



LEONARDO MILANI AVELAR RODRIGUES

**CACHAÇAS ENVELHECIDAS EM
DIFERENTES TIPOS DE MADEIRAS:
QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS,
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIFÚNGICA**

LAVRAS – MG

2013

LEONARDO MILANI AVELAR RODRIGUES

**CACHAÇAS ENVELHECIDAS EM DIFERENTES TIPOS DE
MADEIRAS: QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS,
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA**

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

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientadora

Dra. Adelir Aparecida Saczk

LAVRAS - MG

2013

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

Rodrigues, Leonardo Milani Avelar.

Cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira :
quantificação de compostos fenólicos, atividade antibacteriana e
antifúngica / Leonardo Milani Avelar Rodrigues. – Lavras : UFLA,
2013.

131 p. : il.

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

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Envelhecimento. 2. Extratos. 3. Análise físico-química. 4.
Atividade antimicrobiana. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 663.53

LEONARDO MILANI AVELAR RODRIGUES

**CACHAÇAS ENVELHECIDAS EM DIFERENTES TIPOS DE
MADEIRAS: QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS,
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA**

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

APROVADA em 22 de Fevereiro de 2013.

Dra. Josefina Aparecida de Souza UFPA

Dr. David Lee Nelson UFMG

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

LAVRAS-MG

2013

Aos meus pais, Maria e Leonardo, pelo exemplo de vida, amor, dedicação, coragem e persistência. Vocês me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com muita dignidade. Durante essa caminhada, não houve ninguém tão entusiasmado, não houve maior expectativa que a suas, sonharam comigo e estiveram sempre do meu lado. As palavras se tornam pequenas e não consigo expressar com exatidão todo o meu agradecimento.

Ao meu irmão, Samuel, pela presença, amizade e confiança e por me fazer acreditar que posso ser um bom exemplo, obrigado por estar sempre ao meu lado, apesar de algumas vezes eu não merecer.

Aos meus amigos do laboratório, pela companhia, confiança e pela grande amizade formada ao longo das intermináveis jornadas de trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que esteve comigo em todos os momentos que precisei, protegendo-me durante esta caminhada.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pelos seus valiosos ensinamentos, pela orientação, atenção, credibilidade, oportunidade e principalmente pela amizade e confiança durante todo o tempo, MUITO OBRIGADO!

Ao professor Dr. Luiz Roberto Batista, pelo apoio durante o experimento e pelos ensinamentos.

Às professoras Dra Josefina Aparecida de Sousa e Adelir Aparecida Saczk, por todo carinho e gentileza e principalmente pela amizade.

À minha grande companheira, amiga, madrinha, minha segunda mãe Jeanete, seus filhos, noras e netos. Obrigado por me proporcionar um lar cheio de exemplos, amor e alegria. Vocês fazem parte da minha história e parte de quem eu sou, a todos vocês não bastaria um muitíssimo obrigado.

À Carmem, pelo carinho e presença constante e pelos seus deliciosos almoços.

A meu Vô José Pedro Rodrigues, pelo privilégio de estar presente neste momento.

À minha, Vó Maria Eulina, hoje, especialmente a saudade é mais forte, pois gostaria que estivesse perto de mim neste momento, mas eu sei que, de uma forma ou de outra, você estará sempre comigo e muito feliz com a minha conquista.

A todos os meus familiares que estiveram sempre ao meu lado nas horas em que mais precisei, sem o apoio de vocês nada disso seria tão gratificante.

Aos colegas do curso de Mestrado pela amizade e convivência, em especial à Larissa. Concluimos a graduação e a pós-graduação juntos, obrigado pela amizade e confiança.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos produtores de aguardente de cana, que cederam amostras para a realização deste trabalho.

Aos funcionários das secretarias de graduação e pós-graduação do Departamento de Ciências dos Alimentos e de Química pela paciência e atenção disponibilizada.

Aos professores do Departamento de Ciências dos Alimentos, e do Departamento de Química, pelos ensinamentos durante o curso.

À funcionaria do Laboratório de Qualidade de Aguardente, Cleusa de Fátima e Silva Ribeiro, pela amizade e pelos momentos de ajuda durante a fase do experimento.

Aos amigos do Laboratório de Qualidade de Aguardente e de Química Orgânica, Óleos essenciais João, Felipe, Rafaela, Juliana Andrade, Milene, Cíntia, Marcos, Lucilene, Christiane, Maria Luísa, Lidy, Bruna, Karen e Thiza, pela amizade, companheirismo, conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração e alegria e, em especial, à Juliana Valério e Wilder vocês foram peças principais na concretização deste trabalho **MUITO OBRIGADO!**

As alunas do Laboratório de Micologia e Microbiologia de Alimentos, pela atenção, boa convivência e disponibilidade de matérias que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fapemig pela concessão da bolsa de estudos.

E àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho.

RESUMO

A cachaça é atualmente um dos setores agroindustriais que mais cresce no país, sendo a bebida considerada símbolo da nacionalidade brasileira, apreciada pelo seu sabor e aroma característicos, que são formados durante o processo de fermentação, destilação e envelhecimento. Várias alternativas têm sido utilizadas para agregar valor ao produto; durante o envelhecimento ocorrem diversas reações químicas que proporcionam a incorporação de compostos fenólicos provenientes da madeira, com características multifuncionais como potentes agentes antioxidantes, antibacteriana, anticarcinogênica e antiteratogênica. Diante do exposto, no trabalho objetivo-se avaliar a qualidade físico química das cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, quantificar seus compostos fenólicos e avaliar sua atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica. Foram analisadas quatro amostras de cachaças envelhecidas em barris de carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Aguardente, da Universidade Federal de Lavras. A determinação dos compostos fenólicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Micologia de Alimentos por meio da técnica difusão cavidade em ágar e por vapor, utilizando os micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Salmonella choleraesuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. O efeito inibitório sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus carbonarius* foi realizado empregando-se a técnica de difusão em discos. Os valores obtidos para os compostos fenólicos variaram de 0,41 a 9,69mg/L, observando a predominância de diferentes compostos nas diferentes espécies de madeira utilizadas. Os extratos fenólicos apresentaram atividade antibacteriana satisfatória, tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas; porém, nenhum dos extratos apresentou inibição contra à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, e contra aos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus carbonarius*.

Palavras-chave: Envelhecimento. Compostos Fenólicos. Extratos. Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Cachaça is currently one of the fastest growing agro-industrial sectors in the country and is considered the drink symbol of Brazilian nationality, appreciated for its taste and aroma, which are formed during the process of fermentation, distillation and aging. Various alternatives have been used to add value to the product; during aging occur several chemical reactions that provide the incorporation of phenolic compounds from wood, with multifunctional characteristics as potent antioxidants, antibacterial, anticarcinogenic and antiteratogênica. Given the above the present study aims to evaluate the quality of physical chemistry cachaça aged in different woods, quantify its phenolic compounds, and evaluate its antioxidant activity, antibacterial and antifungal. We analyzed four samples of cachaça aged in oak barrels, amburana balm and jequitibá. All analyzes were performed at the Laboratory Quality Brandy, Federal University of Lavras. The determination of phenol compounds was carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The antimicrobial activity was held at the Mycology Laboratory of Food through the cavity in Agar Diffusion technique and steam, using the micro-organisms *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Salmonella choleraesuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. The inhibitory effect on the fungus *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* was performed employing the disc diffusion technique. The values obtained for phenolic compounds ranged from 0,41 to 9,69 mg / L, observing the predominance of different compounds in different species of wood used. The phenolic extracts showed antibacterial activity satisfactory for both Gram-negative and gram-positive, but none of the extracts showed inhibition against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, and against fungi, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius*.

Keywords: Aging. Phenolic Compounds. Extracts. Antimicrobial Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismo de redução do radical livre DPPH.....	36
Figura 2	Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	37
Figura 3	Principais compostos fenólicos incorporados à aguardente.....	40
Figura 4	Reações envolvidas na análise de álcoois superiores.....	56
Figura 5	Reações envolvidas na análise de aldeídos.....	57
Figura 6	Reações envolvidas na análise de furfural.....	58
Figura 7	Reações envolvidas na análise de ésteres.....	58
Figura 8	Reações envolvidas na análise de metanol.....	59
Figura 9	Reações envolvidas na análise de cobre.....	60
Figura 10	Mecanismo de reação proposto para o método DPPH.....	65
Figura 11	Cromatograma da solução padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido p-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11) 4-metilumbeliferona e (12) ácido o-cumárico.....	76
Figura 12	Compostos fenólicos totais e o somatório dos compostos fenólicos por HPLC das cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira.....	85
Figura 13	Atividade antioxidante das cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira e analisadas em diferentes tempos...	88
Figura 14	Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá frente às bactérias testadas.....	89
Figura 15	Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel	

	de carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá frente aos fungos testados.....	96
Quadro 1	Padrões de identidade da aguardente de cana e de cachaça (Brasil, 2005).....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Local de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do tonel e tempo de armazenamento).....	53
Tabela 2	Condições do cromatográfico líquido de alta eficiência (HPLC) para análise dos compostos fenólicos.....	62
Tabela 3	Resultados das análises físico-químicas de teor alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural e álcoois superiores, das cachaças envelhecidas.....	72
Tabela 4	Resultado das análises físico-químicas de metanol, congêneres, cobre e extrato seco das cachaças envelhecidas.....	73
Tabela 5	Tempo de retenção (tR) médio para os compostos fenólicos analisados.....	77
Tabela 6	Parâmetros, coeficiente de correlação (R^2) das curvas analíticas.....	78
Tabela 7	Limite de detecção e limites de quantificação.....	78
Tabela 8	Compostos fenólicos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em cachaça envelhecida em tonel de carvalho.....	79
Tabela 9	Compostos fenólicos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em cachaça envelhecida em tonel de amburana...	80
Tabela 10	Compostos fenólicos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em cachaça envelhecida em tonel de bálsamo.....	80
Tabela 11	Compostos fenólicos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em cachaça envelhecida em tonel de jequitibá.....	81
Tabela 12	Concentração de compostos fenólicos totais de cachaças envelhecidas.....	83
Tabela 13	Resultados das atividades antioxidantes das cachaças.....	87
Tabela 14	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça	

	envelhecida em tonel de carvalho encontrada para os microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella choleraesuis</i>	90
Tabela 15	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de amburana encontrada para os microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella choleraesuis</i>	91
Tabela 16	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de bálsamo encontrada para os microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella choleraesuis</i>	92
Tabela 17	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de jequitibá encontrada para os microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella choleraesuis</i>	93
Tabela 18	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de carvalho encontrada para os fungos <i>Aspergillus flavos</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	97
Tabela 19	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de amburana encontrada para os para os fungos <i>Aspergillus flavos</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	97
Tabela 20	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça	

	envelhecida em tonel de bálsamo encontrada para os fungos <i>Aspergillus flavos</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	98
Tabela 21	Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de jequitibá encontrada para os fungos <i>Aspergillus flavos</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	98

LISTA DE SIGLAS

APEX	Agência de Produção e Exportação
BHI	Caldo-infusão de cérebro e coração
CL	Cloranfenicol
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	1,1 difenil-2-picrilhidrazila
DTA	Doenças transmitidas por Alimentos
FDA	Food And Drug Administrattion
Gy	Gray
HPLC	High Performance Liquid Chomatographic
IARC	International Agency for Research on Cancer
LQA	Laboratório de qualidade de aguardente
LQ	Limite de detecção
MAPA	Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEA	Malt extract agar
NCCLS	National Committe for Clinical Laboratory Standanda
OTA	Ocratoxina A
PIQs	Padrões de identidade e qualidade
TSA	Triptic soy agar
UFC	Unidades formadoras de Colônia
UFLA	Universidade Federal de Lavras
%vv	Porcentagem de um líquido compreendido em outro
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	Definições de cachaça.....	19
2.2	Padrões de Qualidade – Legislação Brasileira.....	19
2.3	Compostos secundários e contaminantes presentes nas cachaças.....	23
2.3.1	Álcoois superiores.....	23
2.3.2	Ésteres.....	24
2.3.3	Aldeídos.....	25
2.3.4	Ácido Acético.....	26
2.3.5	Metanol.....	26
2.3.6	Furfural.....	27
2.3.7	Cobre.....	28
2.3.8	Acroleína.....	29
2.3.9	Carbamato de Etila.....	30
2.4	Envelhecimento.....	31
2.5	Compostos fenólicos.....	33
2.6	Compostos fenólicos presentes em cachaças envelhecidas.....	38
2.7	Doenças Transmitidas por alimentos – DTA.....	40
2.7.1	<i>Escherichia coli</i>	42
2.7.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	43
2.7.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	44
2.7.4	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	45
2.7.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
2.8	Contaminação por fungos filamentosos.....	48
2.8.1	<i>Aspergillus flavus</i>	49
2.8.2	<i>Aspergillus níger</i>	50
2.8.3	<i>Aspergillus carbonarius</i>	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1	Obtenção das amostras.....	53
3.2	Análises físico-químicas.....	53
3.2.1	Exame organoléptico.....	54
3.2.2	Teor alcoólico.....	54
3.2.3	Extrato seco.....	54
3.2.4	Acidez.....	55
3.2.5	Álcoois superiores.....	55
3.2.6	Aldeídos.....	56
3.2.7	Furfural.....	57
3.2.8	Ésteres.....	58
3.2.9	Metanol.....	59

3.2.10	Cobre.....	60
3.3	Compostos Fenólicos.....	61
3.3.1	Reagentes e padrões.....	61
3.3.2	Preparação das amostras e padrões.....	61
3.3.3	Equipamento do HPLC.....	63
3.4	Compostos fenólicos totais.....	63
3.5	Atividade antioxidante.....	64
3.6	Obtenção dos extratos fenólicos de cachaças envelhecidas.....	66
3.7	Atividade biológica dos extratos fenólicos.....	66
3.7.1	Manutenção e ativação das culturas bacterianas.....	67
3.7.2	Padronização dos inóculos.....	67
3.7.3	Efeito inibitório dos extratos fenólicos sobre as bactérias.....	68
3.7.4	Teste de difusão cavidade em Agar.....	68
3.7.5	Efeito inibitório dos compostos fenólicos sobre as espécies fúngicas.....	69
3.7.6	Avaliação do efeito biocida.....	70
3.8	Análises estatísticas.....	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1	Análises físicas químicas das cachaças envelhecidas.....	72
4.1.1	Quantificação dos compostos fenólicos.....	75
4.1.2	Compostos fenólicos totais.....	83
4.1.3	Atividade antioxidante das cachaças.....	86
4.1.4	Efeito inibitório de extratos fenólicos em bactérias.....	88
4.1.5	Efeito inibitório de extratos fenólicos sobre as espécies fúngicas.....	96
5	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102
	APÊNDICE.....	114

1 INTRODUÇÃO

A produção de cachaça é atualmente um dos setores agroindustriais que mais cresce no país; a bebida é considerada como símbolo da nacionalidade brasileira, sendo apreciada pelo seu sabor e aroma característicos, que são formados durante o processo de fermentação, destilação e envelhecimento.

O mercado de produção de cachaça está cada vez mais competitivo. O envelhecimento em barris de madeira é uma prática comum muito importante, com o intuito de agregar valor ao produto. Nesse processo ocorrem diversas reações químicas que proporcionam a incorporação de compostos provenientes das madeiras. O envelhecimento da bebida não depende exclusivamente da espécie de madeira utilizada para armazenar a aguardente, mas também outros fatores como o tempo de permanência da bebida no interior dos tonéis, melhorando sensorialmente sua qualidade e sendo responsável pelas mudanças químicas e físicas (AQUINO et al., 2006; PARAZZI et al., 2008).

Os compostos fenólicos estão presentes em diferentes tipos de tecidos vegetais, são definidos como substâncias que possuem um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxílicos. As propriedades biológicas dos compostos fenólicos dependem de suas estruturas químicas, pois essas apresentam características multifuncionais como antioxidantes, que são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células; também possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetal e animal. Já foi comprovado cientificamente que os compostos fenólicos incorporados na alimentação humana não conservam apenas a qualidade do alimento, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de micro-organismos patogênicos que são prejudiciais à saúde do consumidor.

Os compostos fenólicos provenientes de vários tecidos vegetais possuem atividades biológicas como antioxidante, anticarcinogênica, antiteratogênica e antimicrobiana. Diversos compostos fenólicos têm sido aplicados em alimentos como conservantes químicos, visando à estabilidade microbiana, além de apresentarem alto valor nutricional. Portanto é necessária a realização de estudos mais abrangentes desses compostos em relação à sua atividade antimicrobiana e sobre seus efeitos em diversos micro-organismos, que são impactantes à saúde. (FARHA et al., 2006).

Diante do exposto, no presente trabalho tem-se como objetivos avaliar a qualidade físico-química e cromatográfica de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, quantificar seus compostos fenólicos e avaliar sua atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definições de cachaça

A aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% em volume, a 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹; a cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% v/v, a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹, expressos em sacarose (BRASIL, 2005).

De acordo com a 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; 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, 2005).

2.2 Padrões de qualidade – legislação brasileira

A qualidade da cachaça pode ser influenciada por diversos fatores, como matéria-prima, fermentação, destilação, envelhecimento, etc. A fermentação é

considerada o ponto crítico do processo de fabricação, uma vez que os compostos formadores do aroma que caracterizam a bebida são formados nesta etapa. Buscando tanto a melhoria do produto final quanto o incremento financeiro para o produtor, a necessidade de um produto competitivo e que atenda às novas exigências do mercado tem atraído investimentos para o setor de cachaça, no intuito de estimular a qualidade e a elitização do consumo. Várias pesquisas têm sido realizadas em toda a cadeia produtiva da cachaça; seleção de variedades de cana-de-açúcar, aspectos fermentativos, seleção de cepas de leveduras, aperfeiçoamento do processo de destilação, escolha de madeiras para o envelhecimento do produto, e quantificação e origem dos contaminantes por meio das análises físico-químicas e cromatográficas que caracterizam o produto de alta qualidade (SCHWAN et al., 2006).

Com o passar do tempo, melhoraram-se as técnicas de produção. E o produto ganhou notoriedade nacional. A cachaça passou a ser apreciada por todos. Hoje, várias marcas de alta qualidade figuram no comércio nacional e internacional e estão presentes nos melhores restaurantes e adegas residenciais no Brasil e no mundo. Segundo a Agência de Promoção de Exportações e Investimentos, APEX (2008), a bebida 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 (APEX, 2008).

No Brasil, existem mais de 30 mil produtores de cachaça, os quais produzem aproximadamente mais de 5 mil marcas, gerando 400 mil empregos diretos e indiretos. O estado de São Paulo é o maior produtor (44%), seguido por Pernambuco e Ceará, com 12% cada um e Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, com 8%, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Paraíba dividem o restante da produção nacional. Minas Gerais é o estado com o maior número de cidades produtoras da bebida de alambique e o mais especializado na área. Representa 50% da produção de cachaça de alambique, com 5.000 alambiques e uma

produção que pode alcançar 200 milhões de litros/ano, destacando as regiões Norte, Jequitinhonha e Rio Doce, as quais detêm cerca de 63% da produção mineira. Acredita-se que apenas 0,3% do que é produzido no Estado seja exportado (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, SEBRAE, 2011).

