



**LEONARDO MILANI AVELAR RODRIGUES**

**QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EM  
AGUARDENTES DE CANA/CACHAÇAS DE ALAMBIQUE E  
DE COLUNAS**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**LEONARDO MILANI AVELAR RODRIGUES**

**QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EM  
AGUARDENTES DE CANA/CACHAÇAS DE ALAMBIQUE E  
DE COLUNA**

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

Orientadora  
Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS –MG**

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

Rodrigues, Leonardo Milani Avelar.

Quantificação de contaminantes em aguardentes de cana/cachaças de alambique e de coluna / Leonardo Milani Avelar Rodrigues. – Lavras : UFLA, 2016.

134 p. : il.

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

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. cachaça. 2. contaminantes. 3. qualidade. 4. alambique. 5. análise. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EM AGUARDENTES DE  
CANA/CACHAÇAS DE ALAMBIQUE E DE COLUNA**

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2016.

Dra. Márcia Justino Rossini Mutton	UNESP
Dra. Katia Júlia de Almeida	UFLA
Dra. Ana Maria de Resende Machado	CEFET/MG
Dra Adelir Aparecida Saczk	UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2016**

## DEDICO

*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.*

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

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que esteve comigo em todos os momentos que precisei, me abençoado e protegendo-me durante esta caminhada, por ter me carregado em seus braços nos momentos mais difíceis, me dando coragem para enfrentar os desafios que me foi concedido

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, a quem dedico esse trabalho pelos seus valiosos ensinamentos, pela orientação, atenção, credibilidade, ética e pelas diversas oportunidades e principalmente pela amizade e confiança durante todo o tempo, com você aprendi a ser uma pessoa melhor e por me fazer acreditar mais em mim e no meu potencial MUITO OBRIGADO!

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

Ào CNPQ, CAPES e FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e pelos recursos liberados.

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

A banca examinadora pela atenção e disponibilidade.

À Tia Jeanete, por me proporcionar um lar tão aconchegante cheio de amor, alegria e grandes exemplos que foram valiosos para a minha formação, aos seus familiares, obrigado por fazer parte da minha história e parte de quem eu sou, em especial agradeço ao Gladyston, Lucine e filhos pelo apoio constante nos momentos em que mais precisei sempre dispostos a me ajudar e a Carmem pelo seu exemplo de consideração, atenção e convivência durante estes anos.

À minha, Vó Maria Eulina, que através de seu silêncio, humildade e caridade me ensinou o verdadeiro sentido da vida, você estará sempre comigo e muito feliz com a minha conquista, SAUDADES.

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 e obrigado pelas constantes orações e por muitas vezes ter compreendido a minha ausência.

Aos colegas do curso de Doutorado Larissa, Thaiana e Raul pela amizade e convivência, estaremos sempre juntos, obrigado pela confiança.

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 Maria Luísa, Juliana, Rafaela Brandão, Danúbia, Lucilene, Mariana, Karen, Thais, Rafaela Vieira, Luana, Vanuzia, Jessica, Wilder, Gabriel, Francielle, Alex, Bruno, Allan, Richard, Gustavo, Lucas e Rodolfo pela amizade, companheirismo, conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração e alegria e, em especial, ao Wilder, você foi peça principal na concretização deste trabalho MUITO OBRIGADO!

Ao movimento de Emaús de Lavras a todos os caminheiros, que me ajudaram nos momentos de fraqueza e pelas emoções vividas a cada momento, por me aproximar mais de Deus, pelos momentos de alegria e diversões em

especial agradeço a minha equipe amada, Equipe de Chamada obrigado pelo carinho, amor e consideração.

Aos meus amigos do grupo do terço Nossa Senhora do Silencio, obrigado pela amizade, cumplicidade e consideração.

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

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma do processo produtivo da cachaça de alambique.....	27
Figura 2	Equação simplificada do processo fermentativo.....	31
Figura 3	Síntese da via de fermentação alcoólica.....	31
Figura 4	Estrutura química do furfural.....	50
Figura 5	Estrutura química do HMF.....	51
Figura 6	Esquema reacional proposto para o método Hewitt's.....	53
Figura 7	Fórmula estrutural (a) e molecular (b) do carbonato de etila.....	59
Figura 8	Via metabólica para produção de acetoína.....	64
Figura 9	Reações envolvidas na análise de aldeídos.....	69
Figura 10	Reações envolvidas na análise de ésteres.....	70
Figura 11	Reações envolvidas na análise de cobre.....	71
Figura 12	Reação envolvida na análise de álcoois superiores.....	72
Figura 13	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das industriais e de alambique quanto aos seus parâmetros físico-químico.....	93
Figura 14	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das industriais e de alambique quanto aos álcoois superiores e metanol.....	98
Figura 15	Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), concentração do padrão injetado $160 \mu\text{g.L}^{-1}$ .....	101
Figura 16	Cromatograma de uma cachaça industrial (amostra L8)	103

	de carbamato de etila.....	
Figura 17	Cromatograma de uma cachaça de alambique (amostra L30) de carbamato de etila.....	103
Figura 18	Cromatograma da solução padrão de 2,3-butanodiona, Concentração do padrão injetado: 140 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	107
Figura 19	Cromatograma de uma cachaça industrial (amostra L1) de 2,3- butanodiona.....	109
Figura 20	Cromatograma de uma cachaça de alambique (amostra L30) de 2,3-butanodiona.....	109
Figura 21	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das industriais e de alambique quanto ao carbamato de etila e 2,3 butanodiona.....	111
Figura 22	Cromatograma da solução padrão de furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	113
Figura 23	Cromatograma de uma cachaça industrial (amostra L1) de 5-hidroximetilfurfural e furfural.....	116
Figura 24	Cromatograma de uma cachaça de alambique (amostra L30) de furfural e 5-hidroximetilfurfural .....	116
Figura 25	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das industriais e de alambique quanto ao 5-HMF e furfural....	119
Figura 26	Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das industriais e de alambique quanto aos contaminantes 5-HMF , furfural, 2,3-butanodiona e carbamato de etila.....	121

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Porcentual de produção de aguardente industrial dos principais estados brasileiros de produtores de aguardentes.....	24
Quadro 2	Variáveis no processo de destilação que podem influenciar na qualidade da aguardente produzida em alambique de colunas...	35
Quadro 3	Padrões de identidade e qualidade (PIQs) da aguardente de cana-de-açúcar e da cachaça.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições do método de cromatografia gasosa empregada para análise de álcoois superiores e metanol.....	73
Tabela 2	Rampa de temperatura do método de cromatografia gasosa empregada para a análise de álcoois superiores e metanol.....	
Tabela 3	Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila.....	76
Tabela 4	Gradiente de eluição da fase móvel para a análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	79
Tabela 5	Análises físico-químicas de aguardente de cana/cachaças de coluna e de alambique.....	86
Tabela 6	Concentrações dos álcoois superiores, álcool propílico, álcool isoamílico, álcool isobutílico, butanol-1, butanol-2 e metanol nas amostras de cachaças de alambique e cachaças de coluna.	94
Tabela 7	Análise cromatográfica dos contaminantes em aguardentes: carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	99

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1	História da cachaça .....	22
2.2	Aspectos gerais da cachaça.....	22
2.3	Cachaça X Aguardente de cana .....	24
2.4	Processo produtivo da cachaça de alambique.....	25
2.5	Matéria-Prima .....	28
2.6	Fermentação.....	30
2.7	Destilação .....	33
2.8	Destilação em Alambique.....	36
2.9	Destilação em Coluna.....	38
2.10	Armazenamento /envelhecimento.....	39
2.11	Compostos secundários e contaminantes presentes nas cachaças	41
2.12	Ácidos Carboxílicos .....	44
2.13	Ésteres .....	45
2.14	Aldeídos .....	46
2.15	Álcoois superiores.....	46
2.16	Metanol.....	47
2.17	Furfural.....	48
2.18	Formação do Furfural e HMF na produção de bebidas.....	51
2.19	Métodos para determinação de furfural em bebidas .....	52
2.20	Carbamato de etila .....	58
2.21	2,3-Butanodiona (3-hidroxi-butano-2-ona) .....	62
2.22	Metais .....	66
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	68

3.1	Obtenção das amostras.....	68
3.2	Análises físico-químicas .....	69
3.3	Álcoois superiores.....	72
3.4	Análises cromatográficas das cachaças .....	73
3.5	Álcoois superiores e metanol .....	73
3.6	Preparação das amostras e cromatógrafo.....	74
3.7	Condições Cromatográficas.....	74
3.8	Análise de carbamato de etila (CE) .....	75
3.8.1	Derivação do padrão de carbamato de etila.....	75
3.8.2	Derivação das amostras .....	76
3.8.3	Condições cromatográficas.....	76
3.8.4	Limite de detecção (LD).....	77
3.8.5	Limite de quantificação (LQ) .....	78
3.9	Furfural e Hidroximetilfurfural.....	78
3.9.1	Preparação dos padrões e amostras.....	79
3.9.2	Condições cromatográficas.....	79
3.9.3	Validação analítica .....	81
3.9.4	Linearidade .....	81
3.9.5	Limite de detecção .....	82
3.9.6	Limite de quantificação.....	82
3.9.7	Precisão .....	83
3.9.8	Exatidão.....	84
3.10	Análise cromatográfica de 2,3-Butanodiona .....	85
3.10.1	Purificação da 2,4-Dinitrofenilidrazina.....	85
3.10.2	Preparação do derivado 2,4-dinitrofenilidrazona de 2,3 butanodiona .....	85
3.10.3	Derivação das amostras.....	86

3.10.4	Análises qualitativa e quantitativa.....	86
3.11	Delineamento experimental.....	87
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
4.1	Resultados das análises físico-químicas .....	89
4.2	Álcoois superiores.....	96
4.3	Análises cromatográficas dos contaminantes em aguardentes de alambique e industriais: carbamato de etila, 2,3- butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural	101
4.4	Análise de Carbamato de etila.....	103
4.5	Análise cromatográfica da 2,3-Butanodiona.....	109
4.6	Análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	116
4.7	Certificação do método analítico.....	117
5.	CONCLUSÃO .....	126
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	128

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
PIQs	Padrões de identidade e qualidade
HMF	Hidroximetilfurfural
DNPH	dinitrofenilidrazona
CE	Carbamato de etila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
LD	Limite de detecção
DAD	Arranjo de diodos
LQ	Limite de quantificação
$\sigma$	Desvio-padrão absoluto
RSD	Desvio-padrão relativo
CV	Coefficientes de variação
CMD	Concentração média determinada
ACP	Análise dos componentes principais
cm	Centímetro
g	Grama
Kg	Quilograma
°C	Graus Celsius
°Brix	Graus Brix
L	Litros
m	Metros
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ g	Micrograma
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
v/v	Volume/volume
mg	Miligramma
g	Grama
g/mol	Grama por mol

## RESUMO

No presente trabalho objetivou-se caracterizar e quantificar quatro contaminantes (carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural) presentes em cachaça de alambique e industrial. Foram coletadas quarenta e quatro amostras de cachaças nas regiões do sul, centro-oeste, sudeste de Minas Gerais e no estado de São Paulo, sendo posteriormente submetidas às análises físico-químicas e cromatográficas. As análises físico-químicas foram realizadas conforme metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural foram caracterizados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Pelos resultados das análises de carbamato de etila, verificou-se que duas amostras de cachaças de coluna apresentaram fora dos padrões exigidos pela legislação, com valores de 245,31 a 235,53  $\mu\text{g L}^{-1}$  e nenhuma das amostras de cachaça de alambique apresentaram concentração superior a 210,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que o método utilizado é muito sensível com baixos limites de detecção e quantificação. Na determinação de 2,3-butanodiona, foi possível perceber que as cachaças de coluna apresentaram níveis mais elevados do contaminante quando comparadas com as cachaças de alambique. Na quantificação do furfural e do 5-hidroximetilfurfural foi desenvolvido e validado um método analítico. As amostras de cachaças de coluna apresentaram valores superiores ao limite estabelecido pela legislação brasileira que variaram e 7,00 a 5,63 mg/100 mL de álcool anidrico em relação as cachaças de alambique.

Palavras-chave: Aguardente de cana, Carbamato de etila. Furfural, 5-hidroximetilfurfural, 2,3-butanodiona.

## ABSTRACT

In the present study aimed to characterize and quantify four contaminants (ethyl carbamate, 2,3-butanedione, furfural and 5-hydroxymethylfurfural) present in alembic cachaça and industrial. Were collected forty-four samples of cachaça in the southern regions, the Midwest, southeast of Minas Gerais and São Paulo state, and subsequently subjected to physical, chemical and chromatographic analyzes. The physicochemical analyzes were performed according to the methodology described by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). The ethyl carbamate, 2,3-butanedione, furfural and 5 hydroxymethylfurfural were characterized and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results of the ethyl carbamate analysis, it was found that both samples showed column cachaças outside the standards required by law, with the values 245.31 235.53 L<sup>-1</sup> ug and none of the liquor samples alembic showed concentration greater than 210.0 ug L<sup>-1</sup>, and the method is very sensitive to low limits of detection and quantification. In determining 2,3-butanedione, it was revealed that the column cachaças showed higher levels of contaminants when compared to cachaça alembic. In the quantification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural was developed and validated analytical methods employed to high-performance liquid chromatography (HPLC) with DAD detector. Samples column cachaças showed higher values than the limit established by Brazilian legislation and ranged from 7.00 to 5.63 mg / 100 ml of anhydrous alcohol over the alembic cachaça.

Keywords: Brandy cane, ethyl carbamate. Furfural, 5-hydroxymethylfurfural, 2,3-butanedione

## 1. INTRODUÇÃO

A cachaça é um dos destilados mais consumidos em nosso país, é obtida do caldo de cana fermentado e suas denominações variam de acordo com a região do país. Sua produção anual é de aproximadamente 1,6 bilhões de litros dos quais 90% são provenientes da produção industrial e 10% da cachaça de alambique (SEBRAE, 2014). O estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor de cachaça de alambique do país, representando 44% da produção nacional. Atualmente pesquisas e projetos estão sendo desenvolvidos visando a qualidade do produto, aprimoramento das práticas de fabricação que resultem em produtos padronizados e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais. No entanto, a produção de cachaça com qualidade requer um aprimoramento técnico e científico das etapas de produção, com estudos e pesquisas nas áreas de desenvolvimento genético de mudas de cana, corte e manejo, fermentação, destilação e envelhecimento (SEBRAE, 2014).

As exigências dos mercados, interno e externo, fazem com que a preocupação com a qualidade da bebida e, conseqüentemente, melhorias na sua qualidade sejam implementadas, não apenas do ponto de vista comercial, mas considerando principalmente os efeitos toxicológicos, já que um produto que contém compostos indesejáveis podem causar danos à saúde do consumidor.

Os dois processos de destilação do vinho (mosto fermentado) mais utilizados para a produção de cachaça são a destilação em alambique de cobre (destilação em batelada) e a destilação em coluna (destilação contínua) (SERAFIM et al., 2012).

Na destilação em alambique, o destilado é dividido em três frações: cabeça, coração e cauda; na destilação realizada em coluna de aço inoxidável não ocorre a separação do destilado em frações, pelo fato de que este sistema é

contínuo, ou seja, a alimentação da coluna com vinho e a saída do destilado acontecem simultaneamente e durante todo o processo. Outro fator importante na destilação em coluna é a quantidade de pratos teóricos que esta possui. Um alambique simples possui apenas um prato. Quando se analisa cachaça industrial e de alambique nota-se grandes diferenças de perfis químicos entre as mesmas podendo ser atribuídas também aos diferentes procedimentos da etapa fermentativa, nos quais os caldos de cana foram submetidos e não somente ao processo de destilação.

É conhecido que o processo de produção de cachaças em alambique e em colunas pode influenciar a composição química e, conseqüentemente, afetar a qualidade sensorial do produto final. Entretanto, poucos são os exemplos encontrados na literatura para o caso da aguardente de cana. Em alguns estudos relacionam algumas influências nas formação de carbamato de etila, furfural, acetaldeído e outros contaminantes devido ao processo de destilação, separações das frações e também a geometria do destilador. O presente trabalho teve como objetivos analisar amostras de cachaças/aguardentes de cana de coluna e de alambique produzidas nas regiões sul, centro-oeste, sudeste de Minas Gérias e no estado de São Paulo quanto a presença de contaminantes como o carbamato de etila, furfural, 5-hidroximetilfurfural e 2,3-butanodiona, validar o método analítico para a quantificação do furfural e do HMF que são compostos que possivelmente são transferidos ou formados em alguma etapa do processo de produção.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 História da cachaça**

A cachaça surgiu no século XVI, juntamente com a história do Brasil com a vinda dos portugueses e as primeiras plantações de cana-de-açúcar. Os primeiros relatos sobre a fermentação vêm dos antigos egípcios, os quais julgavam que a inalação de vapores de líquidos aromatizados e fermentados, absorvidos diretamente do bico de uma chaleira, num ambiente fechado, curava várias moléstias. Os escravos que trabalhavam nos engenhos perceberam que os restos de caldos deixados nos tachos que eram utilizados para a fabricação de açúcares fermentavam, produzindo um líquido, que quando ingerido, os alegravam e animavam, fazendo-os esquecer dos maus tratos sofridos pelos senhores de engenho (CARDOSO, 2013).

A aguardente foi para a Europa e para o Oriente Médio, pela força da expansão do Império Romano. Foram os árabes que descobriram os equipamentos para a destilação, semelhantes aos que conhecemos hoje. A tecnologia de produção espalhou-se pelo velho e novo mundo. Na Itália, o destilado de uva ficou conhecido como Grappa. Em terras germânicas, destilou-se, a partir da cereja, o kirsch. Na Escócia, ficou popular o whisky, destilado da cevada sacarificada. Na Rússia, a vodka foi produzida do centeio. Na China e Japão, o sakê foi feito do arroz; Portugal também absorveu a tecnologia dos árabes e destilou a partir do bagaço de uva, a bagaceira.

No século XIX e início do século XX, a elite e a classe média, buscando demonstrar sua identificação com a cultura europeia, desenvolveram um forte preconceito contra os hábitos e costumes brasileiros. A aguardente de cana passou a ser considerada uma bebida de baixa qualidade, destinada ao consumo dos menos favorecidos, tanto financeiramente quanto intelectualmente. Contudo, esse panorama começou a se alterar com a Semana da Arte, em 1922, quando ocorreu um resgate da brasilidade, ou seja, da valorização da cultura brasileira (SEBRAE, 2014).

Atualmente a cachaça é uma bebida brasileira que atinge todo o mercado nacional e internacional, recebendo o nome próprio “Cachaça do Brasil” e a ela são voltados vários planos e projetos do governo, contribuindo, assim, com a economia do país (CARDOSO, 2013)

## **2.2 Aspectos gerais da cachaça**

No Brasil, o mercado de bebidas alcóolicas é dividido em bebidas fermentadas (cerveja e vinho) e bebidas fermento-destilladas (cachaça, uísque e vodka). Entre o volume total de produção de 14,9 bilhões de litros, a maior participação é da cerveja (88,9%), seguida pelos destilados (7,5%), ficando o restante do mercado para as demais bebidas (3,6%). Entre as bebidas destiladas, a cachaça ocupa a primeira posição no Brasil (SEBRAE, 2014).

A cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida em território nacional, sendo superada apenas pelo consumo de cerveja. A produção nacional é contabilizada em cerca de 1,6 bilhão de litros por ano, entretanto estima-se que a produção real seria de aproximadamente 2,0 bilhões litros/ano, quando se considera o mercado informal do destilado. Tais números estão representados por mais de quatro mil marcas diferentes de aguardentes e de aproximadamente 40 mil produtores, majoritariamente distribuídos por nove estados com 4.000 marcas (IBRAC, 2014).

A cadeia produtiva da bebida gera mais de 600 mil empregos diretos e indiretos. Entre os estados brasileiros, São Paulo é o maior produtor, seguido por Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba, sendo Minas Gerais o maior produtor da bebida de alambique. Menos de 1% da produção é exportada, a cachaça é comercializada para mais de 60 países. Em 2014, a base de empresas exportadoras foi composta por mais de 90 empresas, que exportaram um total

8,06 milhões de litros, gerando uma receita de US\$ 14,99 milhões. Os principais mercados de destino da bebida foram: Alemanha, Portugal, Estados Unidos, França e Paraguai (IBRAC, 2014).

Na produção de aguardente industrial, a bebida é destilada em colunas de aço inox conhecidos como aparelhos contínuos; é uma destilação sistemática, por torres ou colunas de destilação, sendo as empresas produtoras de médio e grande porte, com capacidade de produção entre 10.000 e 100.000 litros/ dia. As cachaças de alambique são destiladas em alambiques de cobre, em baixa escala de produção, com uma média entre 100 e 1.000 litros/dia, podendo chegar a um máximo de até 2.400 litros. Essa destilação pode ser efetuada em alambiques de um dois ou três corpos (RECHE e FRANCO, 2009; DIAS, 2013).

Com base no volume produzido de cachaça, destacam-se também os estados produtores de São Paulo, Pernambuco e Ceará, que são responsáveis por cerca de 70% de toda produção de cachaça industrial (Quadro 1). Os Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia concentram a produção de aguardente de “alambique”. O estado mineiro e o fluminense contribuem com mais de 50% de toda a produção de cachaça de alambique em todo território nacional aproximadamente 300 milhões de litros (IBRAC, 2014).

Dados do Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC), mostram que no ano de 2014, a cachaça foi exportada para 60 países, por aproximadamente 90 empresas, gerando uma receita de US 14.99 milhões. Tal valor corresponde a um aumento de 10% em volume exportado a mais quando comparado ao ano de 2013. A Alemanha, Portugal, Estados Unidos, França e Paraguai são os principais importadores (IBRAC, 2014).

A produção nacional de cachaça é fruto de uma tradição centenária, caracterizada por pequenas empresas familiares, destilarias de médio e grande porte, além de distribuidores independentes. Como não existe um controle

oficial das diversas etapas da produção, diferentes métodos de produzir a aguardente têm sido aplicados, propiciando a produção de uma bebida com características químicas e sensoriais diversificadas (MUTTON e MUTTON, 2010; e LIMA, 1999).

<b>Estado Produtores</b>	<b>Produção Nacional (%)</b>
São Paulo	45
Pernambuco	12
Ceará	11
Rio de Janeiro	8
Goiás	8
Minas Gerais	8
Paraná	4
Bahia	2
Paraíba	2,0

Quadro 1 Porcentual de Produção de Aguardente industrial dos Principais Estados sBrasileiros Produtores de Aguardente (IBRAC, 2014)

### **2.3 Cachaça X Aguardente de cana**

De acordo com o Decreto Federal 4.851 de 2003, baseado na portaria 371 do Decreto original nº 2314, de 04/09/1997, dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e a fiscalização de bebidas. Nesse decreto, complementado pela Instrução Normativa de nº 13, de 30 de junho de 2005, tem-se a aprovação do Regulamento técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) para Aguardente de Cana e para Cachaça, e suas definições.

De acordo com essa instrução normativa, **Aguardente de cana** é a bebida com graduação alcoólica entre 38% e 54% v/v a 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares em até 6,0 g L<sup>-1</sup>, expressos em sacarose. **Cachaça** é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica entre 38% e 48% v/v a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares em até 6,0 g L<sup>-1</sup>, expressos em sacarose (BRASIL, 2005).

#### **2.4 Processo produtivo da cachaça de alambique**

A cachaça de alambique corresponde a um produto que é produzido em menor volume em relação à aguardente industrial, sendo obtida em alambiques de cobre a partir da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, sem adição de açúcar, corante ou qualquer outro ingrediente (OLIVEIRA et al., 2004).

A cachaça produzida nos alambiques utiliza cana cortada, moída, geralmente, inteira em um ou dois conjuntos de moenda, sendo o caldo puro resultante colocado a fermentar em dornas, fermentação essa conseguida na maioria das vezes, através do fermento natural que acompanha a cana vinda da lavoura. O vinho (mosto fermentado) é finalmente destilado em alambiques de cobre resultando no destilado, a cachaça. (OLIVEIRA et al., 2004).

No processo de fabricação da cachaça de alambique, têm-se as seguintes etapas: plantio da cana de açúcar, colheita da matéria-prima, moagem, preparação do mosto, fermentação do mosto, destilação, descanso,

armazenamento/envelhecimento, engarrafamento e comercialização (CARDOSO, 2013). O fluxograma representado na Figura 1 ilustra a cadeia produtiva de cachaça de alambique.

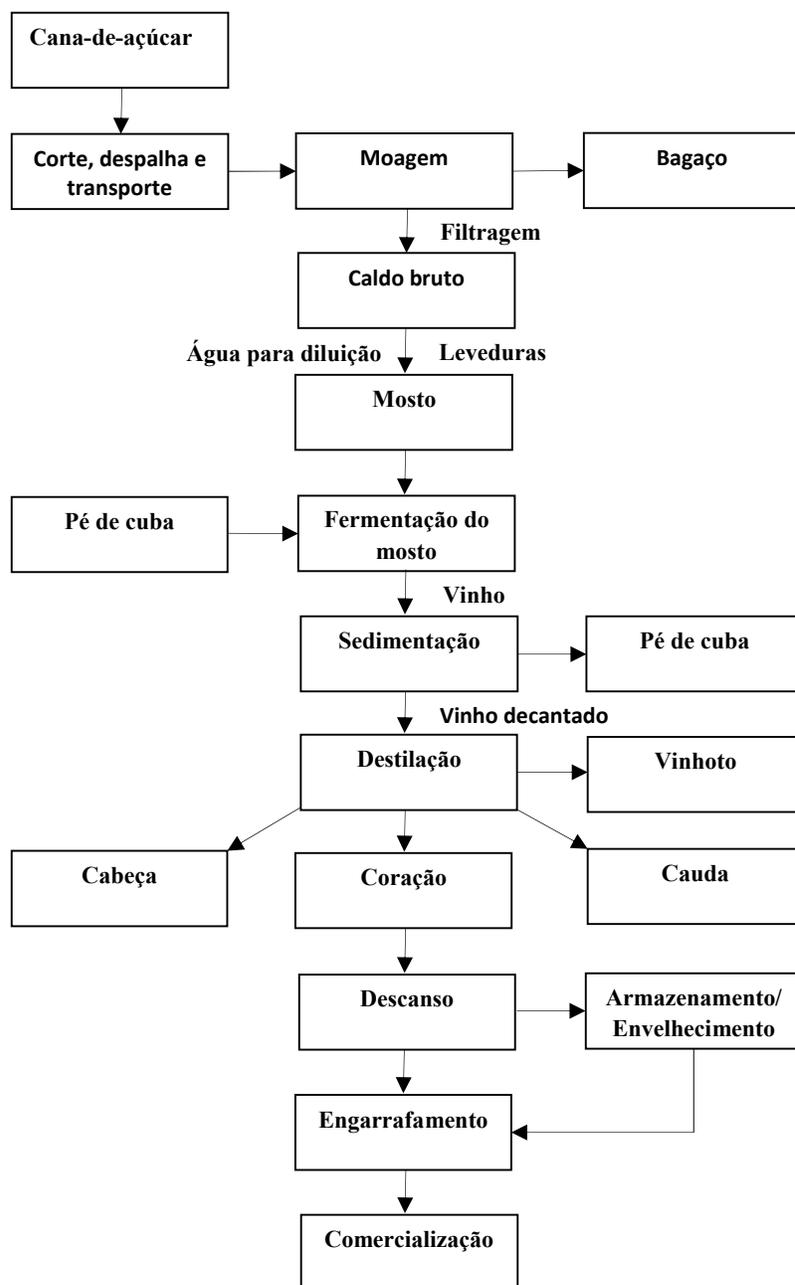


Figura 1 Fluxograma do processo produtivo da cachaça de alambique. Fonte: Cardoso, 2013

## 2.5 Matéria-Prima

A qualidade na produção da cachaça começa na escolha da variedade de cana-de-açúcar, visto que, é uma tecnologia importante no processamento da bebida. Corresponde a um fator capaz de proporcionar aumentos significativos na produtividade agrícola e industrial, sem aumento de custos de produção (ANDRADE, 2013).

