<LQ
12	9,501 aD	<LQ	9,815 aC	10,299 aB	11,763 aA	<LQ	<LQ

<LQ = menor que o limite de quantificação. As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados obtidos, pode-se constatar que a concentração de CE nas amostras de cachaça analisadas variaram de <LQ a $11,763 \mu\text{g L}^{-1}$, para o acompanhamento realizado com as cachaças armazenadas nos tonéis de madeiras, e menor que o limite de quantificação para a cachaça armazenada em recipiente de vidro, tanto na presença quanto na ausência de luz. Estatisticamente, a concentração de CE, em todas as madeiras, apresentaram aumento em sua concentração com o passar do tempo de armazenamento; após 12 meses, os níveis de CE demonstraram valores distintos para cada tipo de madeira utilizada. Nota-se que, mesmo havendo um aumento na concentração de CE ao longo do período de armazenamento, a concentração desse contaminante esteve muito inferior ao limite máximo estabelecido pelo MAPA ($210 \mu\text{g L}^{-1}$). Diversos trabalhos com cachaças têm demonstrado a presença de CE acima do limite máximo estabelecido pela Legislação (BARCELOS et al., 2007;

LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008; BAFFA-JÚNIOR et al., 2007; ZACARONI et al., 2011; MASSON et al., 2014; LELIS et al., 2014).

Apesar da baixa concentração encontrada ao longo dos 12 meses, nota-se uma tendência de estabilização na concentração do CE para as cachaças armazenadas nos tonéis de amburana, carvalho e jatobá. Esses resultados não corroboram aos obtidos por Anjos et al. (2011), que avaliaram a concentração de CE durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. Os autores observaram uma diferença significativa na concentração de CE para ambos os procedimentos, percebendo-se um aumento mais expressivo na concentração desse composto para a cachaça armazenada em recipiente de vidro. Anteriormente, Madrera e Valles (2009), avaliando CE em outra matriz, apontaram um aumento progressivo na concentração desse em cidras submetidas a diferentes níveis de maturação. Santiago et al. (2014a), avaliaram CE em cachaças armazenadas em tonéis de amburana e carvalho por um período de 12 meses, e os autores constataram que a concentração de CE se manteve estabilizada e menor que o limite máximo permitido pela Legislação desde o 1º mês de envelhecimento.

A formação de CE 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 CE antes e após o processo de destilação, como é o caso do fosfato de carbamila e do íon cianeto (POLASTRO et al., 2001; BRUNO et al., 2007; WEBER; SHARYPOV, 2009).

Analisando os resultados das cachaças armazenadas em vidro, pode-se dizer que não sofreram a influência do material e da luminosidade na formação de CE. Esses resultados corroboram com os encontrados por Andrade-Sobrinho

et al. (2009), Galinaro e Franco (2011) e não corroboram com os encontrados por Zacaroni et al. (2015b). Andrade-Sobrinho et al. (2009) simularam o tempo de “descanso” da cachaça, como também o tempo de permanência da bebida na prateleira, antes de seu consumo, e constataram que a concentração de CE após 36 meses de estocagem da cachaça variou de -5,3 a 6,7%, sugerindo a estabilidade na concentração desse composto após a sua formação. Galinaro e Franco (2011) analisaram o CE em 15 amostras de aguardentes coletadas *in loco* em diferentes destilarias, avaliando parâmetros como presença e ausência de luz, temperatura e bidestilação da bebida. De acordo com os resultados, os autores não encontraram diferenças significativas na concentração de carbamato entre as amostras irradiadas e não irradiadas com luz solar, descartando a hipótese de haver um provável precursor ativado fotoquimicamente. Posteriormente, Zacaroni et al. (2015b) estudaram a influência da luz natural na concentração de CE em cachaças envelhecidas em barris de madeira e armazenadas em garrafas de vidro por um período de 6 meses. Todas as amostras apresentaram uma concentração CE abaixo do limite estabelecido pela Legislação brasileira. A maior concentração encontrada foi de $79,70 \mu\text{g L}^{-1}$ e 70% das amostras exibiram uma influência da luz ou da ausência de luz na análise desse composto. Com isso, inferiram que a luz pode influenciar na formação desse composto.

4 Conclusão

Nas análises físico-químicas, as frações “cabeça” e “cauda” estão inadequadas à Legislação, quanto aos teores de grau alcoólico e, no presente trabalho, não ocorreu contaminação por cobre. Após 12 meses de armazenamento nos tonéis de madeira, as cachaças apresentaram valores distintos e uma diminuição quanto à sua graduação alcoólica.