De acordo com a Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005 (BRASIL, 2005), os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para a aguardente de cana-de-açúcar e cachaça, estabelecidos pela Legislação Brasileira, foram definidos como descritos no Quadro 1.

Quadro 1 Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) da aguardente de cana-de-açúcar e da cachaça (BRASIL, 2005).

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

*Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico

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

2.3 Compostos secundários e contaminantes presentes nas cachaças

Os compostos secundários são formados por diversas reações que ocorrem durante o processo de fermentação, destilação e também durante o armazenamento em barris de madeira, os quais são constituídos de alcoóis hidrocarbonetos e compostos carbonilados com três ou mais átomos de carbono. Substâncias como cetonas, compostos fenólicos, aminas e compostos sulfurados podem ser encontrados em pequenas proporções, mas de grande importância na qualidade da bebida.

Do ponto de vista sensorial, as substâncias podem ser classificadas como desejáveis e não desejáveis, realçando o cheiro e o sabor da bebida ou depreciando o paladar, sendo considerados como tóxicos e atóxicos para a saúde do consumidor. Seja qual for a sua classificação, é necessário realizar um controle rigoroso quanto ao seu teor na bebida. As substâncias não desejáveis são designadas de contaminantes e, de acordo com a sua natureza química, recebem a classificação de orgânicas e inorgânicas (SIEBALD; CANUTO; SILVA, 2009).

2.3.1 Álcoois superiores

Os álcoois superiores são considerados como substâncias voláteis presentes na bebida; sendo formados por mais de dois átomos de carbono provenientes da reação de degradação de aminoácidos durante o processo de fermentação ou das vias de degradação do próprio açúcar (PENTEADO; MASINI, 2009; VILELA et al., 2007). Os álcoois superiores, com três a cinco átomos de carbono, apresentam odores característicos, conhecido como “buquê”, tradicionalmente associados com bebidas destiladas, destacando-se os álcoois amílico e propílico, e seus respectivos isômeros. Acima disso, eles tornam-se

oleosos e alguns lembram aromas de flores, diminuindo o valor comercial e a qualidade da cachaça. (MAIA, 1999).

Os principais álcoois superiores encontrados nas cachaças são os álcoois isoamílico (2-metilbutanol-1), amílico (pentanol-1), isobutílico (2-metilpropanol-1) e propílico (propanol-1) (CARDOSO, 2006; VILELA et al., 2007).

Segundo Cardoso (2006), os álcoois superiores podem ser formados quando a cana, já cortada, permanece estocada por um período superior a 24 horas, para depois, ser moída. Do ponto de vista quantitativo, a formação dos álcoois superiores depende da cepa empregada, assim como da ocorrência de micro-organismos contaminantes. A formação desses compostos é maior quando a fermentação é conduzida de maneira lenta, devido à fraca atividade do fermento, à temperatura elevada e ao pH ácido. Esses álcoois, assim como os ésteres e aldeídos, em quantidades normais, são responsáveis pelo aroma e sabor característico da bebida.

2.3.2 Ésteres

Os ésteres são formados pela reação de esterificação entre pequenas quantidades de etanol e ácidos carboxílicos, provenientes do processo de fermentação. Normalmente, o acetato de etila representa aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça. Quando esses estão presentes em baixas concentrações, proporciona um aroma agradável de frutas à aguardente de cana; porém, em grandes quantidades, confere à bebida um sabor enjoativo e indesejado (PARAZZI et al., 2008). Os ésteres propanoato de etila, butanoato de etila, pentanoato de etila, heptanoato de etila e acetato de hexila são minoritários em cachaça e potencialmente importantes ao aroma da bebida (NÓBREGA, 2003).

Durante o processo de envelhecimento, alguns ésteres são formados pela interconversão dos compostos fenólicos, tais como siringato de etila e vanilato de etila, e outros são extraídos da madeira, como o homovanilato de metila e o siringato de metila (VICHI et al., 2007).

Tanto a quantidade quanto a proporção dos diferentes ésteres influencia a percepção de aromas nas bebidas; fatores como o tipo e quantidade de fermento, temperatura, aeração e agitação na fermentação e qualidade do caldo influenciam fortemente a formação dos ésteres. A aeração ou agitação fornece uma maior concentração de oxigênio para as leveduras, que também interfere-se na formação deste composto. Aparentemente a maioria dos ésteres é produzida nos últimos estágios de fermentação, ao contrário dos álcoois, que são produzidos abundantemente no início (BERRY, 1995).

2.3.3 Aldeídos

Os aldeídos são formados durante o processo de fermentação alcoólica. Desses, a maioria é indesejável do ponto de vista tóxico, 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 nesta etapa de produção da bebida é o acetaldeído. Os demais aldeídos são obtidos provavelmente pela oxidação de álcoois superiores (PEREIRA et al., 2003; CARDOSO 2006).

O limite de percepção olfativa do acetaldeído é de 100,0 mg L⁻¹, no vinho, podendo tornar-se irritante ao aparelho respiratório quando em concentração superior a 134,0 mg L⁻¹. O acetaldeído tem se mostrado um potente teratogênico em ratos, sendo considerado também como agente mutagênico e carcinogênico (OSBORNE et al., 2000).

Na indústria de bebidas, é importante conhecer as concentrações de acetaldeído, pois ele tem um papel central na manifestação de intoxicação alcoólica. A Legislação Brasileira estabelece, para aldeídos totais em cachaça, o limite de 30,0 mg de acetaldeído por 100 mL de álcool anidro. Em vinhos, altas concentrações de acetaldeído resultam em um aroma herbáceo indesejável (AZEVEDO et al., 2007).

2.3.4 Ácido Acético

Os ácidos são compostos normalmente produzidos durante a fermentação, sendo produzidos por leveduras ou bactérias provenientes de contaminação. O ácido acético também pode ser formado por meio da conversão do açúcar na presença de oxigênio e do levedo *Saccharomyces cerevisiae*. Quantidades elevadas de ácidos 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 (PEREIRA et al., 2003; CARDOSO, 2006).

Uma acidez elevada na cachaça é sensorialmente desagradável e está associada a práticas de estocagem da cana e contaminações do mosto com bactéria acética. A presença de 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 (CARDOSO, 2006).

2.3.5 Metanol

Entre todos os álcoois presentes na cachaça, o metanol é extremamente indesejável, devido à sua alta toxicidade. Sua ingestão, mesmo em quantidades

reduzidas, por longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira ou mesmo a morte (BADOLATO; DURAN, 2000). Sua formação é devido à degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, durante o processo de fermentação. Portanto, deve-se evitar uma fermentação realizada na presença de frutas ricas em pectina, como laranja, maçã, abacaxi e também a presença de bagacilhos no caldo da cana a ser fermentado (CARDOSO, 2006).

O metanol pode levar vários dias para ser excretado e demorar até 36 horas para manifestar os sintomas de cefaleia, vertigem, vômitos, dor intensa no abdômen, visão embaçada, etc. Segundo Cardoso (2006), a oxidação do metanol origina o ácido fórmico, dióxido de carbono e água. Tanto o ácido fórmico quanto o dióxido de carbono apresentam características ácidas e, assim, promovem a acidose no sangue e, como consequência distúrbios no sistema respiratório, levando até o coma. Os problemas visuais são os sintomas comuns da intoxicação; 15 mL de metanol provoca cegueira e de 10,0 a 100,0 mL pode ser fatal.

2.3.6 Furfural

O furfural e o hidroximetilfurfural são contaminantes orgânicos indesejáveis na bebida. A alta temperatura associada ao baixo pH do mosto acarreta desidratação dos açúcares e hidrólise de polissacarídeos dos bagacilhos (celulose, hemicelulose, pectina e outros) formando 2-furfural (furfural) e 5-hidroximetil-2-furfural (hidroximetilfurfural). As pentoses formam furfural como principal produto de degradação, enquanto as hexoses formam hidroximetilfurfural. Outros fatores, como o envelhecimento da bebida sob condições irregulares, a adição de caramelo e a pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques, também, podem contribuir para o

aumento no teor destes componentes. (FARIA et al., 2003 citado por ZACARONI et al., 2011).

Masson et al. (2007), pesquisando o furfural e o hidroximetilfurfural em cachaças produzidas de cana crua e cana queimada, mostraram que a queima e requeima de cana de açúcar antes da moagem, influenciaram o aparecimento do furfural e hidroximetilfurfural. Trabalhos de Azevedo et al. (2007) relatam que o contato prolongado com o furfural pode causar dermatite, irritação da mucosa e trato respiratório, além de afetar o sistema nervoso central.

2.3.7 Cobre

O cobre, material amplamente empregado na indústria de confecção de destiladores, conduz à contaminação do destilado por íons cúpricos. A presença de cobre nas cachaças de alambique deve-se principalmente ao azinhavre $[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$, carbonato básico de cobre que, uma vez formado, adere-se na parede interna do alambique e é dissolvido pelos vapores levemente ácidos da bebida durante o processo de destilação. A Legislação Brasileira limita o teor de cobre em bebidas destiladas em $5,0 \text{ mg L}^{-1}$; entretanto, para exportação, o limite é de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL, 2005).

Dos metais presentes, somente o cobre é desejável, desde que esteja abaixo de limite estabelecido pela legislação. Sua toxicidade está na grande afinidade com os grupos SH de enzimas e proteínas. Estudos apontam que a sua presença na cachaça melhora as propriedades sensoriais, pois esse metal catalisa a oxidação do gás sulfídrico e dos tióis, sulfito e dissulfeto, que são compostos de baixa solubilidade, permanecendo na fração cauda, ocorrendo, assim, a redução da concentração deles na bebida. O cobre também interfere no equilíbrio líquido-vapor, promovendo um aumento da concentração de acetato de etila no destilado e uma diminuição da concentração do acetaldeído. O cobre

reage com os ácidos carboxílicos, formando os organocúpricos e contribuindo para uma acidez mais equilibrada na bebida. (CARDOSO, 2006).

Para minimizar a contaminação da bebida por cobre, basta fazer uma limpeza apropriada do alambique com água e limão. No entanto, os produtores não acatam essa medida e preferem utilizar filtros de resina de troca iônica ou de carvão ativado, após a destilação. Esse procedimento remove o cobre, podendo remover também outras substâncias importantes no aroma e sabor da bebida (LIMA et al., 2009).

2.3.8 Acroleína

Segundo Cardoso (2006) e Azevêdo et al. (2007), a formação de acroleína ocorre durante o processo de fermentação, por meio da desidratação do glicerol associado a bactérias termofermentativas. Acredita-se que o aroma penetrante e apimentado em bebidas recém-destiladas, uísques conhaques ou rum seja causado pela acroleína. Nos últimos anos, tem-se observado um considerável interesse por parte do WHO (World Health Organization), particularmente pela IARC (International Agency for Research on Cancer), para identificar esses e outros congêneres presentes em bebidas alcoólicas que podem ser carcinogênicos, mutagênicos ou tóxicos (NASCIMENTO et al., 1997). A quantificação dos teores da acroleína em cachaça faz-se necessário visto que a Legislação Brasileira estabelece o limite máximo de 5 mg/100 mL de álcool anidro, acima desse limite, a bebida estará imprópria para ser comercializada.

2.3.9 Carbamato de Etila

O carbamato de etila vem despertando grande interesse devido ao seu alto potencial carcinogênico, sendo sua quantificação exigida pela legislação a partir de 2014 (BRASIL, 2005). No entanto, sua origem e formação ainda não estão bem elucidadas. Alguns autores acreditam que se origina da degradação de aminoácidos, outros que venha de reações entre o etanol e o ácido cianídrico catalisado pelo cobre ou pela auto-oxidação de compostos insaturados induzidos pela radiação ultravioleta (CARDOSO, 2006; MASSON, 2009).

O carbamato de etila é encontrado naturalmente em baixas concentrações, em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados. Geralmente, sua formação envolve a reação entre o etanol e precursores nitrogenados, tais como ureia, fosfato de carbamila e cianeto (MACKENZIE et al., 1990; ARESTA et al., 2001; BOSCOLO, 2002).

Diversos autores relatam sobre a quantificação desse composto em cachaças. Andrade-Sobrinho et al. (2002), analisando 126 amostras de cachaças provenientes de diferentes locais, obtiveram concentração média de 770 µg/L. Barcelos et al. (2007), trabalhando com diferentes cachaças do estado de Minas Gerais, encontraram níveis de carbamato de etila que variaram de não detectado a 643,5 µg/L; em algumas amostras os valores do carbamato de etila não estavam dentro da legislação vigente (150 µg/L). Em vinhos e seus derivados, saquês, cervejas, licores, bebidas destiladas, como aguardentes de frutas, uísque, foram encontradas quantidades que variam de 5 a 1000 µg/L (ppb), excedem 1000 µg/L em alguns tipos de bebidas destiladas, segundo pesquisas realizadas pela *Food And Drug Administration* (FDA).

2.4 Envelhecimento

O envelhecimento da bebida em tonéis de madeira é uma etapa importante, que se tornou uma prática comum entre os produtores de cachaças, com intuito de agregar valor ao produto, tornando mais competitivo no mercado. Essa etapa é responsável por melhorias nas características sensoriais da cachaça, tornando seu sabor mais agradável e suave. Durante o envelhecimento, são incorporadas à bebida substâncias oriundas da madeira (ABREU-LIMA, 2005).

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, como dilatação e contração da cachaça dentro do tonel, vazamentos e expulsão de cachaça por frestas e conseqüente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, devido à inadequação de instalações de ambientes, além do modo de armazenamento (MIRANDA et al., 2006).

Mori et al. (2006) citam as reações entre os compostos secundários provenientes da destilação, a extração direta de componentes da madeira, a decomposição de macromoléculas da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) e a subsequente incorporação desses compostos na bebida, podendo ocorrer também reações entre os compostos da madeira com os componentes originais do destilado.

Os principais compostos extraídos da madeira pelos destilados são os óleos voláteis, compostos fenólicos, substâncias tânicas, açúcares, glicerol e ácidos orgânicos não voláteis, que modificam o aroma, sabor e a coloração da bebida (Mori et al. (2006) citado por Zacaroni, (2009).

Vários fatores influenciam a qualidade da cachaça envelhecida, como a espécie da madeira e sua composição química, o tamanho e o histórico do tonel, pré-tratamento dos barris, condições ambientais e tempo de envelhecimento. Esses devem ser observados, pois irão influenciar nas interações entre a bebida e a madeira. Quando a bebida é envelhecida em temperaturas mais elevadas e em recipientes menores, há uma maior extração e, conseqüentemente, uma maior concentração de componentes da madeira. Bebidas envelhecidas em ambientes cuja temperatura varia de 9 a 15°C e a umidade relativa é próxima a 73%, apresentam um aroma mais fino e agradável (DIAS, 2009).

O tratamento térmico é o tratamento mais comum sofrido pela madeira durante o processo de envelhecimento. Esse termo tratamento é necessário para dar forma aos barris, bem como para modificar as estruturas moleculares da madeira, causando a degradação de polímeros, 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). Pesquisas anteriores realizadas por Campos et al. (2004), avaliando as relações entre o tratamento térmico das madeiras (amburana e bálsamo) e as concentrações de fenólicos (ácidos vanílico e siríngico, siríngaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) para o envelhecimento da cachaça, mostraram que cada madeira necessita de condições específicas durante o tratamento, a fim de se obter uma extração mais efetiva dos compostos fenólicos presentes.

Walder et al., 2004 citam que o uso das radiações ionizantes pode ser uma nova técnica para o tratamento dos tonéis e das madeiras para maturação e envelhecimento de bebidas, aumentando a taxa de extração e de reações entre os compostos, permitindo uma extração mais rápida dos compostos presentes na madeira. Concluíram que as cachaças irradiadas com as doses de 150 e 200 Gy

obtiveram maior aceitação sensorial pelos provadores e maior concentração de compostos fenólicos.

2.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão entre as substâncias com atividade biológica mais estudada em alimentos. Possuem um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas. São substâncias amplamente encontradas no reino vegetal, produzidas naturalmente pelas plantas em resposta às variações ambientais. Abrangem cerca de aproximadamente 8.000 compostos com diferentes estruturas químicas. Possuem influência direta sobre parâmetros sensoriais, tais como conferência de cor e adstringência (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2011).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, divididos em duas categorias: pouco distribuídos na natureza, e polímeros largamente distribuídos na natureza. No primeiro grupo, encontra-se um número bem reduzido, embora com uma certa frequência. Nesses grupos, 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 (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

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 benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (ANGELO; JORGE. 2007).

As propriedades químicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio.

Essa atividade, por sua vez, dependerá das suas estruturas químicas, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor, velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potenciais de quelação de metais (OLDONI, 2010).

De acordo com seu modo de ação como antioxidante, os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação. Os processos de oxidação de substâncias orgânicas são uma das principais causas na redução de vida de útil dos produtos alimentícios industrializados, bem como das matérias primas em geral. Portanto, o conhecimento e compreensão dos mecanismos de reação e as formas de controle para os mesmos são de suma importância econômica para a indústria alimentícia. Entre as principais reações de oxidação em produtos alimentícios, destacam-se o escurecimento enzimático e a oxidação lipídica, causando alterações sensoriais, envolvendo o desenvolvimento de notas aromáticas desagradáveis, denominadas de uma forma generalizada de ranço. Essas reações ocorrem com os substratos específicos, que são os ácidos graxos, encontrados normalmente na constituição dos glicerídeos (ANGELO; JORGE, 2007).

Os mecanismos de reação para explicar a ocorrência desses processos de deterioração em lipídios ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se, no entanto, que podem se oxidar por meio de mecanismo via enzimática ou não enzimática. Os alimentos contendo significantes teores de ácidos graxos polinsaturados têm contribuído pela necessidade de empregar agentes antioxidantes para prevenir a oxidação; esses agentes oxidantes tendem a estabilizar os ácidos graxos em alimentos mediante de uma reação com radicais livres, quelando íons metálicos e oxigênio, interrompendo a fase de propagação da oxidação lipídica. Os antioxidantes naturais ou artificiais apresentam funções similares; sendo que vem sendo questionada a salubridade de alguns

antioxidantes comerciais, vistos que alguns estudos têm demonstrado que eles podem favorecer efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH et al., 2001).

Os compostos fenólicos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora. Esses compostos fenólicos também apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente, como luz, temperatura e umidade, mas para fatores internos, incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo pra sua síntese. (ANGELO; JORGE, 2007).

Quanto às bebidas alcoólicas, o vinho tinto é um dos produtos que apresenta uma elevada ação antioxidante, em razão da presença de altas concentrações de substâncias polifenólicas, como taninos, ácidos fenólicos, flavonóides, catequinas e antocianinas. Mesmo que a composição polifenólica dos vinhos seja altamente dependente do tipo de uva, das condições climáticas, das técnicas de cultivo e produção e da forma de armazenamento, estima-se que todos os tipos de vinho exerçam uma importante ação protetora contra doenças cardiovasculares e degenerativas (GALLICE et al., 2011).

Diversas metodologias têm sido propostas, para determinação da atividade antioxidante, no qual o radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), que é um radical livre e estável, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina, como mostrado na figura 1 (KOLEVA et al., 2002).