A variedade de cana-de-açúcar é a base que sustenta todas as demais tecnologias de produção e processamento da matéria-prima, por isso, sua escolha deve ser preferencialmente orientada por especialista da área, haja vista as inúmeras particularidades relativas ao manejo delas. No Brasil, o cultivo das primeiras mudas de cana ocorreu em 1532 na ilha da Madeira, Capitania de São Vicente, próximo à cidade de Santos, no estado de São Paulo, onde foi fundado o primeiro engenho para produzir açúcar, com o nome de São Jorge dos Erasmos (ANDRADE, 2013).

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à classe das monocotiledôneas, família Poaceae (Gramineae), gênero *Saccharum* e espécie *Saccharum spp.* O nome atual da espécie é relacionado ao fato de que todas as variedades de cana atualmente cultivadas no mundo são para produção na área alimentícia (açúcar, melado, rapadura e a cachaça), na alimentação animal (forragem), e na produção de combustível (etanol) (ANDRADE, 2013).

A composição química da cana-de-açúcar é muito variável; porém, qualitativamente ela se assemelha em todas as variedades. Os colmos são constituídos basicamente por água (74,5%), matéria orgânica (25%) e matéria mineral (0,5%); além disso, esses constituintes não se encontram nas mesmas proporções nas diferentes partes do colmo. Os sólidos solúveis (°Brix) podem ser caracterizados como açúcares e não açúcares (orgânicos e inorgânicos).

Entre os açúcares, a sacarose é o componente mais importante, com um teor médio no caldo em torno de 18%, seguida da glicose (0,4%) e frutose (0,2%), (ANDRADE, 2013).

A obtenção de caldo de cana é realizada por trituração da matéria-prima com auxílio de moendas, seguido de filtração e decantação para a retirada de material particulado como impurezas. A garapa, como também é chamado o caldo de cana, apresenta em sua composição água (65%-75%), açúcares (11-18%), e em menores quantidades, substâncias nitrogenadas, ceras, lipídios, pectinas, materiais corantes (clorofila, antocianinas, compostos polifênicos) e sais minerais. Seu pH é ligeiramente ácido (4,8-6,0) e a alta concentração de nutrientes favorece o desenvolvimento de micro-organismos. Antes de ser levado para a próxima etapa (fermentação), o caldo de cana precisa ser diluído com água potável, abaixando a concentração de açúcares para 15 ou 16 °Brix, visto que, em concentrações elevadas, pode inibir o metabolismo das leveduras. Por fim, o caldo limpo e diluído passa a ser chamado de mosto, estando pronto para a adição do fermento (MARTINI et al., 2011; SCHWAN, DIAS, DIAS, 2013).

Quando ocorre a queima do canavial ocorre danos não só na produtividade da bebida, mas também nas quantidades e na preservação dos nutrientes do solo, podendo afetar ao longo do tempo a própria cultura. Com a finalidade de reduzir essa ação, o Decreto-lei Estadual nº 47.700, de 11 de março de 2003, do estado de São Paulo, regulamenta a Lei Estadual nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, na qual foram determinados prazos para a eliminação gradativa do emprego do fogo para despalha da cana-de-açúcar nos canaviais paulistas, estabelecendo prazos, procedimentos, regras e proibições, a fim de regulamentar as queimas em práticas agrícolas (SEBRAE, 2014).

Deve considerar também que o intervalo entre o corte e a moagem, este não deve ser superior a 24 horas. O correto é que a cana colhida seja usada no mesmo dia, pois a matéria-prima pode sofrer uma deterioração fisiológica, resultante da respiração, causando depreciação do produto e favorecendo a ação de micro-organismo de pode desqualificar o produto final. É importante os colmos estejam limpos (sugere-se a retirada dos ponteiros da cana, em função do seu baixo teor de açúcar, e alta quantidade de resinas e gomas), além do cuidado com a graxa de lubrificação das moendas, para que ela não contamine o caldo durante o processo de moagem (SEBRAE, 2014; CARDOSO, 2013).

## 2.6 Fermentação

A diversidade de micro-organismos envolvidos no processo de fermentação espontânea para a produção da cachaça pode ocasionar oscilações na qualidade e com isso acarretar a falta de padronização na qualidade da bebida produzida ao longo da safra. O uso de levedura selecionada, tanto para a produção de cachaça de alambique ou de coluna tendo o inóculo inicial na etapa de fermentação da bebida, apresenta inúmeras vantagens, como também permite minimizar as contaminações indesejáveis, reduz o tempo de fermentação, aumenta o rendimento alcoólico e o produto final será uniforme e de melhor qualidade.

Existem, dois tipos de processos de fermentação alcoólica utilizados pelas indústrias de cachaças: descontínuo (cortes, *Melle-Boinot* e *Melle-Boinot-Almeida*) e semicontínuo (decantação). Todavia, de maneira geral leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes tipos de cepas são capazes de coexistir em diferentes áreas, mesmo as mais remotas, e metabolizar a glicose, obtida através da atividade catalítica da invertase sobre a sacarose presente na cana. As



características sensoriais da bebida. Dentre estes é possível identificar mais de 200 analitos distribuídos em: ácidos orgânicos, alcoóis superiores, aldeídos, ésteres, entre outros (DUARTE et al., 2011). A fermentação alcoólica deve ser conduzida em condições adequadas de concentração de açúcares e temperatura aproximada de 26°C a 32°C. Além disso, deve se controlar o pH bem como a higiene do processo, circunstâncias essenciais para garantir os melhores rendimentos fermentativos e evitar proliferação bacteriana, com formação de ácidos butírico e acético e dextranas (GALINARO, FRANCO, 2011 ).

Estudos apontam que a utilização de linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* como iniciadoras do processo de fermentação possibilitará a indicação de leveduras apropriadas ao processo de produção de cachaça com características químicas desejáveis à bebida e com potencial para serem utilizadas em escala de alambique ou industrial. Além de permitir a manutenção e padronização da qualidade da bebida produzida, bem como possibilitar o desenvolvimento biotecnológico do processo produtivo da bebida e, conseqüentemente, agregar valor à cachaça e proporcionar um maior incremento financeiro ao produtor.

A levedura a ser utilizada no processo de fermentação deverá ter características específicas bem definidas, como alta velocidade de fermentação, osmotolerância, tolerância a etanol, habilidade para produzir altas concentrações de etanol, alta viabilidade celular para reciclagens repetidas, resistência a altas temperaturas e capacidade de produção de compostos aromáticos (ALENCAR et al., 2009). Portanto a escolha de parâmetros que levem à escolha de cepas que se adaptem às condições de produção e que contribuam para manter e melhorar a qualidade da cachaça é um tema ainda pouco explorado e merecedor de muitos estudos.

Observa-se a finalização do processo de fermentação quando a glicose,

substrato das leveduras, apresenta esgotamento identificado através de análise do °Brix do vinho, denominação do fermentado alcoólico do mosto. Nesta situação, a superfície do mosto não apresenta espuma pela diminuição do desprendimento de CO<sub>2</sub>, além de redução da temperatura e aumento de acidez (VENTURINO FILHO, 2010).

## **2.7 Destilação**

A destilação é um processo de purificação do vinho. Sua principal finalidade é a separação dos componentes voláteis presentes por meio de um aquecimento do líquido e posterior condensação dos vapores formados. Durante a destilação, ocorrem varias reações químicas, tais como hidrólise, esterificação e acetilação, que são induzidas pelo calor. Dependendo de como a destilação é conduzida diversos compostos serão carregados pelo vapor para a bebida, influenciando diretamente a qualidade da cachaça produzida (CARDOSO, 2013).

O vinho produzido é constituído majoritariamente por água (com concentração entre 89 e 94% v/v), etanol (5 a 8% v/v) e demais compostos secundários (menos de 1 % v/v) em sua fração volátil. Já sua fração não volátil ou fixa é composta pelos extratos do mosto, sólidos em suspensão oriundos da decomposição de leveduras e bactérias, e substâncias não solúveis presentes no próprio mosto como o bagacilho, pequenos fragmentos do bagaço obtidos no processo de moagem (NOGUEIRA, VENTURINO FILHO, 2005; VOLPE, 2013). A retirada do vinho ocorre normalmente por gravidade das dornas de fermentação e levado diretamente para destilação em alambique (cobre, aço inox ou misto) de forma descontínua ou em colunas de aço inox ou com aço inox e partes de cobre (alto ou baixo grau) de forma contínua (GALINARO, 2011).

Em média é possível produzir um destilado de aguardente de cana (38% a 54 % v/v) a partir de um vinho com 7% a 8 % (v/v). Isto ocorre devido ao aquecimento do vinho nos destiladores, formando vapores ricos em etanol e compostos secundários, com posterior condensação por resfriamento retornando a fase líquida do combinado mais concentrado. Este produto manufaturado compreende a aguardente de cana, ou seja, uma bebida com abundância de compostos voláteis. A parte quantitativa em água e em substâncias fixas do vinho é conhecida como vinhaça vinhoto ou garapão, que permanece na panela do alambique (SORATTO, VARVAKISII, HORII, 2007; BRUNO, 2012). O processo de destilação além de concentrar os constituintes voláteis da fermentação do mosto, também é capaz de formar novos compostos principalmente por desidratação, esterificação e acetilação. Os congêneres derivados da reação de *Maillard*, tais como alguns heterocíclicos: pirazinas, e compostos furânicos produzidos da degradação de açúcares residuais, estão também relacionados com aromas, como o cacau e caramelo, respectivamente. Os teores de tais substâncias são muito mais elevados em aguardentes de alambiques que são expostos ao calor intenso por períodos mais prolongados (CANUTO, 2013).

O material presente na fabricação dos alambiques artesanais é o cobre. Esse metal é utilizado por apresentar algumas características vantajosas, como maleabilidade (consegue trabalhar facilmente com esse metal); boa condução térmica (o calor recebido em um ponto se dissipa rapidamente por toda a superfície); resistência à corrosão (ocasionada pelo fogo e pelo vinho) e melhoria sensorial da bebida (reações favoráveis no componente do vinho são catalisadas) (CARDOSO, 2013). Quando não ocorre assepsia de forma adequada, as bebidas produzidas por alambique de cobre podem apresentar níveis elevados do metal; a contaminação por cobre ocorre nas partes

descendentes do alambique, sendo a serpentina a responsável pela maior contaminação; assim, o uso de serpentina de inox reduz significativamente os níveis de cobre presentes na cachaça (MAIA, CAMPELO, 2006).

O aparato de utilização para destilação tem influência direta nas características sensoriais e químicas da bebida (RECHE et al., 2007). Adicionalmente, a forma na qual estes equipamentos são operados é capaz de alterar o produto final. Assim, a destilação do vinho apresenta três principais objetivos: realizar extração de compostos voláteis; promover concentração seletiva dos compostos orgânicos voláteis desejáveis e eliminação seletiva dos compostos menos voláteis que podem representar malefícios a saúde ou serem prejudiciais para as características sensoriais da bebida; e propiciar reações químicas interessantes para origem de compostos que tenham a capacidade de influenciar o aroma da aguardente (RECHE et al., 2007; CANUTO, 2013). O Quadro 2 sintetiza estas variáveis relacionadas à qualidade da bebida produzida em alambiques e colunas.

Os dois principais processos de destilação do mosto fermentado mais utilizados para a produção de aguardentes compreendem a destilação em alambique de cobre (destilação em batelada) e a destilação em coluna de aço inoxidável. Outros sistemas de destilação já foram testados, mas não apresentaram melhorias significativas na qualidade da cachaça em relação aos processos já estabelecidos (RECHE, FRANCO, 2009).

**Alambiques****Colunas**

Referentes ao projeto	Referentes a operação	Referentes ao projeto	Referentes a operação
Material de construção: cobre, aço inox ou mistos	Intensidade de calor aplicado	Tipo de coluna: Alto ou baixo grau	Vazões de vinho
Formas de aquecimento: Fogo direto, vapor	Teor alcoólico do vinho	Número de bandejas	Vazões de vapor
Arranjo: Alambiques simples ou de três corpos	Capacidade <i>versus</i> volume de vinho adicionado	Material totalmente em aço inox ou com presença de partes de cobre	Teor alcoólico do vinho
Formato do capitel	Correta separação da cabeça, cauda e coração	Condensadores: horizontais e verticais	Pressão de trabalho

Quadro 2 Variáveis no processo de destilação que podem influenciar na qualidade da aguardente produzida em alambique de colunas.

Fonte: Adaptado de Aquino et al., 2004.

## 2.8 Destilação em Alambique

Ao aquecer o fermentado em alambiques é possível separar o destilado em três subfrações sequenciais: cabeça, coração e cauda. Do ponto de vista comercial, a fração coração é a de maior (ou único) interesse mercadológico por apresentar menor quantidade de compostos indesejáveis bem como aspecto

límpido e incolor, é constituída de 16% do volume total do vinho ou 80% do destilado. (BIZELLI, RIBEIRO, NOVAES, 2000; SOUZA et al., 2009). A determinação do melhor ponto de corte entre as três frações de destilado, é realizada por meio do acerto do perfil qualitativo e quantitativo dos alcoóis, ésteres, ácidos graxos e aldeídos, com especial atenção para o conteúdo de CE, metanol, acroleína, álcool butílico e álcool sec-butílico (BIZELLI; RIBEIRO; NOVAES, 2000).

Os compostos mais voláteis e com menor temperatura de ebulição do que o álcool etílico podem ser recolhidos na primeira fração do destilado (cabeça). Essa possui um teor alcoólico alto (50 – 70% v/v) que corresponde aos primeiros vapores e é separada recolhendo-se 1 a 5% do volume total do vinho ou 5 a 8% do total do destilado, dependendo da geometria do aparelho. Os compostos menos voláteis e com temperatura de ebulição superior ao álcool etílico são coletados na fração final (cauda), que é caracterizada por baixo teor alcoólico (10 – 38% v/v) e, é chamada de água fraca e corresponde a 3% do volume total do vinho ou 15% do destilado. As frações da cabeça e da cauda não devem ser aproveitadas para fins alimentícios por conterem substâncias tóxicas, como o metanol (DIAS, 2013, SOUZA et al., 2009).

As porções medianas voláteis compõem a fração coração. Adicionalmente, o comportamento de compostos secundários é dependente de suas propriedades termodinâmicas, podendo ser distribuídos em categorias de compostos mais voláteis que o álcool (representados por ésteres e aldeídos), compostos menos voláteis que o álcool (compostos fenólicos e ácidos orgânicos) e compostos que são mais voláteis que o álcool nas soluções alcoólicas de baixa concentração e menos voláteis que o álcool nas soluções alcoólicas mais concentradas (BIZELLI, RIBEIRO, NOVAES, 2000).

O resíduo decorrente da destilação conhecido como vinhoto ou vinhaça com baixo teor de etanol e alto teor de água, pode ser reutilizado como repositório de minerais e água na fertilização do solo e também na alimentação animal (SERAFIM et al., 2012; DIAS, 2013).

Após destilação, a bebida não se encontra na forma ideal de ser previamente consumida, porque ela apresenta um bouquet irregular, sendo necessário um período de descanso de aproximadamente três meses para completar sua qualidade, devendo ser armazenada em dornas de aço inoxidável, madeira ou em recipientes de vidro, em local protegido e arejado, evitando altas temperaturas (CARDOSO, 2013).

## **2.9 Destilação em Coluna**

Na destilação em coluna de aço, não há estratificação do destilado em frações, devido ao sistema ser contínuo, ou seja, a alimentação da coluna com vinho e a saída do destilado acontecerem simultaneamente e durante todo o processo. Outro fator importante na destilação em coluna é a quantidade de pratos teóricos que esta possui. Um alambique simples possui apenas um prato, enquanto que em colunas de baixo grau, utilizadas na produção de cachaça, o número varia de 15 a 20 pratos (RECHE, FRANCO, 2009).

A coluna de destilação empregada em processos industriais de produção de cachaça é constituída por um cilindro de aço inox, com variações de diâmetro e altura em função da sua produtividade horária, provida internamente com bandejas que contém chaminés, calotas e sifões. O vinho é introduzido continuamente na parte superior da coluna, de onde vai descendo de bandeja em bandeja e, simultaneamente, a vaporização do álcool e dos demais compostos voláteis ocorre em virtude do aquecimento do sistema pelo vapor de água. O

vinhoto se instala na base da coluna, enquanto que no topo os vapores contendo álcool e as demais substâncias voláteis, é que são separadas através de um condensador, ou podem sofrer ainda uma condensação parcial e retornar ao interior da coluna. O sistema pode dispor ainda de um condensador auxiliar para liquefazer os vapores que não se condensaram anteriormente. Os destilados alcoólicos provenientes dos dois condensadores passam juntos pela resfriadeira e são coletados. Após armazenado, o destilado assim obtido pode ser diluído em água, adoçado e filtrado, antes de ser engarrafado (NOVAES, 2000; MORETTI, 2011).

As cachaças produzidas em colunas possuem características sensoriais diferenciadas, devido a presença de compostos sulfurados que também estão presentes em diversos tipos de alimentos e bebidas. Faria et al., (2003) já haviam sugerido uma possível relação entre os teores de enxofre e o defeito sensorial das cachaças destiladas na ausência de cobre e relacionaram a presença de sulfeto de metila (DMS), com o defeito sensorial das cachaças destiladas na ausência de cobre. O controle dos teores de DMS é portanto muito importante não só para evitar o defeito característico das cachaças destiladas na ausência de cobre mas também como importante fator no controle da aceitação dessa bebida. (FARIA et al, 2003).

## **2.10 Armazennamento /envelhecimento**

Após a destilação da cachaça o envelhecimento vem se tornando uma prática muito comum entre os produtores, que tem como principal objetivo agregar valor ao seu produto, tornando-o mais competitivo no mercado (ANJOS et al., 2011). A cachaça pode ser armazenada ou envelhecida em tonéis de madeira. Portanto o envelhecimento não é uma etapa obrigatória do processo;

porém, apresenta uma importante etapa na produção de bebidas destiladas, agregando valor econômico e influenciando na qualidade, pois altera acentuadamente a composição química, aroma, sabor e cor. (CATÃO et al., 2011).

De acordo com o MAPA, a aguardente de cana envelhecida refere-se à bebida que contiver, no mínimo, 50% de aguardente de cana envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano. Aguardente de cana premium é o destilado 100% envelhecido em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período mínimo de um ano. Aguardente de cana extra-premium é aquela 100% envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período mínimo de três anos (BRASIL, 2005).

No envelhecimento ocorrem diversas reações químicas que geram alguns ácidos e aldeídos aromáticos, mudança leve de cor e um decréscimo do teor alcoólico durante o período prolongado do envelhecimento, incluindo as interações químicas dos componentes secundários entre si com o etanol e o oxigênio da atmosfera. Outro fator relevante é que durante o envelhecimento várias substâncias são extraídas da madeira para a bebida, ou seja, as extrações dos componentes solúveis como os flavonóides e taninos resultantes da decomposição parcial de macromoléculas da madeira (lignina, celulose, hemicelulose) em monômeros solúveis, principalmente aldeídos e os compostos fenólicos, assim como óleos voláteis, açúcares, glicerol, ácidos orgânicos não voláteis e substâncias tânicas. Outros compostos importantes resultam da oxidação de aldeídos fenólicos que se convertem em ácidos fenólicos, assim como a interação entre os ácidos fenólicos e álcoois da cachaça, gerando ésteres fenólicos, componentes oleosos e com aromas peculiares e agradáveis (MAIA, CAMPELO, 2006; SOUZA et al., 2009; ANJOS et al., 2011).

Entretanto isso pode ser variado de acordo com o tipo de madeira e com as substâncias químicas que estão presentes, podendo tornar uma cachaça mais suave e agradável sensorialmente, diferenciando significativamente de uma bebida recém destilada, que apresenta um gosto ardente e seco (ALCARDE, SOUZA E BLLUCO 2010).

Pode-se reconhecer que a etapa de envelhecimento dentro da cadeia produtiva de cachaça é sem dúvida uma etapa muito importante para melhorar os atributos sensoriais da bebida, resultando um produto com qualidade diferenciada, não só compatível com as exigências do mercado externo, como também necessário para ampliar o mercado interno, pois já está evidente o aumento do consumo de cachaças envelhecidas, com qualidades diferenciadas (FARIA, et al., 2003).

### **2.11 Compostos secundários e contaminantes presentes nas cachaças**

Durante a fermentação alcoólica, ocorre o desdobramento dos açúcares do caldo de cana com formação de dois produtos principais: álcool etílico e dióxido de carbono. Além desses, há, normalmente a formação de pequenas quantidades de outros componentes, os quais recebem a denominação de compostos secundários ou congêneres, tais como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores, que podem influenciar positivamente ou negativamente a qualidade da bebida. Os componentes químicos secundários são compostos orgânicos voláteis que conferem características sensoriais peculiares à cachaça, como o aroma e o sabor, onde a quantidade e a natureza química desses componentes dependem da matéria-prima, da fermentação, da destilação e do envelhecimento (LIMA et al., 2009; CARDOSO, 2013).

A cachaça é dividida em duas frações, a orgânica que é constituída basicamente de alcoóis, aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, carbamato de etila e compostos sulfurados, e a fração inorgânica, que é constituída principalmente por íons metálicos, tais como cobre, alumínio, cálcio, chumbo, ferro, entre outros.

Os componentes secundários formados durante o processo de fermentação do mosto mudam de caráter químico e proporção durante a destilação, havendo uma posterior maturação do produto. Contudo, alguns compostos são indesejáveis à bebida devido, principalmente, as suas propriedades tóxicas que depreciam a qualidade do produto final (SIEBALD, CANUTO, SILVA, 2009; ZACARONI et al., 2011 ).

De acordo com França, Sá e Fiorini (2011), uma boa Cachaça não deve possuir em sua composição teores não permitidos de substâncias que possam ser nocivas ao consumidor mesmo quando estas não prejudiquem as propriedades sensoriais da bebida (cor, aroma, sabor). Assim, a cachaça deve ser submetida a controles de qualidade físico-química e sensorial.

Com o grande aumento da produção de cachaça no país e também no mercado externo, cada vez mais tem-se exigido que o processo de fabricação de cachaça seja com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais. A legislação estabelecida pelo MAPA determina os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) (Quadro 3) para a aguardente de cana-de-açúcar e cachaça, com os seguintes limites para os compostos secundários e contaminantes presentes em aguardentes de cana/ cachaça:

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
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	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	210,0
Cobre	$\text{mg L}^{-1}$	-	5,0
Arsênio	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	100,0
Chumbo	$\mu\text{g L}^{-1}$	-	200,0

\*Alcoois superiores: isobutilico + isoamilico + propilico \*\*Congêneres: acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores

Quadro 3 Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) da aguardente de cana-de-açúcar e da cachaça (BRASIL, 2005).

## 2.12 Ácidos Carboxílicos

Os ácidos são compostos normalmente produzidos durante a fermentação, sendo produzidos por leveduras ou bactérias provenientes de contaminação. O ácido acético 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, 2013).

De acordo com França, Sá e Fiorini (2011), durante o processo fermentativo ocorre a formação de vários ácidos, sendo o ácido acético, expresso em acidez volátil, o principal componente da fração ácida da cachaça.

Uma acidez elevada na cachaça é sensorialmente desagradável promove um sabor indesejável e agressivo prejudicando a qualidade da bebida. Essa alta acidez pode ser causada por fatores relacionados à contaminação do mosto por bactérias acéticas, que podem ocorrer desde a obtenção da matéria-prima, durante a estocagem da cana e após a moagem, e mesmo após a fermentação, quando a destilação do vinho não é realizada logo após o final do processo fermentativo. Além disso, durante o processo fermentativo, deve-se evitar a areação do mosto, uma vez que o aumento de oxigênio faz com que o lêvedo transforme o açúcar em ácido acético, em vez de etanol. 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 (MOSER, 2012; CARDOSO, 2013;

BORTOLETTO, 2013).

### **2.13 Ésteres**

Os ésteres são formados pela reação de esterificação entre pequenas quantidades de etanol e ácidos carboxílicos, provenientes do processo de fermentação, outra rota para a formação dos ésteres ocorre por meio das reações de esterificação entre os álcoois e os ácidos carboxílicos durante o processo de destilação e envelhecimento. Normalmente, o acetato de etila representa aproximadamente 80% de todos os ésteres da cachaça. (MIRANDA et al., 2008; CARDOSO, 2013). Esse composto, em baixas concentrações incorpora um aroma agradável de frutas à bebida, porém, em grandes quantidades confere à cachaça um sabor indesejável e enjoativo (MOSER, 2012). Os ésteres constituem a maior classe de compostos aromáticos nas bebidas alcoólicas e sua origem está no metabolismo secundário intracelular das leveduras durante a fermentação alcoólica. Juntamente com os ésteres, os álcoois superiores, aldeídos e ácidos orgânicos são responsáveis pelo aroma e sabor típicos de bebidas e desempenham um importante papel na formação do perfil sensorial dos destilados (MOREIRA, NETTO, MARIA, 2012).

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 et al., 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).

## 2.14 Aldeídos

Os aldeídos podem ser formados durante o processo de fermentação pela ação das leveduras em estágios preliminares no processo fermentativo. O principal aldeído é o acetaldeído, que pode ser formado principalmente durante a fermentação, bem como pela oxidação do álcool etílico, tendendo a desaparecer no final, pela oxidação a ácido acético. Aldeídos com até oito átomos de carbono tem aromas penetrantes e enjoativos considerados indesejáveis em bebidas destiladas. Já os aldeídos com mais de dez átomos de carbono apresentam um aroma agradável (MOSER, 2012; CARDOSO, 2013).

