



JOÃO GUILHERME PEREIRA MENDONÇA

**ANÁLISE DE CARBAMATO DE ETILA EM
CACHAÇAS DE ALAMBIQUE PRODUZIDAS
POR LEVEDURA SELECIONADA E
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA**

LAVRAS-MG

2014

JOÃO GUILHERME PEREIRA MENDONÇA

**ANÁLISE DE CARBAMATO DE ETILA EM CACHAÇAS DE
ALAMBIQUE PRODUZIDAS POR LEVEDURA SELECIONADA E
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA**

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

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Mendonça, João Guilherme Pereira.

Análise de carbamato de etila em cachaças de alambique
produzidas por levedura selecionada e fermentação espontânea /
João Guilherme Pereira Mendonça. – Lavras : UFLA, 2014.

127 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Aguardente de cana. 2. Processo fermentativo. 3.
Contaminantes. 4. Cachaça - Armazenamento. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.53

JOÃO GUILHERME PEREIRA MENDONÇA

**ANÁLISE DE CARBAMATO DE ETILA EM CACHAÇAS DE
ALAMBIQUE PRODUZIDAS POR LEVEDURA SELECIONADA E
FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Dra. Adelir Aparecida Saczk UFLA

Dra. Ana Maria de Resende Machado CEFET/MG

Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

LAVRAS-MG

2014

À minha família, pelo amor, carinho e incentivo;
À Kelly, um anjo colocado por Deus em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me amparar em todos os momentos difíceis, mostrando os caminhos certos nas horas incertas e por me presentear a cada amanhecer, dando-me a oportunidade de recomeçar tudo novamente, pelo dom da vida, por agraciar-me com saúde e paz. À Nossa Senhora, minha mãe intercessora que, em seus braços maternos, me acolhe a cada amanhecer e anoitecer.

Aos meus pais (Antônio e Maria), por tudo que me ensinaram, pelo exemplo que são em minha vida, por lutarem e acreditarem nos seus filhos sem medir esforços, apoiando, incentivando, ensinando a amar e a conscientizar sobre a importância de ser família.

Às minhas irmãs, (Izadora e Mayra); que mesmo nas ausências, me acolhem com carinho, amor e amizade.

À Kelly, que ao longo desses últimos anos, tem compartilhado momentos de alegria e tristeza, dificuldades e superação. Por sonhar comigo e acreditar que juntos podemos mais.

À Profa. Maria das Graças Cardoso, pela confiança, ensinamentos, oportunidades e amizade. Por me ajudar a tornar possível a realização e a conquista de mais uma etapa importante em minha vida, hoje a maior delas academicamente.

À Josiane Maria Mendes e à sua família, produtores da Cachaça Artesanal JM, e ao funcionário José Geraldo (Pelinha), pela disponibilidade para a realização dos experimentos, apoio e profissionalismo.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química e à Capes, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do DQI/UFLA, pelos ensinamentos.

À Cleuza, por estar sempre auxiliando-nos e ajudando-nos.

Aos amigos do laboratório (Wilder, Leonardo, Gabriel, Rafaela(s), Rodolfo, Alex, Bruno, Juliana, Cristiane, Lucilene, Marcos, Maria Luíza, Danúbia, Karen, Thaís).

Aos meus familiares (avós, tios (a), primos (a)), e aos amigos que, direto ou indiretamente, ajudaram-me com incentivo e coragem.

Muito obrigado!

RESUMO

A cachaça, típica bebida brasileira, é produzida pela destilação do mosto da cana-de-açúcar fermentado, muito apreciada por possuir aroma e sabor característicos, conquistando cada vez mais apreciadores de diferentes lugares. Durante o processo fermentativo, é originada a maioria dos compostos secundários, responsáveis pelo buquê da cachaça. A bebida produzida por fermentação espontânea poderá exibir certa variabilidade química e sensorial, principalmente, se estiver presente diversas espécies e linhagens de leveduras, ao passo que a bebida produzida por linhagens de levedura selecionada torna-se uma alternativa, levando à produção de uma bebida padronizada. Entre os contaminantes da bebida, encontra-se o carbamato de etila, altamente tóxico e com potencialidades carcinogênicas. O envelhecimento é uma etapa da produção que tem possibilitado aos produtores agregar valor ao produto final, devido às alterações na composição química, aroma, sabor e cor da bebida, destacando-se o carvalho, que é a madeira mais utilizada para essa finalidade. Objetivou-se neste estudo analisar a qualidade físico-química e a presença do carbamato de etila em cachaças produzidas por diferentes tipos de fermentação, além de realizar um acompanhamento desses parâmetros durante o armazenamento dessas bebidas. Em todos os tratamentos, foram observadas importantes alterações químicas nas bebidas, ao longo do período de armazenamento. O armazenamento da bebida, tanto em tonel de carvalho quanto em recipiente de vidro, influenciou o aumento da concentração do carbamato de etila, estando sua concentração, ao longo do período de monitoramento, muito inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação para esse composto. Observou-se que as cachaças que continham farelo de arroz como nutrientes na fermentação foram as que apresentaram os maiores teores de carbamato de etila, antes e após o armazenamento das bebidas.