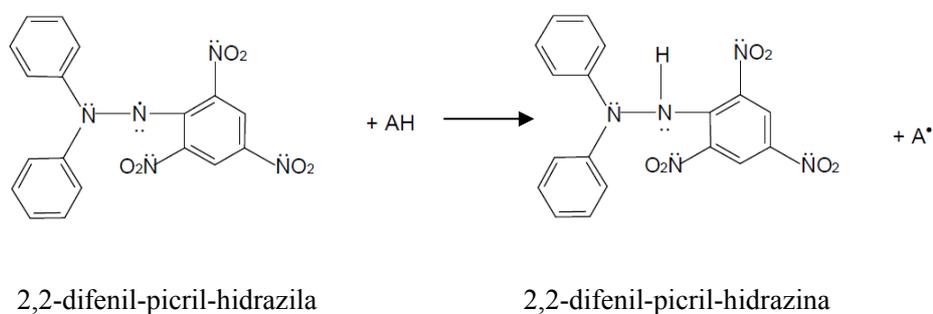


Figura 1 Mecanismo de redução do radical livre DPPH

Nesse método, ocorre a redução do radical livre do reagente DPPH•. Esse apresenta cor púrpura que absorve em aproximadamente 515 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, podendo a reação ser medidas por absorbância (ARBOS, 2009).

Nessa reação, à medida que o radical livre sofre redução pelos compostos presente na bebida, observa-se uma mudança da coloração violeta intensa, que é a original da solução, para uma coloração amarela, e que pode ser medida espectrofotometricamente. A descoloração se deve ao pareamento, dos elétrons do DPPH• disponíveis; assim, quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução e maior a coloração amarela. (ARBOS, 2009).

Entre os compostos extraídos da madeira e incorporados à bebida, destacam-se os compostos fenólicos, que têm sido largamente estudados pelo fato de serem específicos para cada espécie de madeira utilizada para o armazenamento da bebida, bem como por apresentarem conhecidas propriedades antioxidantes (ANJOS et al., 2011).

Oliveira (2009) cita alguns métodos para a determinação de compostos fenólicos totais, empregando a metodologia que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico, Nessa real o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI). Essa coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica. Um exemplo da reação de Folin-Ciocalteu ocorre com o padrão ácido gálico em meio básico (FIGURA 2), gerando ânions fenolatos, ocorrendo uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual, segundo Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul, por meio das seguintes reações:

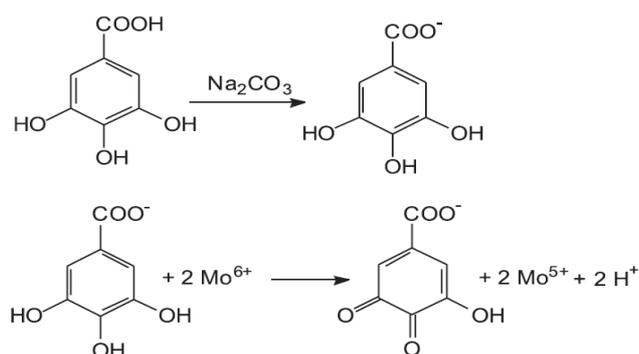


Figura 2 Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin- Ciocaulteau

2.6 Compostos fenólicos presentes em cachaças envelhecidas

Um grande número de compostos presentes em aguardentes envelhecidos em tonéis de madeira são provenientes da degradação de macromoléculas da madeira (hemicelulose, celulose, lignina e tanino). São extraídos pela bebida os óleos voláteis, substâncias tânicas, aldeídos fenólicos, glicídios, açúcares, glicerol, ácidos orgânicos não voláteis e esteroides que modificam o aroma e sabor da bebida (CARDELLO; FARIA, 2000). Esse efeito está intimamente ligado à composição química da madeira utilizada. Alguns compostos derivam da hemicelulose e celulose, como os glicídios (glicose, arabinose, xilose e manose) (FLANZY, 2003).

Numerosos compostos fenólicos estão presentes em várias espécies de madeiras. Esses compostos incluem um grande número de ácidos, aldeídos, álcoois, flavonóides, taninos e cumarinas. Entre os fenóis mais simples, de baixo peso molecular, estão os derivados da degradação da lignina, como vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, e sinapaldeído e, entre os fenóis mais complexos, estão as cumarinas e os flavonoides (SOARES, 2002).

As cumarinas, escopoletina, ácidos gálico e elágico são os componentes majoritários em madeira de carvalho. Além dos compostos acima mencionados, encontram-se também os ácidos e aldeídos aromáticos derivados da lignina (ácidos cinâmico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) (CARDELLO; FARIA, 2000).

Os terpenos e seus derivados, compostos aromáticos alifáticos, furânicos, os óleos voláteis também estão presentes nas diferentes tipos de madeiras. Os terpenos e seus derivados representam um grupo diversificado de compostos que estão amplamente distribuídos na madeira. Muitos destes compostos já foram identificados, muitos dos quais possuindo aromas potentes e característicos.

Na madeira de carvalho a vanilina é oxidada a ácido vanílico (aroma de baunilha). Os principais compostos fenólicos encontrados em cachaças armazenadas em tonéis de carvalho são: ácidos gálico, vanílico, siríngico e siringaldeído. Em cachaças armazenadas em tonéis balsamo, castanheira e jequitibá os principais compostos fenólicos encontrados são: ácido gálico, siringaldeído, ácido vanílico e ácido siríngico. A queima das barricas promove a degradação da lignina, obtendo-se uma extração mais rápida de compostos para a bebida. No caso do carvalho e algumas outras madeiras, a vanilina proporciona características sensoriais desejáveis a bebida (FLANZY, 2003).

Os compostos fenólicos presentes em cachaças envelhecidas são responsáveis pelo gosto, aroma, sabor e flavour da bebida (SOARES, 2002). Os principais compostos incorporados à cachaça estão relatados na literatura e estão descritos na Figura 3.

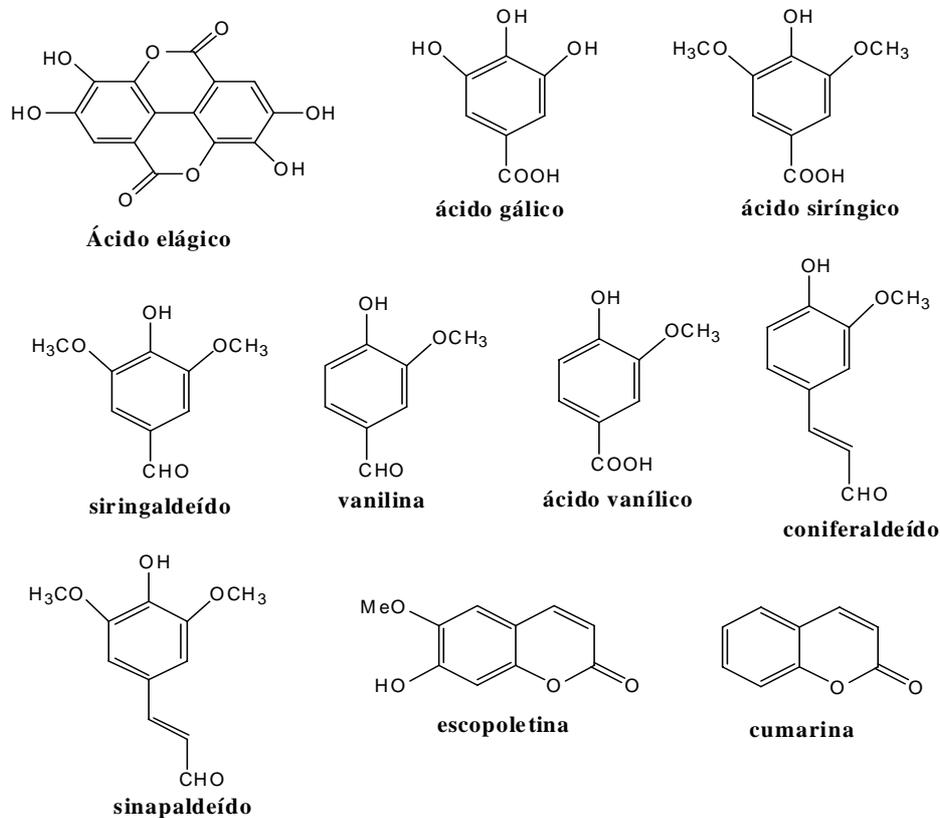


Figura 3 Principais compostos fenólicos incorporados à aguardente de durante o processo de envelhecimento

2.7 Doenças transmitidas por alimentos - DTA

As principais doenças de origem alimentar, ou transmitidas por alimentos, são de vital interesse para a saúde pública. Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas como qualquer doença infecciosa ou de natureza tóxica causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. A

maioria, no entanto, é de origem microbiana. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2004).

De acordo com Jay (2005), as bactérias são os principais micro-organismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos, pois atuam sobre numerosos tipos de substratos, sob diferentes faixas de temperatura e de pH, bem como de condições do meio ambiente. Casos de DTA ocorrem diariamente em todos os países, mas como a maioria não é relatada, a verdadeira dimensão do problema é desconhecida.

Apesar da evolução dos conhecimentos sobre micro-organismo, dos mecanismos de intoxicação e das técnicas de higienização, tem-se observado ainda ocorrência de um número elevado de surtos e de casos de (DTA) (ANDRADE, 2011).

Doença transmitida por alimentos é um termo usado para definir uma síndrome que se caracteriza por apresentar sintomas como anorexia, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída à ingestão de alimentos contaminados. Além desses sintomas, ainda podem ocorrer infecções extra-intestinais, em diferentes órgãos e sistemas, como meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido (BRASIL, 2010).

A maioria dos surtos provocados por DTA tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração sensorial visível. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de micro-organismos necessária para degradar os alimentos. Problemas como esses dificultam a rastreabilidade dos alimentos causadores de surtos, tendo em vista que na maior parte dos casos os consumidores afetados dificilmente conseguem identificar os alimentos fonte da DTA. Alimentos com características sensoriais alteradas dificilmente causam surtos alimentares, pois normalmente são rejeitados devido

à sensação repulsiva que causam aos consumidores. Nessas condições, a contaminação microbiana é elevada, podendo ultrapassar números da ordem de 10^8 UFC/g de alimento (FORSYTHE, 2010).

2.7.1 *Escherichia coli*

A principal causa de doenças diarreicas é a ingestão de alimentos e/ou água contaminados por micro-organismos patogênicos. Um dos agentes etiológicos das infecções entéricas é a bactéria *Escherichia coli*, sendo a principal representante do grupo dos coliformes termotolerantes. Pertence à família Enterobacteriaceae, apresentam-se como bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 44,5 – 45°C (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

A espécie *Escherichia coli* inclui cepas não patogênicas que têm como habitat o trato intestinal de humanos e animais sadios, e cepas altamente patogênicas, responsáveis por provocarem surtos de doenças em humanos e animais, com considerável taxa de mortalidade. Sua presença em alimentos e água indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerada o indicador clássico da possível presença de micro-organismos patogênicos (JAY, 2005; TORTORA, 2000).

Assim, contagens elevadas de *E. coli* relacionam-se à falta de higiene e falhas no processamento de alimentos. O leite, carne e seus derivados podem sofrer contaminação direta ou indireta por esse micro-organismo. Tem sido demonstrado que essa bactéria é capaz de sobreviver às condições de processamento de queijos, incluindo a maturação (KARPER et al., 2004).

De acordo com Germano e Germano (2003), a água contaminada com despejos de esgoto é uma das mais importantes vias de transmissão do agente na

natureza. Por outro lado, qualquer alimento exposto a contaminação fecal, seja através de preparo ou dos manipuladores infectados, pode veicular a *E. coli*. A infecção por *E coli* tem período médio de incubação de 36 horas e caracteriza-se por diarreia aquosa com muco, náuseas, dores abdominais, vômitos e febre. Na forma eteroinvasora, o período de incubação é de apenas 11 a 21 horas e os sintomas são diarreia, disenteria, cólicas, febre e mialgia.

Por esses motivos, cuidados especiais devem ser tomados com as águas de abastecimento, com a higiene dos operários que manipulam alimentos e com a limpeza e desinfecção dos equipamentos, instalações e instrumentos em geral. Deve-se tomar cuidados também no uso adequado das técnicas de oclusões, no momento da evisceração dos animais abatidos. É importante a cocção adequada e o acondicionamento dos alimentos sob refrigeração, depois de manipulados em atmosfera controlada (PARDI et al., 2005).

2.7.2 *Staphylococcus aureus*

Entre os diversos tipos de micro-organismos que podem ser transmitidos pelo leite, carne, ovos e seus derivados, destaca-se o *Staphylococcus aureus*. Esse é um patógeno contagioso da mastite, sendo disseminado durante o processo de ordenha, e também por alimentos que passam por vários processos de manipulação.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, apresentam-se como cocos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbio facultativo (JAY, 2005). É um organismo coagulase positivo, oxidase negativo e aeróbico facultativo, podendo crescer em uma ampla margem de temperatura, tendo como limite mínimo e máximo 7°C e 49°C, respectivamente, e a produção de toxinas ocorre na faixa de 10°C – 48°C, mas a faixa ótima de sua produção é de 40°C - 45°C (TORTORA, 2000).

O hábitat principal de *Staphylococcus aureus* é em humanos e animais; é a mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal. Organismos presentes no nariz podem contaminar facilmente a pele; assim, portadores nasais podem ser portadores cutâneos (FUEYO; MENDONZA; MARTIN, 2005).

É a partir da cavidade nasal que o micro-organismo atinge a epiderme, ar, água, solo, alimentos, ou qualquer outro objeto que entre em contato com o indivíduo. Os portadores nasais de *S. aureus*, ao manipularem alimentos, podem se tornar importante fonte de contaminação. Os produtos lácteos são os principais substratos alimentícios para esse micro-organismo. A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais fazem com que o *S. aureus* desenvolva-se com facilidade em vários alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Devido à capacidade de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano, esse micro-organismo está associado a altas taxas de mortalidade e morbidade. É capaz de adquirir resistência a antibióticos e de sobreviver em diferentes condições ambientais, o que o torna um perigoso agente infeccioso no ambiente hospitalar. Considerando o cenário epidemiológico mundial, esse micro-organismo é considerado a terceira causa mais relevante de DTAs. (SAGINUR; SUH, 2008).

2.7.3 *Listeria monocytogenes*

Segundo Jay (2005), a *L. monocytogenes* está representada por 13 sorovares, alguns dos quais são compartilhados por *L. innocua* e por *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*. A grande heterogeneidade antigênica dessa última espécie pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de multiplicar-se.

A espécie *Listeria monocytogenes* apresenta-se na forma de bastonetes curtos Gram-positivos, sendo não formadora de esporos, móveis (com flagelos peritríquios), catalase positiva, oxidase negativa, halotolerantes, desprovida de cápsula. É amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada do solo e fezes de humanos e de animais (JAY, 2005). Crescem em temperatura de 1 a 45°C, sendo a faixa ótima de 30 a 37°C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0°C. Suportam repetidos congelamentos e descongelamentos. (MANTILLA et al., 2007).

De acordo com Jay (2005), a ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode vir afetar principalmente indivíduos imunodeprimidos, gestantes e recém-nascidos. Manifesta-se por gastroenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante para o feto e septicemias, resultando na morte de 25 a 30% dos casos (KHELEF et al., 2005; SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

Segundo Silva e Junqueira (2007), a dose infectiva é desconhecida, mas, acredita-se variar conforme a cepa e a susceptibilidade do indivíduo atingido. O período de incubação é variável, havendo casos de surtos com períodos que vão de três a sete dias após a exposição ao produto contaminado.

Os mecanismos pelos quais causa listeriose ainda não estão bem definidos. Sabe-se, entretanto, que a bactéria produz algumas toxinas, destacando-se as toxinas hemolíticas (hemolisinas) e as toxinas lipolíticas, responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade de linfócitos (MANTILLA et al., 2007).

2.7.4 *Salmonella Choleraesuis*

Salmonella é o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo e também no Brasil. O gênero *Salmonella* pertence à

família Enterobacteriaceae e se apresenta na forma de bastonetes, Gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, oxidase negativa e catalase positiva. O organismo apresenta crescimento ótimo a 37°C, sendo o pH 7 ideal, variando entre 4 e 9 (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

Oficialmente o gênero apresenta duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, que incluem atualmente 2.519 e 22 sorotipos, respectivamente (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2004)

A incidência de salmonelose humana vem aumentando em várias partes do mundo, mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico utilizado na produção de alimentos e a adoção de melhores medidas higiênicas (GUIMARÃES et al., 2001).

A *Salmonella*. é um micro-organismo amplamente difundido na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais, De acordo com (MESQUITA et al., 2006), os mais variados tipos de alimentos estão envolvidos em surtos de infecção alimentar com *Salmonella*, mas principalmente o encontramos em alimentos de origem animal, como ovos e carnes de aves e seus derivados.

Para Germano e Germano (2003), a transmissão ocorre através de um ciclo de infecção entre o homem e animais, pelas fezes, água e alimentos, particularmente os de origem animal e também alimentos submetidos a irrigação, com águas contaminadas por esgotos, ou diretamente com material fecal utilizado como fertilizante, como no caso de produtos de origem vegetal.

De acordo com Jay (2005), a síndrome é causada pela ingestão de alimentos que contenham números significativos de espécies ou sorovares não hospedeiro específicos do gênero *Salmonella*. Os sintomas consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais (não tão agudas como na intoxicação estafilocócica), dor de cabeça, calafrios e diarreia. Esses sintomas são geralmente acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada,

nervosismo e sonolência, os quais persistem por 2 a 3 dias. A taxa de mortalidade, em média, é de 4,1%, variando de acordo com a faixa etária envolvida, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida, 2% entre o primeiro e os 50 anos e de 15% em pessoas acima de 50 anos.

Esse controle pode também ser facilitado pelo tratamento dos efluentes e dos dejetos de origem animal, higiene no abate de animais, pasteurização do leite, manipulação adequada e higiênica, conservação e cocção em temperaturas corretas, tratamento dos animais enfermos, prescrição cuidadosa de antibióticos nos casos humanos (e animais), visando a reduzir o número de cepas resistentes (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.7.5 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* é extremamente importante na indústria leiteira, por ser constituído por espécies capazes de se desenvolverem a uma temperatura igual ou menor a 7°C, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento (ROBINSON, 1987).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* tem sido responsável pela maioria dos casos de doença infecciosa no homem, como infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, idosos e crianças (MALLET et al., 2007).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa, aeróbica obrigatória, possui flagelos, não esporulada, capaz de crescer em ambientes simples e causa infecções crônicas por biofilmes em indivíduos imunocomprometidos (MASSAGUER, 2005). Essas infecções são notoriamente difíceis de se tratar, devido à alta resistência dos biofilmes a antibióticos. São oxidase e catalase positiva que crescem a 37°C e a 42°C; possui o metabolismo

oxidativo, tolera valores de pH relativamente altos e é capaz de sobreviver em substratos com pequenas quantidades de nutrientes (TRABULSI, 2002).

2.8 Contaminação por fungos filamentosos

A contaminação e a deterioração dos alimentos causados por fungos são muito comuns. A contaminação por fungos é importante não apenas sob o ponto de vista sensorial, mas também pelo perigo que a produção de micotoxinas representa para o consumidor.