Os aldeídos são compostos muito voláteis, de odor penetrante, que afetam o aroma das bebidas alcóolicas; durante a destilação, encontram-se presentes em maiores concentrações na fração “cabeça”, e apenas pequenas concentrações compõem a bebida na fração “coração”. A intoxicação por aldeídos pode levar a sérios problemas relacionados com o sistema nervoso central, como sintomas de “ressaca”, náusea, vômitos, inquietação, sudorese, confusão, queda da pressão sanguínea, aceleração dos batimentos cardíacos e dores de cabeça; geralmente estão associados à intoxicação por aldeídos (ALCARDE et al., 2009; CARDOSO, 2013).

## 2.15 Alcoóis superiores

Os alcoóis superiores são aqueles que possuem mais de dois átomos de carbono, são formados durante o processo de fermentação, provenientes das reações de degradação de aminoácidos. Os alcoóis superiores, com até cinco átomos de carbono, apresentam odores característicos (buquê), tradicionalmente associados com bebidas destiladas. Além disso, o aroma modifica-se

substancialmente e os alcoóis tornam-se oleosos e alguns lembram fortemente o aroma de flores. Esse excesso é chamado de óleo fúsel, que em teor elevado desvaloriza a cachaça e prejudica a qualidade da bebida. A formação de alcoóis superiores depende da cepa de levedura empregada e da ocorrência de micro-organismos contaminantes (CARDOSO, 2013).

Os principais álcoois superiores encontrados nas aguardentes são os álcoois isoamílico (3-metilbutanol-1), amílico (pentanol-1), isobutílico (2-metilpropanol-1), propílico (propanol-1), butílico (butanol-1) e sec-butílico (butanol-2) (PENTEADO, MASINI, 2009; CARDOSO, 2013). De acordo com a legislação vigente, os dois alcoóis butílico (butanol-1) e sec-butílico (butanol-2) devem ser quantificados separadamente e possuem limites permitidos de 3 e 10 mg 100 mL de álcool anidro, respectivamente (BRASIL, 2005).

Para evitar a formação dos álcoois superiores em excesso algumas medidas devem ser tomadas durante a produção de cachaça. Uma delas é que a cana-de-açúcar não deva ser armazenada por um longo período após o corte excedido de 24 horas, evitando, assim, a degradação de aminoácidos e a posterior formação dos álcoois superiores; não utilizar cana bisada e lavar a cana após o corte, impedindo sua contaminação por bactérias, que podem interferir no desempenho das leveduras durante a fermentação. Além disso, no processo fermentativo, alguns fatores influenciam a formação de álcoois superiores, como a espécie e a linhagem da levedura, temperatura e composição do meio (CARDOSO, 2013).

## **2.16 Metanol**

O metanol, álcool com um carbono apenas, é totalmente indesejável na bebida, devido a sua alta toxidez. Ele origina-se da degradação da pectina, um

polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, durante o processo de fermentação (ZACARONI et al., 2011). A molécula de pectina corresponde a um polímero formado pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante a fermentação, através das reações de hidrólise ácida ou enzimática (ZACARONI et al., 2011).

A ocorrência de metanol no mosto pode estar associada à queima da cana no momento da colheita e a degradação de substâncias pécnicas, especialmente quando o caldo de cana é acrescido de bagaços ou suco de frutas (CARDOSO, 2013). De acordo com Bortoletto (2013), na cachaça o metanol é formado pela degradação de bagacilhos da cana-de-açúcar, fibra que contém pectina, quando inicialmente não é separado do caldo por filtração. O referido autor ressalta também que normalmente o teor de álcool metílico em destilados de cana-de-açúcar é baixo devido ao conteúdo de pectina na cana ser baixo quando comparado ao de outras matérias-primas empregadas para a produção de bebidas destiladas.

Dependendo da quantidade ingerida, o metanol pode causar intoxicação que se configura inicialmente por dor de cabeça, náusea, cegueira. No organismo, o metanol é oxidado a ácido fórmico e, posteriormente, a  $\text{CO}_2$ , provocando uma acidose grave (diminuição do pH sanguíneo), afetando o sistema respiratório, podendo levar ao coma e até mesmo à morte. Sua ingestão, mesmo em quantidades reduzidas, por longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira e morte (CARUSO, FARAH-NAGATO, ALABURDA, 2010 e CARDOSO, 2013).

## **2.17 Furfural**

O furfural e o hidroximetilfurfural são contaminantes orgânicos indesejáveis na bebida, sendo resultados da decomposição química de carboidratos. 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 destes componentes (MASSON et al., 2007; ZACARONI et al., 2011; CARDOSO, 2013).

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.

O furfural também denominado, 2-furaldeído, 2-furancarboxaldeído, 2-furanocarboxialdeído, furaldeído, 2-furanaldeído, fural e furfuraldeído é um aldeído furânico, de fórmula molecular  $C_5H_4O_2$ , massa molecular de 96,08 g  $mol^{-1}$ , cuja estrutura química é apresentada na figura 4

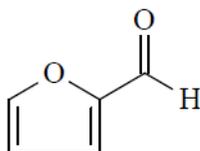


Figura 4 Estrutura química do furfural.

(Arquivo pessoal)

Esse aldeído furânico apresenta-se, à temperatura ambiente, sob a forma de um líquido oleoso incolor, com um odor peculiar, passando para amarelo ou castanho, mediante exposição ao ar e à luz, devendo ser conservado em recipiente escuro. É solúvel em etanol, éter, acetona e clorofórmio apresentando  $83 \text{ g L}^{-1}$  de solubilidade em água, sendo o principal produto da hidrólise de pentoses. Esse composto é considerado um indicador da degradação de alimentos e bebidas quando encontrado em concentrações acima do limite permitido estando, assim, relacionado às mudanças no aroma do alimento (AZEVEDO et al., 2007; FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA, 2012).

O contato prolongado ou repetitivo com o furfural pode afetar o sistema nervoso central, além de produzir dermatites, irritação da mucosa e trato respiratório. Pode, ainda, causar dor de cabeça, convulsões, paralisia, danos no fígado e rins, possibilidade de efeitos cancerígenos, vertigens, garganta seca/dolorida e hemorragia nasal. Se ingerido, causa náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, perturbações de coordenação, câimbras/contrações musculares incontroláveis (FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA, 2012).

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) é um aldeído furânico que também pode estar presente nas bebidas alcoólicas sendo designado, também, por hidroximetilfurfuraldeído, hidroximetilfurfural ou 5-hidroxi-2-furanocarboxaldeído. Sua massa molecular de  $126,1 \text{ g mol}^{-1}$  corresponde à fórmula  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$  e a estrutura química é representada na Figura 5.

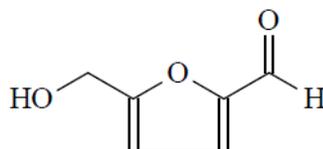


Figura 5 Estrutura química do HMF.

(Arquivo pessoal)

À temperatura ambiente, esse composto apresenta-se sob a forma de um líquido viscoso de cor amarela e odor característico. O HMF é solúvel em água, metanol, etanol, acetona, acetato de etila, dimetilformamida, éter, benzeno, clorofórmio. Tem sido reconhecido como o produto principal da decomposição da frutose, da glicose e de outros açúcares em meio ácido. Assim como o furfural, o HMF é fotossensível, devendo ser conservado ao abrigo da luz. O aumento da concentração do HMF está relacionado, principalmente, com mudanças na cor, em espécies que sofrem reação de Maillard ou caramelização. Nas cachaças, é resultante da ação dos mesmos fatores que provocam a formação do furfural, porém, para formação do HMF, esses fatores agem sobre as frutoses e glicoses.

A exposição ao HMF pode prejudicar rins e fígado, provocar irritação ocular, inflamação da pele além de acentuar dermatites pré-existentes. Sua ingestão produz náuseas e vômitos. Se inalado, pode causar irritação das vias respiratórias, alterações na função pulmonar (pneumoconiose) e tem ainda, potencial cancerígeno (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2012).

## 2.18 Formação do Furfural e HMF na produção de bebidas

O furfural e o HMF formam-se a partir das pentoses e hexoses. Esses açúcares encontram-se no bagaço e no caldo extraído do cana-de-açúcar. A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas, enquanto que, a hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por pentoses, hexoses e ácidos urônicos. As maiores frações de hemicelulose são de xilose, ácido acético e furfural. Já para a celulose, a glicose e o hidroximetilfurfural constituem a maior fração. A temperatura elevada associada ao baixo pH do mosto acarreta desidratação dos açúcares e hidrólise de polissacarídeos dos bagacilhos (celulose, hemicelulose) formando furfural e HMF. (GOUVEIA et al., 2001).

### 2.19 Métodos para determinação de furfural em bebidas

Os métodos de referência para determinação de furfural, expresso como a soma de furfural e HMF, adotados pelo MAPA, para essas bebidas, baseiam-se no método de Hewitt's (BRASIL, 2012) e na técnica de cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) (BRASIL, 2012; BRASIL, 2007).

O método de Hewitt's, consiste no desenvolvimento de coloração rosa, pela reação do furfural e anilina em meio ácido, formando uma imina (Figura 6)

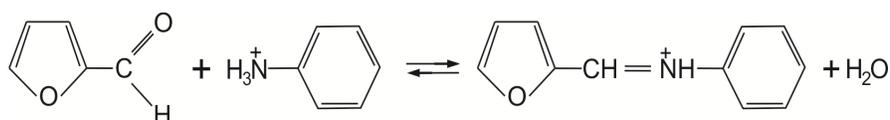


Figura 6 Esquema reacional proposto para o método de Hewitt's (ZAREI, 2009)

O método apresenta várias etapas a serem realizadas e controladas como destilação das amostras, correção do grau alcoólico para 50% (v/v) de álcool etílico e controle da temperatura, estando, pois, mais susceptível a erros durante os procedimentos metodológicos.

A cromatografia em fase gasosa, com detecção por ionização em chama, é o método oficial para análise de furfural em bebidas destiladas (BRASIL, 2012; BRASIL, 2007). A separação dos componentes da mistura ocorre pela passagem de um gás inerte (fase móvel) por uma coluna cromatográfica (fase estacionária). A quantificação é realizada por comparação com padrões analíticos. O detector de ionização de chama (FID) possui uma chama onde as substâncias orgânicas provenientes da amostra são queimadas ou ionizadas. A quantificação é realizada pela padronização interna, utilizando 1-pentanol e a partir das curvas de calibração, a concentração é obtida. (DEL GRANDE, 2013).

Vários outros métodos espectrofotométricos e cromatográficos têm sido propostos na literatura para a determinação de furfural e HMF em bebidas. Os métodos espectrofotométricos oferecem características muito atraentes que incluem a instrumentação simples, o rápido tempo de resposta e a fácil operação que determinam furfural, expresso como a soma de furfural e HMF, em bebidas destiladas pelo método de Hewitt's (ZAREI, 2009; DOBRINAS, STANCIU, SOCEANU, 2009).

O método de Winkler foi utilizado para análise de bebidas destiladas. O método consiste na preparação de um reagente de derivação que reagirá com a amostra a 18° C por 5 minutos requerendo, deste modo, um rigoroso controle de temperatura e tempo. O reagente de derivação consiste em quantidades conhecidas de p-toluidina, ácido barbitúrico, ácido acético

glacial, etanol e água deionizada. O produto de cor violeta apresenta absorção máxima em 585 nm, tem elevada taxa de formação, porém, é instável mostrando que para tempos maiores que 100 s, a absorbância diminui rapidamente. Esse método exige um controle rigoroso da temperatura reacional, da concentração de p-toluidina e do ácido barbitúrico, da acidez do meio, da proporção de etanol, visto que, o produto é instável em solução aquosa (WINKLER, 1995; MANSILLA, SALINAS, NEVADO, 1992).

Outro procedimento baseia-se na reação de furfural com acetato de mercúrio (II) com ácido sulfúrico por 30 minutos, sob aquecimento em banho-maria em ebulição sendo esse, o tempo ótimo para a reação fotométrica. As concentrações e volumes de acetato de mercúrio (II) e ácido sulfúrico afetam substancialmente a banda de absorção devendo ser também, controlados rigorosamente. O produto reacional origina uma banda muito intensa de absorção em 238 nm podendo ser quantificado através da curva analítica construída nas condições ideais estabelecidas (KHABAROV et al., 2006).

É descrito também, a determinação de furfural em nível de ultratraços em água por extração da fenilhidrazona, produto da reação do furfural com a fenilidrazina em meio ácido. Neste método, a fenilidrazona é concentrada num pequeno volume de fase rica em surfactante. A separação e pré-concentração do furfural ocorrem a partir da mistura de micelas num sistema misto de surfactantes iônico e não iônico (Triton X- 100 / dodecilsulfato de sódio- SDS). A reação entre a amostra contendo o analito, a fenilidrazina em meio ácido e o SDS ocorre imersa num banho de água a 70° C durante 10 min, seguido de arrefecimento para posterior adição do Triton X-100. A separação da fase aquosa e da fase rica em surfactante dar-

se-á por centrifugação durante 5 min a 3500 rpm. A mistura é então, arrefecida num banho de gelo-sal para aumentar a viscosidade da fase surfactante que será dissolvida e diluída em etanol para medição espectrofotométrica a 446 nm (ZAREI,2009).

O procedimento consiste na determinação de componente voláteis majoritários (concentração maior ou igual que  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e minoritários dependendo dos seus níveis de concentração em amostras. No entanto, o estudo de compostos minoritários tem certos inconvenientes resultantes das suas baixas concentrações e o grande número de compostos presentes. Por esta razão, a quantificação dos compostos minoritários, pode requer uma extração líquido-líquido clássica. O método pode necessitar também de uma diluição prévia, o que poderia causar a insolubilidade de alguns dos componentes que são solúveis em altas proporções de álcool ou modificar o equilíbrio entre o etanol e compostos reativos alterando, assim, a composição original do destilado (MADRERA, VALLES, 2007).

Alves et al., (2011), realizou a análise de furfural por GC-FID, no destilado alcoólico da cajarana, por meio da utilização da coluna do tipo carbowax 20m. O princípio foi baseado na adição de uma mesma quantidade do padrão interno (pentanol) a bebida destilada e a uma solução padrão de furfural. Tanto a amostra quanto a solução de concentração conhecida foram injetadas diretamente no cromatógrafo e os picos correspondentes foram comparados. O teor encontrado para soma de furfural e HMF foi de  $1,5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ .

Para determinar, se o teor de furfural encontra-se dentro do estabelecido pelo MAPA para cachaças, Vilela et al., (2007) destilou 100 mL de cada amostra de cachaça e, do destilado, recolheu 20 mL num balão volumétrico de 100 mL, o qual foi completado com água destilada e em

seguida homogeneizado. Deste balão foram retiradas alíquotas, para as determinações por GC-FID tendo como fase estacionária, a coluna DB-WAX.

Madrera, Valles (2007), determinaram furfural em bebidas destiladas utilizando uma coluna meta. wax, encontrando teores entre 1 e 80,8 mg L<sup>-1</sup>, através de injeção direta das amostras e preparo das soluções a 40% de etanol em água.

Masson et al., (2007) analisaram amostras de cachaça fabricadas a partir da matéria- prima colhida sem a queima e após a queima da mesma. Utilizaram uma coluna DB-WAX e o furfural como reagente para comparação das áreas de picos das amostras. Os resultados mostraram que a queima do palhicho da cana influenciou, significativamente, na concentração do furfural. Das amostras analisadas, apenas uma encontrava-se com o teor acima do limite máximo fixado pelo MAPA.

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação de furfural em bebidas é reportado na literatura como um método viável de determinação. Neste, variáveis podem estar presentes e serem controladas para aumentar a resolução das medidas e também a sensibilidade. Dentre as variáveis encontram-se o tipo e tamanho de coluna cromatográfica e partículas da mesma, constituição e proporção da fase móvel, temperatura, loop de injeção, tipo de detectores.

De acordo com Yuan, Chen (1999) o uso da coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H de troca de cátions de hidrogênio baseada em resina divinilbenzenosulfonado-copolímero de estireno com uma partícula de 9 mm, temperatura da coluna mantida a 25°C e fase móvel constituída por acetonitrila e solução aquosa de ácido sulfúrico, loop de 20 mL e detectores de fotodiodo e índice de refração, permitiu a quantificação de furfural e HMF em sucos de frutas baseado no tempo de retenção dos analitos.

Métodos de derivatização para a obtenção de compostos do tipo 2,4-dinitrofenilidrazonas (2,4-DNPH) também têm sido recorrentes. Neste caso, para a quantificação de aldeídos e acetonas emprega-se o método de padronização externa e detecção a 365nm. Os derivados carbonílicos da 2,4-DNPH são obtidos conforme descrito na literatura: a 2,4-DNPH é dissolvida em ácido sulfúrico concentrado e água destilada. A esta solução, os aldeídos padrões, dissolvidos em etanol são adicionados. Os correspondentes derivados são então, filtrados e por recristalização com etanol absoluto. A pureza das hidrazonas pode ser confirmada por determinação da temperatura de fusão e análise elementar (C, H, N). As soluções padrões dos derivados carbonílicos das 2,4-DNPHs podem enfim, ser obtidas para construção das curvas de calibração. Para análise das amostras, uma solução 0,4% de 2,4-DNPH em acetonitrila é posta para reagir com a amostra e com o ácido perclórico. A solução resultante é agitada e mantida a temperatura ambiente por 40 minutos, alíquotas desta solução são injetadas no cromatógrafo líquido usando metanol-água como fase móvel e empregando uma coluna C-18 (NASCIMENTO, 1998).

Aquino et al., (2004) quantificaram furfural e HMF em xarope de guaraná e cajuína. Para as análises cromatográficas foram utilizadas as colunas CLC-SIL e C18. As determinações de HMF e furfural foram realizadas empregando-se o método do padrão externo. Foram usadas alíquotas de 25 $\mu$ L, de cada amostra filtrada. A fase móvel, acetonitrila: água 20:80 v/v e detecção a 285nm. Observou-se que, a concentração média do HMF, nas amostras de cajuínas de cor escura é muito maior que nas cajuínas claras, fato atribuído, segundo os autores, ao elevado e/ou prolongado tempo de aquecimento destas bebidas, indicando a degradação térmica das hexoses, visto que, esse é um dos processos que mais contribui para formação

do HMF.

Souza et al., (2009) quantificaram furfural e HMF em vinhos de 10 e 30 anos por HPLC, com injeção direta sem pré-tratamento das amostras, utilizando uma coluna C18, fase móvel, constituído por metanol contendo 2% de ácido fórmico em água e detecção em 280nm. Os picos foram identificados por comparação, com os correspondentes, das soluções padrão. As análises mostraram que, os vinhos mais envelhecidos, apresentavam maior teor desses analitos.

## **2.20 Carbamato de etila**

A quase uma década o carbamato de etila é objeto de estudo de bebidas alcoólicas no Brasil. Na época, foram apresentados dados alarmantes das quantidades presentes principalmente em cachaças comum na concentração média de  $770 \mu\text{g L}^{-1}$  registrada em uma ampla pesquisa em bebidas comerciais no Brasil. Tendo isto em evidência, vários autores observaram a ocorrência de CE em cachaças produzidas em Minas Gerais, identificando teores médios de CE bem acima dos valores máximos de  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  (BAFFA JÚNIOR et al., 2007; BARCELOS et al., 2007; LABANCA, GLÓRIA, AFONSO, 2008).

Grandes quantidades na bebida podem trazer sérios problemas ao organismo devido a suas potencialidades genotóxicas e carcinogênicas. Trata-se de um éster etílico do ácido carbâmico também chamado de uretana ou etiluretana, cuja fórmula molecular e estrutural estão representadas na Figura 7, Possui massa molar de  $89,09 \text{ g mol}^{-1}$ , alta solubilidade em água, etanol, éter, cetonas, ésteres e solventes clorados. A temperatura de fusão e ebulição varia de  $48-50 \text{ }^\circ\text{C}$  e de  $182-184 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Encontra-se na forma de cristal incolor, de sabor salino refrescante e levemente amargo. Essas propriedades

conferem ao carbamato de etila (CE) alta polaridade e baixa volatilidade, além de se decompor a baixa temperatura (MERCK, 2001; CARDOSO, 2013).

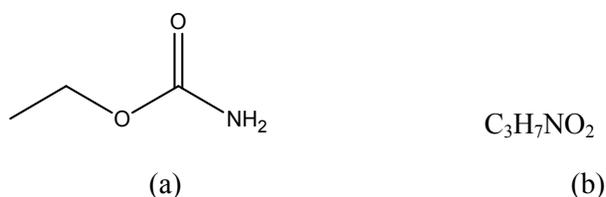


Figura 7 Fórmula estrutural (a) e molecular (b) do Carbamato de Etila.

O CE pode ser encontrado naturalmente em diversos tipos alimentos fermentados e também em bebidas destiladas. A ocorrência desse contaminante em bebidas alcoólicas surgiu no início de 1985, quando, no Brasil, detectaram níveis relativamente altos em aguardentes e outras bebidas (LACHENMEIER et al., 2006).

Lachenmeier e colaboradores (2010) avaliaram o risco de câncer da população brasileira frente à exposição do CE presente na dieta, principalmente com relação à cachaça e tiquira (aguardente de mandioca). A avaliação de risco revelou, como resultado de um amplo levantamento bibliográfico, uma concentração média de CE em cachaças destiladas em alambique e em coluna de  $380 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $490 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. A faixa de exposição diária ao CE pela população foi estimada em 0,1-0,2  $\mu\text{g}$  por kg de massa corporal (mc), sendo a cachaça o principal fator contribuinte (0,06-0,07  $\mu\text{g kg}^{-1}$  mc). Em relação à margem de exposição (MOE), a média calculada foi de 1.300, fato considerado preocupante, visto que o valor de baixo risco foi estimado em MOEs maiores ou iguais a 10.000, indicando um risco significativo de câncer da população

brasileira consumidora de aguardentes, em especial de tiquira e cachaça. Em conclusão, os autores ressaltaram que se o teor médio de CE nas cachaças estivesse em  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  (nível máximo tolerado pelo MAPA em 2010), haveria aumentos da MOE para patamares mais seguros.

De acordo com o Programa Toxicológico Nacional dos Estados Unidos, é possível exposição a risco em humanos através de inalação, ingestão e contato com a pele. Segundo a Comissão Científica Europeia sobre Limites de Exposição Ocupacional, é razoável assumir que o CE é um carcinógeno humano estabelecido, com base em contundentes evidências de sua carcinogenicidade em modelos animais, com indução de tumores malignos em ratos e camundongos em múltiplos locais de proliferação e com diferentes formas de administração, como oral, intravenosa e intramuscular. (SCOEL, 2012).

Andrade-Sobrinho et al., (2002), ressaltam que o perigo de exposição ao CE se evidencia ainda mais em virtude de sua formação natural durante processo fermentação de alguns alimentos além das bebidas alcoólicas, como vinagres, molhos de soja, queijos, iogurtes e azeitonas. Ainda há casos de presença de CE, em alimentos como chucrute, extrato de levedura ( $41 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e “pudim de natal” apresentando baixos valores quantificados, com  $29 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $41 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. No caso de aguardentes, o consumo médio estimado é de no máximo  $80 \text{ ng Kg}^{-1}$  de massa corporal/dia (WEBER, SHARIPOV, 2009; GALINARO, 2011).

Em humanos, o CE pode ser absorvido rapidamente e quase completamente a partir do trato gastrointestinal e da pele. Dentro do organismo, ele é distribuído uniformemente pelo corpo e rapidamente eliminado. As principais rotas de exposição humana são inalação, ingestão e contato com a pele. A exposição aguda a altos níveis pode prejudicar o fígado, rins e o sistema

nervoso central. Os sintomas incluem tonturas, vômito, perda da consciência, coma e hemorragias. Mais de 90% do que é metabolizado são excretados em 24 horas como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (IARC, 2010).

Existem algumas hipóteses propostas para formação de CE em bebidas fermentadas, porém seu principal precursor é o cianeto de hidrogênio (HCN), que pode ser originado, principalmente, a partir da uréia e seus derivados, cianoglicosídeos, piracarbonato de dietila e carbonato de dietila, os dois últimos achados em vinhos (GALINARO, 2011; PEREIRA, 2012, MENDONÇA et al., 2016).

Alguns estudos mostram que o processo de destilação pode interferir na formação do carbamato de etila em aguardentes de cana-de-açúcar, observando-se uma dependência entre a concentração de carbamato de etila, a geometria do destilador e o processo de destilação (BRUNO et al., 2007, SANTIAGO et al., 2014).

Durante a produção de cachaça a formação do CE, pode ocorrer antes, durante e depois do processo de destilação, incluindo o armazenamento da bebida, podendo haver um aumento potencial do CE na bebida que foi armazenada em tonéis de madeira e também em recipientes vidros (ANJOS et al., 2011). A formação do CE em etapas posteriores à destilação é dependente de vários fatores: concentração, pH, luz e tempo de armazenamento (NAGATO, NOVAES, PENTEADO, 2003).

Em vinhos, o CE pode ser formado durante e depois da fermentação, sendo que as reações de fermentação do CE são influenciadas pelo tipo de levedura, nutrientes adicionados ao mosto, temperatura e acidez da fermentação (LABANCA et al., 2008).

No Canadá inicialmente definiram o nível máximo dessa substância para bebidas alcoólicas, em concordância com os padrões de consumo e valor de

ingestão diária aceitável. O governo canadense fixou limites para o CE para diversos tipos de bebidas fermentadas de 30, 150 e 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  em vinho de mesa, bebidas destiladas e aguardente de frutas, respectivamente. Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration elaborou um plano de redução dos níveis, sendo os limites para uísques de até 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para vinhos de mesa de 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  (XU et al., 2012).

O MAPA estipulou, por meio da Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005, que o limite máximo permitido para esse composto em aguardente e cachaça seria de **150  $\mu\text{g L}^{-1}$** , até agosto de 2014, quando o limite foi elevado para **210  $\mu\text{g.L}^{-1}$** , pela Instrução Normativa nº 28, de 08/08/2014 (BRASIL, 2014).

### **2.21 2,3-Butanodiona (3-hidroxi-butano-2-ona)**

No controle de qualidade de aguardente/cachaça a legislação brasileira não estabelece limite quanto a classe de cetonas, sendo que este composto é importante e interfere no sabor da bebida. Na indústria de alimentos os derivados de cetona atuam como aromatizantes em produtos lácticos e bebidas podendo ser produzidos por processos fermentativos, utilizando bactérias e leveduras. A acetoína está relacionada, normalmente, com o diacetil, um aromatizante produzido também pelo mesmo processo. Estes dois componentes formam os aromas de diversos produtos, principalmente de queijo, manteiga, vinagre e café (ANTINONE et al., 1994).