A concentração de CE não foi detectada no caldo de cana, mostrando que a variedade da cana e a moagem não influenciaram na sua formação. Na etapa de fermentação e destilação, os níveis de carbamato variaram de <LQ a 17,081 $\mu\text{g L}^{-1}$. No armazenamento em tonéis, constatou-se, que ao longo dos 12 meses, os níveis de CE aumentaram e se apresentaram distintos quanto ao tipo de madeira. As bebidas estocadas no vidro, com presença ou ausência de luz, apresentaram valores abaixo do limite de quantificação, demonstrando que o material e a luminosidade não afetaram a formação de carbamato de etila.

De modo geral, tanto nas análises físico-químicas como nas cromatográficas, todos os parâmetros avaliados demonstraram ser favoráveis para que as bebidas produzidas fossem aceitáveis ao consumo. Apesar dos bons resultados encontrados neste trabalho, vários estudos ainda são necessários para elucidar o caminho de formação do CE em alimentos fermentados e bebidas como cachaça.

5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e bolsa concedida. À Cachaça Artesanal João Mendes, pela valiosa contribuição e por ceder as amostras de cachaças.

6 Referências

ABREU, S. M. et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 2, p. 498-503, May 2005.

- ANDRADE SOBRINHO, L. G. et al. 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.
- 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, 874-878, 2011.
- ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, June 2001.
- BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography – mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 4, p. 1383-1387, Dec. 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**, Araraquara, v. 18, n. 4, p. 371–373, out./dez. 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, jul./ago. 2007.
- BELAND, F. A. et al. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 1–19, Jan. 2005.
- BORGES, G. B. V. et al. Selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and accurate separation of distillate fractions reduce the ethyl carbamate levels in alembic cachaças. **Food Control**, Guildford, v. 37, p. 380-384, Mar. 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial [da] União** de 30 jun. 2005, Seção 1, Página 3. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões

de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. 2005a. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 24, de 08 de setembro de 2005**. Aprova o Manual operacional de bebidas e vinagres. 2005b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13576>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

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, n. 4, p. 1345-1352, 2007.

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, abr. 2003.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. 340 p.

CANTÃO, F. O. et al. Avaliação e remoção de cobre em aguardentes de cana pela utilização dos aluminossilicatos: zeólita e bentonita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1109-1115, set./out. 2010.

DENNIS, M. J. et al. Investigation of ethyl carbamate levels in some fermentated foods and alcoholic beverages. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n. 3, p. 383-389, July/Sept. 1986.

DUARTE, F. C. et al. Removal of copper in cachaças using clays. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 4, p. 382-389, jun. 2014.

EFSA – European Food Safety Authority. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. **European Food Safety Authority**, Parma, v. 551, p. 1-44, Oct. 2007.

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

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

GALINARO, C. A. et al. Cyanate as an active precursor of ethyl carbamate formation in sugar cane spirit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 63, n. 33, p. 7415-7420, Aug. 2015.

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

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

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.

IMA, 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.

JAGERDEO, E. et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 21, p. 5797-5802, Oct. 2002.

JANEGITZ, B. C. et al. Removal of copper (II) from sugar-cane spirits employing chitosan. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 458-460, 2010.

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

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

LACHENMEIER, D. W. et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **BMC Câncer**, London, v. 10, n. 266, p. 1-15, June 2010.

LELIS, V.G. et al. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças de alambique e em aguardentes industriais. **Revista Ceres**, Viçosa (MG), v. 61, n. 4, p. 467-474, jul./ago. 2014.

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, A. 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.

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**, New York, v. 45, n. 10, p. 1143-1155, Apr. 2012.

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

MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 139-143, Feb. 2009.

MASSON, J. et al. GC-MS analysis of ethyl carbamate in distilled sugar cane spirits from the northern and southern regions of Minas Gerais. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 120, n. 4, p. 516-520, Sept. 2014.

MENDONÇA, J. G. P. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 122, n. 1, p. 63-68, 2016.

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.

NEVES, E. A. et al. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 33-36, 2007.

NÓBREGA, I. C. C. et al. Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugarcane spirits): Influence of distillation and storage conditions. **Food Chemistry**, London, v. 117, n. 4, p. 693–697, Dec. 2009.

NÓBREGA, I. C. C. et al. Ethyl carbamate in cachaça (Brazilian sugarcane spirit): extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation. **Food Chemistry**, London, v. 127, n. 3, p. 1243–1247, Aug. 2011.

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, n. 8, p. 975-982, July 2007.

PARK, S. R. et al. Exposure to ethyl carbamate in alcohol-drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 10, p. 946-952, Oct. 2009.

POLASTRO, L. R. et al. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 78-81, jan./abr. 2001.

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

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

SANTIAGO, W. D. et al. Comparação do perfil físico-químico de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) e amburana (*Amburana cearensis*). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 7, p. 17-29, 2014b.

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

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

WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg, v. 7, n. 3, p. 233-247, Sept. 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, 2011.

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

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