As exigências no controle de qualidade e nas condições higiênico-sanitárias dos produtos são fundamentais e estão se tornando cada vez mais rigorosas, especialmente para os produtos destinados à alimentação humana e animal. Contaminações em alimentos causadas por fungos têm sido assunto de diversas pesquisas no mundo. Estima-se que aproximadamente 25% da produção anual de alimentos são deteriorados por fungos. Parte desses mico-organismo tem potencial para a produção de micotoxinas e representam um dos fatores de preocupação para a saúde (VARGA et al., 2003).

As espécies de fungos toxigênicos são encontradas em todo o mundo, muitas vezes em solos de regiões temperadas e tropicais, e a produção da micotoxina está sujeita a diversas influências, como: fatores geográficos e sazonais, práticas de cultivo, colheita, estocagem, transporte dos produtos agrícolas, umidade, temperatura e susceptibilidade do produto à contaminação. Fatores biológicos como a coexistência de outros fungos como patógenos também podem levar à biossíntese dessas toxinas. Os fungos toxigênicos podem ser encontrados contaminando as sementes antes ou após a colheita, e mesmo quando seu crescimento não é visível, grandes quantidades de micotoxina já podem ter sido produzidas, pois as condições ótimas para sua produção não são,

muitas vezes, as condições ótimas para o crescimento do fungo. (BHATNAGAR et al., 2002).

As micotoxinas são definidas como metabólitos secundários de fungos filamentosos, tóxicos ao homem e animais, mesmo em pequenas concentrações. Entre os vários patógenos fúngicos, destaca-se o gênero *Aspergillus* como um dos mais importantes, pois, em geral, são capazes de produzir micotoxinas em grãos no campo, durante o transporte e armazenagem, sendo responsáveis por doenças em animais e humanos (BENNETT; KLICH, 2003).

2.8.1 *Aspergillus flavus*

A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, a presença de micotoxina, assim como a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Os *Aspergillus flavus* crescem em uma temperatura de 25 a 35°C, sendo sua temperatura ótima de crescimento de 25°C; possui atividade de água entre 0.91 – 0.97 (PEREIRA et al., 2002). As espécies *Aspergillus flavus*, são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos, “as aflatoxinas”, além de alterarem as condições físicas dos produtos, reduzirem o valor nutritivo, alterarem o aspecto externo e favorecem a ação de outros agentes de deterioração, como leveduras, bactérias e insetos (ATANDA et al., 2007).

Esses metabólitos secundários, como as aflatoxinas secretados por fungos do gênero *Aspergillus flavus*, têm recebido grande atenção devido aos efeitos carcinogênicos e tóxicos que podem provocar em animais e seres humanos (PEREIRA et al., 2002). As principais toxinas de interesse são designadas de aflatoxina B1, B2, G1 e G2. Essas são geralmente encontradas associadas em vários alimentos e rações, em diferentes proporções. Entretanto, a aflatoxina B1 é geralmente predominante, sendo considerada a mais tóxica

(RASOOLI; OWLIA, 2005). A espécie *A. flavus*, na maioria das vezes, produz somente duas aflatoxinas B1 e B2 (TANIWAKI; SILVA, 2010).

Aflatoxicose é uma intoxicação resultante da ingestão da aflatoxina em alimentos e rações contaminadas. As contaminações ocorrem com maior intensidade em nozes, amendoins e outras sementes oleosas, incluindo o milho e sementes de algodão. A aflatoxina causa necrose aguda, cirrose e carcinoma de fígado em diversas espécies animais, sendo nenhuma dessas é resistente aos efeitos tóxicos da aflatoxina, assumindo-se que humanos possam ser igualmente afetados (ATANDA et al., 2007).

2.8.2 *Aspergillus niger*

Os *Aspergillus niger* apresentam distribuição geográfica mundial como espécies deteriorantes de alimentos e sendo também uma espécie amplamente utilizada nos processos de biotecnológicos; é a única que possui o ‘status’ (“Generally Regarded as Safe”) pela Food And Drug Administration. São frequentemente responsáveis pela contaminação pós-colheita de frutas, como as uvas, alguns vegetais e grãos. Essa espécie cresce a temperaturas de 30 - 35°C e atividade de água entre 0.93 – 0.98 (KLICH, 2002).

A produção de ocratoxina A normalmente ocorre a 20 – 25°C e 0.95 – 0.98 de atividade de água. Devido às suas características fisiológicas, essa espécie se torna predominante em regiões ou em determinadas estações do ano em que as temperaturas atingem os 40°C. Essa temperatura favorece o crescimento do fungo no campo. De modo geral, os *A. niger* podem ser encontrados em vários alimentos, principalmente em alimentos secos e especiarias. (PERRONE et al., 2009).

Alguns estudos sobre a frequência e distribuição de *Aspergillus nigri* em uvas e cereais vêm sendo realizados e os resultados obtidos demonstram que as

espécies *A. niger* são as espécies prevalentes, sendo considerada a principal fonte de OTA (ocratoxina A) em uvas e vinhos. A ocratoxina A vem merecendo atenção mundial pelo risco que pode causar à saúde de animais e humanos, sendo considerada nefrotóxicas e carcinogênicas, teratogênicas e imunotóxicas (MAGNOLI et al., 2004).

2.8.3 *Aspergillus carbonarius*

Aspergillus carbonarius caracteriza-se por apresentar conídios pretos e/ou marrom-escuros, paredes rugosas, estipes longas e largas. Devido a essas suas características morfológicas microscópicas, pode ser facilmente distinguível de outras espécies bisseriadas pertencentes à Seção *Nigri*.

A germinação dos esporos de *A. carbonarius* é muito rápida e ocorre um período de 24 horas a uma temperatura entre 25 - 35°C e atividade de água entre 0.90 – 0.99. A temperatura ótima para o crescimento é de 32 - 35°C, com temperatura mínima de 10°C e máxima de 42°C, e atividade de água ótima entre 0.95 e 0.98 (PERRONE et al., 2009). Condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* ocorre a 20°C e a 0.95 – 0.98 de atividade de água. Não foi observada produção de OTA a 0.90 de atividade de água (MITCHELL et al., 2004).

Uma alta porcentagem de cepas pertencentes a essa espécie (98 – 100%) são produtoras de ocratoxina A. Essa espécie vem sendo considerada a principal fonte de contaminação de ocratoxina A em uvas e vinhos (KLICH, 2002).

O *Aspergillus carbonarius* está presente em diversos produtos vegetais, como os cereais, café, cacau, especiarias, frutos secos, e amendoim, uva, já a ocratoxina foi detectada em produtos à base de cereais, café, vinho, cerveja e sucos de uva, e em produtos de origem animal, como nos rins de porco. Estudos têm demonstrado que a ocratoxina A tem ação nefrotóxica, teratogênica,

carcinogênica, imunossupressor para animais, e possivelmente, para humanos (PRADO et al., 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

As quatro amostras de cachaças envelhecidas, provenientes de diferentes tonéis de madeiras, com capacidades distintas, foram coletadas diretamente nas unidades produtoras. A Tabela 1 apresenta a origem, tipo de madeira, capacidade do barril e tempo de armazenamento de cada amostra.

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

Amostra (codificação)	Local	Tipo de madeira	Capacidade do tonel/ barril (L)	Tempo de armazenamento (meses)
A1	Lavras	Jequitibá	5.000	24
A2	Perdões	Amburana	700	96
A3	Perdões	Carvalho	700	108
A4	Perdões	Bálsamo	700	36

3.2 Análises físico-químicas

Foram realizadas as análises físico-químicas no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardente no Departamento de Química da UFLA, segundo os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005, do Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA, (BRASIL, 2005).

Inicialmente as amostras foram redestiladas em triplicata para as seguintes análises: grau alcoólico, álcoois superiores, furfural, metanol, aldeídos e ésteres, e acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (-15°C). As metodologias empregadas para as análises estão descritas a seguir.

3.2.1 Exame organoléptico

Foi determinado observando-se as amostras contra um transluminador de luz branca, cujos parâmetros analisados foram: aspecto, coloração, limpidez, presença de corpos estranhos e vazamentos (BRASIL, 2005).

3.2.2 Teor alcoólico

Foi determinado por densimetria, sendo o resultado expresso em porcentagem em volume. As amostras foram redestiladas e o teor alcoólico obtido a partir de medidas a 20°C, com o auxílio de um densímetro digital DensiMat Gibertini (BRASIL, 2005).

3.2.3 Extrato seco

A análise foi efetuada por meio de métodos gravimétricos. Inicialmente, uma cápsula de alumínio foi previamente pesada em balança analítica. Em seguida, uma alíquota de 25 mL da amostra sem redestilar foi transferida para a cápsula e evaporada em banho-maria a 95°C, por 3 horas. Após esse período, a amostra foi levada à estufa a 100°C por 30 minutos e, posteriormente, o material foi resfriado em dessecador. O resíduo sólido remanescente foi pesado em

balança analítica (Marte/ AM - 220) e os resultados obtidos foram expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra (BRASIL, 2005).

3.2.4 Acidez

A acidez foi determinada por volumetria de neutralização. Os ácidos voláteis foram extraídos da bebida pela técnica arraste de vapor, utilizando o Destilador Eletrônico Enochimico Gibertini. Posteriormente, titulou-se com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de fenolftaleína 1%. Os resultados obtidos foram expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra ou por 100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005).

3.2.5 Álcoois superiores

A quantidade total de álcoois superiores foi determinada por meio de reação colorimétrica e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160-1PC) a 540 nm. As concentrações foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1. A quantidade total desses compostos foi expressa em miligrama por 100 mL de álcool anidro. As reações envolvidas na análise de álcoois superiores estão representadas na Figura 4 (BRASIL, 2005).

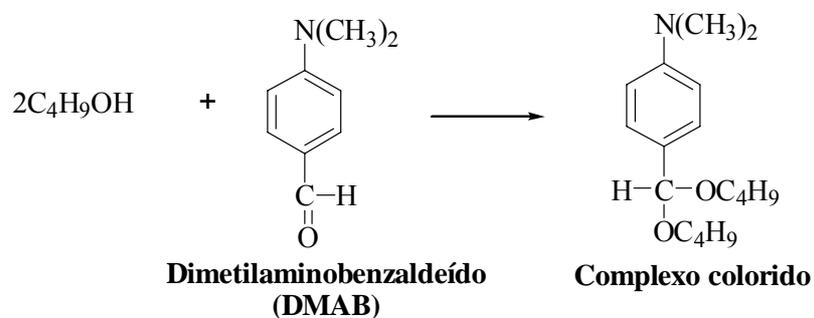


Figura 4 Reação envolvida na análise de álcoois superiores

3.2.6 Aldeídos

Os aldeídos foram analisados pelo método titulométrico com iodo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, titulando o SO_2 formado por meio das reações envolvidas na análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro. As reações envolvidas na análise de aldeído estão representadas na Figura 5 (BRASIL, 2005).



O SO_2 em excesso reage com I_2 em meio ácido



Em meio alcalino, o aldeído é então determinado



Figura 5 Reações envolvidas na análise de aldeídos

3.2.7 Furfural

A quantificação do furfural foi realizada por meio das leituras espectrofotométricas na região visível do espectro a 520 nm (Shimadzu UV-160-1PC). Essa foi realizada por comparação das absorvâncias observadas nas amostras da bebida com valores de absorvâncias de uma curva analítica, previamente construída com soluções padrão de etanol/furfural. Para a análise de furfural, o grau alcoólico do destilado foi corrigido para 50°GL. Os resultados obtidos foram expressos em miligrama de furfural por 100 mL de álcool anidro. As reações envolvidas na análise de furfural estão representadas na Figura 6 (BRASIL, 2005).

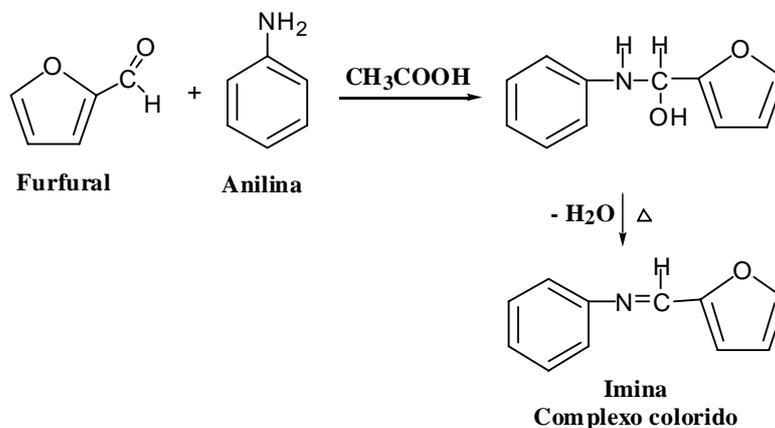


Figura 6 Reações envolvidas na análise de furfural

3.2.8 Ésteres

Os ésteres foram determinados pela titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas bebidas. Suas quantidades foram expressas em gramas de acetato de etila por 100 mL de amostra. As reações envolvidas na análise de ésteres estão representadas na Figura 7 (BRASIL, 2005).

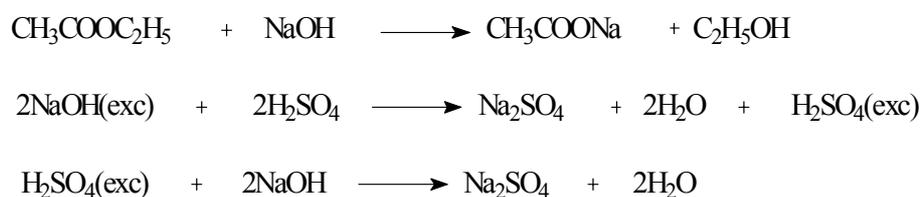


Figura 7 Reações envolvidas na análise de ésteres

3.2.9 Metanol

O metanol foi quantificado por reações colorimétricas e determinação nos espectrofotômetro a 575 nm (Shimadzu UV-160-1PC). As quantidades deste composto foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol. Os resultados obtidos foram expressos em mL de metanol por 100 mL de álcool anidro. As reações envolvidas na análise de metanol estão representadas na Figura 8 (BRASIL, 2005).

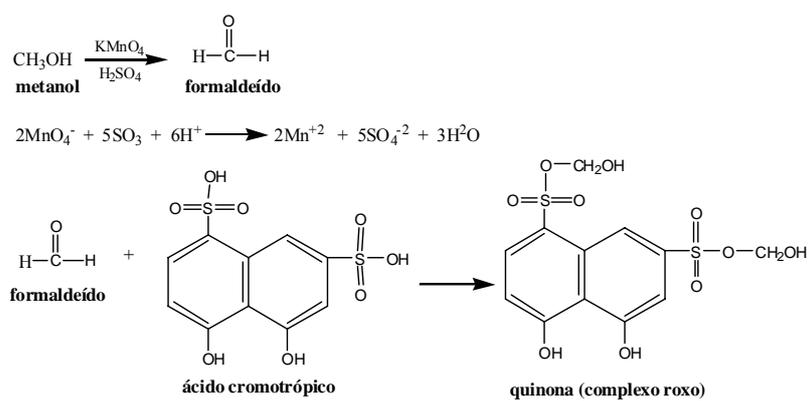


Figura 8 Reações envolvidas na análise de metanol

3.2.10 Cobre

A quantificação do cobre presente nas cachaças foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro a 546 nm (Shimadzu UV-160-1PC), comparado a valores de absorvância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando-se sulfato de cobre como padrão primário. As reações colorimétricas foram realizadas nas amostras de cachaças sem redestilar. Os resultados obtidos foram expressos em mg L^{-1} , as reações envolvidas na análise de cobre estão representadas na Figura 9 (BRASIL, 2005).

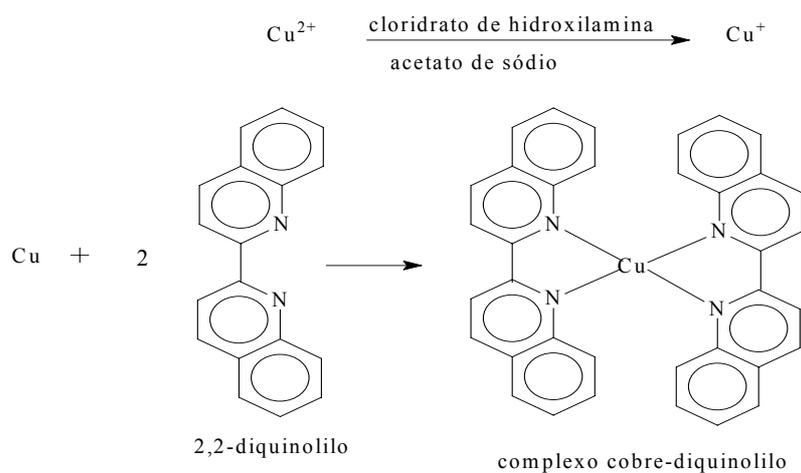


Figura 9 Reações envolvidas na análise de cobre

3.3 Compostos Fenólicos

As análises dos compostos fenólicos das amostras de cachaças foram realizadas no Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente do Departamento de Química da UFLA.

3.3.1 Reagentes e padrões

Os padrões utilizados para análise foram ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, 4-metilubeliferona, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, ácido *p*-cumárico, cumarina, 4-metilumbeliferona e ácido *o*-cumárico. Todos os compostos químicos utilizados como solventes para cromatografia foram de grau analítico para o equipamento HPLC: metanol (Merck), ácido acético glacial (J.T. Baker) e água ultra pura obtida de um sistema Milli-Q.

3.3.2 Preparação das amostras e padrões

Os compostos fenólicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência pelo método de padronização externa. As curvas analíticas foram realizadas por diluições da solução-estoque (1×10^{-3} mol L⁻¹), contendo uma mistura de todos os padrões, conforme descrito na Tabela 2. Cada padrão foi diluído em solução de etanol 50%. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9900 (AQUINO et al., 2006).

Tabela 2 Condições do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) para análise dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)	Comprimento de onda (nm)
0,01	100	0	280
25,00	60	40	280
40,00	45	55	280
43,00	40	60	280
50,00	0	100	280
55,00	100	0	280

Solvente A: água: ácido acético, 2% em água (v/v).

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

As amostras e os padrões foram filtrados em uma membrana de polietileno de 0.45 μm e diretamente injetados no sistema cromatográfico. As injeções foram realizadas em duplicata e a identidade dos analitos foi confirmada pelos tempos de retenção das amostras, comparados aos dos padrões. Os solventes de eluição utilizados foram: solução de ácido acético 2% em água (fase A), solvente A e metanol: água: ácido acético (70:28:2% v/v) (fase B) solvente B. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, o fluxo de 1,25 mL/min⁻¹, volume de injeção de 20 μL e tempo de corrida de 60 min, realizada a uma temperatura de 40°C (AQUINO et al., 2006).

A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões. Para a construção da curva analítica, foi realizada uma mistura de todos os padrões por meio de diluições previamente preparadas, obtendo as seguintes concentrações: ácido gálico (6,80 mg/L), catequina (11,61 mg/L), ácido vanílico (6,73 mg/L), fenol (3,76 mg/L), ácido siríngico, (7,93 mg/L), vanilina (6,08 mg/L), siringaldeído (7,29 mg/L), ácido *p*-cumarico (6,56 mg/L), ácido sinápico (8,97 mg/L), cumárina (5,85

mg/L), 4-metilumbeliferona (7,05 mg/L) e ácido *o*-cumárico (6,56 mg/L) (AQUINO et al., 2006, ZACARONI, 2009).