As dicetonas, principalmente 2,3- butanodiona (diacetil), 2,3-pentanodiona, e acetoína estão presentes em bebidas como cervejas, vinhos, uísque, rum e cachaça, geralmente, não afetam a qualidade sensorial das bebidas alcoólicas em baixas concentrações, mas em elevadas concentrações, pode

modificar o sabor, devido ao seu gosto levemente amargo e sua viscosidade. O limiar de percepção do odor é da ordem de 3 ppm em bebidas alcoólicas. A 2,3-butanodiona origina-se do metabolismo das leveduras pela descarboxilação oxidativa de hidroxiácidos ou contaminação por certas bactérias como *Pediococcus* e *Lactobacillus* que produzem também a pentanodiona (BERRY, 1995.; ROMANO et al., 1998 )

A 2,3-butanodiona, um produto formado proveniente da fermentação alcoólica, é um componente muito importante no estudo dos vinhos, devido ao envolvimento com o “bouquet”. Seu teor em vinhos geralmente é baixo e sua presença nestes não é muito desejada principalmente por tratar-se de uma substância derivada do diacetil, o qual apresenta um forte odor característico. (TAKEMOTO, 2000).

A acetoína (3-hidroxi-2-butanona), principal cetona encontrada em bebidas alcoólicas, apresenta odor agradável, atuando também como potencializador de aromas em manteiga, vinagre e café. É uma substância comumente produzida em processos fermentativos tanto por leveduras como por bactérias durante a fermentação malolática. A rota da acetoína passa pelo diacetil (2,3-butanodiona) e pelo 2,3-butanodiol, que são importantes componentes de aromas de diversos produtos lácteos. A reação inicia-se com a condensação do piruvato com uma molécula de acetaldeído, combinada com o pirofosfato de tiamina, formando ácido  $\alpha$ -acetoláctico que, posteriormente, sofre descarboxilação oxidativa, formando a acetoína. (FLEET, 2003).

Segundo Perego et al., (2003), o efeito da temperatura na produção da acetoína foi aumentado quando a temperatura oscila entre 34 a 40°C, e verificaram que até 37°C ocorreu um aumento progressivo na concentração final do produto. Os autores ainda relatam que a produção de acetoína durante a fermentação do vinho por leveduras é dependente da temperatura. Quando a

temperatura aumenta, a velocidade de decomposição de acetolactato também aumenta, e mais diacetil e acetoína são produzidos.

O diacetil também conhecido como 2,3-butanodiona, apresenta uma coloração amarela esverdeado, peso molecular 86,09 e temperatura de ebulição de 88°C. É um composto de alto valor agregado por produzir o aroma da manteiga, porém pode ser desagradável em alguns produtos como: suco de maçã, cerveja e outras bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas. Tanto o diacetil como a acetoína são compostos produzidos por via fermentativa através de diversos microrganismos, principalmente bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* e leveduras do gênero *Saccharomyces*, que são utilizadas para produção de bebidas. Nas leveduras a formação de acetoínas a partir de carboidratos, ocorre através da condensação de uma molécula de acetaldeído ou de piruvato com um complexo de acetaldeído enzima (hidroxietilamina pirofosfato) para que ocorra a formação desta (MORITZ,1998).

A síntese ocorre através do piruvato, que é derivado da degradação de carboidratos. O acetaldeído ativo e o piruvato são transformados em  $\alpha$ -acetolactato pela ação enzimática de ácido acetohidroxi sintetase (Figura 10). Leveduras do gênero *Saccharomyces* produzem  $\alpha$ - acetolactato em concentrações consideráveis durante a fermentação e este composto pode ser facilmente convertido a acetoína, particularmente na presença de  $O_2$ .

O  $\alpha$ - acetolactato pode ser degradado enzimaticamente a diacetil através da descarboxilação oxidativa, e sua decomposição depende das propriedades químicas e físicas das bebidas alcoólicas. A evidência concreta é que o diacetil é formado a partir do ácido  $\alpha$  acetolactato como metabólito secundário na biossíntese do ácido  $\alpha$ -oxoisovalérico, intermediário da biossíntese da valina.

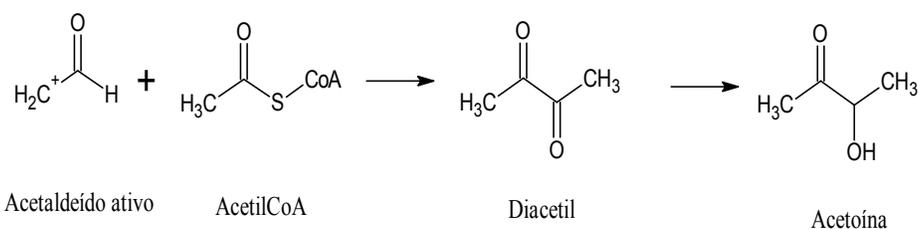


Figura 8 Via metabólica para a produção de acetoína

Segundo Teixeira (1999) leveduras presentes no mosto que é altamente aerado produzem mais acetoína e 2,3-butanodiona, do que com baixa concentração de oxigênio. Leveduras do gênero *Saccharomyces* produzem  $\alpha$ -acetolactato em concentrações consideráveis durante a fermentação, que posteriormente poderá ser convertido á diacetil e /ou acetoína, particularmente na presença de oxigênio. Estudos mostram que a produção de 2,3-butanodiona é totalmente dependente da taxa de oxigênio disponível na cultura. O autor observou também que a maior produção de acetoína ocorreu quando o pH apresentou-se abaixo de 4,5.

Apesar das cetonas estarem presentes em pequenas quantidades em bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas, podem ter uma participação importante para o sabor e aroma dessas bebidas, incluindo as aguardentes de cana brasileiras. Entretanto, a inalação prolongada desses compostos pode causar irritação das membranas mucosas, dores de cabeça, confusão, efeitos narcóticos e, também, pode levar a uma situação de coma. Estudos desenvolvidos com o auxílio de HPLC após derivatização de cetonas para obtenção de compostos do tipo 2,4-dinitrofenilidrazonas foram desenvolvidos em aguardentes de cana brasileiras. Em um deles, foram separados 4 compostos dessa classe. A 2,3-butanodiona (valor médio de 4,3 mg L<sup>-1</sup>) foi a cetona majoritária, seguida da propanona (acetona) (3,3 mg L<sup>-1</sup>), da acetofenona (1,2 mg

L-1) e da ciclopentanona (1,1 mg L<sup>-1</sup>). Em uma segunda parte, os autores observaram que o teor médio da acetona não variou de forma estatisticamente significativa entre a aguardente de cana produzida em alambique de cobre e a produzida em coluna de aço. (MOREIRA , NETO, MARIA,2012).

## 2.22 Metais

Os principais contaminantes inorgânicos encontrados na cachaça são cobre, chumbo e arsênio que podem estar presentes na bebida devido a certas embalagens ou oriundos de soldas de ligas metálicas do material utilizado na construção do destilador (CARDOSO, 2013). Caldas, Oliveira e Gomes Neto (2009) citaram outras fontes de contaminação da cachaça por esses metais, ocorrendo por meio da matéria-prima, utilização de produtos agroquímicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas) e pelo solo.

Em relação aos contaminantes metálicos, o valor exigido pela legislação para o cobre é de 5 mg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005). Esse metal é proveniente, principalmente, do material constituinte dos alambiques. Em quantidades normais, sua presença é desejável pois contribui na eliminação de certos odores desagradáveis, observados em aguardentes destiladas em alambiques confeccionados com materiais onde ele não está presente, como, por exemplo, os de aço inox (CARDOSO, 2013).

O emprego de cobre na fabricação de alambiques corresponde a um aspecto que favorece a qualidade da cachaça de alambique, uma vez que o cobre atua como catalisador durante a destilação, eliminando odores desagradáveis, como os sulfetos. A contaminação de cobre na cachaça de alambique ocorre devido à falta de higienização do alambique, principalmente durante as paradas longas da destilação e do término da produção, visto que, como o alambique,

que normalmente é de cobre, entra em contato com o ar úmido, o qual oxida o cobre e forma-se então uma camada esverdeada de nome azinhavre, composta por carbonato básico de cobre, na superfície do metal. Este carbonato é solubilizado pelos vapores ácidos produzidos durante a destilação, e por arraste, conduz à contaminação da bebida por íons de cobre. Por isso recomenda-se encher o alambique e as serpentinas com água para evitar a oxidação do cobre e contaminação da bebida pelo metal (MOSER, 2012; MONTEIRO, 2010).

O alambique deve ser obrigatoriamente limpo depois de toda alambicada para evitar que incrustações formadas nas paredes do alambique, possam produzir substâncias que prejudiquem a qualidade sensorial da cachaça, bem como impedir a ação catalítica do cobre, e, com isso, ocasionar problemas no *flavor* da bebida. Os autores descrevem que ao final da safra de produção da cachaça, o alambique deve ser totalmente desmontado e limpo com água potável acidificada. Assim que o alambique estiver limpo e seco, procede-se a sua montagem, enchendo-o a seguir, tanto o alambique quanto a serpentina, com água potável para evitar a oxidação do cobre e conseqüentemente a presença do azinhavre. Os autores destacam ainda que quando do início da nova safra, o alambique que ficou cheio de água na entressafra será esvaziado. Em seguida, deverá ser lavado com água potável acidificada. Após este procedimento, encher o alambique com água potável até o limite de trabalho e realizar uma destilação com esta água. Assim serão eliminados os resíduos de cobre e dos materiais utilizados na limpeza (MOSER, 2012; MONTEIRO, 2010).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das amostras

As cachaças e aguardentes utilizadas no experimento foram adquiridas aleatoriamente nas regiões de Minas Gerais (sul, centro-oeste e sudeste) e no estado de São Paulo. Coletaram-se 44 amostras, em diferentes unidades produtoras de pequeno e médio porte e também no comércio. As amostras foram codificadas sendo que, 15 amostras foram destiladas em destilador inox (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15), sendo L3 e L12 envelhecidas. E 29 amostras foram destiladas em alambiques de cobre (L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L28, L29, L30, L31, L33, L34, L35, L36, L37, L38, L39, L40, L41, L42, L43 e L44, sendo que as amostras L20, L21, L32, L33, L38, L39 e L44, são envelhecidas.

Logo após a coleta, foram realizadas as análises físico-químicas e cromatográficas no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardente no Departamento de Química da UFLA, sendo as primeiras realizadas 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, acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob-refrigeração (4°C) até o momento das seguintes análises: grau alcoólico, álcoois superiores, metanol, aldeídos e ésteres. As metodologias empregadas para as análises estão descritas a seguir. O exame organoléptico e a determinação de acidez volátil, extrato seco e cobre foram realizados sem a redestilação da cachaça.

### 3.2 Análises físico-químicas

- **Exame organoléptico:** a análise foi realizada observando-se a amostra de cachaça contra um transluminador de luz branca. Os seguintes parâmetros foram observados: aspecto, coloração, limpidez, presença de corpos estranhos, vazamentos e oleosidade.

- **Teor alcoólico:** determinado por densimetria, sendo o resultado expresso em percentagem em volume. Mediu-se o teor alcoólico das amostras redestiladas que estavam à temperatura ambiente de 20°C, com o auxílio de um densímetro digital DensiMat Gibertini.

- **Extrato seco:** a análise foi efetuada por meio de métodos gravimétricos. Inicialmente, uma cápsula de alumínio seca foi previamente pesada em balança analítica com precisão de 0,0001 g. 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. Decorrido esse tempo, a amostra foi levada à estufa a 100°C por 30 minutos e, logo depois, o material foi resfriado em dessecador. O resíduo sólido remanescente foi pesado em balança analítica (Marte/ AM - 220) e os resultados obtidos, expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra.

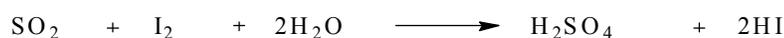
- **Acidez:** foi determinada por titulação volumétrica de neutralização. Os ácidos voláteis foram extraídos da bebida por arraste a vapor d'água, utilizando o destilador eletrônico Enochimico Gibertini. Foram utilizados 20 mL de cachaça sem redestilar e recolhidos 250 mL da mistura hidroalcoólica obtida, que, em seguida, foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> 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.

- **Aldeídos:** foram analisados pelo método titulométrico direto com iodo 0,05 mol L<sup>-1</sup>, titulando o SO<sub>2</sub> formado por meio das reações envolvidas na análise. Os aldeídos reagem com íons bissulfitos (em excesso), em pH neutro em um meio tamponado. Em meio fortemente ácido, o bissulfito em excesso reage com o iodo para impedir a dissociação do composto aldeído-bissulfito, que é estável em pH 2,0. O bissulfito, que está combinado com o aldeído, é titulado com a solução de iodo, após ser liberado em meio alcalino (pH 9,0). 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 nesse processo estão apresentadas na Figura 9.



O SO<sub>2</sub> em excesso reage com I<sub>2</sub> em meio ácido



Em meio alcalino, o aldeído é então determinado

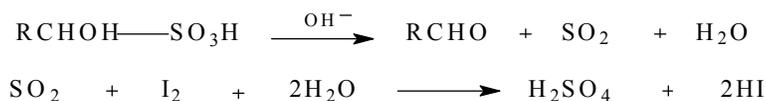


Figura 9 Reações envolvidas na análise de aldeídos

Fonte: CARDOSO, 2013

- **Ésteres:** foram determinados pela titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas amostras, conforme mostrado na Figura 10. Inicialmente, 50 mL de amostra foram colocados em erlenmeyers e neutralizados com solução padronizada de hidróxido de sódio, concentração de  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ , na presença de fenolftaleína 1% como indicador. Logo depois, foram adicionados 5 mL de solução padronizada de NaOH; desta vez, na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , e deixado em repouso por 12 horas. Decorrido esse intervalo, 5 mL de ácido sulfúrico,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , foram acrescentados à amostra, quando, então, foi titulada com hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A quantidade total de ésteres foi expressa em gramas de acetato de etila por 100 mL de amostra.

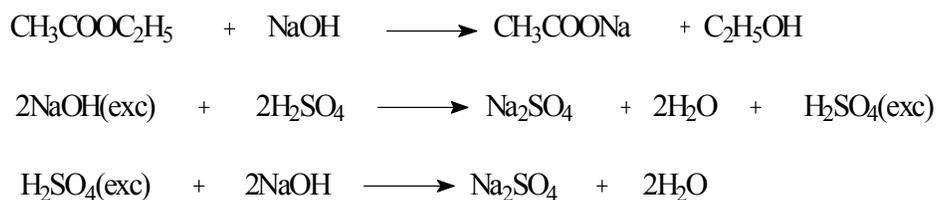


Figura 10 Reações envolvidas na análise de ésteres

Fonte: CARDOSO, 2013

- **Cobre:** A quantificação do cobre foi realizada por meio da adição de cloridrato de hidroxilamina e acetato de sódio para promover uma redução do  $\text{Cu}^{2+}$  presente nas amostras para  $\text{Cu}^+$ . Em seguida, foi adicionada solução de 2,2-diquinolilo em álcool isoamílico, formando-se um complexo de coloração violeta entre o cobre reduzido e a solução (Figura 11). Quanto mais intensa a coloração violeta, maior o teor de cobre. A quantificação do metal foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro, a 546

nm, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, sendo as quantidades nas amostras determinadas por meio da construção de uma curva analítica, utilizando-se sulfato de cobre como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em  $\text{mg L}^{-1}$  (CARDOSO, 2013).

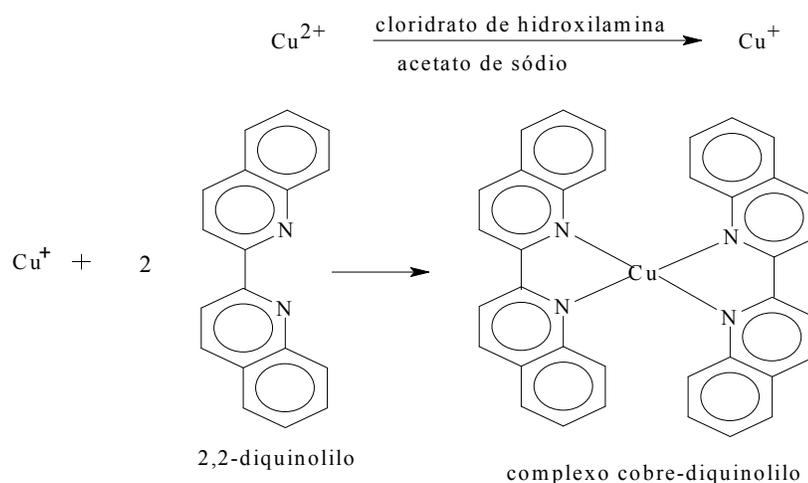


Figura 11 Reações envolvidas na análise de cobre

Fonte: CARDOSO, 2013

### 3.3 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 alcoóis superiores estão representadas na Figura 12.

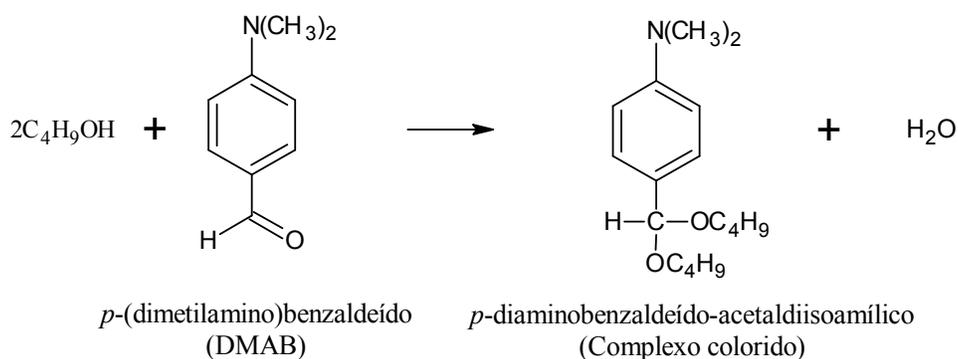


Figura 12 Reação envolvida na análise de alcoóis superiores

Fonte: CARDOSO, 2013

### 3.4 Análises cromatográficas das cachaças

As análises dos alcoóis superiores foram realizadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu (GC2010), autoamostrador AOC-20i, detector de ionização de chama e coluna DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

### 3.5 Álcoois superiores e metanol

A metodologia empregada para a análise dos alcoóis superiores foi aquela proposta por Vilela et al., (2007), com algumas modificações. Os padrões empregados foram o butano-1-ol (álcool butílico), butano-2-ol (álcool sec-butílico), álcool isoamílico, álcool isobutílico, propanol, metanol, sendo todos da

marca Merck, de grau analítico para cromatografia. Para a curva analítica, foi feita uma solução (mix) em uma concentração de  $4 \text{ g L}^{-1}$  em etanol 40%.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões.

### 3.6 Preparação das amostras e cromatógrafo

As amostras foram previamente destiladas e injetadas diretamente no cromatógrafo gasoso. As injeções das amostras foram realizadas em triplicata, sendo a identidade dos analitos confirmada pelo tempo de retenção e o perfil dos picos das amostras comparados aos dos padrões.

### 3.7 Condições Cromatográficas

As condições do método cromatográfico empregado estão apresentadas nas Tabela 1 e 2.

Tabela 1 Condições do método de cromatografia gasosa empregada para análise de álcoois superiores e metanol.

Temperatura da coluna	55°C
Temperatura do injetor	150°C
Temperatura do detector	170°C
Fluxo	1,4 mL/min
Split	1:10

Tabela 2 Rampa de temperatura do método de cromatografia em fase gasosa empregada para análise de álcoois superiores e metanol.

Rampa/rate	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
-	55	1
1,0°C/min	70	1

### 3.8 Análise de carbamato de etila (CE)

A metodologia utilizada para a análise do CE nas amostras, foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anjos et al. (2011), Machado et al., (2013) e Santiago et al. (2014), utilizando a padronização externa e realizando uma derivação prévia das amostras para posterior análise por HPLC. Os reagentes empregados para análise foram: padrão de carbamato de etila (Acros Organics), etanol (Vetec), propanol (Vetec), hexano (Fmaia), ácido clorídrico (Vetec), acetato de etila (Macron), acetato de sódio (Dinâmica), acetonitrila grau HPLC (Merck), água tipo I e 9-xantidrol (Acros Organics). Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3, um injetor automático com autoamostrador modelo SIL-10AF, interface modelo CBM-20A e um detector de DAD (FLD) modelo RF-10AXL. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5µm).

#### 3.8.1 Derivação do padrão de carbamato de etila

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

Para a análise quantitativa, preparou-se uma solução-estoque do carbamato de etila derivado, em uma concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , em acetato de etila. Para a construção da curva analítica, foram realizadas diluições em etanol 50% a partir da solução-estoque previamente preparada, sendo diluídas as soluções de trabalho em concentrações que variaram de 5,0 a  $300,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

### **3.8.2 Derivação das amostras**

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

### **3.8.3 Condições cromatográficas**

Na determinação do carbamato de etila nas amostras estudadas, foi utilizada uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA ( $4,6 \times 150 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ )

conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 $\mu$ m) e a detecção foi realizada com detector de fluorescência.

A quantificação do carbamato de etila foi realizada utilizando-se o método de padronização externa. Os comprimentos de onda de excitação e emissão empregados foram 233 e 600 nm, respectivamente. O fluxo utilizado foi de 0,75 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20  $\mu$ L. As amostras e os padrões foram injetados em triplicata. A eluição foi realizada em sistema do tipo gradiente (Tabela 3), sendo a fase móvel composta por solução de acetato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B).

Tabela 3 Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila.\*

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

\*Fase móvel: Solvente A: solução de acetato de sódio 20 mmol L; Solvente B: acetonitrila.

### 3.8.4 Limite de detecção (LD)

O Limite de detecção trata-se da menor quantidade existente do analito presente na amostra que pode ser detectada; porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

São três maneiras diferentes de se calcular o LD: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

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

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

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

### **3.8.5 Limite de quantificação (LQ)**

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

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

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

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

## **3.9 Furfural e Hidroximetilfurfural**

A metodologia utilizada para a análise furfural e hidroximetilfurfural nas cachaças de alambique e industriais foi realizada de acordo com a aquela proposta por Souza et al., (2009) e acrescidas de pequenas modificações.

Os padrões desses compostos descritos anteriormente foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os compostos referentes à fase móvel foram de grau analítico para HPLC: metanol (Merck) e ácido acético glacial (J.T.Baker) e água tipo I obtida de um sistema Milli-Q.

### **3.9.1 Preparação dos padrões e amostras**

Para cada um dos padrões de furfural e hidroximetilfurfural, foram preparadas soluções-estoque com concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , solubilizados em álcool etílico 50%.

O método utilizado para a quantificação dos compostos foi o da padronização externa. A construção das curvas analíticas foi realizada por meio da diluição da solução estoque previamente preparada, obtendo-se soluções com as respectivas faixas de concentração para os padrões: 0,1 a  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . As equações das curvas analíticas foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados, medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração, após a injeção em triplicata das soluções contendo os padrões.

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

### **3.9.2 Condições cromatográficas**

As análises do furfural e hidroximetilfurfural foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão, modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3, interface modelo CBM-20A e injetor automático modelo SIL-10AF. A coluna utilizada para as separações foi a Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 $\mu$ m) e o detector utilizado foi o de arranjo de diodos (DAD). Os solventes utilizados como fase móvel foram: solução de ácido acético 2% em água (Solvente A) e metanol:água:ácido acético (70:28:2% v/v/v) (Solvente B). As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente apresentado na Tabela 4. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20  $\mu$ L.

Tabela 4 Gradiente de eluição da fase móvel para a análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural.

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

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

### 3.9.3 Validação analítica

Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al., 2004).

Portanto, para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método utilizado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão de acordo com Anjos et al (2011) e Santiago et al (2014).

### 3.9.4 Linearidade

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

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

### 3.9.5 Limite de detecção

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

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

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

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

### 3.9.6 Limite de quantificação

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

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

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

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

### 3.9.7 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Pode ser avaliada por meio do desvio-padrão absoluto ( $\sigma$ ) ou pela estimativa do desvio-padrão absoluto ( $s$ ), quando o número de determinações é pequeno, pelo intervalo de confiança médio, ou mesmo pela estimativa do desvio-padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Neste estudo, para estimativas da precisão do método, foram determinados os coeficientes de variação (CV) de uma série de medidas, por meio da utilização da seguinte equação matemática:  $CV(\%) = (s/CMD) \times 100$ , em que,  $s$  = estimativa do desvio-padrão;  $CMD$  = concentração média determinada. Segundo Snyder et al. (1997), para a análise de compostos presentes em baixas concentrações, o valor de CV não deve ultrapassar 5 ou 10%, dependendo da complexidade da amostra, atestando, assim, a precisão do método analítico proposto (Anjos et al., 2011).

A precisão, em validação de métodos, é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Neste estudo foi utilizado a precisão intermediária. A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório em razão de eventos, como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Para isso, foi

realizada a análise, em 5 dias diferentes, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração (0,1; 1 e 25 mg L<sup>-1</sup>), sendo estimado o CV ao final das sucessivas repetições.

### 3.9.8 Exatidão

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

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

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

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando 3 amostras, escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações (0,5; 5 e 20 mg L<sup>-1</sup>) diferentes. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática:

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

### **3.10 Análise cromatográfica de 2,3-Butanodiona**

Para a análise de 2,3-butanodiona em cachaças foi realizado previamente uma derivação do composto presente na amostra, com consequente determinação quantitativa em cromatógrafo líquido. Os reagentes utilizados foram de grau analítico, padrão de 2,3- butanodiona (General Purpose Reagent-BDH Limited PODE England). Os solventes, metanol e acetonitrila, grau HPLC (Merck), 2,4-Dinitrofenilidrazina (Vetec). A água usada foi purificada pelo sistema Milli-Q (Milipore).

#### **3.10.1 Purificação da 2,4-Dinitrofenilidrazina**

A 2,4-Dinitrofenilidrazina foi purificada por três vezes sucessivas utilizando 2,0 g em 60 mL de metanol submetido a ebulição sob agitação constante até a solubilização completa. Filtrou-se a quente e o filtrado foi levado ao aquecimento novamente até a ebulição, repetiu o procedimento mais uma vez, deixou-se em repouso à temperatura ambiente, até completar a cristalização.

#### **3.10.2 Preparação do derivado 2,4-dinitrofenilidrazona de 2,3 butanodiona**

O derivado 2,4-DNPH de 2,3 butanodiona foi obtido seguindo a metodologia de Shriner et al. (1983). Preparou-se uma solução com 0,4 g de 2,4-DNPH (purificada) em 2 mL de ácido sulfúrico, adicionando a essa gota a gota 2 mL de água, com agitação até completa solubilização. Em seguida, colocaram-se 10 mL de etanol a 95%. Paralelamente preparou-se a solução de 2,3 butanodiona (0,1 g) em 15 mL de etanol. A solução de 2,4-DNPH recém-preparada foi

colocada nessa solução e a mistura resultante ficou em repouso à temperatura ambiente. A cristalização da 2,4- dinitrofenilidrazona ocorreu em torno de dez minutos. O derivado 2,4-DNPH de 2,3 butanodiona foi isolado por filtração e purificado por recristalização em etanol absoluto, por duas vezes. A pureza foi confirmada pela determinação da temperatura de fusão, e análises por HPLC.