3.3.3 Equipamento do HPLC

As análises dos compostos fenólicos foram realizadas por cromatografia, utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, contendo duas bombas de alta pressão modelo LC-6AD, com um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20³, interface modelo CBM-20³ e um injetor automático com autoamostrador modelo SIL-10AF. As separações foram realizadas utilizando uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm com partículas esféricas de 5 µm) conectada a uma pré-coluna: Agilent - Zorbax Eclipse XDB - C18 4-Pack (12,5 x 4,6 mm, 5µm).

3.4 Compostos fenólicos totais

Para a análise de determinação dos compostos fenólicos totais presente nas amostras de cachaça, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu modificado (SINGLETON; ROSSI, 1965; LIN et al., 2005 citado por (ANJOS et al., 2011).

Em 1mL da amostra de cachaça, foram adicionados 1 mL de etanol 40% e 5 mL de água destilada. Agitou-se, adicionou-se 0,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 50% e, após 5 minutos, 1mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 5% foi adicionado à mistura reacional. Após agitação, os tubos foram deixados em repouso por 60 minutos. Decorrido esse tempo, realizaram-se leituras espectrofotométricas a 725 nm (Shimadzu UV-1601 PC). As concentrações foram determinadas construindo-se uma curva analítica, utilizando diferentes concentrações de ácido gálico em etanol 40% (10-100 mg

L⁻¹). A concentração de polifenóis totais foi expressa em mg equivalente de ácido gálico por litro. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5 Atividade antioxidante

A utilização do método do DPPH mostra-se como uma alternativa interessante, sendo de custo viável por utilizar reagentes acessíveis, pelo tempo gasto, e por não necessitar de equipamentos sofisticados. Além disso, nesse método, a eficiência antioxidante é mensurada em temperatura ambiente, eliminando-se o risco potencial de degradação térmica de algumas das substâncias analisadas. (MOLYNEUX, 2004, citado por ARBOS, 2009)

Brand-Williams et al. (1995), após estudos, propuseram o seguinte mecanismo de reação para o método do DPPH•, conforme apresentado na Figura 10.

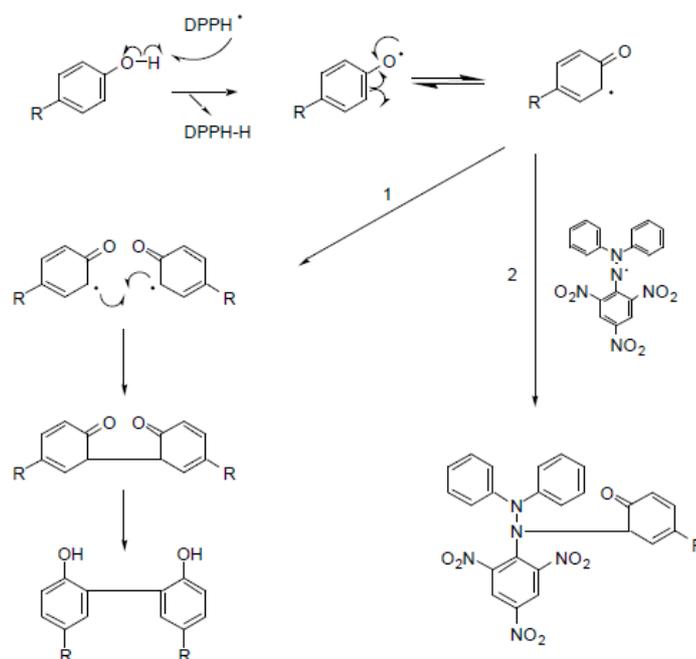


Figura 10 Mecanismo de reação proposto para o método DPPH

Quando se avaliam substâncias fenólicas, por este método, uma molécula de DPPH• pode complexar-se com um radical arila, na qual pode ocorrer na forma isolada ou combinada. A dimerização entre dois radicais fenoxila, seguida da regeneração de dois grupos hidroxila pela transferência do hidrogênio, podendo novamente reagir com DPPH•.

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Li et al. (2005). Adicionaram-se 3,12mL da solução de DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazila) 0,004% (0,004g de DPPH para 100mL em álcool 95%), + 0,3mL da amostra, para o controle, foi adicionado 0,3 mL de etanol 95% sem a amostra. Incubou-se por 10 min no escuro a 30°C e a absorbância foi medida

após uma hora a 515nm, (Shimadzu UV-160-1PC). Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte expressão:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Em que:

A_{controle} = absorvância do controle

A_{amostra} = absorvância da amostra

3.6 Obtenção dos extratos fenólicos de cachaças envelhecidas

Os extratos fenólicos foram concentrados para a realização das análises microbiológicas, utilizando parte da metodologia de análise de cobre por absorção atômica (MAPA). Inicialmente, alíquotas de cachaça envelhecida foram colocadas em banho maria a uma temperatura de 60 a 70°C, por um tempo indeterminado visando à eliminação total do teor alcoólico, obtendo-se o concentrado de extrato de compostos fenólicos não voláteis (BRASIL 2005).

3.7 Atividade biológica dos extratos fenólicos

A avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos fenólicos foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e no Laboratório de Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

As bactérias utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

3.7.1 Manutenção e ativação das culturas bacterianas

No decorrer do experimento, os micro-organismos foram mantidos em eppendorfs contendo meio de congelamento, sob refrigeração (4°C). Para ativação das culturas, as cepas foram repicadas em caldo-infusão de cérebro e coração (BHI), e ficaram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a ativação, foram realizados os plaqueamentos em meios específicos para cada espécie.

3.7.2 Padronização dos inóculos

As culturas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 foram padronizadas empregando-se a escala de McFarland de 0,5 de BaSO₄. A cultura ativa foi repicada para caldo infusão de cérebro (BHI) e incubada a 37°C por 24 horas. Posteriormente, uma alíquota de 300 µL foi transferida para caldo Tryptic Soy (TSB) e novamente incubada nas mesmas condições, sendo monitorado de meia em meia hora o aumento do número de inóculo pelo espectrofotômetro com densidade óptica a 625 nm, de acordo com a escala de McFarland de 0,5 de BaSO₄, até a concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹. Essa foi diluída até que alcançasse uma concentração de 10⁶ UFC mL⁻¹. Posteriormente, realizou-se o plaqueamento em Agar TSA (Tryptic Soy Agar) para a espécie *Listeria monocytogenes*, e *Pseudomonas aeruginosa*, e para as demais espécies, utilizou-se Agar Müeller-Hinton, para a confirmação da concentração do inóculo (NATIONAL

COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, NCCLS, 2003).

3.7.3 Efeito inibitório dos extratos fenólicos sobre as bactérias

O efeito inibitório dos extratos fenólicos foi determinado utilizando-se as metodologias de difusão cavidade em Ágar e difusão por vapor.

3.7.4 Teste de difusão cavidade em Ágar

Nesta análise, a metodologia utilizada foi a de difusão cavidade em Ágar, empregando-se, para tal, o Ágar TSA (Tryptic Soy Agar) para a espécie *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* e para as demais espécies, Ágar Müeller-Hinton (PEREIRA et al., 2008).

Inicialmente, uma fina camada de Ágar foi adicionada em placas de Petri (140 mm de diâmetro). Após a solidificação desse, pérolas de vidro estéreis com 4 mm de diâmetro foram posicionadas sobre o meio sólido. Aliquotas padronizadas de culturas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 foram transferidas para erlemeyers contendo 200 mL de ágar Müeller-Hinton ou TSA, obtendo-se concentração de 10^6 UFC mL⁻¹. O meio ainda líquido foi vertido sobre a camada anterior. Após a solidificação do Ágar, as pérolas de vidro foram retiradas com auxílio de pinças estéreis e em seguida foi feita a deposição dos extratos fenólicos nos poços formados. As diluições foram realizadas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo utilizadas as seguintes proporções: extrato puro, 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16, equivalentes às respectivas concentrações 1000 (extrato puro) 500; 250; 125; 62,5; 31,25µL mL⁻¹. Foram aplicados nos

poços 10 μL dos extratos diluídos. Para cada extrato utilizado, realizou-se o controle constituído de solução de DMSO a 1%. As placas foram incubadas em BOD 37 °C por 24 horas e medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, uma testemunha relativa com a aplicação de 10 μL de DMSO; como padrão de comparação, utilizou-se uma solução de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico cloranfenicol (CL) (OGUNWANDE et al., 2005).

Com base nos diâmetros formados pela ação dos extratos fenólicos, que evidenciaram a sensibilidade do micro-organismo, pôde-se avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias em diferentes concentrações dos extratos. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração de extrato em que ocorreu a presença de halo de inibição.

3.7.5 Efeito inibitório dos compostos fenólicos sobre as espécies fúngicas

Para a verificação do efeito inibitório de fungos filamentosos, foi utilizado o teste de difusão em discos, aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Inicialmente, os fungos foram identificados quanto a sua espécie e foram repicados em Agar extract malt (MEA). Para isso, foi utilizado um inóculo na concentração de 10^7 esporos/mL, com contagem em câmaras de Newbauer. O inóculo foi transferido para a placa contendo meio de Agar extract malt (MEA), pela técnica de espalhamento em superfície.

Discos de papel-filtro de 5 mm de diâmetro embebidos com 10 μL de extratos fenólicos nas concentrações de 1000 (extrato puro), 500, 250, 125, 62,5, 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram colocados sobre o meio de cultura, como sugerido por Karaman et al. (2003). O controle negativo foi realizado por meio de discos contendo 10 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) e, para o controle positivo, foi

utilizado um fungicida-controle (hipoclorito de sódio 2%). As placas foram incubadas em BOD, a 25°C, por um período de 72 horas.

3.7.6 Avaliação do efeito biocida

A avaliação foi comparativa seguindo a um padrão biológico de referência (controle positivo), e a zona ou o halo de inibição de crescimento foi medida partindo-se da circunferência do disco, até a margem onde houve crescimento de micro-organismo, realizando-se medições ortogonais do diâmetro, tendo cada medição correspondido a média de duas medidas diametralmente opostas. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração de extrato fenólico, no qual se identificou a presença do halo de inibição (ZACARONI et al., 2009).

3.8 Análises estatística

Para as análises físico-químicas, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as medias comparadas pelo teste Scoot-Knott ao nível de 95% de confiança utilizado pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

Para as análises microbiológicas, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial 8x4x6, e constituídos por oito micro-organismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Cholerasuis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus níger* e *Aspergillus flavus*), quatro extratos fenólicos (carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá) e seis concentrações (1000 (extrato puro) 500; 250; 125; 62,5; 31,25µL mL⁻¹) de extratos fenólicos. O programa estatístico utilizado foi o

SISVAR versão 4.6 (FERREIRA, 2008). Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-químicas das cachaças envelhecidas

Os resultados das análises físico-químicas estão representados nas Tabelas 3 e 4. Pode-se observar que a amostra A1 (cachaça envelhecida em tonel de carvalho) apresentou um teor alcoólico abaixo dos padrões estabelecidos pela legislação, e a amostra A4 (cachaça envelhecida em tonel de jequitibá) apresentou uma acidez elevada e uma quantidade de furfural acima do limite permitido pela legislação. As amostras A2 e A3 (envelhecidas em tonel de amburana e bálsamo, respectivamente) apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pelo MAPA, sendo, portanto, bebidas que podem ser consumidas com moderação, sem causar danos à saúde humana.

Tabela 3 Resultados das análises físico-químicas de teor alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural e álcoois superiores, das cachaças envelhecidas.

Amostras	Teor alcoólico ¹	Acidez volátil ²	Ésteres ²	Aldeídos ²	Furfural ²	Álcoois superiores ²
A1	37,83±0,05	67,98±0,15	83,88±2,04	15,23±0,12	0,48±0,03	202,47±8,11
A2	39,22±0,07	39,95±0,09	33,82±2,31	11,65±0,12	0,24±0,04	276,46±1,61
A3	39,27±0,03	84,03±0,07	74,24±2,31	12,77±0,15	0,88±0,07	250,28±15,7
A4	40,79±0,02	162,30±0,04	85,09±2,15	8,77±0,14	6,76±0,04	251,73±6,03

*Média ± desvio-padrão (1 %v/v; 2 mg/100 mL de álcool anidro; 3 mg L-1)

Tabela 4 Resultado das análises físico-químicas de metanol, congêneres, cobre e extrato seco das cachaças envelhecidas.

Amostras	Metanol ¹	Congêneres ¹	Cobre ²	Extrato seco ³
A1	nd	370,21±10,15	1,07±0,07	1,57±0,0
A2	nd	401,34±3,85	1,28,±0,05	1,36±0,0
A3	nd	461,47±18,39	1,35±0,18	1,13±0,0
A4	nd	555,44±8,23	2,04±0,01	0,53±0,01

*Média ± desvio-padrão (1 %v/v; 2 mg/100 mL de álcool anidro; 3 mg L-1) ND não detectado

Provavelmente, o baixo teor alcoólico encontrado na amostra A1 pode ser explicado pela redução do álcool etílico. Por ser uma cachaça envelhecida, essa redução na concentração de álcool pode estar relacionada com a possibilidade de perda de álcool pelos poros da madeira do tonel, que pode ser influenciada pela temperatura e umidade do ar. Segundo (CARDELLO; FARIA, 1998, citado por PEREIRA et al., 2003), durante o envelhecimento ocorre uma redução na graduação alcoólica devido a reações de esterificação e oxidação durante o processo, contribuindo também para a melhoria da qualidade sensorial do produto. Os ésteres são formados por meio da reação entre os álcoois e os ácidos presentes na bebida, ou podem ser oriundos da madeira empregada. Tais compostos, juntamente com os álcoois superiores, aldeídos e ácidos, são responsáveis pela formação do sabor e aroma, compondo, assim, o chamado flavour ou buquê da bebida. Vários componentes da cachaça têm suas concentrações modificadas durante o envelhecimento devido à evaporação parcial do etanol e da água, sendo comuns perdas de álcool em torno de 3 a 4 % ao ano (MIRANDA et al., 2006; PARAZZI et al., 2008).

Outro ponto a ressaltar é que a bebida utilizada neste estudo passou por um processo de envelhecimento, o que lhe proporcionou uma diminuição do

grau alcoólico, com valores bem próximos do limite. De acordo com Cantão (2006), uma das possíveis causas para uma cachaça ou aguardente com grau alcoólico abaixo do limite permitido é a prática de longas esperas do mosto antes da destilação. Esse procedimento acarreta perdas por evaporação do álcool.

O limite da acidez volátil estabelecido pela legislação para bebida alcoólica é de 150,0 mg de ácido acético por 100 mL de álcool anidro. No entanto, as concentrações de ácido na amostra A4 foram acima do permitido pela legislação. Essa amostra, envelhecida em tonel de jequitibá, apresentou um valor de 162,30 mg/100 mL⁻¹. O aumento da acidez volátil da aguardente envelhecida deve-se provavelmente à reação de oxidação do etanol, formando o acetaldeído como intermediário e, posteriormente, o ácido acético (LITCHEV, 1989; REAZIN, 1981).

Bogusz Júnior e Ketzer (2006) demonstraram que altos teores de acidez volátil revelam uma falta de conhecimentos técnicos por parte dos produtores, podendo ser o caso da amostra A4. Para Cardoso (2006), a acidez volátil da cachaça depende de fatores, como o adequado controle do tempo e da temperatura durante o processo fermentativo, tipo de levedura utilizada, manejo do mosto e, principalmente, higiene no processo de fabricação, dados confirmados por Vilela et al. (2007), que afirmam que uma alta concentração de acidez volátil pode ser reflexo de uma má fermentação ou má higienização do alambique.

Além disso, para a cachaça envelhecida em tonéis de madeira, alguns compostos oriundos da madeira, tais como ácidos orgânicos não voláteis, componentes secundários, taninos e compostos fenólicos, favorecem o aumento da acidez da cachaça durante envelhecimento. Isso não desqualifica o produto no aspecto sensorial, pelo conjunto agradável que forma com outros componentes, portanto, a acidez volátil é um importante parâmetro correlacionado às

características sensoriais de bebidas destiladas (BOZA; HORII, 1998; ALCARDE et al., 2010).

Em relação aos teores de furfural, apenas a amostra A4 excedeu o limite da legislação, que é de 5,0 mg por 100 mL de álcool anidro, sendo observado um valor de 6,76 mg 100 mL⁻¹. O furfural e o hidroximetilfurfural são contaminantes orgânicos cuja presença é indesejável na bebida. A alta temperatura, associada ao baixo pH do mosto, acarreta desidratação dos açúcares e hidrólise de polissacarídeos dos bagacilhos (celulose, hemicelulose, pectina e outros) formando 2-furfural (furfural) e 5-hidroximetil-2-furfural (hidroximetilfurfural). As pentoses formam furfural como principal produto de degradação, enquanto as hexoses formam hidroximetilfurfural. Outros fatores, como o envelhecimento da bebida sob condições irregulares, a adição de caramelo e pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques, também podem contribuir para o aumento no teor desses componentes (FARIA et al., 2003 citado por ZACARONI et al., 2011).

Masson et al. (2007), estudando a formação do furfural e do hidroximetilfurfural utilizando cana crua e queimada na produção de cachaça, mostraram que a queima e a requeima de cana de açúcar antes da moagem influenciaram no aparecimento desses compostos.

4.1.1 Quantificação dos compostos fenólicos

Na Figura 11 está representado o cromatograma da solução-padrão dos compostos fenólicos por detecção espectrofométrica obtidos após injeções de 20 µL. De acordo com o cromatograma, abaixo pode-se observar a separação dos compostos fenólicos em análise.

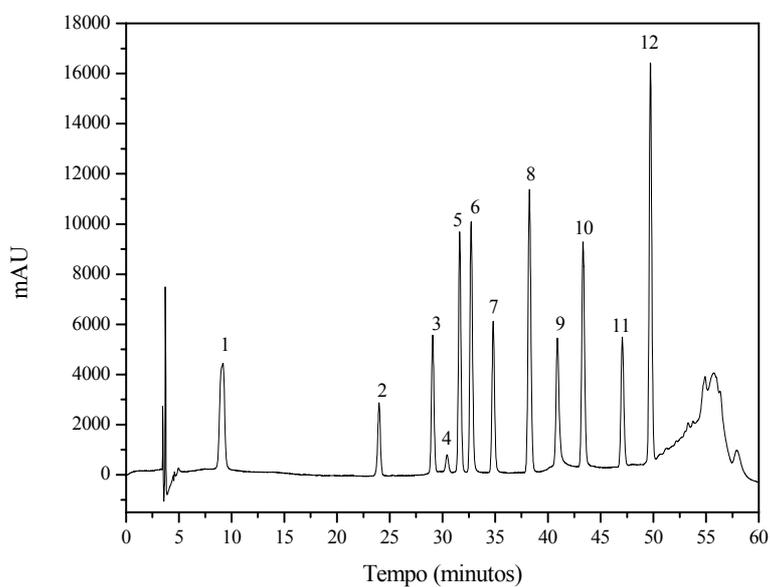


Figura 11 Cromatograma da solução-padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido vanílico; (4) fenol; (5) ácido siríngico; (6) vanilina; (7) siringaldeído; (8) ácido p-cumárico; (9) ácido sinápico; (10) cumarina; (11)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

Na Tabela 5 está apresentados os tempos de retenção médio obtido para cada composto fenólico analisado.

Tabela 5 Tempos de retenção (tR) médio para os compostos fenólicos analisados.

Compostos Fenólicos ¹	tR (minutos)*
Ácido Gálico	8,12±0,16
Catequina	23,59±0,31
Ácido Vanílico	28,03±0,36
Fenol	30,94±0,45
Ácido Siríngico	32,63±0,31
Vanilina	33,88±0,33
Siringaldeído	34,95±0,29
Ácido p-cumárico	37,97±0,43
Ácido Sinápico	41,07±0,30
Cumarina	43,13±0,26
4-metilumbiliferona	45,79±0,30
Ácido o-cumárico	50,51±0,35

* Média ± desvio-padrão

As curvas analíticas foram calculadas medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração, após a injeção em triplicata das soluções contendo todos os padrões. Foram obtidos coeficientes de correlação com variação entre 0,9900 a 0,9997, mostrando alta correlação linear entre a concentração dos compostos analisados e as

áreas dos picos, com valores acima de 0,99 para o coeficiente de correlação, conforme recomendado na literatura (SNYDER et al., 1997).

Nas Tabelas 6 e 7, estão representados os valores dos parâmetros do coeficiente de correlação das curvas analíticas, e os limites de quantificação e de detecção, respectivamente.

Tabela 6 Parâmetros, coeficiente de correlação (R^2) das curvas analíticas.

Compostos	B	A	R^2
Ácido gálico	62755,12	-5246,3	0,9921
Ácido sinápico	29124,37	-2988,28	0,9934
Fenol	9993,77	-115,93	0,9987
Catequina	15036,73	-324,62	0,9988
Metilumbeliferona	36837,27	-1074,17	0,9989
Cumarina	95761,46	-1943,73	0,9990
Vanilina	92486,88	-1254,13	0,9991
Siringaldeído	42269,19	-707,19	0,9994
Ácido p-cumárico	106730,17	-1010,82	0,9994
Ácido vanílico	38961,13	-680,5	0,9996
Ácido siríngico	67983,39	-846,47	0,9997
Ácido o-cumárico	128591,69	-907,92	0,9997

*Regressão linear: $y = bx + a$

Tabela 7 Limite de detecção e limites de quantificação.

LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
0,168	0,561
0,009	0,331
0,037	0,124
0,037	0,126
0,037	0,123
0,053	0,178
0,047	0,158
0,042	0,139
0,203	0,677
0,051	0,168
0,065	0,216
0,013	0,563

*Regressão linear: $y = bx + a$

Nas Tabelas 8, 9, 10 e 11, estão representados os valores dos compostos fenólicos. Quanto às espécies de madeira analisadas, pode-se observar a predominância de diferentes compostos fenólicos. Na cachaça envelhecida em barril de carvalho, tem-se a predominância do siringaldédo (9,69 mg/L) e o ácido gálico (6,32 mg/L); na amburana, ácido vanílico (4,71 mg/L) e cumarina (4,08 mg/L), no bálsamo, ácido vanílico (8,74mg/L) e ácido gálico (7,48mg/L), no jequitibá, siringaldeído (2,11mg/L) e ácido gálico (1,49mg/L). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Dias et al. (2002), que encontraram diferenças quanto à presença e concentração dos compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em espécies de madeiras diferentes. Neste trabalho, os autores observaram a predominância de compostos, como ácidos elágico, vanílico e siringaldeído no carvalho; ácido vanílico e sinapaldeído em amburana; ácido vanílico, ácido elágico, ácido vanílico e ácido gálico no bálsamo; e presença de ácido gálico no jequitibá.

Tabela 8 Compostos Fenólicos analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Cachaça envelhecida em tonel de carvalho.

Compostos Fenólicos ¹	mg mL ⁻¹	Desvio Padrão
Ácido Gálico	6,326	±0,032
Catequina	0,726	±0,012
Ácido Vanílico	1,729	±0,086
Fenol	4,609	±0,027
Ácido Siringico	4,874	±0,043
Vanilina	1,671	±0,052
Siringaldeído	9,691	±0,021
Ácido p-cumárico	<LQ	±0,039
Ácido Sinápico	1,120	±0,014
Cumarina	0,239	±0,023
4-metilumbiliferona	<LQ	±0,095
Ácido o-cumárico	0,055	±0,042

* Média ± desvio-padrão

Tabela 9 Compostos Fenólicos analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Cachaça envelhecida em tonel de amburana.

Compostos Fenólicos ¹	mg mL ⁻¹	Desvio Padrão
Ácido Gálico	1,366	±0,053
Catequina	3,287	±0,015
Ácido Vanílico	4,717	±0,081
Fenol	0,312	±0,023
Ácido Siringico	2,301	±0,001
Vanilina	0,190	±0,050
Siringaldeído	1,099	±0,022
Ácido p-cumárico	<LQ	±0,003
Ácido Sinápico	3,210	±0,019
Cumarina	4,089	±0,032
4-metilumbiliferona	2,008	±0,008
Ácido o-cumárico	<LQ	±0,003

* Média ± desvio-padrão

Tabela 10 Compostos Fenólicos analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Cachaça envelhecida em tonel de bálsamo.

Compostos Fenólicos ¹	mg mL ⁻¹	Desvio Padrão
Ácido Gálico	7,484	±0,053
Catequina	2,235	±0,001
Ácido Vanílico	8,740	±0,008
Fenol	3,347	±0,023
Ácido Siringico	0,964	±0,000
Vanilina	1,329	±0,050
Siringaldeído	0,872	±0,022
Ácido p-cumárico	1,498	±0,003
Ácido Sinápico	0,982	±0,019
Cumarina	1,345	±0,032
4-metilumbiliferona	<LQ	±0,008
Ácido o-cumárico	<LQ	±0,003

* Média ± desvio-padrão

Tabela 11 Compostos Fenólicos analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Cachaça envelhecida em tonel de jequitibá.

Compostos Fenólicos ¹	mg mL ⁻¹	Desvio Padrão
Ácido Gálico	1,492	±0,053
Catequina	<LQ	±0,001
Ácido Vanílico	0,974	±0,008
Fenol	0,954	±0,023
Ácido Siringico	1,067	±0,006
Vanilina	0,443	±0,050
Siringaldeído	2,118	±0,022
Ácido p-cumárico	0,419	±0,003
Ácido Sinápico	<LQ	±0,019
Cumarina	<LQ	±0,032
4-metilumbiliferona	<LQ	±0,008
Ácido o-cumárico	<LQ	±0,003

* Média ± desvio-padrão

De acordo com os dados observados nas tabelas (8 a 11), constata-se que as amostras provenientes de diferentes espécies de madeira apresentaram diferentes quantidades de compostos fenólicos. Essas diferenças podem ser explicadas devido a fatores, como tipo de madeira utilizada no envelhecimento, capacidade dos tonéis, o tempo de armazenamento da bebida, tamanho e pré-tratamento do barril, condições ambientais como, umidade e temperatura do ambiente de armazenamento e teor alcoólico da bebida. Esses parâmetros relacionados influenciam na composição de compostos fenólicos extraídos da madeira durante o processo de envelhecimento da bebida (MIRANDA et al., 2006).

Segundo Miranda et al. (2006), os teores de compostos extraídos da madeira aumentam com o tempo de envelhecimento e com o aumento da superfície de contato entre bebida/madeira, o que pode ser explicado para as amostras de carvalho, amburana e bálsamo, com um tempo de envelhecimento maior. A cachaça envelhecida em barril de jequitibá, armazenada por um menor tempo, apresentou uma menor extração de compostos fenólicos. Zacaroni (2009), analisando algumas amostras de cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira, comprovou que o composto que se apresentava menos expressivo durante o tempo de envelhecimento foi o 4-metilumbeliferona, resultados que corroboram com aqueles encontrados neste trabalho nas cachaças armazenadas em carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá.

Pode-se constatar que, na amostra analisada de cachaça envelhecida em madeira de carvalho, o composto predominante foi o siringaldeído incorporado na bebida ao longo do tempo de armazenamento, estando de acordo com os resultados encontrados por Anjos et al. (2011). Esses autores pesquisaram amostras de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho e mostraram que, entre os compostos fenólicos de cachaça envelhecida, aqueles que apresentaram maior concentração foram o siringaldeído e o ácido gálico. Aguiar (2004), analisando

cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho durante oito anos, observou que além do cheiro característico da madeira, ocorreu uma intensificação na cor, com o aumento dos anos de envelhecimento. Outro fator relevante que pode interferir na extração desses compostos é o tempo de uso dos barris. Segundo Mori et al. (2006), a relação é inversamente proporcional entre o teor de compostos fenólicos presente na bebida e o tempo de uso dos barris de madeira no processo de envelhecimento.

Santiago et al. (2012), analisando duas amostras de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho observaram que os principais compostos majoritários presentes nas amostras foram o siringaldeído e o ácido gálico, resultados que corroboram com aqueles encontrados neste trabalho. A diferença na quantidade desses compostos pode estar relacionada diretamente com o tempo de armazenamento. Esses resultados também estão de acordo com aqueles encontrados por Madrera et al. (2003), que observaram diferenças nos teores e na presença de ácido gálico e siringaldeído durante o envelhecimento, além da presença de derivados de aldeídos cinâmico presentes em bebidas destiladas, como o conhaque, com diferentes tempos de armazenamento.

Outro fator que interfere no envelhecimento da cachaça é a madeira. Essa, por ser um material de estrutura complexa formada por materiais de parede celular (celulose, polioses e lignina) e por extrativos diferentes (compostos fenólicos, esteróides, terpenos, etc), apresenta uma distribuição dos compostos de forma variada e dependente da idade do vegetal. Portanto, além dos fatores citados acima, a presença de compostos fenólicos na bebida pode estar relacionada com a posição da madeira (próximo da casca, medula, topo ou base) utilizada na confecção dos barris, assim como a idade da árvore para obtenção da madeira. A espécie da madeira pode variar, como a sua morfologia, o tamanho da fibra, a espessura da parede celular, que pode estar obstruída impedindo a penetração da bebida e conseqüentemente, o contato dessa com os

extrativos e com as substâncias da parede celular, diminuindo a incorporação dos compostos à bebida (ZACARONI et al., 2011).

4.1.2 Compostos fenólicos totais

Os resultados obtidos para a concentração de fenólicos totais estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 Concentração de fenólicos totais de cachaças envelhecidas.

Compostos Fenólicos Totais	Carvalho	Amburana	Bálsamo	Jequitibá
(mg L ⁻¹)	95,492±0,053	73,280±0,043	38,111±0,023	22,957±0,036

Pelos resultados obtidos, pode-se constatar que as concentrações de compostos fenólicos totais apresentaram uma grande variação entre as amostras analisadas. As amostras de cachaças envelhecidas em tonéis de carvalho, amburana e balsamo, com capacidade de 700L, apresentaram uma maior extração de compostos fenólicos; essas amostras de cachaça possuem um maior tempo de armazenamento em relação à cachaça envelhecida na madeira de jequitibá que apresentou uma menor concentração fenólica (22,95 mg L⁻¹) em relação às outras amostras. De acordo com Miranda et al. (2008), nas extrações de compostos durante o envelhecimento de cachaça, deve-se considerar a superfície/volume do tonel, pois os tonéis de menor capacidade resultam em uma maior extração de componentes. Outros autores ainda citam que quanto maior a graduação alcoólica do destilado a ser envelhecido, mais lenta é a extração de taninos, já que a degradação hidrolítica da madeira requer água.

A extração de compostos fenólicos depende de vários fatores, como tipo de madeira, as condições ambientais, teores de umidade, temperatura, tamanho e histórico do tonel e tempo de armazenamento. Para Mendes et al. (2009), os compostos fenólicos provenientes de madeiras incorporam-se progressivamente na bebida durante o período de envelhecimento, atribuindo uma coloração que dependerá do tipo de madeira empregada, suavizando o paladar e acentuando a sensação desidratante do álcool presente. Miranda et al. (2008) mostraram que nos 5 primeiros meses de envelhecimento ocorre uma grande extração de compostos fenólicos. Nesse mesmo ano, Parazzi et al. (2008) observaram um aumento significativo até o sexto mês de armazenamento da bebida.

Anjos et al. (2011), ao avaliarem a composição fenólica total em cachaças envelhecidas em carvalho ao longo de um ano, observou que, o teor destes compostos variou de aproximadamente 12 a 19 mg L⁻¹, ocorrendo um aumento expressivo da composição fenólica total no oitavo mês de armazenamento da bebida. Nesse trabalho o autor determinou que os compostos encontrados em cachaças envelhecidas foram ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, ácido p-cumárico, cumarina, 4-metilumbeliferona, ácido o-cumárico e eugenol, sendo que esses resultados encontrados pelos autores corroboram com os resultados deste trabalho.

Na Figura 12 apresentam-se a relação de compostos fenólicos totais e o somatório dos compostos fenólicos quantificados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) das cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira.

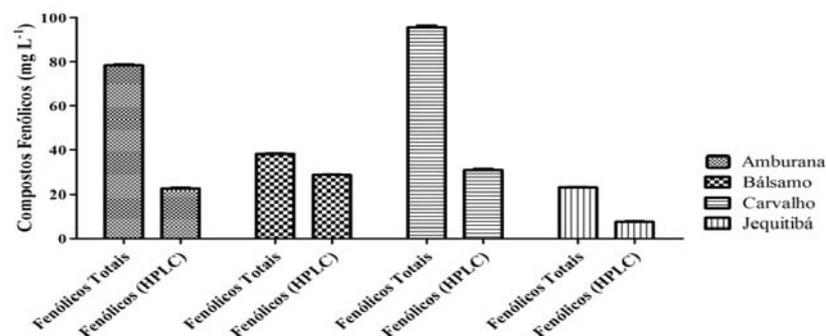


Figura 12 Compostos fenólicos totais e o somatório dos compostos fenólicos por HPLC das cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira.

Diante dos resultados apresentados acima, a concentração de compostos fenólicos totais foi maior em relação à concentração de compostos fenólicos analisados por HPLC. Esses dados podem ser explicados pelas reações e incorporações dos compostos na bebida durante o envelhecimento. Durante esse processo, alguns ésteres aromáticos são formados pela interconversão dos compostos fenólicos, tais como siringato de etila e vanilato de etila e outros ésteres que são extraídos da madeira, como o homovanilato de metila e o siringato de metila, sendo esses compostos quantificados pela análise de compostos fenólicos totais (VICHI et al., 2007).

4.1.3 Atividade antioxidante das cachaças

Os compostos fenólicos presentes em cachaças, aguardentes de frutas e também em diversas bebidas alcoólicas, como uísques e outras envelhecidas em tonéis de madeira, podem apresentar atividade antioxidante devido à extração de compostos fenólicos da madeira. Os compostos fenólicos caracterizam-se pela

presença de um anel aromático, com a presença de hidroxilas que conferem propriedades antioxidantes (VALKO et al., 2006).

Na Tabela 13 observaram-se os resultados das atividades antioxidantes das cachaças envelhecidas.

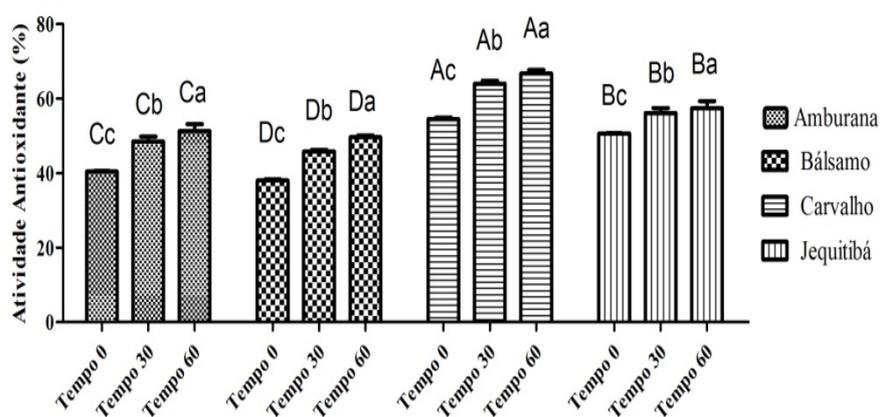
Tabela 13 Resultados das atividades antioxidantes das cachaças envelhecidas.

% Atividade Antioxidante			
Amostras	Tempo 0	Tempo 30	Tempo 60
Amburana	40,440 ± 0,25	48,269 ± 0,33	51,308 ± 0,18
Balsamo	38,010 ± 0,65	45,805 ± 0,69	49,621 ± 0,82
Carvalho	54,473 ± 0,37	64,048 ± 0,21	66,750 ± 0,31
Jequitibá	50,605 ± 0,11	56,194 ± 0,23	57,413 ± 0,36

Os quatro tipos de madeira apresentaram um comportamento semelhante de atividade antioxidante à medida que o tempo decorreu. A atividade antioxidante aumentou com o aumento dos tempos de análise, ou seja, observou-se um efeito dose dependente em relação aos tempos testados (Figura 13). Em contra partida, quando se analisa essas atividades entre os tipos de madeira em cada tempo, a atividade antioxidante variou significativamente de acordo com os tempos utilizados. A cachaça envelhecida em tonel de carvalho foi a que obteve o maior valor de atividade antioxidante em todos os tempos, seguida das madeiras, jequitibá, amburana e bálsamo (Scott-Knott 5%).

Em relação à atividade antioxidante das cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira e analisadas em diferentes tempos, observou-se, por

meio da análise de variância, que houve diferença significativa ($P < 0,05$) tanto entre os tipos de madeira, quanto entre os tempos analisados na Figura 13.



*Médias seguidas da mesma letra, sendo minúscula entre os tempos e maiúsculas entre os tipos de madeira, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Figura 13 Atividade antioxidante das cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira e analisadas em diferentes tempos

4.1.4 Efeito inibitório de extratos fenólicos em bactérias

Na Figura 14 apresenta-se o efeito inibitório dos extratos de cachaças envelhecidas sobre as bactérias testadas.