Para análise quantitativa, a solução-padrão de 2,4-DNPH de 2,3 butanodiona foi obtida pela diluição da solução-estoque ( $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  em dimetilsufóxido DMSO) em etanol-água (45:55 v/v). Seis pontos foram utilizados para obtenção da curva analítica nas concentrações de  $0\text{-}140 \text{ mg.L}^{-1}$

### **3.10.3 Derivação das amostras**

Em um balão volumétrico de 100 mL, preparou-se uma solução dissolvendo 0,4 g de 2,4-dinitrofenilidrazona purificada com metanol. Em um frasco à parte, adicionaram-se na seqüência 1,0 mL da solução de 2,4-dinitrofenilidrazona, 4,0 mL da amostra e 50  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) a 1,0 M. A solução resultante foi agitada e mantida a temperatura ambiente por aproximadamente 45 minutos. As amostras derivadas foram filtradas em filtros de membranas de polietileno  $0,45 \mu\text{m}$  (Milipore) e 20  $\mu\text{L}$  da solução foi injetado no HPLC para análise (RECHE et al., 2007).

### **3.10.4 Análises qualitativa e quantitativa**

Para a quantificação da concentração de 2,3 butanodiona nas amostras, utilizou-se a técnica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando-se um equipamento Shimadzu com loop de 20  $\mu\text{L}$ , e, detector de UV-

Vis SPD-M6A, utilizando uma coluna  $C_{18}$ (25 cmx 4,6 mm I.D.; 5  $\mu$ L), sendo metanol-acetonitrila (80:20) e água a fase móvel utilizada. O gradiente utilizado foi: 0- 9,0 min. (40% fase A: 60% fase B), 9,0 – 15 min. (30:70), 15 -20min. (30:70), 20 – 30min. (10:90) e 30 – 45min. (40:60), com o termino da análise em 45 minutos.

A conversão quantitativa de cetonas nas bebidas alcoólicas destiladas aos derivados 2,4-DNPHs é assegurada por meio de um excesso de 2,4-dinitrofenilidrazina. A 2,4-DNPH de 2,3- butanodiona nas amostras foi quantificada usando-se o método de padrão externo (0-140 mg L<sup>-1</sup>), com detecção a 365 nm. A curva analítica foi obtida pela regressão linear ( $y = 234819x - 9086,7$ ), plotando a área de pico *versus* concentração, sendo o coeficiente de correlação linear igual a 0,9998.(RECHE et al., 2007).

### **3.11 Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com 44 tratamentos respectivamente e duas repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância utilizando um programa estatístico SISVAR 9 (Ferreira, 2011). As médias foram comparadas pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Em seguida por meio da análise dos componentes principais (PCA) as médias foram distribuídas em um gráfico biplot.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises físico-químicas foram realizadas seguindo a metodologia estabelecida pelo MAPA com algumas modificações. Os resultados estão representados na tabela 5.

Tabela 5 Análises físico-químicas de aguardente de cana/cachaças industriais e de alambique

	<b>Grau</b>					<b>Extrato</b>	<b>Alcoóis</b>
	<b>Alcoólico</b>	<b>Acidez</b>	<b>Aldeído</b>	<b>Ésteres</b>	<b>Cobre</b>	<b>Seco</b>	<b>Superiores</b>
							<b>Totais</b>
<b>L1</b>	39,36 a <sub>7</sub>	13,17 a <sub>13</sub>	8,92 a <sub>8</sub>	14,89 a <sub>12</sub>	nd	0,23 a <sub>3</sub>	105,21 a <sub>14</sub>
<b>L2</b>	43,59 a <sub>3</sub>	15,67 a <sub>13</sub>	11,15 a <sub>6</sub>	15,78 a <sub>12</sub>	nd	0,39 a <sub>3</sub>	108,12 a <sub>14</sub>
<b>L3</b>	38,64 a <sub>8</sub>	12,54 a <sub>14</sub>	9,14 a <sub>8</sub>	15,31 a <sub>12</sub>	nd	1,35 a <sub>1</sub>	134,11 a <sub>10</sub>
<b>L4</b>	39,32 a <sub>7</sub>	12,34 a <sub>13</sub>	4,39 a <sub>11</sub>	12,17 a <sub>13</sub>	nd	1,35 a <sub>1</sub>	125,12 a <sub>11</sub>
<b>L5</b>	38,51 a <sub>8</sub>	15,83 a <sub>13</sub>	7,78 a <sub>9</sub>	12,72 a <sub>13</sub>	nd	0,25 a <sub>3</sub>	118,48 a <sub>12</sub>
<b>L6</b>	39,25 a <sub>7</sub>	12,16 a <sub>14</sub>	7,72 a <sub>6</sub>	15,22 a <sub>12</sub>	nd	0,32 a <sub>3</sub>	122,13 a <sub>11</sub>
<b>L7</b>	40,37 a <sub>6</sub>	18,21 a <sub>12</sub>	10,3 a <sub>7</sub>	14,61 a <sub>12</sub>	nd	0,28 a <sub>3</sub>	128,59 a <sub>10</sub>
<b>L8</b>	38,33 a <sub>8</sub>	20,3 a <sub>12</sub>	8,39 a <sub>9</sub>	22,6 a <sub>11</sub>	nd	0,19 a <sub>4</sub>	131,34 a <sub>10</sub>
<b>L9</b>	39,55 a <sub>7</sub>	14,42 a <sub>13</sub>	7,43 a <sub>9</sub>	20,22 a <sub>11</sub>	nd	0,88 a <sub>2</sub>	107,57 a <sub>14</sub>
<b>L10</b>	38,44 a <sub>8</sub>	20,22 a <sub>12</sub>	3,34 a <sub>12</sub>	18,38 a <sub>12</sub>	nd	0,57 a <sub>2</sub>	117,95 a <sub>12</sub>
<b>L11</b>	46,76 a <sub>2</sub>	18,32 a <sub>12</sub>	6,76 a <sub>10</sub>	19,51 a <sub>11</sub>	nd	0,46 a <sub>2</sub>	113,36 a <sub>13</sub>
<b>L12</b>	38,36 a <sub>8</sub>	15,25 a <sub>12</sub>	9,62 a <sub>8</sub>	16,86 a <sub>12</sub>	nd	0,68 a <sub>2</sub>	109,92 a <sub>14</sub>
<b>L13</b>	46,57 a <sub>2</sub>	15,28 a <sub>13</sub>	8,6 a <sub>8</sub>	22,61 a <sub>11</sub>	nd	1,05 a <sub>1</sub>	107,83 a <sub>14</sub>
<b>L14</b>	42,09 a <sub>4</sub>	14,28 a <sub>13</sub>	9,11 a <sub>8</sub>	15,14 a <sub>12</sub>	nd	0,56 a <sub>2</sub>	122,52 a <sub>11</sub>
<b>L15</b>	39,39 a <sub>7</sub>	12,2 a <sub>14</sub>	10,49 a <sub>7</sub>	40,3 a <sub>6</sub>	1,05 a <sub>5</sub>	0,19 a <sub>4</sub>	94,11 a <sub>15</sub>
<b>L16</b>	40,58 a <sub>6</sub>	56,15 a <sub>8</sub>	11,18 a <sub>6</sub>	14,26 a <sub>12</sub>	1,15 a <sub>5</sub>	0,06 a <sub>9</sub>	159,52 a <sub>7</sub>
<b>L17</b>	41,49 a <sub>5</sub>	47,05 a <sub>9</sub>	8,31 a <sub>9</sub>	20,37 a <sub>11</sub>	2,31 a <sub>4</sub>	0,08 a <sub>8</sub>	173,52 a <sub>5</sub>
<b>L18</b>	52,35 a <sub>1</sub>	22,61 a <sub>12</sub>	15,62 a <sub>4</sub>	27,77 a <sub>10</sub>	3,14 a <sub>3</sub>	0,02 a <sub>10</sub>	173,22 a <sub>5</sub>
<b>L19</b>	39,31 a <sub>7</sub>	27,01 a <sub>12</sub>	12,19 a <sub>6</sub>	105,52 a <sub>1</sub>	<b>7,45</b> a <sub>1</sub>	0,23 a <sub>3</sub>	122,37 a <sub>11</sub>
<b>L20</b>	<b>33,35</b> a <sub>10</sub>	<b>153,18</b> a <sub>2</sub>	16,09 a <sub>4</sub>	8,8 a <sub>14</sub>	1,26 a <sub>5</sub>	0,03 a <sub>10</sub>	215,08 a <sub>2</sub>
<b>L21</b>	<b>32,21</b> a <sub>10</sub>	104,6 a <sub>5</sub>	3,29 a <sub>12</sub>	33,73 a <sub>9</sub>	2,62 a <sub>4</sub>	0,14 a <sub>6</sub>	99,83 a <sub>15</sub>
<b>L22</b>	40,38 a <sub>6</sub>	40,16 a <sub>10</sub>	14,67 a <sub>5</sub>	16,38 a <sub>12</sub>	0,41 a <sub>6</sub>	0,09 a <sub>8</sub>	195,78 a <sub>3</sub>
<b>L23</b>	44,76 a <sub>2</sub>	16,64 a <sub>13</sub>	18,38 a <sub>3</sub>	11,47 a <sub>13</sub>	nd	0,02 a <sub>10</sub>	149,46 a <sub>9</sub>
<b>L24</b>	39,25 a <sub>7</sub>	35,87 a <sub>11</sub>	20,53 a <sub>2</sub>	22,62 a <sub>11</sub>	3,36 a <sub>3</sub>	0,09 a <sub>8</sub>	160,92 a <sub>7</sub>

Tabela 5 Análises físico-químicas de aguardente de cana/cachaças industriais e de alambique (Continuação...)

	<b>Grau Alcoólico</b>	<b>Acidez</b>	<b>Aldeído</b>	<b>Ésteres</b>	<b>Cobre</b>	<b>Extrato Seco</b>	<b>Alcoóis Superiores Totais</b>
<b>L25</b>	42,84 a <sub>4</sub>	48,09 a <sub>9</sub>	<b>33,99</b> a <sub>1</sub>	22,22 a <sub>11</sub>	3,27 a <sub>3</sub>	0,08 a <sub>8</sub>	237,98 a <sub>1</sub>
<b>L26</b>	42,61 a <sub>4</sub>	45,39 a <sub>9</sub>	<b>34,34</b> a <sub>1</sub>	36,60 a <sub>8</sub>	1,42 a <sub>5</sub>	0,17 a <sub>5</sub>	160,91 a <sub>7</sub>
<b>L27</b>	51,24 a <sub>1</sub>	51,53 a <sub>8</sub>	12,32 a <sub>6</sub>	44,09 a <sub>6</sub>	nd	0,09 a <sub>8</sub>	173,96 a <sub>5</sub>
<b>L28</b>	41,51 a <sub>5</sub>	128,56 a <sub>4</sub>	18,55 a <sub>3</sub>	36,47 a <sub>8</sub>	1,28 a <sub>5</sub>	0,16 a <sub>5</sub>	209,36 a <sub>3</sub>
<b>L29</b>	52,23 a <sub>1</sub>	51,52 a <sub>8</sub>	12,44 a <sub>6</sub>	72,01 a <sub>4</sub>	4,23 a <sub>2</sub>	0,09 a <sub>8</sub>	172,97 a <sub>5</sub>
<b>L30</b>	48,97 a <sub>2</sub>	89,88 a <sub>6</sub>	22,68 a <sub>2</sub>	44,41 a <sub>6</sub>	2,07 a <sub>4</sub>	0,79 a <sub>2</sub>	166,92 a <sub>6</sub>
<b>L31</b>	39,43 a <sub>7</sub>	88,44 a <sub>6</sub>	14,27 a <sub>5</sub>	99,15 a <sub>2</sub>	1,75 a <sub>5</sub>	0,23 a <sub>3</sub>	181,17 a <sub>4</sub>
<b>L32</b>	<b>36,61</b> a <sub>9</sub>	<b>157,64</b> a <sub>2</sub>	7,55 a <sub>9</sub>	34,36 a <sub>9</sub>	3,71 a <sub>3</sub>	0,23 a <sub>3</sub>	171,46 a <sub>5</sub>
<b>L33</b>	42,49 a <sub>4</sub>	122,07 a <sub>4</sub>	12,47 a <sub>6</sub>	33,02 a <sub>9</sub>	2,57 a <sub>4</sub>	0,03 a <sub>10</sub>	193,03 a <sub>3</sub>
<b>L34</b>	44,55 a <sub>2</sub>	30,63 a <sub>11</sub>	18,7 a <sub>3</sub>	24,57 a <sub>10</sub>	0,55 a <sub>6</sub>	0,33 a <sub>3</sub>	122,84 a <sub>11</sub>
<b>L35</b>	39,23 a <sub>7</sub>	139,33 a <sub>3</sub>	10,33 a <sub>7</sub>	57,22 a <sub>5</sub>	<b>7,54</b> a <sub>1</sub>	0,14 a <sub>6</sub>	172,67 a <sub>5</sub>
<b>L36</b>	46,25 a <sub>2</sub>	80,61 a <sub>6</sub>	15,11 a <sub>4</sub>	89,48 a <sub>3</sub>	4,28 a <sub>2</sub>	0,16 a <sub>5</sub>	217,97 a <sub>2</sub>
<b>L37</b>	40,84 a <sub>6</sub>	<b>203,88</b> a <sub>1</sub>	7,66 a <sub>9</sub>	99,28 a <sub>2</sub>	1,71 a <sub>5</sub>	0,29 a <sub>3</sub>	242,26 a <sub>1</sub>
<b>L38</b>	<b>36,63</b> a <sub>9</sub>	<b>156,89</b> a <sub>2</sub>	8,13 a <sub>9</sub>	60,88 a <sub>5</sub>	2,53 a <sub>4</sub>	0,34 a <sub>3</sub>	169,15 a <sub>6</sub>
<b>L39</b>	39,67 a <sub>7</sub>	81,49 a <sub>6</sub>	15,71 a <sub>4</sub>	54,57 a <sub>5</sub>	0,77 a <sub>6</sub>	0,13 a <sub>7</sub>	177,69 a <sub>5</sub>
<b>L40</b>	42,17 a <sub>4</sub>	62,99 a <sub>7</sub>	15,08 a <sub>4</sub>	61,60 a <sub>5</sub>	3,51 a <sub>3</sub>	0,15 a <sub>5</sub>	156,57 a <sub>8</sub>
<b>L41</b>	40,55 a <sub>6</sub>	124,93 a <sub>4</sub>	6,33 a <sub>10</sub>	75,08 a <sub>4</sub>	1,33 a <sub>5</sub>	0,88 a <sub>2</sub>	167,89 a <sub>6</sub>
<b>L42</b>	43,49 a <sub>3</sub>	96,46 a <sub>6</sub>	24,6 a <sub>2</sub>	86,35 a <sub>3</sub>	4,34 a <sub>2</sub>	0,04 a <sub>10</sub>	164,58 a <sub>6</sub>
<b>L43</b>	42,62 a <sub>4</sub>	66,05 a <sub>7</sub>	8,2 a <sub>9</sub>	41,91 a <sub>7</sub>	2,42 a <sub>4</sub>	0,01 a <sub>10</sub>	168,93 a <sub>6</sub>
<b>L44</b>	<b>36,48</b> a <sub>9</sub>	33,28 a <sub>11</sub>	14,81 a <sub>5</sub>	56,76 a <sub>5</sub>	4,11 a <sub>2</sub>	0,12 a <sub>7</sub>	167,04 a <sub>6</sub>

Médias seguidas do mesmo número na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade % v/v; <sup>2</sup> mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro; <sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>; <sup>4</sup> g L<sup>-1</sup>; ND = não detectado; \*\* Brasil, 2005.

#### 4.1 Resultados das análises físico-químicas

Pode-se observar que 25 % das amostras analisadas estão fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira. Valores inferiores ao estabelecido para a graduação alcoólica foram observado para as amostras (L20, L21, L32,

L38 e L44), Observam-se também valores superiores de acidez volátil (L20, L32 L37 e L38), de aldeídos (L25 e L26) e de cobre (L19 e L35).

Baseando nos resultados apresentados, verifica-se que, as cachaças produzidas em alambiques apresentam-se fora dos padrões exigidos pela legislação. Vários fatores podem ter influenciado como cortes inadequados, °Brix, fermentação inadequada durante a produção da bebida. A graduação alcoólica obtida para as amostras variou de 52,23% (v/v) a 32,21% (v/v). Observa-se que cinco amostras encontram-se com o teor alcoólico fora dos padrões para cachaças; L20 com (33,35°GL), L21 (32,21°GL), L32 (36,61°GL), L38 (36,63 °GL), e L44 (36,48 °GL). O grau alcoólico é considerado como um dos parâmetros de grande importância, pois é por meio dele que se caracteriza o produto. Segundo Miranda et al., (2007), uma das causas para o baixo teor alcoólico pode ser resultado de possíveis erros e imprecisões nos equipamentos utilizados pelos produtores na determinação do teor alcoólico e possíveis erros na execução da destilação ou na diluição que afetam diretamente a quantidade desse componente na cachaça. Perdas ao longo do processo de envelhecimento, também podem ocorrer devido o armazenamento da bebida em barris de madeira e das condições ambientais ou pelo próprio consumo do etanol nas reações de esterificação com ácidos durante o armazenamento (CARDOSO, 2013; MIRANDA et al., 2008). As perdas ao longo do processo de envelhecimento podem ser amenizadas pelo armazenamento da bebida à baixa temperatura e umidade mais elevada.

Observa-se que as cachaças que apresentaram uma graduação alcoólica abaixo dos limites exigidos são envelhecidas. Parazzi et al., (2008), observaram que o teor alcoólico variou ao longo de um período de dois anos para cachaças armazenadas em madeira e vidro. Zacaroni et al., (2011) relataram que para as cachaças armazenadas em toneis, em média, ocorre uma diminuição na

gradação alcoólica em função das condições do armazenamento, que está relacionado à umidade, temperatura e porosidade do barril. Outro ponto a resaltar é que durante o envelhecimento ocorre uma redução na gradação alcoólica devido a reações de esterificação e oxidação durante o processo, contribuindo também para a melhoria da qualidade sensorial do produto. 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

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. Pelos resultados descritos na Tabela 5, observa-se que os maiores teores de acidez volátil encontram-se nas cachaças de alambique com o seus respectivos valores L20 (153,18), L32 (157,64), L37 (203,88) e L38 (156,89 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro).

Serafim et al., (2012) estudando cachaças de coluna observaram que todas as amostras analisadas apresentaram concentrações inferiores quanto à acidez total, em relação as cachaças de alambique, sendo que estes dados corroboram com os dados encontrados neste estudo, porém os autores afirmam que os cortes corretos realizados nas cachaças de alambique entre as frações de “coração” e “cauda” reduzem pela metade a acidez total da fração “coração”.

Pereira et al., (2003), trabalhando com 45 amostras de cachaças provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais, encontraram um valor médio para acidez volátil de 77,79 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro, sendo que apenas 3 amostras apresentavam valores fora dos padrões exigidos pela legislação vigente. Segundo Cardoso (2013) e Vilela et al., (2007), a elevada acidez volátil pode estar relacionada com diversos fatores, como o

adequado controle do tempo e a temperatura de fermentação, manejo do mosto e higienização adequada são fatores que quando controlados podem minimizar altos valores de acidez.

A acidez da cachaça depende principalmente do controle do processo de fermentação, em relação a fatores como estirpe da levedura predominante no pé-de-cuba, pureza da fermentação, tempo e temperatura da fermentação, manejo do mosto e da cana colhida. A aeração do mosto deve ser evitada, pois o aumento do oxigênio no meio induz o metabolismo celular oxidativo, em que a levedura oxida os carboidratos por respiração podendo ocorrer a multiplicação celular e ácido acético como produto de reação em lugar do etanol, diminuindo o rendimento da bebida e causando conseqüente aumento da acidez. (SCHWAN, DIAS, DIAS, 2013).

Silva et al., (2009) estudando compostos de cachaças produzidas por diferentes leveduras isoladas de alambiques de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, onde a produção dessas cachaças, segundo os autores, são totalmente com características artesanais, e o tipo de fermentação é espontâneo, observaram diferenças significativas em relação aos teores de ácido acético, demonstrando a influência de diferentes linhagens de levedura durante o processo de fermentação. Duarte et al., (2011) estudando a qualidade da cachaça de alambique, avaliaram o efeito da contaminação do mosto ocasionado por *Lactobacillus fermentum* Eles encontraram valores de acidez volátil para a fração coração de 193,33 mg 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro, os autores observaram um aumento na concentração de ácido acético que é o responsável por grande parte da acidez volátil.

A acidez elevada pode influenciar negativamente o paladar do consumidor, desestimulando-o de continuar degustando a cachaça. Odello et al., (2009) realizaram uma avaliação sensorial e hedônica (em que o

provador/consumidor avalia o quanto gostou ou desgostou de um produto) em 36 amostras de cachaças comerciais não adoçadas e constataram uma correlação negativa com a acidez.

As amostras L20 e L32 são cachaças envelhecidas, podendo ocorrer também uma aumento significativo da acidez para essas amostras armazenadas em toneis de madeira, pois alguns compostos oriundos da madeira, tais como ácidos orgânicos não voláteis e outros metabólitos 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 (ALCARDE, SOUZA, BELLUCO, 2010).

Pelos dados descritos na Tabela 5, observa-se que duas cachaças de alambique excederam o limite de aldeídos permitido pela legislação, estando acima de 30 mg/100 mL de álcool anidro. As amostras L25 e L26 apresentaram valores elevados de aldeídos (33,99 e 34,34, respectivamente).

Os aldeídos têm sua origem na ação das leveduras durante estágios preliminares do processo da fermentação, principalmente o acetaldeído, que tende a desaparecer com o tempo, pela oxidação a ácido acético; por outro lado, vários aldeídos podem também ser formados de aminoácidos presentes no caldo de cana.

Serafim et al. (2012) relatam que os aldeídos são compostos responsáveis pela definição e conseqüente separação do grupo de compostos referentes à fração de cabeça, pois esses compostos apresentam maior solubilidade em etanol. Logo, valores elevados de aldeídos observados em cachaças podem estar associados a erros no processo do corte entre as frações de cabeça e coração. Erros no processo de corte ocorrem quando o produtor não

calcula previamente a graduação alcoólica da bebida desejada e/ou não calcula o volume de mosto fermentado correspondente e/ou não acompanha a mudança do grau alcoólico do destilado que está saindo do alambique.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5 nota-se que a amostra L19, proveniente de alambique apresentou um valor maior para o cobre do que aquele estipulado pela legislação que é de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ , em relação ao teor de cobre. Na cachaça, a presença desse metal deve-se principalmente à dissolução do carbonato básico de cobre  $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3]$  presente nas paredes internas do alambique, que é arrastado pelos vapores alcoólicos ácidos durante a destilação. Fazer a higienização adequada para remoção do azinhavre, bem como encher o alambique e as serpentinas com água para reduzir a oxidação do cobre, são medidas que reduzem consideravelmente a possibilidade de contaminação da cachaça por cobre (CARDOSO, 2013). O uso de filtros de resinas de troca iônica é uma boa alternativa para remover o cobre da bebida contaminada, sem, contudo, remover componentes secundários responsáveis pela qualidade sensorial do aperitivo (DUARTE et al., 2013).

Para comparar os resultados das avaliações físico-químicas das cachaças, aplicou-se a Análises das Componentes Principais (ACP). Na Figura 13 representa-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, em que se relacionam os parâmetros físico-químicos das 44 amostras em estudo.

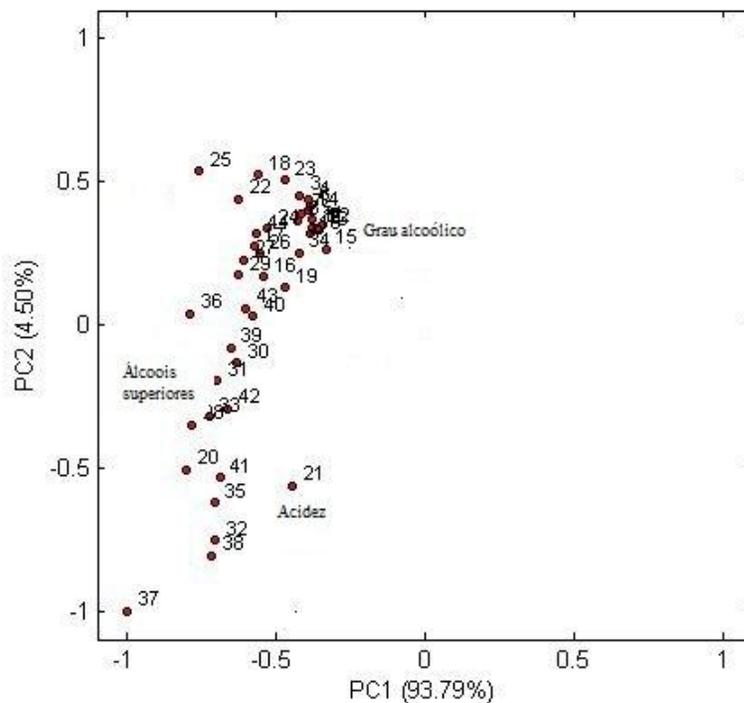


Figura 13 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das industriais e de alambique quanto aos seus parâmetros físico-químicos.

Pelos dados apresentados na ACP observa-se que, com a primeira a segunda componente principal, foi possível descrever 99,6% dos dados, sendo 93,79% da variância total descrita pela primeira componente principal. Analisando-se a Figura 13, pode-se constatar que as cachaças de alambique diferiram das cachaças de coluna nos parâmetros álcoois superiores e acidez volátil, respectivamente, pois estes parâmetros apresentaram maior similaridade para todas as amostras analisados. Esses resultados corroboram a análise de

variância aplicada anteriormente (Tabela 5), pois tais parâmetros apresentaram valores superiores, quando comparados com as demais amostras.

#### 4.2 Álcoois superiores

Os dados encontrados para os álcoois superiores separadamente estão descritos na Tabela 6, observa-se que os valores dos álcoois superiores, Propan-1-ol (álcool propílico), 3-metilbutan-1-ol (álcool isoamílico), 2-metilpropan-1-ol (álcool isobutílico), Butan-1-ol (álcool butílico) e metanol (álcool metílico), encontram-se dentro dos padrões para todas as amostras, apenas nas amostras (L21 e L40) os valores obtidos para Butan-2- (álcool sec-butílico) excederam o limite permitido pela legislação.

Tabela 6 Concentrações dos álcoois superiores, álcool propílico, álcool isoamílico, álcool isobutílico, álcool butílico, álcool sec-butílico e álcool metílico nas amostras de cachaças de alambique e cachaças industriais.

	<b>Álcool Propílico</b>	<b>Álcool Isoamílico</b>	<b>Álcool Isobutílico</b>	<b>Álcool sec-butílico</b>	<b>Álcool butílico</b>	<b>Álcool metílico</b>
<b>L1</b>	22,92 a <sub>15</sub>	30,21 a <sub>12</sub>	50,24 a <sub>16</sub>	nd	0,05 a <sub>9</sub>	1,39 a <sub>4</sub>
<b>L2</b>	30,28 a <sub>11</sub>	32,12 a <sub>11</sub>	56,46 a <sub>14</sub>	nd	0,07 a <sub>9</sub>	0,37 a <sub>7</sub>
<b>L3</b>	32,41 a <sub>11</sub>	36,86 a <sub>9</sub>	60,67 a <sub>12</sub>	0,12 a <sub>10</sub>	0,04 a <sub>9</sub>	3,25 a <sub>2</sub>
<b>L4</b>	20,51 a <sub>15</sub>	40,17 a <sub>6</sub>	61,12 a <sub>11</sub>	0,39 a <sub>11</sub>	1,05 a <sub>8</sub>	2,52 a <sub>3</sub>
<b>L5</b>	18,09 a <sub>17</sub>	35,49 a <sub>10</sub>	62,55 a <sub>11</sub>	0,63 a <sub>8</sub>	1,23 a <sub>5</sub>	1,28 a <sub>4</sub>
<b>L6</b>	31,45 a <sub>11</sub>	34,49 a <sub>10</sub>	53,16 a <sub>15</sub>	nd	1,48 a <sub>4</sub>	1,68 a <sub>4</sub>
<b>L7</b>	24,26 a <sub>14</sub>	45,33 a <sub>5</sub>	56,52 a <sub>14</sub>	nd	1,14 a <sub>7</sub>	2,17 a <sub>3</sub>
<b>L8</b>	28,24 a <sub>12</sub>	37,15 a <sub>8</sub>	63,13 a <sub>11</sub>	nd	1,22 a <sub>5</sub>	1,26 a <sub>4</sub>
<b>L9</b>	17,28 a <sub>17</sub>	29,38 a <sub>12</sub>	59,15 a <sub>12</sub>	0,12 a <sub>10</sub>	1,01 a <sub>8</sub>	0,92 a <sub>5</sub>
<b>L10</b>	28,88 a <sub>12</sub>	34,17 a <sub>10</sub>	52,25 a <sub>15</sub>	0,25 a <sub>9</sub>	1,59 a <sub>4</sub>	0,34 a <sub>7</sub>
<b>L11</b>	21,21 a <sub>15</sub>	31,27 a <sub>11</sub>	58,21 a <sub>13</sub>	nd	1,49 a <sub>4</sub>	0,87 a <sub>5</sub>
<b>L12</b>	13,47 a <sub>18</sub>	34,22 a <sub>10</sub>	56,45 a <sub>14</sub>	nd	1,02 a <sub>8</sub>	0,86 a <sub>5</sub>

Tabela 6 Concentrações dos álcoois superiores, álcool propílico, álcool isoamílico, álcool isobutílico, álcool butílico, álcool sec-butílico e álcool metílico nas amostras de cachaças de alambique e cachaças industriais (Continuação...)

	Álcool Propílico	Álcool Isoamílico	Álcool Isobutílico	Álcool sec-butílico	Álcool butílico	Álcool metílico
L13	24,13 a <sub>14</sub>	29,28 a <sub>12</sub>	53,09 a <sub>15</sub>	nd	1,08 a <sub>8</sub>	0,31 a <sub>7</sub>
L14	26,31 a <sub>13</sub>	34,69 a <sub>10</sub>	60,05 a <sub>12</sub>	0,07 a <sub>8</sub>	1,43 a <sub>4</sub>	1,19 a <sub>4</sub>
L15	21,33 a <sub>15</sub>	22,28 a <sub>15</sub>	50,25 a <sub>16</sub>	nd	1,42 a <sub>4</sub>	3,83 a <sub>2</sub>
L16	54,19 a <sub>5</sub>	29,10 a <sub>12</sub>	76,63 a <sub>8</sub>	nd	1,24 a <sub>5</sub>	nd
L17	41,01 a <sub>8</sub>	45,39 a <sub>5</sub>	86,77 a <sub>6</sub>	0,71 a <sub>8</sub>	1,16 a <sub>7</sub>	0,87 a <sub>5</sub>
L18	55,55 a <sub>5</sub>	29,15 a <sub>12</sub>	88,25 a <sub>5</sub>	nd	1,40 a <sub>4</sub>	nd
L19	35,67 a <sub>10</sub>	23,67 a <sub>14</sub>	62,64 a <sub>11</sub>	nd	2,15 a <sub>3</sub>	nd
L20	89,44 a <sub>3</sub>	21,5 a <sub>16</sub>	55,26 a <sub>14</sub>	1,33 a <sub>7</sub>	2,42 a <sub>3</sub>	4,26 a <sub>1</sub>
L21	65,63 a <sub>5</sub>	19,4 a <sub>17</sub>	14,33 a <sub>17</sub>	2,75 a <sub>6</sub>	<b>3,34</b> a <sub>2</sub>	1,23 a <sub>4</sub>
L22	69,46 a <sub>5</sub>	41,21 a <sub>6</sub>	85,32 a <sub>6</sub>	4,19 a <sub>4</sub>	1,73 a <sub>4</sub>	nd
L23	39,52 a <sub>9</sub>	35,65 a <sub>10</sub>	73,66 a <sub>9</sub>	nd	1,16 a <sub>7</sub>	1,43 a <sub>4</sub>
L24	39,98 a <sub>9</sub>	41,54 a <sub>6</sub>	79,25 a <sub>7</sub>	nd	1,51 a <sub>4</sub>	nd
L25	112,3 a <sub>1</sub>	40,49 a <sub>6</sub>	84,51 a <sub>6</sub>	7,87 a <sub>1</sub>	1,03 a <sub>8</sub>	nd
L26	39,48 a <sub>9</sub>	41,74 a <sub>6</sub>	79,31 a <sub>7</sub>	nd	1,50 a <sub>4</sub>	nd
L27	18,22 a <sub>17</sub>	49,41 a <sub>4</sub>	106,9 a <sub>2</sub>	nd	1,01 a <sub>8</sub>	nd
L28	53,35 a <sub>5</sub>	58,58 a <sub>2</sub>	101,15 a <sub>3</sub>	nd	1,14 a <sub>7</sub>	nd
L29	19,59 a <sub>16</sub>	54,43 a <sub>3</sub>	98,35 a <sub>3</sub>	nd	1,81 a <sub>4</sub>	nd
L30	63,49 a <sub>5</sub>	29,29 a <sub>12</sub>	68,55 a <sub>10</sub>	5,54 a <sub>3</sub>	1,05 a <sub>8</sub>	nd
L31	43,27 a <sub>7</sub>	39,73 a <sub>7</sub>	99,11 a <sub>3</sub>	nd	1,06 a <sub>8</sub>	nd
L32	23,26 a <sub>14</sub>	48,32 a <sub>4</sub>	99,09 a <sub>3</sub>	nd	1,76 a <sub>4</sub>	nd
L33	46,47 a <sub>6</sub>	45,58 a <sub>5</sub>	100,39 a <sub>3</sub>	nd	1,35 a <sub>4</sub>	nd
L34	40,51 a <sub>8</sub>	25,85 a <sub>13</sub>	55,72 a <sub>14</sub>	nd	0,88 a <sub>8</sub>	nd
L35	19,59 a <sub>16</sub>	54,33 a <sub>3</sub>	98,35 a <sub>3</sub>	nd	1,18 a <sub>7</sub>	nd
L36	63,37 a <sub>5</sub>	57,71 a <sub>2</sub>	92,24 a <sub>4</sub>	1,65 a <sub>7</sub>	2,24 a <sub>3</sub>	nd
L37	53,68 a <sub>5</sub>	67,37 a <sub>1</sub>	120,07 a <sub>1</sub>	3,91 a <sub>5</sub>	1,74 a <sub>4</sub>	nd
L38	23,04 a <sub>14</sub>	49,09 a <sub>4</sub>	97,32 a <sub>3</sub>	nd	1,69 a <sub>4</sub>	nd
L39	95,48 a <sub>2</sub>	27,95 a <sub>13</sub>	53,45 a <sub>15</sub>	6,73 a <sub>2</sub>	1,86 a <sub>4</sub>	0,63 a <sub>6</sub>

Tabela 6 Concentrações dos álcoois superiores, álcool propílico, álcool isoamílico, álcool isobutílico, álcool butílico, álcool sec-butílico e álcool metílico nas amostras de cachaças de alambique e cachaças industriais (Continuação...)

	Álcool Propílico	Álcool Isoamílico	Álcool Isobutílico	Álcool sec-butílico	Álcool butílico	Álcool metílico
<b>L40</b>	73,29 a <sub>4</sub>	19,29 a <sub>17</sub>	63,49 a <sub>11</sub>	3,32 a <sub>5</sub>	<b>4,67</b> a <sub>1</sub>	2,42 a <sub>3</sub>
<b>L41</b>	56,48 a <sub>5</sub>	29,56 a <sub>12</sub>	81,14 a <sub>7</sub>	1,69 a <sub>7</sub>	2,64 a <sub>3</sub>	3,24 a <sub>2</sub>
<b>L42</b>	57,61 a <sub>5</sub>	28,19 a <sub>12</sub>	79,46 a <sub>7</sub>	1,31 a <sub>7</sub>	1,04 a <sub>8</sub>	nd
<b>L43</b>	60,65 a <sub>5</sub>	29,38 a <sub>12</sub>	79,13 a <sub>7</sub>	1,23 a <sub>7</sub>	1,05 a <sub>8</sub>	nd
<b>L44</b>	60,06 a <sub>4</sub>	29,04 a <sub>12</sub>	75,41 a <sub>8</sub>	1,53 a <sub>7</sub>	1,08 a <sub>8</sub>	nd

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade % v/v; <sup>2</sup> mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro; <sup>3</sup> mg L<sup>-1</sup>; <sup>4</sup> g L<sup>-1</sup>; ND = não detectado; \*\* Brasil, 2005

Cardoso (2013), ressaltaram que os álcoois isoamílico, amílico, isobutílico e propílico são os principais álcoois superiores encontrados nas cachaças. Ao analisar separadamente, nota-se que as amostras L21 e L40 apresentaram valores superiores ao permitido pela legislação para o álcool butílico (3 mg/100 mL de álcool anidro).

Pesquisas de Penteadó e Masini (2009) identificaram e quantificaram, o álcool butílico e o álcool sec-butílico em concentrações acima daquelas estabelecidas pela legislação em 33 amostras de aguardentes de alambique e industrial, produzidas em quatro estados do Brasil. Eles observaram grande heterogeneidade nas características físico-químicas e sensoriais; nas amostras de aguardentes de alambiques dos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais (região de Salinas). As concentrações de álcool sec-butílico estiveram dentro da faixa de valores permitidos pela legislação; uma amostra de Belo Horizonte apresentou concentração elevada de 408 mg/100 mL de álcool anidro; três amostras de aguardentes industriais também estavam com concentrações acima da legislação, 110, 111 e 115 mg/100 mL de álcool anidro. Dados que não

corroboram com esses encontrados neste estudo, sendo que as amostras em relação ao álcool sec-butílico que excederam o limite permitido pela legislação, são oriundas de cachaça de alambique. Nas cachaças colunas nenhuma amostra excedeu o limite para todos os álcoois superiores.

Fernandes (2013) estudou cinco variedades de cana para a produção de cachaça colhidas em três épocas distintas (segunda quinzena dos meses de junho e agosto e primeira quinzena do mês de outubro), observou que suas amostras não ultrapassaram o limite permitido pela legislação do álcool butílico e não detectou nelas presença do álcool sec-butílico, demonstrando que a formação dos álcoois superiores não foi influenciada pelas variedades de cana. A formação de álcoois superiores em excesso pode ser evitada com algumas medidas, como não utilizar a cana bisada e nem armazenar a cana por longo período após o corte, evitando a degradação de aminoácidos e a posterior formação dos álcoois superiores (CARDOSO, 2013)

A cana bisada é a cana que ficou de uma safra para outra, porém devido a este fato pode ocorrer à perda de qualidade, já que os canaviais estavam em um ponto de maturação e voltaram a se desenvolver. Os fatores que contribuem para a má qualidade da cana bisada são o tombamento, enraizamento, brotação lateral, maior infestação de pragas e doenças, colmos secos ou mortos, além do aumento de impurezas (ROSSINI, 2010).

Souza et al., (2009), estudando amostras de cachaças da Cooperativa de Produtores do Norte do Fluminense observaram que três amostras apresentaram teores superiores dos álcoois, butílico e sec-butílico sendo considerados contaminantes de cachaça. Um dos principais fatores para a formação de álcool butílico em cachaças é a contaminação por bactérias acetobutílicas durante o processo de fermentação. Esta contaminação pode ser

reduzida não deixando a cana-de-açúcar próxima a estábulos e locais de ordenha.

Para comparar os resultados da avaliação dos álcoois superiores (Tabela 6), aplicou-se a ACP. Na Figura 14 representa-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, em que se relacionam os álcoois superiores, propílico, isoamílico, isobutílico, butílico, sec-butílico e metílico das 44 amostras em estudo.

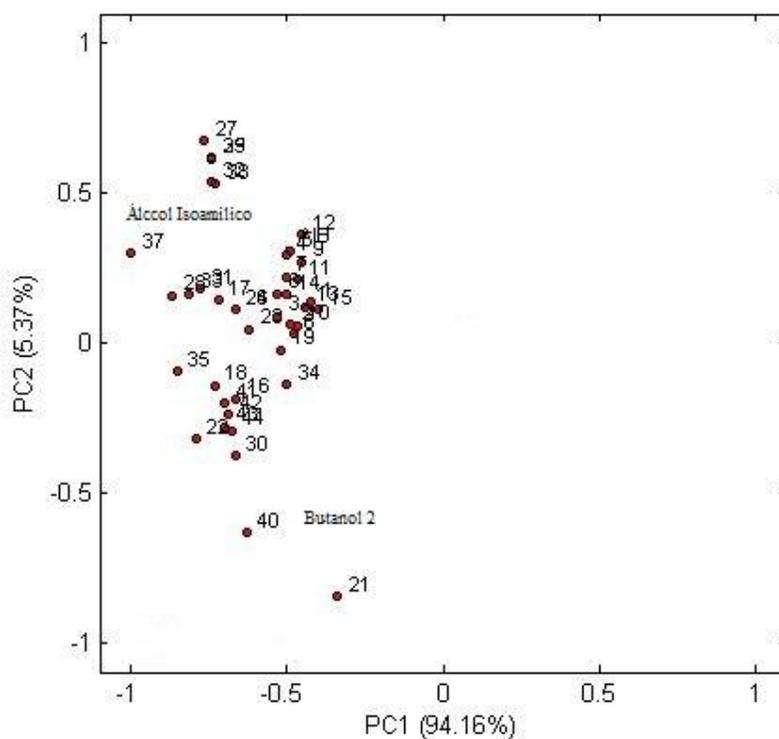


Figura 14 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das industriais e de alambique quanto aos álcoois superiores e metanol.

Pelos dados apresentados na ACP, com a primeira e a segunda componente principal, descreveu-se 92,7% dos dados, sendo 94,16% da variância total descrita pela primeira componente principal. Observando-se a Figura 14, pode constatar que em relação aos álcoois superiores, (álcool isoamílico, álcool isobutílico, butílico e metílico) as cachaças de alambique e as cachaças industriais apresentaram um agrupamento similar para todas as amostras analisadas, porém algumas amostras diferiram em relação aos álcoois isoamílico e o sec-butílico em relação as outras variáveis. Esses resultados corroboram com a análise de variância aplicada anteriormente (Tabela 6), pois tais parâmetros apresentaram valores superiores, quando comparados com as demais amostras.

#### 4.3 Análises cromatográficas dos contaminantes em aguardentes de alambique e industriais: carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural

As concentrações dos comtaminates carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e HMF e a somatória do furfural e HMF obtidas nas amostras de cachaças analisadas, estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 Análise cromatográfica dos contaminantes em aguardentes: carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-Hidroximetilfurfural

	<b>Carbamato de Etila</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>2,3-butanodiona</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>Furfural</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>5-HMF</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>FU+HMF</b>
<b>L1</b>	133,73 a <sub>2</sub>	0,66 a <sub>1</sub>	,39 a <sub>1</sub>	3,24 a <sub>2</sub>	<b>5,63</b> a <sub>2</sub>
<b>L2</b>	120,77 a <sub>3</sub>	0,24 a <sub>2</sub>	,98 a <sub>2</sub>	6,02 a <sub>1</sub>	<b>7,00</b> a <sub>1</sub>
<b>L3</b>	131,33 a <sub>2</sub>	0,21 a <sub>2</sub>	,85 a <sub>2</sub>	2,76 a <sub>2</sub>	3,61 a <sub>4</sub>
<b>L4</b>	150,34 a <sub>2</sub>	0,12 a <sub>2</sub>	,39 a <sub>3</sub>	2,33 a <sub>2</sub>	2,72 a <sub>5</sub>
<b>L5</b>	189,48 a <sub>1</sub>	0,18 a <sub>2</sub>	,92 a <sub>2</sub>	1,32 a <sub>3</sub>	2,24 a <sub>5</sub>

Tabela 7 Análise cromatográfica dos contaminantes em aguardentes: carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-Hidroximetilfurfural. (Continuação...)

	Carbamato de Etila $\mu\text{g.L}^{-1}$	2,3- butanodiona $\mu\text{g.L}^{-1}$	Furfural $\mu\text{g.L}^{-1}$	5-HMF $\mu\text{g.L}^{-1}$	FU+HMF
L6	145,41 a <sub>2</sub>	0,53 a <sub>1</sub>	LQ	7,23 a <sub>1</sub>	7,23 a <sub>1</sub>
L7	143,93 a <sub>2</sub>	0,16 a <sub>2</sub>	,35 a <sub>1</sub>	2,34 a <sub>2</sub>	4,70 a <sub>3</sub>
L8	<b>245,31</b> a <sub>2</sub>	0,60 a <sub>1</sub>	,57 a <sub>1</sub>	0,93 a <sub>4</sub>	<b>5,68</b> a <sub>2</sub>
L9	141,52 a <sub>2</sub>	0,31 a <sub>2</sub>	,52 a	0,70 a <sub>5</sub>	1,22 a <sub>6</sub>
L10	<LQ	<LQ	,32 a <sub>3</sub>	1,22 a <sub>3</sub>	1,54 a <sub>6</sub>
L11	<b>235,53</b> a <sub>1</sub>	0,14 a <sub>2</sub>	,25 a <sub>4</sub>	2,12 a <sub>2</sub>	2,37 a <sub>5</sub>
L12	189,78 a <sub>1</sub>	0,31 a <sub>2</sub>	LQ	0,58 a <sub>6</sub>	0,58
L13	89,13 a <sub>4</sub>	0,14 a <sub>2</sub>	,46 a <sub>1</sub>	1,08a <sub>3</sub>	2,54 a <sub>5</sub>
L14	131,51 a <sub>2</sub>	0,41 a <sub>1</sub>	,93 a <sub>2</sub>	0,94 a <sub>4</sub>	1,83 a <sub>6</sub>
L15	144,20 a <sub>2</sub>	0,16 a <sub>2</sub>	LQ	<LQ	<LQ
L16	76,21 a <sub>4</sub>	<LQ	LQ	<LQ	<LQ
L17	31,22 a <sub>6</sub>	0,19 a <sub>2</sub>	,42 a <sub>8</sub>	<LQ	0,42
L18	46,19 a <sub>5</sub>	<LQ	,02 a <sub>9</sub>	0,03 a <sub>10</sub>	0,05
L19	22,78 a <sub>7</sub>	0,15 a <sub>2</sub>	,64 a <sub>2</sub>	<LQ	0,64 a <sub>8</sub>
L20	32,83 a <sub>6</sub>	<LQ	,44 a <sub>3</sub>	0,04 a <sub>9</sub>	0,48 a <sub>9</sub>
L21	27,79 a <sub>7</sub>	<LQ	,67 a <sub>2</sub>	0,53 a <sub>6</sub>	1,20 a <sub>6</sub>
L22	22,72 a <sub>7</sub>	<LQ	LQ	<LQ	<LQ
L23	<LQ	<LQ	,11 a <sub>5</sub>	<LQ	0,11 a <sub>13</sub>
L24	45,14 a <sub>5</sub>	<LQ	,02 a <sub>9</sub>	<LQ	0,02 a <sub>18</sub>
L25	22,13 a <sub>7</sub>	<LQ	,07 a <sub>6</sub>	<LQ	0,07 a <sub>15</sub>
L26	14,01 a <sub>2</sub>	<LQ	,07 a <sub>6</sub>	0,08 a <sub>7</sub>	0,15 a <sub>13</sub>
L27	12,67 a <sub>2</sub>	<LQ	,24 a <sub>4</sub>	<LQ	0,24 a <sub>12</sub>
L28	18,78 a <sub>8</sub>	<LQ	,24 a <sub>1</sub>	0,07 a <sub>8</sub>	1,28 a <sub>6</sub>
L29	31,79 a <sub>6</sub>	<LQ	LQ	<LQ	<LQ
L30	<LQ	0,24 a <sub>2</sub>	LQ	<LQ	<LQ
L31	46,29 a <sub>5</sub>	<LQ	,04 a <sub>8</sub>	<LQ	0,04 a <sub>17</sub>
L32	32,06 a <sub>6</sub>	<LQ	,03 a <sub>9</sub>	0,32	0,35 a <sub>10</sub>
L33	<LQ	<LQ	,83 a <sub>2</sub>	<LQ	0,83 a <sub>7</sub>
L34	12,34 a <sub>2</sub>	<LQ	,02 a <sub>9</sub>	<LQ	0,02 a <sub>18</sub>
L35	34,27 a <sub>6</sub>	<LQ	,04 a <sub>8</sub>	<LQ	0,04 a <sub>17</sub>
L36	<LQ	<LQ	,05 a <sub>7</sub>	0,63 a <sub>5</sub>	0,68 a <sub>8</sub>

Tabela 7 Análise cromatográfica dos contaminantes em aguardentes: carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-Hidroxiacetilfurfural. (Continuação...)

	<b>Carbamato de Etila</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>2,3-butanodiona</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>Furfural</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>5-HMF</b> $\mu\text{g.L}^{-1}$	<b>FU+HMF</b>
<b>L37</b>	23,01 a <sub>4</sub>	<LQ	,24 a <sub>1</sub>	<LQ	1,24 a <sub>6</sub>
<b>L38</b>	<LQ	<LQ	,06 a <sub>7</sub>	<LQ	0,06 a <sub>16</sub>
<b>L39</b>	43,32 a <sub>5</sub>	<LQ	,01 a <sub>10</sub>	<LQ	0,01 a <sub>18</sub>
<b>L40</b>	56,44 a <sub>6</sub>	<LQ	LQ	<LQ	<LQ
<b>L41</b>	<LQ	<LQ	LQ	<LQ	<LQ
<b>L42</b>	34,04 a <sub>6</sub>	<LQ	,02 a <sub>9</sub>	<LQ	0,02 a <sub>18</sub>
<b>L43</b>	23,34 a <sub>7</sub>	0,12 a <sub>2</sub>	,08 a <sub>7</sub>	<LQ	0,08 a <sub>14</sub>
<b>L44</b>	17,10 a <sub>8</sub>	<LQ	LQ	<LQ	<LQ

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade ND = não detectado

#### 4.4 Análise de Carbamato de etila

Na Figura 15, encontra-se o cromatograma obtido para o padrão de carbamato de etila

A curva analítica obtida por regressão linear para quantificação do CE nas amostras foi  $y = 11914,70x - 47197,63$  (em que  $y =$  área do pico e  $x =$  concentração de CE), correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução padrão, sendo o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) obtido de 0,99996. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando-se os parâmetros da curva analítica, cujos valores encontrados foram de 1,86 e 6,23  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente.

O tempo médio de retenção obtido para o composto analisado neste estudo foi de  $13,06 \pm 0,09$  minutos. Santiago et al. (2014) avaliaram teores de CE no processo de produção e envelhecimento em tonéis de carvalho e

amburana, encontrando um tempo médio de retenção de 13,34 minutos. Anjos et al. (2011), estudando o carbamato em cachaças armazenadas em carvalho e em vidro, encontraram um tempo médio de retenção de 13,10 minutos para esse composto. Mendonça et al., (2016) observou um tempo médio de retenção de 13,29 minutos, enquanto estudava cachaças produzidas com levedura selecionada e fermentos caipiras. Todos os resultados corroboram com os aqueles encontrados neste trabalho.

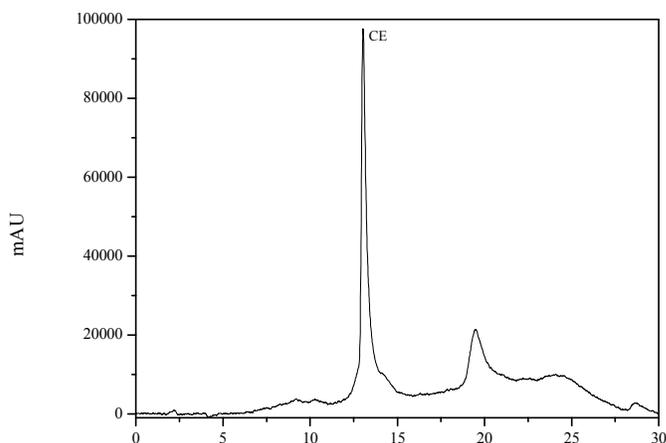


Figura 15 Cromatograma da solução padrão de carbamato de etila (CE), Concentração do padrão injetado:  $160 \mu\text{g.L}^{-1}$

A concentração de CE foi determinada pela construção da curva analítica obtida por regressão linear ( $y = 11716,89x - 19225,71$ ), plotando a área de pico versus concentração, sendo o coeficiente de correlação linear igual a 0,99996. Os valores para o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados foram de  $1,86$  e  $6,23 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores são inferiores aqueles encontrados por Anjos et al., (2011) ( $3,93\text{LD}$  e  $13,09 \mu\text{g L}^{-1}$  LQ ), Machado et al., (2013) ( $6,39 \mu\text{g L}^{-1}$  LD e  $21,32 \mu\text{g L}^{-1}$  LQ ), Mendonça

(2016) ( $2,48 \mu\text{g L}^{-1}\text{LD}$  e  $8,26 \mu\text{g L}^{-1}\text{LQ}$ ) e Santiago et al. (2014) ( $3,24 \mu\text{g L}^{-1}\text{LD}$  e  $10,83 \mu\text{g L}^{-1}\text{LQ}$ ). Em todos esses trabalhos, a matriz usada pelos autores foi a cachaça.