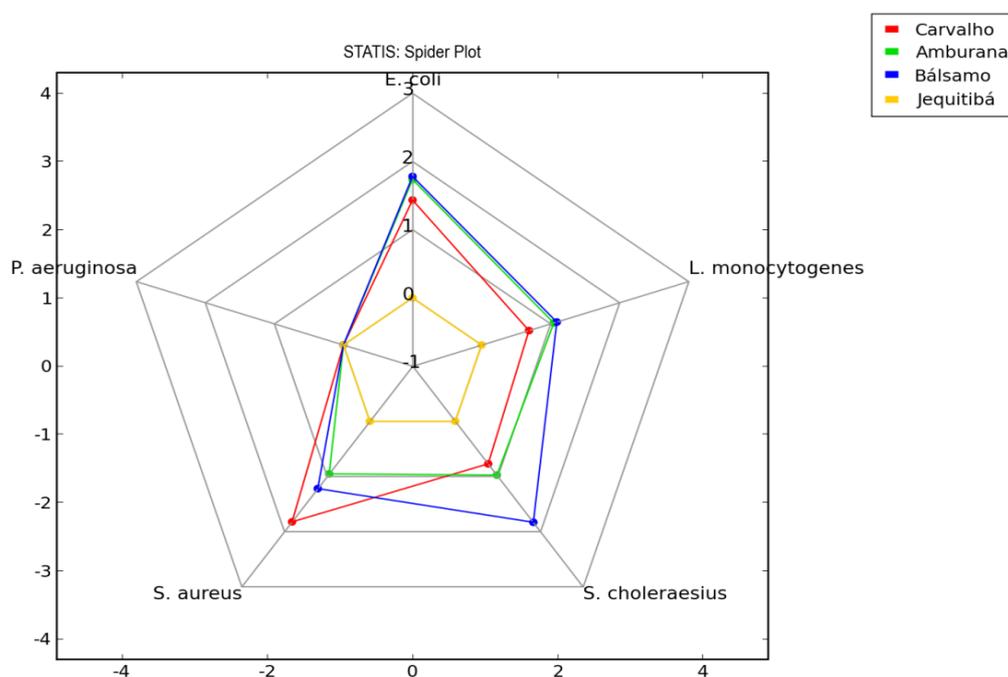


Figura 14 Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de carvalho, amburana, bálamo e jequitibá frente às bactérias testadas

O extrato de cachaça envelhecida em barril de carvalho apresentou maior inibição para *S. aureus*, seguido de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. choleraesius*, mas não interferiu no crescimento de *P. aeruginosa*. Para o extrato de cachaça envelhecida em bálamo, pôde-se notar que houve uma maior inibição para um maior número de bactérias, visto que também não houve inibição para *P. aeruginosa*. Resultado semelhante ao extrato de bálamo foi verificado para o extrato de amburana, diferenciando-se apenas na intensidade de inibição para *S. choleraesius*. Apenas o extrato de jequitibá não demonstrou efeito inibitório sobre às bactérias testadas.

As concentrações mínimas inibitórias dos extratos de cachaças envelhecidas em carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá, sobre os microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*, estão descritos nas Tabelas 14, 15, 16 e 17. Analisando separadamente cada extrato de cachaça envelhecida, observa-se que a concentração mínima inibitória do extrato de carvalho para a bactéria *Staphylococcus aureus* foi de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Escherichia coli* 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Salmonella choleraesuis* e *Listeria monocytogenes* 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para *Pseudomonas aeruginosa* não ocorreu inibição.

Tabela 14 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de Carvalho encontrada para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*.

Bactéria	Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		Carvalho	DMSO	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	+	125	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	1000	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	500	NI	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	NI	NI	100
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	1000	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO: dimetilsulfóxido.

Pelos dados na Tabela 15, observa-se que a concentração mínima inibitória do extrato de amburana para a bactéria *Staphylococcus aureus* foi de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Escherichia coli* 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Salmonella choleraesuis* 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Listeria monocytogenes* 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e para *Pseudomonas aeruginosa* não ocorreu inibição.

Tabela 15 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de amburana encontrada para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*.

Bactéria	Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		Amburana	DMSO	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	+	125	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	500	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	500	NI	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	NI	NI	100
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	500	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO: dimetilsulfóxido.

Os dados da concentração mínima inibitória do extrato de bálsamo para a bactéria encontram-se na Tabela 16. Verifica-se que para *Staphylococcus aureus* foi de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Escherichia coli* 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Salmonella choleraesuis* 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Listeria monocytogenes* 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para *Pseudomonas aeruginosa* não ocorreu inibição.

Tabela 16 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de bálsamo encontrada para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*.

Bactéria	Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		Bálsamo	DMSO	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	+	125	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	500	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	500	NI	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	NI	NI	100
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	500	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO: dimetilsulfóxido.

Observa-se na tabela 17 que o extrato de Jéquitibá não apresentou inibição para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 17 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de Jequitibá encontrada para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*.

Bactéria	Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		Jequitibá	DMSO	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	+	NI	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	NI	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	NI	NI	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	NI	NI	100
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	NI	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO dimetilsulfóxido.

De acordo com os resultados obtidos, foi observada uma inibição dos extratos de carvalho, amburana e bálsamo sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*. Provavelmente essa inibição ocorreu pela presença dos compostos fenólicos, ácido gálico, cumarina, sirilgaldeído e ácido vanílico, que se apresentaram em quantidades expressivas nesses extratos. Esses dados corroboram com aqueles encontrados por Vaquero et al. (2007), que estudaram a inibição de micro-organismos pelos ácidos p-cumárico, ácidos cumárico, ácido gálico e siringaldeído extraídos de vegetais. Observaram uma pequena atividade desses compostos sobre às bactérias patogênicas como a *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Bacillus cereus*.

Barbosa (2010), mostraram que o ácido gálico componente do metabolismo secundário de plantas, possui propriedade antioxidante e algumas

atividades antimicrobianas. Em suas pesquisas, o autor concluiu que o ácido gálico tem capacidade de inibir a cadeia respiratória do parasita *Trypanosoma cruzi*, possuindo também uma atividade antimicrobiana contra a *Escherichia coli*.

Segundo Antonioli et al. (2004), a adição de ácido vanílico em sucos possui efeito antimicrobiano, pois durante seu armazenamento, foi observado que esse composto inibiu o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Pelczar Jr., Chan e Krieg (1997), pesquisando a atividade antimicrobiana do fenol e seus derivados, mostraram que esses compostos têm a capacidade de lesar as células microbianas ocasionando uma alteração da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, causando uma perda das substâncias intracelulares vitais. Alguns autores como Vaquero et al. (2007), acreditam que quanto mais hidroxilados estiver o fenol, maior poder inibitório apresenta sobre os micro-organismo, sendo este o mecanismo que confere a toxicidade dos grupos fenólicos. Sroka e Cisowski (2003) discorrem que a eficiência dos compostos fenólicos depende de suas propriedades estruturais, tais como a posição da ligação e a posição do grupo hidroxila no anel aromático. Esses autores acreditam que quanto maior o grau de hidroxilação de fenóis, maior a sua toxicidade para o micro-organismo.

A diferença nos resultados relacionados com as atividades antimicrobianas de espécies de bactérias pode ser influenciada por diversos fatores, como as diferenças na metodologia experimental, composição de meios, micro-organismos empregados, concentrações investigadas e baixa solubilidade de muitos compostos (WEN et al., 2003).

Segundo Holley e Patel (2005), a atividade antibacteriana de compostos fenólicos e o seu mecanismo de ação não está completamente entendido; pode-se considerar que o modo de ação de agentes antimicrobianos é estabelecido considerando-se um entre os três a seguir como: a reação com a membrana

celular causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares, inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia; e síntese de componentes estruturais ou a destruição ou inativação funcional do material genético. Segundo Burt (2004), existe consenso de que compostos aromáticos e fenólicos atuam nas membranas citoplasmáticas, alterando a sua estrutura e sua função em transporte ativo e coagulam o conteúdo celular. Em vários trabalhos, relata-se que bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à atividade de extratos fenólicos que bactérias Gram-negativas.

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, a qual faz com que tenham uma superfície hidrofílica devido à presença de moléculas de lipopolissacarídeos. Porém, pequenos solutos hidrofílicos são capazes de passar por essa membrana externa por meio de poros hidrofílicos formados por canais de proteínas de membranas. Dessa maneira, considera-se que a membrana externa sirva como uma barreira de penetração para macromoléculas e compostos hidrofóbicos, e é por essa razão que bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos e outras drogas hidrofóbicas, assim como os compostos fenólicos (MANN; COX; MARKHAM, 2000).

O ácido vanílico, ácido gálico e fenol foram compostos majoritários presentes nos extratos de bálsamo, que apresentou uma maior atividade antibacteriana. Isso pode ser justificado pela capacidade desses compostos penetrarem na superfície do citoplasma das bactérias, passando pelos poros de proteínas presentes em sua membrana externa. Neste estudo, a atividade sobre as bactérias testadas mostrou-se similar, tanto para as Gram-negativas quanto para as Gram-positivas.

4.1.5 Efeito inibitório de extratos fenólicos sobre as espécies fúngicas

Os extratos de cachaça envelhecidas em tonel de carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá não demonstraram efeito inibitório sobre os fungos filamentosos. Na Figura 15 verifica-se que não houve efeito inibitório dos extratos de cachaças envelhecidas sobre os fungos testados.

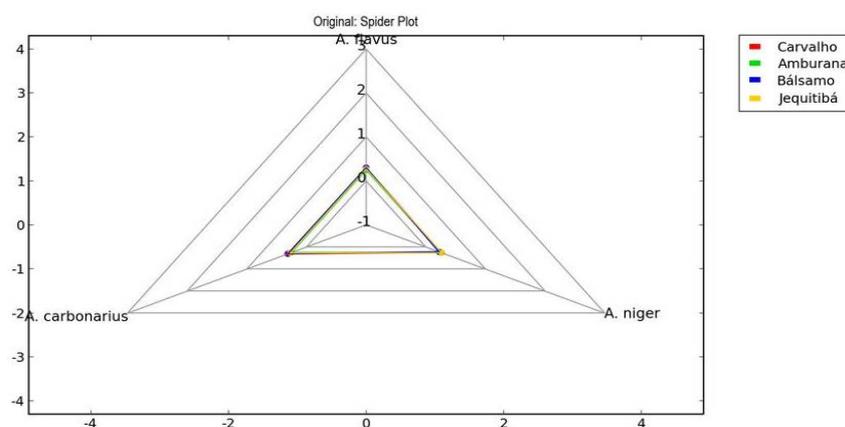


Figura 15 Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de carvalho, amburana, bálsamo e jequitibá sobre os fungos testados

Analisando separadamente cada extrato de cachaça envelhecida, pode-se perceber pelos dados das Tabelas 18, 19, 20 e 21 que a concentração mínima inibitória dos extratos testados, carvalho, amburana, balsamo e jequitibá, para os fungos filamentosos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus carbonarius*, foi muito, baixa não ocorrendo inibição.

Tabela 18 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de carvalho encontrada para os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*.

Bactéria	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Carvalho	DMSO	HP
<i>Aspergillus flavus</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Niger</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Carbonarius</i>	NI	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, HP: Hipoclorito 2%, DMSO: dimetilsulfóxido.

Tabela 19 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de amburana encontrada para os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*.

Bactéria	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Amburana	DMSO	HP
<i>Aspergillus flavus</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Niger</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Carbonarius</i>	NI	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, HP: Hipoclorito 2%, DMSO: dimetilsulfóxido.

Tabela 20 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em tonel de bálsamo encontrada para os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*.

Bactéria	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Bálsamo	DMSO	HP
<i>Aspergillus flavus</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Niger</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Carbonarius</i>	NI	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, HP: Hipoclorito 2%, DMSO: dimetilsulfóxido

Tabela 21 Concentração mínima inibitória do extrato de cachaça envelhecida em barril de jequitibá encontrada para os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*.

Bactéria	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Jequitibá	DMSO	HP
<i>Aspergillus flavus</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Niger</i>	NI	NI	100
<i>Aspergillus Carbonarius</i>	NI	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, HP: Hipoclorito 2%, DMSO: dimetilsulfóxido

Atualmente, os compostos fenólicos são considerados substâncias de grande interesse nutricional, por sua contribuição na manutenção da saúde humana e também do ponto de vista tecnológico, possuindo funções como antioxidantes e antimicrobiana. Segundo Cerezo et al. (2010), em várias espécies de plantas são encontrados os ácidos fenólicos que também atuam como antibióticos, e promovem a atividade antifúngica.

O ergosterol é um esteroide que está presente na membrana dos fungos. Ele se apresenta como modulador de fluidez da membrana fúngica, e qualquer alteração de alguns elementos químicos desencadeia um desequilíbrio na fluidez da membrana plasmática dos fungos, promovendo alterações na homeostase intracelular. De forma geral, qualquer alteração que interfira na composição da membrana plasmática celular microbiana estará tornando-a desprovida de uma organela essencial ao equilíbrio homeostático, condição fundamental para o seu ótimo funcionamento fisiológico. Assim, uma alteração nessa estrutura celular pode vir a tornar o ambiente microbiano intracelular incompatível com a sua sobrevivência (SOUZA et al., 2003).

Tassou et al. (2007), quantificaram extratos fenólicos de plantas e verificaram a presença de compostos, fenólicos como o ácido vanílico, vanilina, ácido gálico e cumarinas. Observaram, pelo método de difusão em discos, que esses compostos possuem efeito inibitório sobre o crescimento de fungos, como os *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus fumigatus*; no entanto a atividade antifúngica vem sendo atribuída a compostos fenólicos usualmente presentes em tecidos vegetais. A catequina e o fenol apresentam relativa toxicidade para micro-organismo como fungos e bactérias. Em diversos tecidos vegetais, encontram-se uma variedade de fenóis, polifenóis e outros compostos, muitos deles mostraram-se úteis na descoberta conservantes, e possuem um grande potencial antifúngico (JOHANN et al., 2009).

Segundo Rodrigues et al. (2007), a presença de compostos aromáticos como o fenol dificulta a reprodução de fungos filamentosos. O autor utilizou o composto fenol, com uma concentração de (1 mg/L) para inibir a proliferação de *Aspergillus niger* em águas residuárias, utilizando uma concentração de 2×10^6 esporos/mL, verificou que a presença desse composto promoveu uma inibição total de *Aspergillus niger* durante o tratamento.

Verifica-se que os resultados apresentados neste estudo não corroboram com os dados mencionados, pois não houve efeito inibitório sobre os fungos testados nas concentrações de extratos fenólicos, houve inibição apenas para o hipoclorito 2% utilizado como controle positivo, após o período de incubação por 72 horas.

Segundo Perrone et al. (2009) a classe de *Aspergillus* apresenta algumas características morfológicas, como a presença de conídios pretos ou marrons e escuros, e também possui paredes celulares rugosas e rígidas, estipes longas e largas, podendo ser resistente sobre a alguns compostos fenólicos utilizados.

5 CONCLUSÃO

Os compostos majoritários encontrados nas cachaças envelhecidas foram; siringaldeído (9,69 mg/L carvalho), ácido vanílico (4,71 mg/L amburana), ácido vanílico (8,74mg/L bálsamo) e siringaldeído (2,11 mg/L jequitibá).

A atividade antioxidante foi evidenciada pelo teste DPPH para as cachaças testadas, sendo a cachaça envelhecida em tonel de carvalho a que apresentou maior atividade, seguida das cachaças envelhecidas em tonéis de jequitibá, amburana e bálsamo.

Os extratos fenólicos apresentaram uma considerável atividade biológica sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, e *Salmonella choleraesuis*; porém, não foi eficiente no controle de *Pseudomonas aeruginosa*, e não apresentou nenhuma inibição sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, e *Aspergillus niger*.

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 Processamentos de Alimentos**, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 347-360, 2005.

AGÊNCIA DE PROMOÇÃO DE EXPORTAÇÕES E INVESTIMENTOS. **Alimentos, bebidas e agronegócio**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.apexbrasil.com.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

AGUIAR, P. M. **Aspectos físico-químicos de cachaças armazenadas em tonéis de carvalho**. 2004. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

ALCARDE, A. R. et al. 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, p. 226-232, maio 2010.

ANDRADE, J. dos S. D. **A situação atual da gestão do risco em alimentos no Brasil**: percepções dos principais atores-chave. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios)- Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

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.

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. Evolution of the concentration of Phenolic compounds in cachaça during aging in na oak (*Quercus sp*) barrel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 7, p. 1307-1314, 2011.

ANTONIOLLI, L.R. et al. Avaliação da vanilina como agente antimicrobiano em abacaxi minimamente processado. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 473-477, 2004.

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

ARBOS, K. A. **Qualidade sanitária e nutricional de hortícolas orgânicas**. 2009. 161 p. Tese (Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ARESTA, M. et al. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 2819–2824, 2001.

ATANDA, 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.

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

BADOLATO, E. S. G.; DURAN, M. C. Risco de intoxicação por metanol pela ingestão de bebidas alcoólicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 90-92, mar./abr. 2000.

BARBOSA, V. F. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo***. 2010. 31 p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” Araraquara, 2010.

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

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented beverage production**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 32-44.

BHATNAGAR, D. et al. Toxins of filamentous fungi. Fungal Allergy and Pathogenicity. **Chemical Immunology**, v. 81, p. 167-206, 2002.

BIRCH, A. J. et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Chicago, v. 49, n. 9, p. 4502-4507, 2001.

BOGUSZ JÚNIOR, S.; KETZER, D. C. M. 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.

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

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana de açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 391-396, out./dez. 1998.

BRAND-WILLIAMS, W. et al. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005**. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de jun. 2005. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, 2010. 158 p. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_doencas_transmitidas_por_alimentos_pdf.pdf> Acesso em: 3 nov. 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial propertis and potential applications in foods – review. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

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

CANTÃO, F. O. **Análise físico-química e avaliação da presença do cobre em aguardente de cana por aluminossilicatos**. 2006. 62 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CARDOSO, M. das G. Análises físico-químicas de aguardente. In: _____. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

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

CEREZO, A. B. et al. Isolation and identification and antioxidant activity of anthocyanin compounds in *Camarosa strawberry*. **Food Chemistry**, London, v. 123, p. 574-582, 2010.

DIAS, S. M. B. C. Fatores que influenciam no processo de envelhecimento da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 32-40, 2009.

DIAS, S. M. B. C. et al. Utilização de madeiras nativas no envelhecimento da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 46-51, 2002.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 373-380, 2006.

FERNANDEZ-PANCHON, M. S. et al. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 7, p. 649-671, Aug. 2011.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6, Build 61. Lavras: UFLA/DEX, 2008. Software.

FLANZY, C. **Enología fundamentos científicos y tecnológicos**. 2. ed. Madrid: AMV/ Mundi-Prensa, 2003.

FORSYTHE, S. J. **Microbiology of safe food**. 2. ed. Oxford: Blackwell, 2010.

FRANCO, B. G. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FUEYO, J. M.; MENDONZA, M. C.; MARTIN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetics findings. **Microbes and Infection**, Paris, v. 7, n. 2, p. 187-194, Feb. 2005.

GALLICE, W. C. et al. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 397-403, 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GUIMARÃES, A. G. et al. Detecção de Salmonella spp. em alimentos e manipuladores envolvidos em surtos de infecção alimentar. **Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 1, 2001.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobial. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273-292, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 668 p.

JOHANN, S, et al. Antifungal activities of compounds isolated from *Piper abutiloides* **Kunt. Mycoses**, v. 52, p. 499-506, 2009.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethanopharmacology**, Lousanne, v. 85, n. 1, p. 231-235, Apr. 2003.

KARPER, J. B. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review**, v. 2, n. 2, p. 123-140, Feb. 2004.

KHELEF, N. et al. **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. 3rd ed. New York: Springer, 2005. 959 p.

KLICH, M. A. **Identification of common Aspergillus species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelculture, 2002. 116 p.

KOLEVA, V. A. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.

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. Tecnologia de Produtos Florestais)-Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 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.

LITCHEV, V. Influence of oxidation process on the development of the taste and flavor of wine distillates. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 40, n. 1, p. 31-35, 1989.