De acordo com os resultados as concentrações de carbamato de etila encontradas para as amostras de cachaças, apresentaram diferença entre as cachaças de alambique e as cachaças industriais. Apenas duas cachaças industriais, amostras L8 e L11 apresentaram valores de  $245,31 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $235,53 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente, diferindo significativamente das demais amostras analisadas excedendo o limite permitido pela legislação que é de  $210 \mu\text{g.L}^{-1}$ , o cromatogramas das amostras estão representados pelas figuras 16 e 17.

Na amostra L10 encontrou-se um valor abaixo do limite de quantificação. As concentrações de carbamato de etila encontradas para todas as amostras de cachaças de alambique, estão dentro do limite permitido para a legislação. As menores concentrações de CE foram observadas nas seguintes amostras L23, L30, L33, L36 e L41 onde os valores encontrados apresentaram-se abaixo do LQ do método.

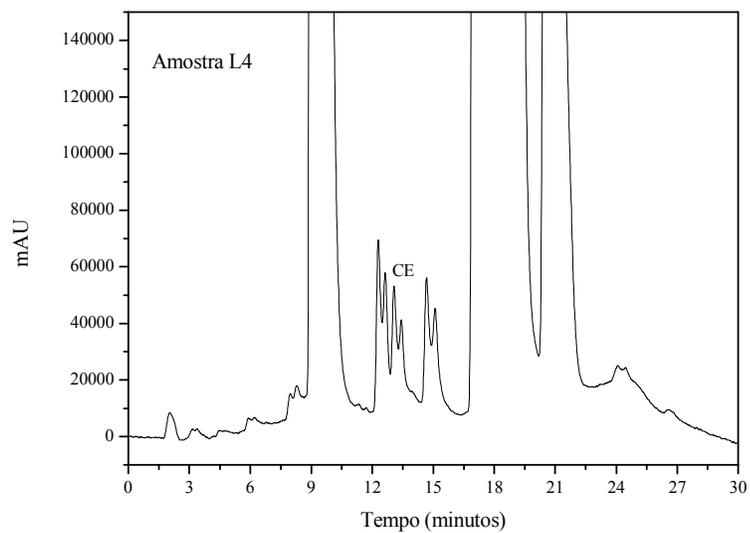


Figura 16 Cromatograma de uma cachaça de coluna (amostra L8) de carbamato de etila.

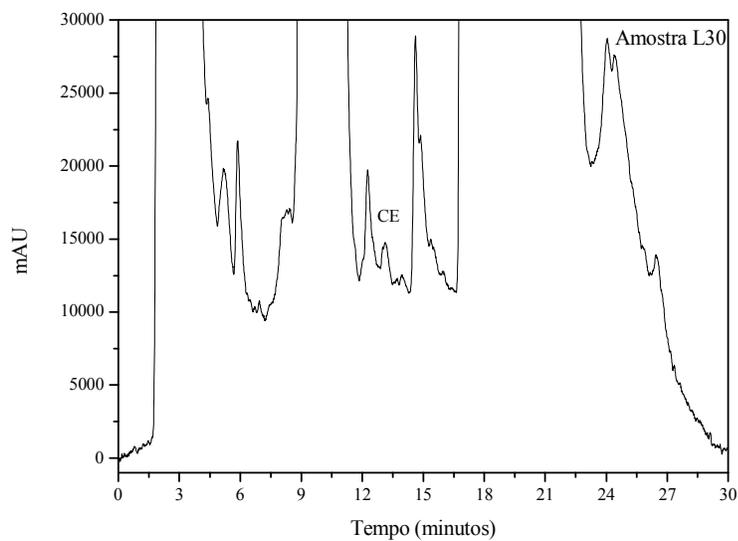


Figura 17 Cromatograma de uma cachaça de alambique (amostra L30) de carbamato de etila.

Por meio dos resultados obtidos, pode-se observar que todas as amostras de alambique apresentaram concentração abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira ( $210,00 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo a maior concentração encontrada de  $76,21 \mu\text{g L}^{-1}$ . Esses resultados são similares aos de Barcelos et al., (2007), Masson et al., (2014), Machado et al. (2013) e Anjos et al. (2011), que também não encontraram níveis de carbamato de etila acima do permitido nas cachaças provenientes do sul de Minas Gerais.

Barcelos et al., (2007) avaliando amostras de cachaça de três regiões diferentes do estado de Minas Gerais (sul de Minas, Zona da Mata e Vale do Jequitinhonha) obtiveram valores que variam desde de não detectado até  $700 \mu\text{g.L}^{-1}$  de carbamato. Entre as regiões estudadas, apenas as amostras do Vale do Jequitinhonha apresentaram níveis superiores aos estabelecidos pelo MAPA de carbamato de etila.

Masson et al., (2007), estudaram cachaças produzidas em alambiques de pequeno e médio porte das regiões norte e sul de Minas Gerais, e encontraram valores que variavam de  $22,6$  a  $980 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Os autores relatam que os teores de CE encontrados na aguardente não se correlacionam com a graduação alcoólica, acidez ou cobre nas amostras analisadas. Neste presente estudo, as amostras L20, L32, L37 e L38 não ultrapassaram o limite permitido para acidez e a amostra L19 excedeu o limite permitido de cobre; provavelmente esse fato não influenciou o teor de carbamato de etila presente nessas amostras de alambique.

Embora alguns autores acreditem que a destilação da cachaça em alambiques de cobre promova a formação do CE catalisado pelo metal (ARESTA, BOSCOLO, FRANCO, 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; BRUNO et al., 2007; MASSON et al., 2014), outros demonstraram a não correlação entre a concentração de cobre e CE em cachaças (BARCELOS et al., 2007; MACHADO et al., 2013; ZACARONI et al., 2011; ANJOS et al.,

2011, MENDONÇA et al., 2016).

Anjos et al. (2011) confirmam que o armazenamento da bebida, tanto em tonel de carvalho quanto em recipiente de vidro, influenciam na formação do carbamato de etila, proporcionando um aumento significativo na concentração desse contaminante. Para os autores a presença de luz também influencia, já que foi detectado  $13,63 \mu\text{g.L}^{-1}$  de carbamato na cachaça armazenada em vidro logo no segundo mês de armazenamento, ao passo que a mesma concentração só foi observada na cachaça do tonel de carvalho no nono mês, dados que não corroboram com este estudo sendo que as cachaças de alambique envelhecidas apresentaram uma baixa concentração de carbamato de etila. Santiago et al. (2014) acompanharam periodicamente o perfil cromatográfico do carbamato de etila no processo de produção e no envelhecimento de cachaça em tonéis de amburana. Os autores observaram que a concentração do carbamato de etila, ao longo do processo de produção e na etapa de envelhecimento, apresentou valor inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação para esse composto.

Baffa Júnior (2011) mostraram correlações existentes entre a concentração deste contaminante e parâmetros envolvidos durante o processo de produção e principalmente durante o processo de destilação, tais como, constituição de partes ascendentes e descendentes (cobre ou aço inoxidável), tipo de aquecimento (direto ou indireto), corte das frações (cabeça, coração e cauda) e taxa de refluxo durante o processo.

Serafim et al. (2012), analisando amostras de cachaças em colunas de aço inox observaram que essas bebidas apresentam em geral concentrações de carbamato de etila superiores a das cachaças de alambique, considerando-se o mesmo vinho. As somas das concentrações de carbamato das frações “cabeça” “coração” e “cauda” dos destilados de alambique são em geral compatíveis com o teor deste, no destilado de coluna. Assim, as cachaças oriundas dos alambiques

tendem a apresentar menores concentrações de carbamato com relação á cachaça de colunas devido ao processo de cortes. Os autores afirmam que na obtenção da cachaça de alambique, a presença do carbamato de etila ocorre principalmente na seguinte ordem do processo de destilação: “cabeça” > “coração” > “cauda”, devido à sua maior solubilidade em álcool do que em água, dessa forma, é previsível que a “cabeça” apresente uma maior concentração de carbamato de etila, já que ela apresenta uma maior graduação alcoólica. Os resultados encontrados por Serafim e colaboradores (2012), corroboram com os resultados obtidos neste estudo, no qual foi encontrado maiores concentrações de CE para as cachaças industriais em comparação com as cachaças de alambique.

Galinaro e Franco (2011), demonstraram que, durante a primeira semana após a destilação, ocorre um aumento gradual na concentração de carbamato de etila em aguardentes oriundas do mesmo vinho e destiladas em alambique e em coluna. Após este período, ocorre uma estabilização no teor deste composto. Desta forma, o carbamato de etila formado pós-destilação deve-se à presença de potenciais precursores nas diversas frações do destilado. Entretanto, os autores afirmam que as diferenças entre as concentrações de carbamato de etila observadas nos destilados de coluna e nas frações de alambique são devidas ao processo de destilação e independentes do processo fermentativo.

#### **4.5 Análise cromatográfica da 2,3-Butanodiona**

Na Figura 18, encontra-se o cromatograma obtido para o padrão de 2,3-butanodiona.

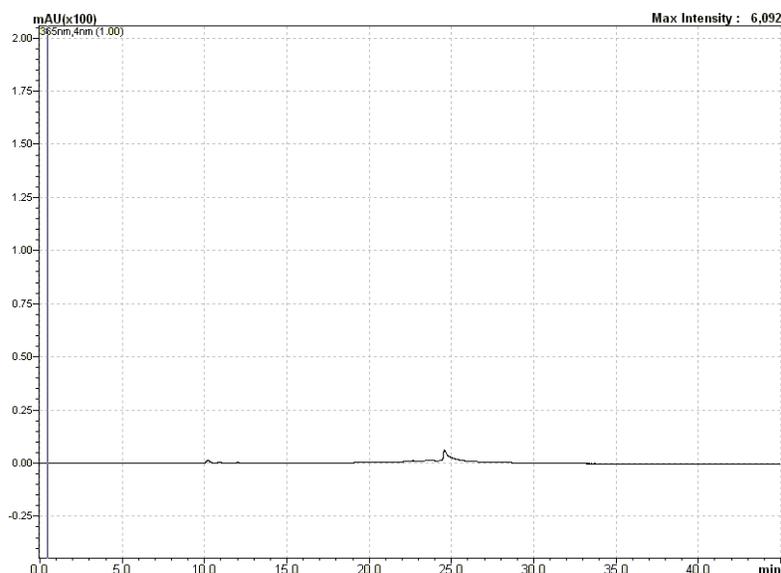


Figura 18 Cromatograma da solução padrão de 2,3 butanodiona de 2,4-dinitrofenilhidrazona, concentração do padrão injetado:  $140\mu\text{g.L}^{-1}$

O tempo médio de retenção obtido para o composto analisado neste estudo foi de 25 minutos. A concentração de 2,3-butanodiona foi determinada pela construção da curva analítica, obtida pela regressão linear ( $y = 234819x - 9086,7$ ), plotando a área de pico versus concentração, sendo o coeficiente de correlação linear igual a 0,99998. Os valores para o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados foram de  $0,054$  e  $0,0182 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 7 pode-se observar uma predominância de composto 2,3-butanodiona nas amostras de cachaças industriais sendo que as amostras que apresentaram maiores quantidades desse composto foram as amostras L1 e L6 com  $0,66 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,53 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. Nas amostras de cachaças de alambique as concentrações foram muito baixas e muitas amostras apresentaram valores abaixo do limite

de quantificação. As figuras 19 e 20 correspondem aos cromatogramas das amostras de cachaça de alambique e de coluna.

Moreira, Neto e Maria (2012), relatam que as cetonas podem estar presentes em diversos processos fermentativos provenientes de variações de temperaturas, nutrientes presente no mosto, quantidade de oxigênio disponível e também o tipo de micro-organismo, sendo encontradas em pequenas quantidades em bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas. Estes compostos na maioria das vezes proporciona uma importante participação para o sabor e aroma dessas bebidas, incluindo as aguardentes de cana brasileiras. Entretanto, a inalação prolongada desses compostos pode causar irritação das membranas mucosas, dores de cabeça, confusão, efeitos narcóticos e, também, pode levar a uma situação de coma. Esses autores desenvolveram alguns estudos em aguardente de cana produzida em alambiques de cobre e de aço inox utilizando um HPLC para identificar. Após derivatização de cetonas para obtenção de compostos do tipo 2,4-dinitrofenilidrazonas. Em um deles, foram separados 4 compostos dessa classe. A 2,3-butanodiona (valor médio de  $4,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi a cetona majoritária, dados que corroboram com o presente estudo. Os autores observaram também que o teor médio desta não variou de forma estatisticamente significativa entre a aguardente de cana produzida em alambique de cobre e a produzida em coluna de aço inox.

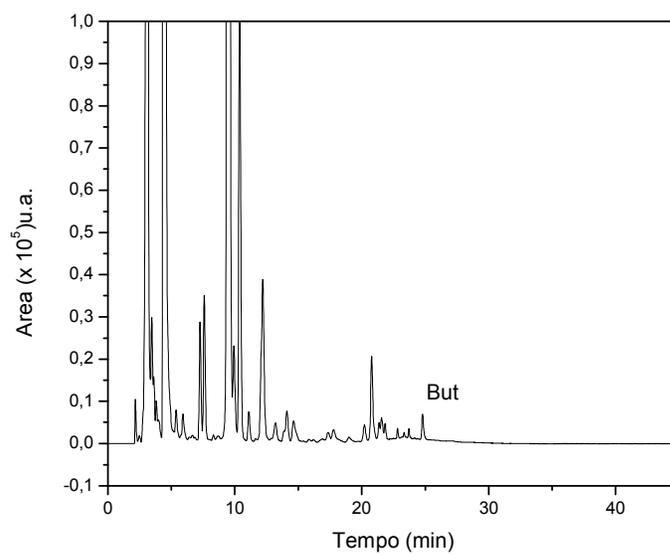


Figura 19 Cromatograma de uma cachaça coluna (amostra L1) de 2,3-butanodiona.

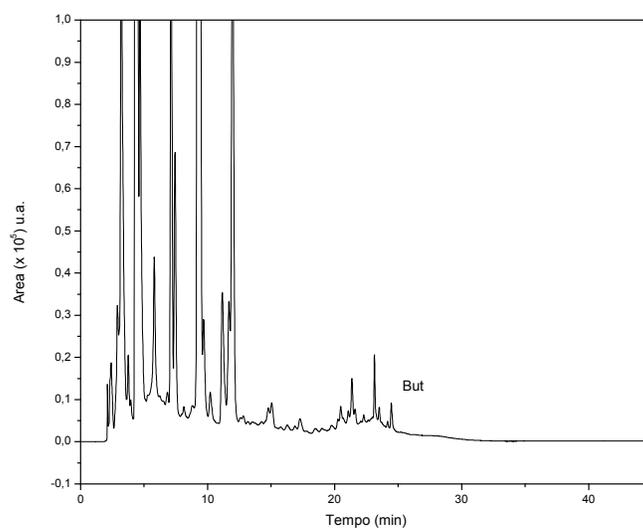


Figura 20 Cromatograma de uma cachaça de alambique (amostra L30) de 2,3 butanodiona.

De acordo com Nakashimada, Kanai e Nshio (1998), fermentações em batelada alimentada e com o excesso de nutrientes a base de carboidratos podem influenciar na concentração de acetoina durante o processo fermentativo, outro possível fator que pode influenciar para a formação de 2,3-butanodiona durante a fermentação é o fornecimento de oxigênio. Os autores realizaram um experimento nas mesmas condições de fermentação (concentração inicial de açúcar, pH, temperatura), porém ocorreu uma variação na velocidade de agitação, após a ativação da levedura para iniciar o processo fermentativo. O experimento foi realizado nas mesmas condições variando apenas a velocidade de agitação de 500 para 750 rpm. Observaram um aumento de 2,3-butanodiona no final do processo de fermentação.

Perego et al., (2003) afirmam que a produção de cetonas está associada à taxa de aeração, quanto maior a aeração maior será a produção de cetonas. O efeito da temperatura também interfere na produção de cetonas, os autores verificaram que nas superiores temperaturas a 37 °C, ocorreu um aumento na concentração final do produto. Os autores ainda relatam que a produção de cetonas durante a fermentação do vinho por leveduras é dependente da temperatura. Quando a temperatura aumenta, a velocidade de decomposição de acetolactato também aumenta, e mais diacetil é produzidos. Os autores afirmam que na produção de bebidas fermentadas e destilados várias alterações de temperatura, podem ocorrer levando a produção de cetonas.

Reche et al., (2007), observam a presença de benzoaldeído, e 2,3-butanodiona, nas cachaças destiladas em alambique que apresentaram concentrações abaixo do detectado para a metodologia de 2,3 butanodiona e benzoaldeído (limite de detecção 0,002 mg. 100 mL<sup>-1</sup> de álcool anidro). Isso pode ser explicado pelo fato de que esses dois compostos não possuem uma temperatura de ebulição tão baixo; quanto o acetaldeído e o formaldeído, sendo

que o formaldeído é um gás à temperatura ambiente e está presente dissolvido na bebida. provavelmente será difícil quantificar o benzoaldeído e a 2,3-butanodiona na fração coração de cachaça de alambique, aonde ocorrem os cortes, não podendo dizer o mesmo para a cachaça de coluna, aonde não ocorre a separação das frações cabeça, coração e calda. Estes dados corroboram com os encontrados neste estudo sendo que as maiores concentrações de 2,3-butanodiona foi detectado nas amostras de cachaças industriais.

Para comparar os resultados da avaliação dos contaminantes, carbamato de etila e 2,3 butanodiona (Tabela 7), aplicou-se a ACP. Na Figura 21 representa-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, em que se relacionam o carbamato de etila e a 2,3-butanodiona das 44 amostras em estudo. Aparentemente, pela análise de componentes principais observa-se que as amostras oriundas de alambique são completamente diferentes das amostras de coluna no que diz a respeito ao seu teor de carbamato de etila e 2,3-butanodiona.

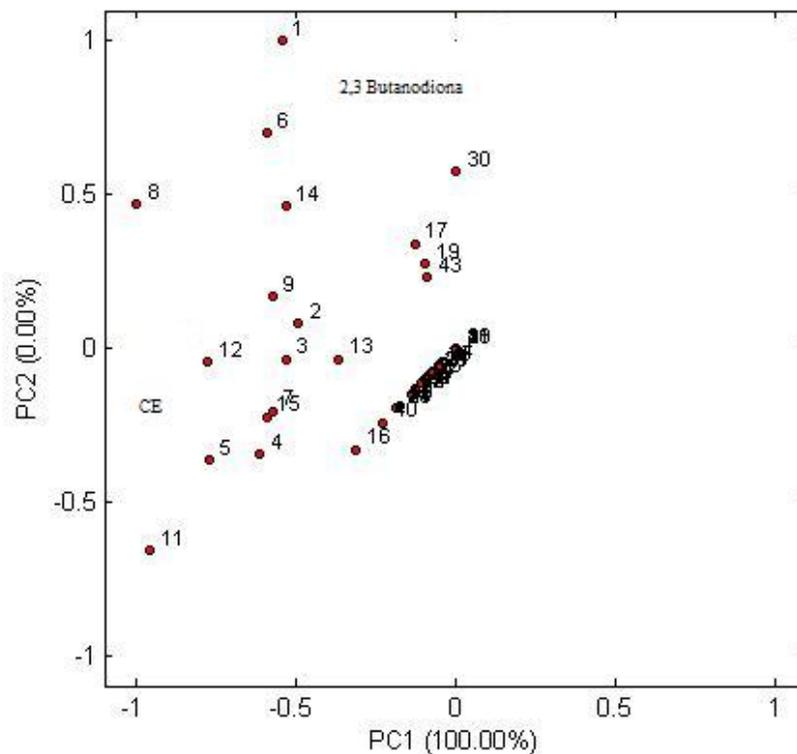


Figura 21 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das de coluna e de alambique quanto ao carbamato de etila e 2,3 butanodiona.

Pelos dados apresentados na ACP, com a primeira e a segunda componente principal, foi possível descrever 95,5% dos dados, sendo 100,00% da variância total descrita pela primeira componente principal. A análise multivariada foi aplicada a fim de verificar as possíveis semelhanças entre as amostras. Com base no gráfico pode-se observar três agrupamentos distintos correspondente as cachaças de alambique e as de coluna, o gráfico evidencia que algumas amostras de cachaças de coluna foram agrupadas em relação as maiores

quantidades de carbamato de etila e 2,3-butanodiona, resultados que corroboram a análise de variância aplicada anteriormente (Tabela 7), pois tais parâmetros apresentaram valores mais altos, quando comparados com as demais amostras.

#### 4.6 Análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural

A Figura 22 ilustra o perfil cromatográfico da solução padrão de furfural e 5-hidroximetilfurfural, podendo observar a separação dos dois compostos.

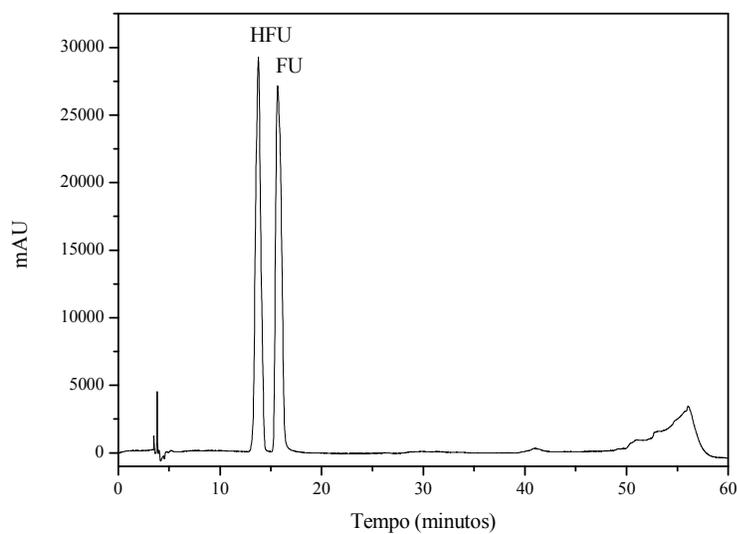


Figura 22 Cromatograma da solução padrão de de furfural e 5-hidroximetilfurfural.

#### 4.7 Certificação do método analítico

As avaliações dos parâmetros para a validação do método proposto foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.

Nas condições cromatográficas empregadas, constatou que as amostras não apresentaram substâncias interferentes nos tempos de retenção do furfural e do 5-hidroximetilfurfural. Por meio da construção das curvas analíticas, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de determinação referentes às equações das curvas, obtidas por regressão linear. Para o furfural foi obtido um coeficiente de regressão linear de 0,9999 e para o 5-hidroximetilfurfural obteve um coeficiente de regressão linear de 0,9999, conforme recomendado na literatura (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997 e SOUZA et al., 2009).

A precisão do método analítico foi avaliada em relação aos níveis de repetitividade e precisão intermediária, estimado o coeficiente de variação para cada composto analisado, mediante sucessivas medições para três níveis de concentração.

Pelos resultados obtidos mediante cinco repetições obtiveram-se os CV, que, variaram de 0,991% na concentração de 0,1 mg/L<sup>-1</sup>, 0,558% na concentração de 1,0 mg/L<sup>-1</sup> e 0,515% a concentração 25 mg/L<sup>-1</sup> para o furfural. Os resultados obtidos do CV para o 5-hidroximetilfurfural variaram de 0,187% na concentração de 0,1 mg/L<sup>-1</sup>, 0,487% na concentração de 1,0 mg/L<sup>-1</sup> e 0,921% na concentração de 25 mg/L<sup>-1</sup>.

De maneira geral nos testes de repetitividade os valores encontrados para o CV estão abaixo do limite de 5% para os dois compostos analisados, conforme é recomendado. Portanto pode-se aferir que o método apresenta

precisão para os dois compostos analisados em cachaças, devendo-se considerar a complexidade das amostras de cachaças envelhecidas e não envelhecidas.

Os limites de detecção encontrados para o furfural variaram de 0,087 mg/L a 0,017 mg/100 de álcool anidro, e os limites de quantificação variaram de LQ= 0,291 mg/L a 0,058 mg/100 de álcool anidro. Para o composto 5-hidroximetilfurfural os limites de detecção variaram de 0,058 mg/L a 0,011 mg/100 de álcool anidro e os limites de quantificação variaram de 0,193 mg/L a 0,039 mg/100 de álcool anidro, respectivamente. O tempo de retenção para o furfural foi de  $15,567 \pm 0,12$  minutos e para o 5-hidroximetilfurfural foi de  $13,658 \pm 0,14$  minutos, corroborando com os valores encontrados por Souza et al., (2009). Segundo esses autores o método utilizado demonstrou boa sensibilidade para esse tipo de análise. Ribani et al (2004) afirmaram que podem ocorrer diferenças nesses parâmetros provenientes das condições cromatográficas, como na aparelhagem ou nas metodologias adotadas para a quantificação dos compostos.

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em que a concentração do furfural e 5-hidroximetilfurfural foi calculada pelo aumento das áreas de picos, após uma adição de uma quantidade conhecida dos padrões a três amostras escolhidas aleatoriamente L12, L13 e L27. As concentrações utilizadas para o furfural e o 5-hidroximetilfurfural foram 0,5, 5,0 e 20,0 mg/L<sup>-1</sup>. Adicionaram-se a concentração de 0,5 mg/L<sup>-1</sup> de furfural para três amostras, obteve-se uma recuperação de 98%, 83% e 108%; na concentração de 5,0 mg/L<sup>-1</sup> os valores de recuperação de 96%, 94% e 78% na concentração de 20,0 obteve-se uma recuperação de 97%, 99% e 98% respectivamente. Para o composto HMF repetiu-se o mesmo procedimento, obtendo-se os seguintes resultados: concentração de 0,5 mg/L<sup>-1</sup> (recuperação de 95%, 83% e 74%,) concentração de 5,0 mg/L<sup>-1</sup> (recuperação de 93%, 97% e

81%), e para a concentração de 20,0 (recuperação de 107%, 100% e 98% respectivamente). Com base nos limites aceitáveis para a porcentagem de recuperação (entre 70 e 120%), consta-se que o método apresentou boa recuperação para os dois compostos analisados, cujo valores médios incluíam-se nos limites aceitáveis. Trabalhos de Anjos et al., (2011) utilizando o a mesma metodologia para a quantificação de compostos fenólicos também apresentou porcentagens de recuperação similares encontradas neste estudo.

Analisando os dados descritos para o furfural e HMF, ambos descritos anteriormente na Tabela 9, nenhuma das amostras de cachaça de alambique excedeu o limite, porém três cachaças de coluna L1, L2 e L8 excederam o limite que é de 5,0 mg por 100 mL de álcool anidro, sendo encontrados valores de 5,63, 7,00 e 5,68 mg/100mL<sup>-1</sup> de álcool anidro respectivamente. Os cromatogramas das amostras de cachaça de alambique e de coluna estão representadas nas figuras 23 e 24

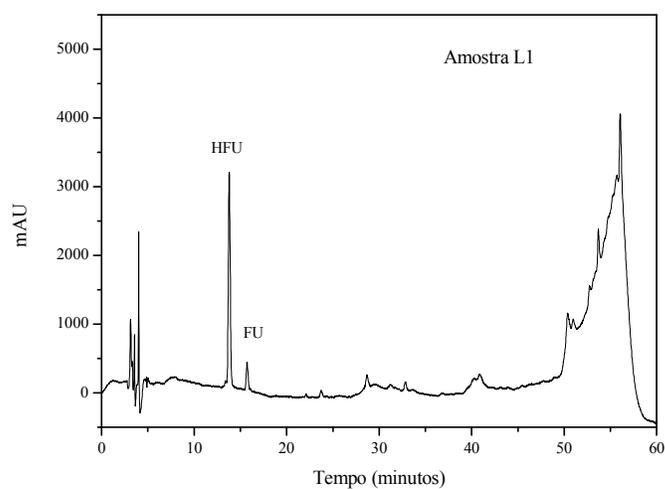


Figura 23 Cromatograma de uma cachaça de coluna (amostra L1) de 5-hidroximetilfurfural e furfural.

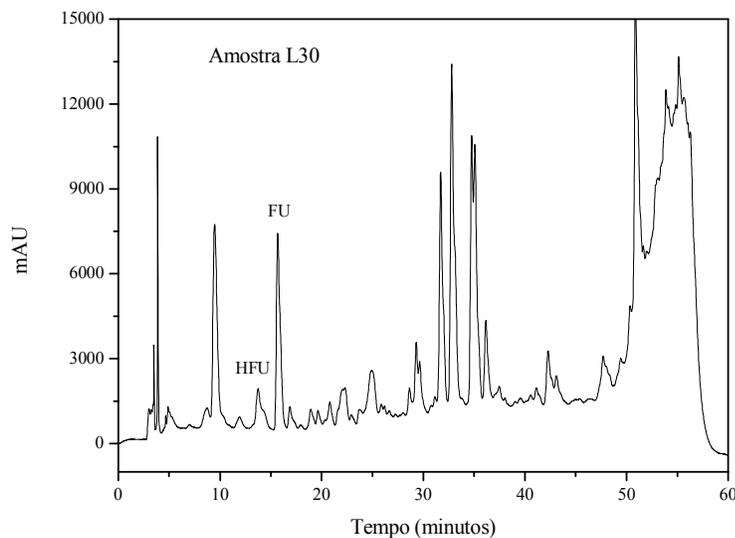


Figura 24 Cromatograma de uma cachaça de alambique (amostra L30) de 5-hidroximetilfurfural e furfural.

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. Na queima do palhiço da cana-de-açúcar, a exsudação do açúcar torna-se um excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas e posteriormente para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural e hidroximetilfurfural, chegando ao produto final.

Souza et al., (2009), estudando 31 amostras de cachaça na região do norte do fluminense do estados do Rio de Janeiro, obseraram que a soma dos teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) variaram de 1,1 a 9,5 mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro, sendo que nove amostras continham teores acima do máximo permitido, dados similares aos dados encontrados neste estudo. Os autores observaram também que teores de 8,8 mg 100 mL<sup>-1</sup> álcool anidro para o composto furfural foi encontrado em amostras de cachaça artesanal de cana queimada. Outros fatores que podem contribuir para o aumento no teor destes compostos são a presença de açúcares residuais polissacarídeos oriundos de bagacilhos, fermentação fraca e calor excessivo na caldeira de destilação, ou também pela adição de açúcares. Os dados obtidos para o extrato seco descritos na Tabela 5, mostraram que ocorreu uma maior concentração de extratos em algumas as cachaças industriais, sendo uma possível contribuição para a formação desses compostos.

De acordo com Serafim et al., (2012) os aldeídos também apresentaram as maiores concentrações na fração “cabeça”, com a exceção do 5-hidroximetilfurfural e o furfural, os quais apresentaram maiores concentrações

nas frações “coração” e “cauda” do destilado. Isto pode estar relacionado à maior afinidade destes compostos pela água, em relação ao etanol e pelos seus respectivos valores de temperatura de ebulição. Os autores afirmam que na fração “cabeça” as concentrações de acetato de etila, metanol, acetaldeído, carbamato de etila, furfural, 5-hidroxiacetilfurfural, são maiores em relação nas frações “coração” e “cauda”, esses compostos podem ter suas quantidades reduzidos em concentrações menores após a aplicação de corte, promovendo assim um equilíbrio entre a qualidade e produtividade da bebida.

Reche et al., (2007), analisaram 27 amostras de cachaça, e observaram que as amostras destiladas em coluna apresentaram um maior valor na concentração de ácido acético e 5-hidroxiacetilfurfural em relação as cachaças de alambique.

Pinheiro et al., (2010), analisou aleatoriamente 16 amostras de cachaças de alambique e cachaças de coluna. O autor descreveu que as mesmas encontravam-se dentro do limite máximo estabelecido, com valores menores que  $1,0 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ , afirmando que em todas as amostras analisadas, a cana-de-açúcar utilizada para o processo de fabricação da bebida não era proveniente de cana queimada, não tinha presenças de açúcares residuais, de polissacarídeos oriundos de bagacilhos presentes na cana de açúcar, e também sem adição de caramelo.

Para comparar os resultados da avaliação dos contaminantes, furfural e 5-metilhidroxifurfural (Tabela 7), aplicou-se a ACP. Na Figura 25 representa-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores, em que se relacionam o furfural e 5-metilhidroxifurfural das 44 amostras em estudo. Aparentemente as amostras oriundas de alambique de cobre e as amostras de coluna, mostraram-se completamente diferentes em relação aos dois compostos analisados, quando empregado a ACP.

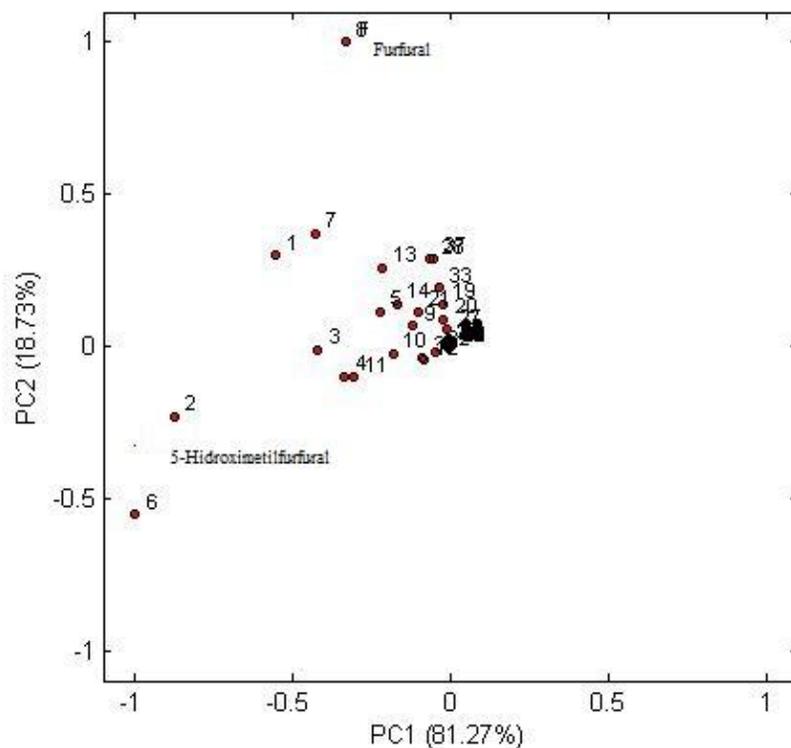


Figura 25 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das de coluna e de alambique quanto ao 5-hidroximetilfurfural e furfural.

Pelos dados apresentados na ACP, com a primeira e a segunda componente principal, foi possível descrever 92,5% dos dados, sendo 81,27% da variância total descrita pela primeira componente principal. A análise multivariada foi aplicada a fim de verificar as possíveis semelhanças entre as amostras de cachaças destiladas em alambiques e as cachaças de coluna. Com base no gráfico pode-se observar três agrupamentos distintos correspondente as cachaças de alambique e as industriais, evidenciando que algumas amostras de cachaças industriais foram agrupadas em relação às maiores quantidades de

furfural e 5-hidroximetilfurfural, Os aldeídos também apresentaram as maiores concentrações na fração “cabeça”, com a exceção do 5-hidroximetilfurfural e o furfural, os quais apresentaram maiores concentrações nas frações “coração” e “cauda” do destilado. Isto pode estar relacionado à maior afinidade destes compostos pela água, em relação ao etanol e pelos seus respectivos valores de temperatura de ebulição. Foi observado um agrupamento entre as cachaças de alambique em relação os dois compostos analisados. Esses resultados corroboram a análise de variância aplicada anteriormente (Tabela 7), pois tais parâmetros apresentaram valores mais altos, quando comparados com as demais amostras.

A análise de Componentes Principais novamente foi aplicada ao conjunto de dados da Tabela 7, referente às amostras de cachaças de alambiques e industriais. Pelos dados apresentados na ACP com a primeira e a segunda componente principal, foi possível descrever 93,1% dos dados, sendo 99,97% da variância total descrita pela primeira componente principal.

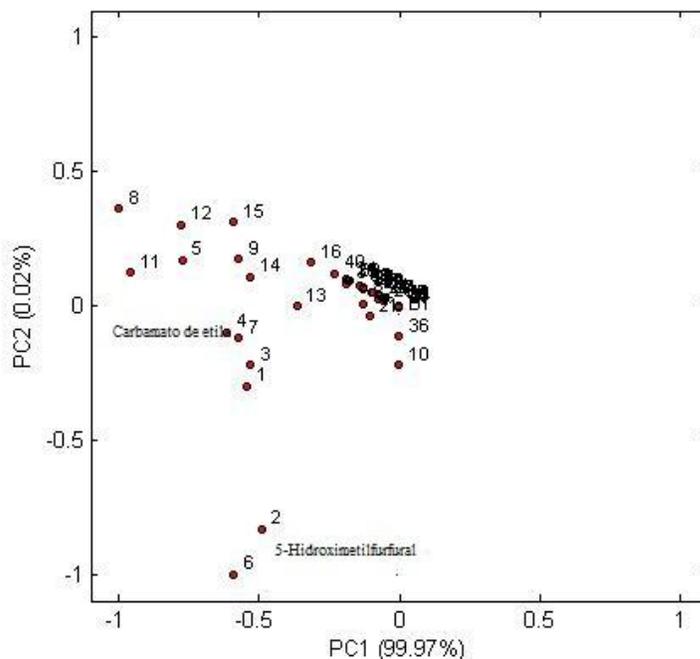


Figura 26 Gráfico biplot PC1 x PC2 dos loadings e scores das de coluna e de alambique quanto aos contaminantes 5-hidroximetilfurfural, furfural, 2,3 butanodiona e carbamato de etila.

Os dados obtidos são similares aqueles observados na Figura 26, aonde as amostras de cachaças de coluna, tiveram uma tendência de agrupamento provavelmente devido ao tipo de processamento da bebida. Tal fato pode ser devido a influência do processo de destilação utilizado. Dados de Apostolopoulou et al., (2005), mostram conhecido que o processo de cortes de diferentes bebidas alcoólicas realizado durante a destilação, podem influenciar a composição química e, conseqüentemente, afetar a qualidade do produto final. Entretanto, poucos são os exemplos encontrados na literatura para o caso da aguardente/cachaça de cana de açúcar uma vez que, no caso da destilação em alambiques, o processo de “cortes” separa o destilado em três frações: “cabeça”,

“coração” e fração “cauda”. Assim, o agrupamento das amostras de alambique pode ter sido evidente devido à remoção das frações do destilado cabeça e cauda durante a operação de destilação, uma vez que a fração “cabeça” segundo alguns autores possui maiores concentrações de ácido acético acetato de etila, metanol, acetaldeído, carbamato de etila, furfural, 5-hidroximetilfurfural. O carbamato de etila, embora também seja solúvel em água, possui uma maior afinidade com o etanol o que poderia justificar sua maior presença na fração de “cabeça”, sendo que no processo de destilação em coluna de aço inox não ocorre a separação das frações, sendo que o processo de produção de cachaça não é uniforme por si só. Isto não é inesperado, pois na produção existem muitas variáveis em que torna difícil a reprodutibilidade do destilado.

No que diz respeito à produção da aguardente de cana, mesmo que a fermentação e a destilação do caldo de cana venham a ser conduzida de forma técnica rigorosamente correta, a bebida pode não apresentar especificações legais devido a presença de contaminantes prejudiciais a saúde do consumidor proporcionando também sabor e aroma desagradáveis (VILANOVA et al., 2010)

## **5. CONCLUSÃO**

Em todas as amostras estudadas, houve diferenças em relação aos parâmetros físico-químicos e cromatográficas (carbamato de etila, 2,3-butanodiona, furfural e 5-hidroximetilfurfural). Físicoquimicamente as cachaças de alambique apresentaram alguns parâmetros fora dos limites exigidos pela legislação: teor alcoólico, (32,21 a 36,63), acidez volátil (153,18 a 203, 88), aldeídos (33,99 a 34,34) e cobre (7,45 a 7,54).

As concentrações de carbamato de etila em cachaças de alambique apresentaram abaixo do limite permitido pela legislação e em algumas amostras

não foi detectado. Os teores de carbamato de etila nas cachaças de coluna variaram de menor que o limite de quantificação a  $245,31 \mu\text{g L}^{-1}$

Nas amostras de cachaças industriais, as concentrações de 2,3-butanodiona apresentaram valores superiores em relação as cachaças de alambique que apresentaram valores menores e em algumas amostras não foi detectada apresentando concentrações menores que o limite de detecção.

O método cromatográfico proposto foi validado e mostrou-se eficiente para a análise simultânea dos dois compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural em amostras de cachaça. As cachaças de coluna apresentaram concentrações maiores quanto aos teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural que variaram de 5,63 a 7,00 mg/100 mL de álcool anidro e as cachaças de alambique apresentaram concentrações inferiores permitidos pela legislação vigente.

Pode-se concluir que as cachaças industriais estudadas apresentaram maior quantidade dos contaminantes analisados quando comparadas com as cachaças de alambique, induzindo os produtores industriais um maior rigor durante o processo de fabricação da bebida.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALCARDE, A. R.; MONTEIRO, B. M. dos S.; BELLUCO, A. E. de S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Quim. Nova**, v. 35, n. 8, p. 1612-1618, 2012

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

ALENCAR, E. M. B. de et al. Fermentation Capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Cultures. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 52, n.4: p. 819-824, jul/agt, 2009.

ALVES, H. O. Obtenção e análise físico-química do destilado alcoólico da cajarana (*spondias* sp) no semiárido paraibano **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 29, n. 6, p. 2819-2824, June 2011.

ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. ampl. e revis. Lavras: Editora UFLA, 2013. p. 26-56.

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, Nov/Dez. 2002.

ANJOS, J. P. et al. Identification of ethyl carbamate during the aging of cachaca in an oak barrel (*Quercus* sp) and a glass vessel. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5 p. 874-878, 2011.

ANTINONE, M. J. et al. Diacetyl as a flavor component in full fat cottage cheese. **Journal of Food Science**, v. 1, p. 38-42, 1994.

APOSTOLOPOULOU, A. A. et al. Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates **Food Control**, v. 16, p. 157-164, 2005.

AQUINO, F. W. B. et al. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** P.24-32, 2004.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, June 2001.

AZEVEDO, L. C. et al; Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Quim. Nova**, . 30: 1968, 2007.

BADOTTI, F. et al. Two interbreeding populations of *Saccharomyces cerevisiae* strains coexist in cachaça fermentations from Brazil. **FEMS Yeast Research**. United States, v. 10 n.1111, p. 1567-1364, 2013.

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

BAFFA JÚNIOR, J. C. et al. **Mecanismos de formação de carbamato de etila durante a produção e estocagem de aguardentes de cana-de-açúcar**. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.30, n.7, p. 156-173, out./dez. 2011.

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

BERRY, D. R. **Alcoholic beverage fermentations. Fermented beverage production**. Academic and Professional. 2 ed. London: Blackie, 1995, p. 25-40.

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

BORTOLETTO, A. M. **Composição química de cachaça maturada com lascas tostadas de madeira de carvalho proveniente de diferentes florestas francesas**. 2013. 80p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP),

Piracicaba, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 28, de 08 de agosto de 2014**. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=11/08/2014&jornal=1&pagina=7&totalArquivos=100>. Acesso em: 10 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 1, de 29 de janeiro de 2007. Critérios para credenciamento, reconhecimento, extensão de escopo e monitoramento de laboratórios no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - mapa. Diário Oficial da União. Brasília, **17/01/2007**, >. Acesso em: 10 dez. 2015

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 13, de 29 de junho de 2005**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2015

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA nº 32, de 13 de março de 2012. LABTOX - Laboratório de análises de agrotóxicos e bebidas alcoólicas. Diário Oficial da União. Brasília, **15/03/2012**.

BRUNO, S. N. F. Distillation of Brazilian Sugar Cane Spirits. Revista Internacional do Conhecimento. Ano 3, Número 5, 2012. Disponível em <http://revistainternacionaldoconhecimento.wordpress.com/2012/05/02/destilao-distillation-of-brazilian-sugar-cane-spirits-cachaas-by-sergio-nicolau-freire-bruno/>. Acessado em 05 de dezembro de 2015.

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

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

CANUTO, M. H. **Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado.**

Tese de Doutorado em Ciências em Química. Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG, 2013.

CARDOSO, M. G. Análises físico-químicas de aguardente. In: **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. rev. e ampl. Lavras: Editora UFLA, 2013.

CARUSO, M.S.F.; FARAH-NAGATO, L. A.; ALABURDA, J. Benzo(a)pireno, carbamato de etila e metanol em cachaças. **Química Nova**. São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1973-1976. 2010.

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

DEL, GRANDE. M. Cromatografia gasosa princípios básicos. 2013 Disponível <http://www.cpatc.embrapa.br/eventos/seminariodequimica/1%B0%20Minicurso%20Produ%E7%E3o%20e%20Qualidade%20de%20Biodiesel/cromatografiagasosa.pdf> Acesso em **27/11/2015**.

DIAS, S. M. B. C. O processo da destilação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3 ed. Lavras: Editora UFLA, 2013. p. 104-150.

DOBRINAS, S.; STANCIU, G.; SOCEANU, A. Analytical characterization of three distilled drinks. Ovidius University **Annals of Chemistry**. p.20- 48, 2009.

DUARTE, F. C. et al. Physicochemical and sensory changes in aged sugarcane spirit submitted to filtering with activated carbon filter. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 3, p.471-477, jul./set. 2013.

DUARTE, F.W. et al. Effect of Co-Inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the Quality of the Distilled Sugar Cane everage Cachaça. **Journal of Food Science**. United States, v. 76, p.1307- 1318, 2011.

DUARTE, W.; AMORIM, J.; SCHWAN, R. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek Online**. Netherlands, vol. 103, n. 1, p. 175-194, ago. 2012.

FARIA, J. B. et al. Cachaça, Pisco and Tequila . In: LEA, A G H; PIGGOTT J R. (Org.). Fermented Beverage Production 2nd. New York: **Kluwer Academic / Plenium Publishers**. p. 335-363. 2003.

FERNANDES, O. W. B.; **Avaliação da composição físico-química de cachaça de alambique de cinco cultivares de cana-de-açúcar colhidas em três épocas de maturação**. 2013. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

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

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA. Segundo a Directiva 2012/58/CE da Comissão das Comunidades Europeias. Disponível em: [http://www.furan.com/\\_resources/downloads/10195pt\\_rev6.pdf](http://www.furan.com/_resources/downloads/10195pt_rev6.pdf). Acesso em: **25/11/2015**.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1/2, p.11-22, Sept. 2003.

FRANÇA, N.; SÁ, O. R. de.; FIORINI, J. E. Avaliação da qualidade da cachaça artesanal produzidas no município de Passos (MG). **Ciência et Praxis**, v. 4, n. 7, 2011.

GALINARO, C. A. Da formação e controle de carbamato de etila em aguardentes. Tese de Doutorado em Ciências em Química Analítica. **Instituto de Química de São Carlos**, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.

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

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim. Nova**. V.32, n. 7, p150, 164. 2001

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA: **Mercado da cachaça 2014**. Disponível em: < <http://www.ibraccachacas.org>> Acesso em: 21 de out de 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate (Urethane)**. Lyon, 2010. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 96).

KHABAROV, Y. G. et al. A New Spectrophotometric Method for Determination of Furfural and Pentoses. **Russian journal of applied chemistry**. p.79-84, 2006.

LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM. **Química Nova**. São Paulo, v. 31, n. 7, p.18060- 1864, 2008.

LACHENMEIER, D. W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1108, n. 1, p. 116-120, Mar. 2006.

LACHENMEIER, D.W. et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **Biomed Central**. United Kingdom, v.10, p. 266 -281, 2010

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

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

LIMA, U. A.; **Aguardente**: fabricação em pequenas destilarias, 1ª ed., FEALQ: Piracicaba, 1999

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

MADRERA R. R.; VALLES, B. S.; Determination of Volatile Compounds in Cider Spirits by Gas Chromatography with Direct Injection. **Journal of Chromatographic Science**, p. 45-52, 2007.

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

MANSILLA, A. E.; SALINAS, F.; NEVADO, J. J. B. Differential determination of furfural and hydroxymethylfurfural by derivative spectrophotometry. **J. AOAC Int.** p. 75-78, 1992.

MARTINI, C. et al. Yeast composition of sugar cane juice in relation to plant varieties and seasonality. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 710-717, Sept./Oct. 2011.

MASSON, J; et al., Cg-ms analysey Analysis of ethwl carbamate in distilled sugar cane spirits from the northern and southern regions of Minas Gerais **Journal of the Institute of Brewing**, v 120, p 506-520, 2014.

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

MENDES, T. A. O. et al. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**. Brasil. Vol. 16, n. 2, p. 81-89, abr/jun, 2013.

MENDONÇA, J G P et al., Determination of ethyl carbamat in cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, 2016.

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

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

MIRANDA, M.B. de et al. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 897 - 901, 2007.

MONTEIRO, B. M. dos S. **Composição química de aguardente de cana-de-açúcar obtidas por fermentação com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2010. 73p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2010.

MOREIRA, R. F. A.; NETTO, C. C.; MARIA, C. A. B. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1819-1826, 2012.

MORETTI, J. C. B. Produção de cachaça: um produto legitimamente. Tese de Doutorado em Ciências em Química Analítica. **Instituto de Química de São Carlos**, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.

MORITZ, D. E. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 1998.

MOSER, Alexandre de Souza. **Efeito da micro-oxigenação na qualidade química e sensorial da cachaça não envelhecida**. 2012. 86p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, 2012.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente de cana. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. cap. 12, p. 237-266.

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

NAKASHIMADA, Y.; KANAI, K.; NISHIO, N. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 1133-1138, 1998.

NASCIMENTO, R. F. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, p. 18-25, 1998.

NÓBREGA, I. C. C. et al. 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.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINO FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2005.

NOVAES, F.V. **Cachaça de alambique x Aguardente industrial**. O Engarrafador Moderno, n. 72, p. 46-49, 2000.

ODELLO, L. et al. Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1839-1844, 2009.

OLIVEIRA, E. S. et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 20, p. 19 – 24, 2004.

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.

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

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; BORGHI, M. D. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanodiol production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 125-131, 2003.

PEREIRA, E. V. S. **Níveis de congêneres, carbamato de etila e outros contaminantes em vodcas e cachaças de consumo popular no Brasil**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

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.

PINHEIRO, S. H. M. et al., Avaliação sensorial das bebidas aguardente industrial de cana-de-açúcar e cachaça de alambique: uma contribuição para o desenvolvimento de um protocolo de análise. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. United States, v. 22, n. 14, p. 323--334, 2010.

RECHE, R. V. et al. Influence of Type of Distillation Apparatus on Chemical Profiles of Brazilian Cachaças. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. United States, v. 55, n. 16, p. 6603-6608, 2007.

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

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

ROMANO, P. et al. The production of 2,3-butanodiol as a differentiating character in wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 649-653, Oct. 1998.

ROSSINI, C. Cana Bisada: a primeira a ser processada em 2010. **Revista Canavieiros - A força que movimenta o setor**. Sertãozinho, n. 45, ano V, p. 22, mar. 2010.

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde. 2012, Disponível em: <http://datasheets.scbt.com/sc-210345.pdf>. Acesso em: **05 dez 2015**.

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

SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; DIAS, R. W.. de. Fermentação. In: CARDOSO, M das G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2013. p. 81-101.

SCOEL. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Ethyl Carbamate [Urethane]. European Commission. Employment, Social Affairs & Inclusion. SCOEL/SUM/172. March 2012. Disponível em

<http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=7723&langId=en>. Acessado em 04/12/2015

SERAFIM, F. A. T. et al. Comparação do perfil químico entre cachaças de um mesmo vinho destiladas em alambiques e em colunas. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1412-1416, 2012.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cachaça artesanal**. Brasília, 2014. (Série Estudos Mercadológicos). Disponível em: <[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/444c2683e8debad2d7f38f49e848f449/\\$File/4248.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/444c2683e8debad2d7f38f49e848f449/$File/4248.pdf)>. Acesso em: 7 nov. 2015.

SHRINER, R. L. et al. **Identificação sistemática dos compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983. 148 p.

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, 2009.

SILVA, C. L. C. et al. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional Brazilian cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, p. 203-210, 2009.

SILVA, P. H. A. Et al. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 100-106, jan/mar. 2009.

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

SORATTO, A. N.; VARVAKISII, G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 681-687, out/dez, 2007.

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

TAKEMOTO, S. Y. **Avaliação do teor de acetoína em vinagres como forma de verificação de sua genuidade.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2000.

TEIXEIRA, R. M. **Otimização das condições de cultura para produção de acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii*.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 1999.

VENTURINI FILHO, F. W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia.** São Paulo: Blucher, 2010.

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

VILANOVA, M. et al. Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines, **Microchemical Journal**, v. 95, p. 240-246, 2010.

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

VOLPE, T. C. **Avaliação das características físico-químicas da cachaça industrial e artesanal comercializadas no Centro Norte Paranaense.** Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica do Paraná. Campo Mourão, 2013.

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

WINKLER, O. **Detection and determination of hydroxy-methylfurfuraldehyde** in genuine and artificial honey. *Z. Lebensmitt.-Untersuch.* p.102- 161, 1995.

XU, X. et al. Derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for quantification of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 35, n. 7, p. 804-810, Apr. 2012.

YUAN, J-P.; CHEN, F. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by hplc - dual detection. **Food Chemistry**. p. 64: 74, m..23, 1999.

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.

ZAREI, A. R. Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Furfural in Water Samples After Mixed MicLLee-Mediated Extraction. **Acta Chim. Slov.** p. 56-65, n. 32, 2009.