MACKENZIE, W. M. et al. 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, 1990.

MADRERA, R. R. et al. Characterization of cider brandy on the basis of aging time. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 6, p. 1958-1961, 2003.

MAGNOLI, C. et al. Survey of mycoflora and ochratoxina A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 326-331, 2004.

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

MALLET, A. C. T. et al. Quantificação e identificação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* de águas utilizadas em pequenas propriedades leiteiras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 62, n. 4, p. 394-400, fev. 2007.

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, S. L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 294-297, Aug. 2000.

MANTILLA, S. S. et al. Importância da *listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 180-192, set. 2007.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005. 258 p.

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

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

MENDES, L. M. et al. Potencial da madeira de agregar valor á cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 248, p. 41-48, 2009.

MESQUITA, M. O. de. et al. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 198-203, jan./mar. 2006.

MIRANDA, M. B. et al. 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, 2006.

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

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 439-445, 2004.

MOREIRA A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, out./dez. 134-256, 2004.

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

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6th ed. Wayne, 2003. 232 p.

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

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 147-152, Jan. 2005.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellífera*** 2010. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)-Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

OSBORNE, J. P. et al. Acetaldehyde metabolism by wine lacte acid bactéria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, n. 1, p. 51-55, Oct. 2000.

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

PARDI, M. C. S. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2. ed. Goiânia: UFG, 2005.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v. 1.

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, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PEREIRA, M. M. G. et al. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **CEPPAC**, v. 20, n. 1, p. 114-156, 2002.

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

PERRONE, G. et al. **Aspergillus in grapes**: ecology, biodiversity and genomics. Bari: University of Szeged/Faculty of Sciences/Department of Microbiology, 2009.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (nº 46) to the Kauffman-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 7, p. 568-570, Sept. 2004.

PRADO, G. et al. Incidence of ochratoxin A in roast and ground coffee and soluble coffee consumed in the city of Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, 2000.

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

ROBINSON, R. K. **Microbiologia lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987. 320 p.

RODRIGUES, K. S. et al. Influencia de da glicose sobre o consumo de fenol por *Aspergillus Níger* em reatores em batelada. **Bio**: revista de engenharia sanitária, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 222-228, abr./jun. 2007.

SAGINUR, R.; SUH, K. N. *Staphylococcus aureus* bacteraemia of unknown primary source: where do we stand? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 21-25, Nov. 2008.

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. **Científica**, Jaboticabal, v. 40, p.189-197, 2012

SCHWAN, R. F. et al. Fermentação. In: CARDOSO, M das G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 102-103.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Oportunidades e negócios: os desafios da cadeia produtiva de cachaça**. Brasília, 2011.

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, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.

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

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

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

SOUZA, E. L. et al. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente as novas perspectiva da industria alimentícia. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 113, p. 38-42, 2003.

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

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos – ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL - Núcleo de Microbiologia, 2010. 82 p.

TASSOU, C. C. et al. Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 12, p. 2884-2888, 2007.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.

VAQUERO, M. J. R. et al. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93-101, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer – Mini review. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VARGA, J. Z. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2003.

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, 2007.

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

WALDER, J. M. M. et al. Aging of sugar cane spirit using gamma radiation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 9., 2004, Montpellier. **Proceeding...** Montpellier: International Association of Engineering and Food, 2004.

WEN, A. et al. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, v. 20, p. 305-311, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food and health in Europe: a new basis for action**. Geneva, 2004. 96 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. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-198, 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.

APÊNDICE

APÊNDICE – A curva analítica de compostos fenólicos totais

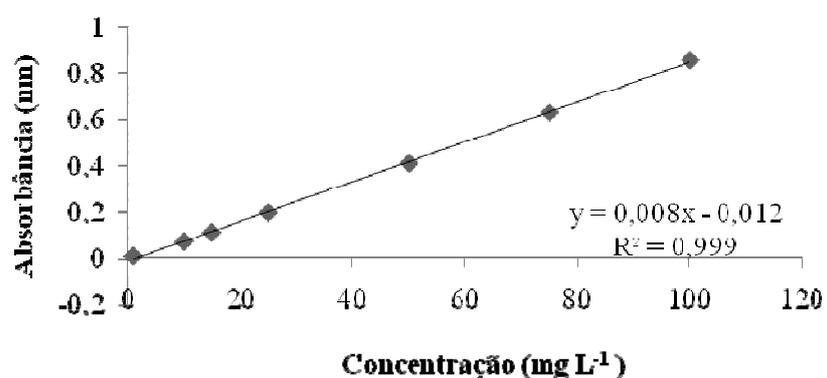


Figura 1A Curva analítica obtida por regressão linear das concentrações do padrão de ácido gálico, Por meio da construção da curva analítica, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa do coeficiente de determinação referente à equação da curva que foi igual a $y = 0,008x - 0,012$, obtida por regressão linear. Foi obtido um coeficiente de determinação de 0,999 mostrando a precisão da curva analítica

APÊNDICE – B Mecanismo de reação proposto para o método DPPH

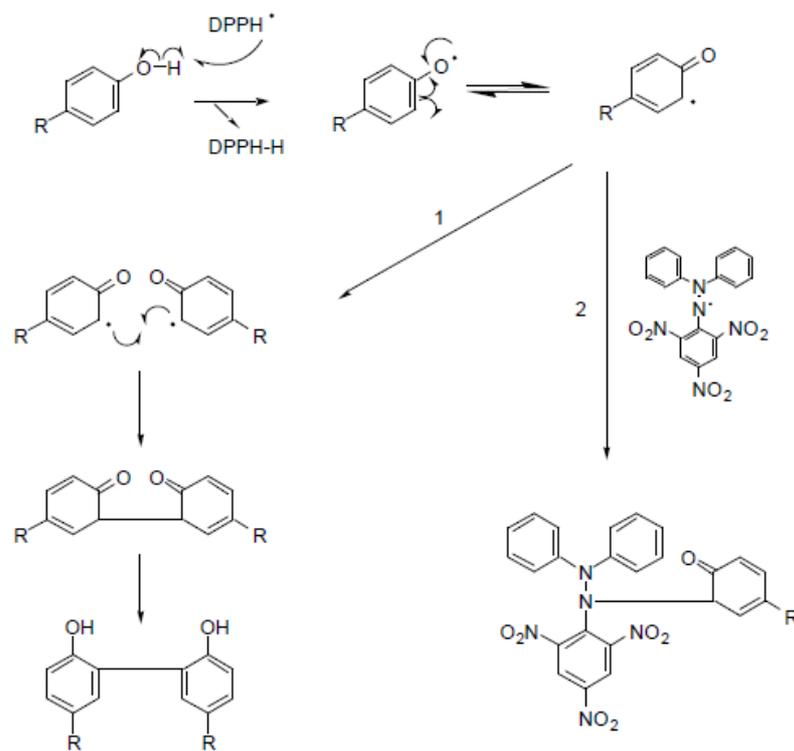


Figura 2B Mecanismo de reação proposto para o método DPPH

APÊNDICE – C Efeito inibitório dos extratos de cachaças envelhecidas em bactérias

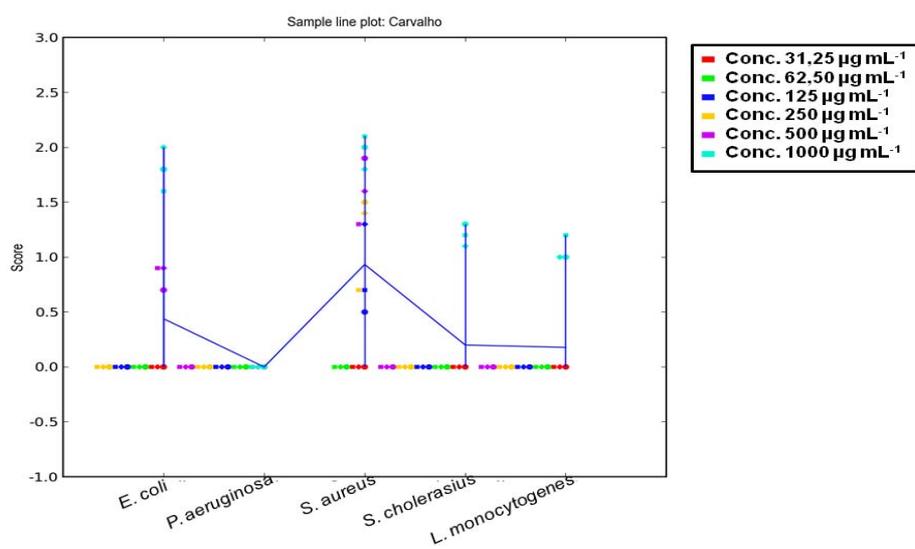


Gráfico 1C Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de carvalho frente às bactérias testadas

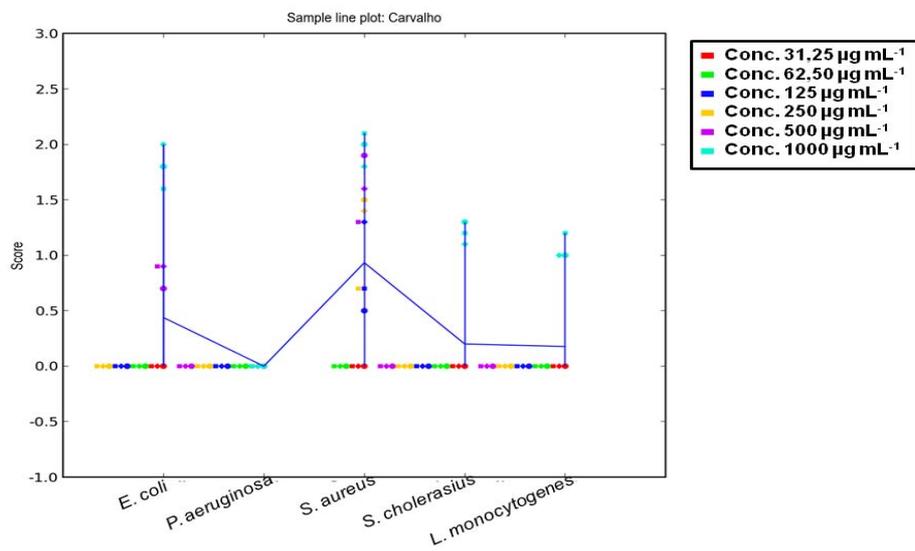


Gráfico 2C Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de amburana frente às bactérias testadas

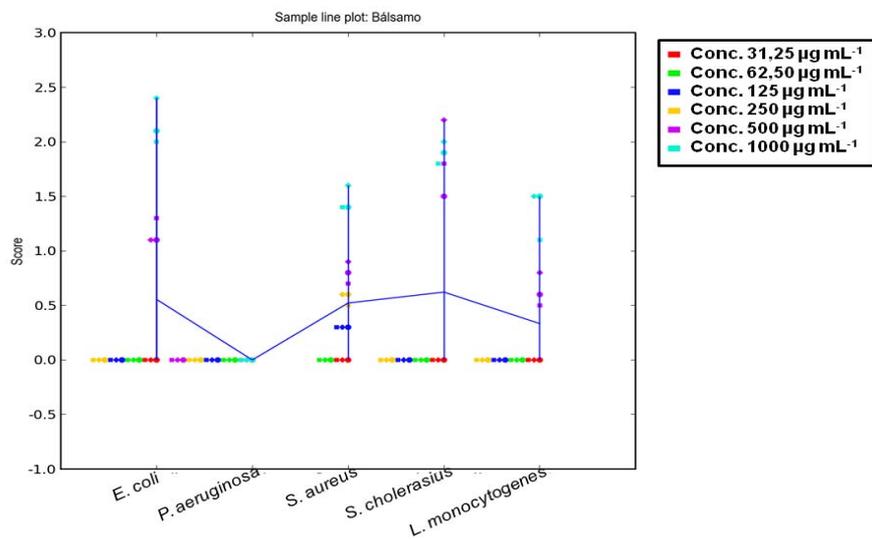


Gráfico 3C Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de bálsamo frente às bactérias testadas

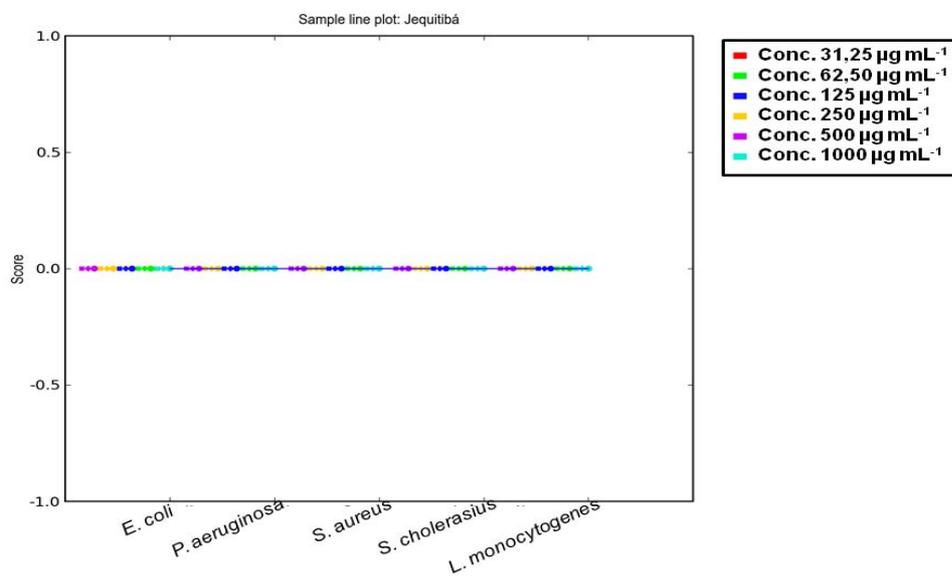


Figura 4C Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de jequitibá frente às bactérias testadas

APÊNDICE – D Efeito inibitório dos extratos de cachaças envelhecidas em fungos filamentosos

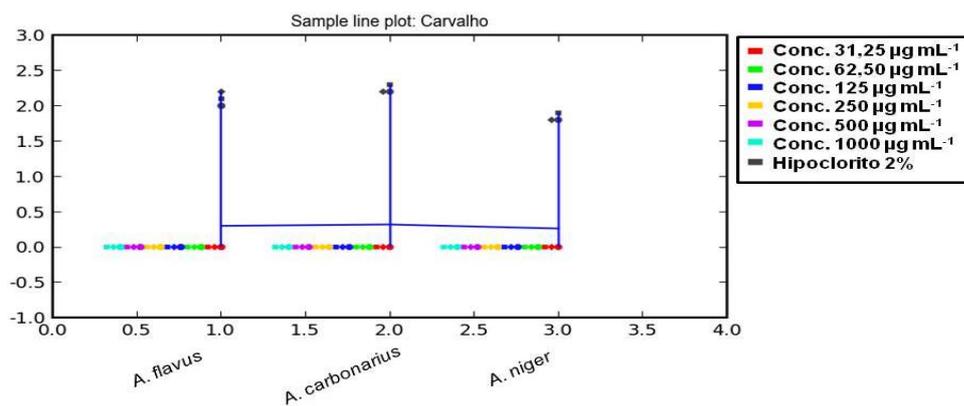


Figura 1D Efeito inibitório do extrato de cachaça envelhecidas em tonel de carvalho frente aos fungos testados

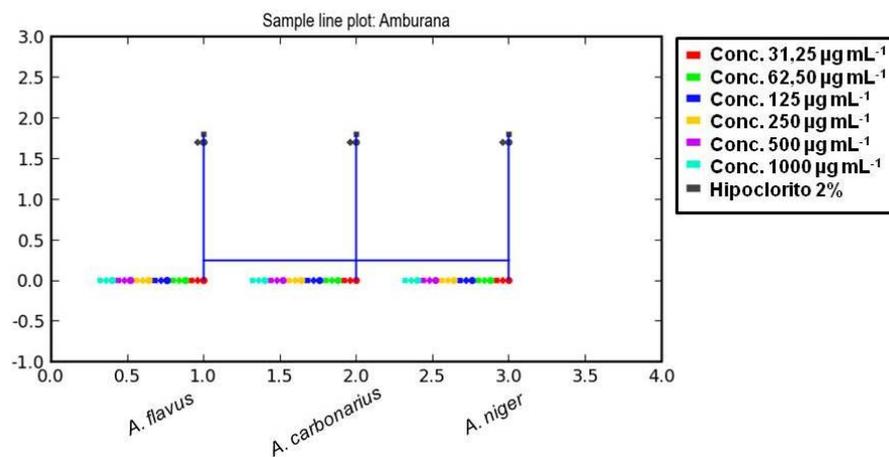


Figura 2D Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de amburana frente aos fungos testados

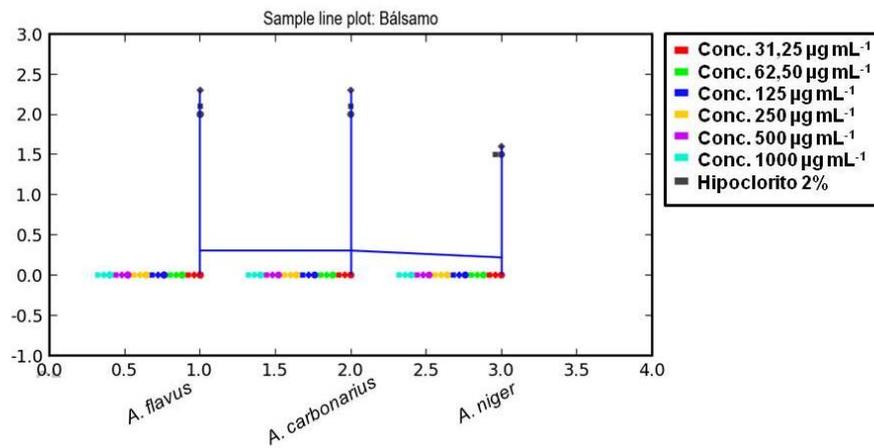


Figura 3D Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de balsamo frente aos fungos testados

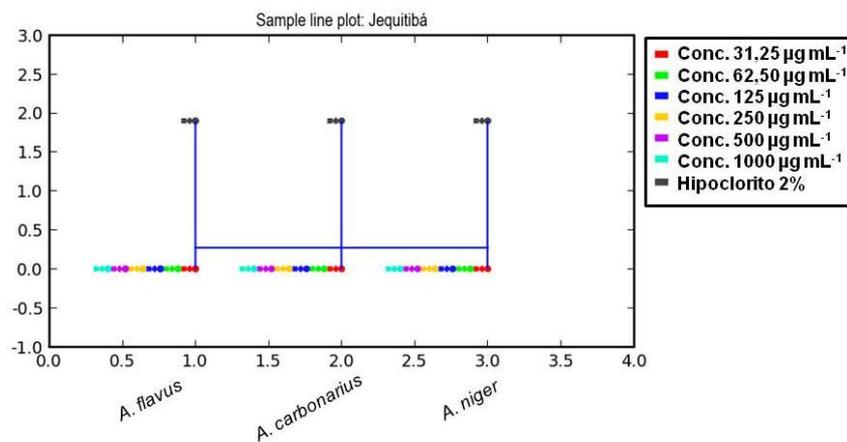


Figura 4D Efeito inibitório dos extratos de cachaça envelhecidas em tonel de jequitibá frente aos fungos testados