Palavras-chave: Aguardente de cana. Processo fermentativo. Contaminantes. Armazenamento.

ABSTRACT

The cachaça, typical Brazilian liquor, is produced by the distillation of the fermented sugar cane wort, and much appreciated for its characteristic aroma and flavor, gaining more and more liquor lovers from different locations. During the fermentation process, most of the secondary components, responsible for the cachaça's flavor, are produced. The beverage produced by the spontaneous fermentation may exhibit chemical and sensorial variability, especially if many yeast species and lineages are present, while the beverage produced by selected yeast lineages is an alternative, leading to the production of a standardized beverage. Among its contaminants, is the ethyl carbamate, which is highly toxic and presents carcinogenic potential. Aging is a production stage which has allowed the producers to aggregate value to the final product due to the alterations in the chemical composition, aroma, flavor and color of the beverage, highlighting the oak, wood most used for this end. The objectives of this study were to analyze the physical-chemical quality and the presence of ethyl carbamate in cachaças produced by different types of fermentation, in addition to accompanying these parameters during the storage of these beverages. In all treatments we observed important chemical alterations along the storage period. Whither in oak barrels or glass recipient, storage influenced the increase in the concentration of ethyl carbamate, given that its concentration, at the beginning of the monitoring period, was largely inferior to the maximum concentration established by legislation observed that the cachaças containing rice meal as nutrient in the fermentation were those which presented the highest contents of ethyl carbamate before and after storing the beverages.

Keywords: Sugar cane spirit. Fermentative process. Contaminants. Storage.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Fluxograma do processo produtivo da cachaça de alambique | 21 |
| Figura 2 | Equação simplificada do processo fermentativo..... | 25 |
| Figura 3 | Fórmula estrutural (a) e molecular (b) do CE..... | 41 |
| Figura 4 | Formação do carbamato de etil xantila por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas | 43 |
| Figura 5 | Principais precursores do CE em bebidas alcoólicas..... | 46 |
| Figura 6 | Glicosídeos cianogênicos encontrados no centeio e trigo (a) e na mandioca, aveia e cereais (b)..... | 49 |
| Figura 7 | Reações envolvidas na análise de ésteres..... | 58 |
| Figura 8 | Reações envolvidas na determinação dos aldeídos..... | 59 |
| Figura 9 | Reações envolvidas na determinação dos álcoois superiores totais..... | 60 |
| Figura 10 | Reação envolvida na análise de furfural..... | 61 |
| Figura 11 | Reações envolvidas na determinação de metanol..... | 62 |
| Figura 12 | Reação envolvida na análise do cobre..... | 63 |
| Figura 13 | Graduação alcoólica em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula comparação dentro de cada mês e a minúscula comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 73 |
| Figura 14 | Avaliação da acidez volátil em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem | |

| | | |
|-----------|---|----|
| | significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 77 |
| Figura 15 | Análise de álcoois superiores em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula comparação dentro de cada mês e a minúscula comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 82 |
| Figura 16 | Análise de ésteres em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 85 |
| Figura 17 | Análise de aldeídos em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 88 |
| Figura 18 | Análise de furfural em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 91 |
| Figura 19 | Análise de cobre em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias | |

| | | |
|-----------|---|-----|
| | seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 94 |
| Figura 20 | Análise de extrato seco em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott..... | 96 |
| Figura 21 | Cromatograma da solução-padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: 160,0 µg L ⁻¹ | 98 |
| Figura 22 | Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida por levedura selecionada, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)..... | 103 |
| Figura 23 | Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida com fubá de milho, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)..... | 104 |
| Figura 24 | Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida com farelo de arroz, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)..... | 105 |
| Figura 25 | Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida com fubá de milho + farelo de arroz, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)..... | 106 |
| Figura 26 | Cromatograma da cachaça produzida por levedura | |

| | | |
|-----------|--|-----|
| | selecionada, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)..... | 110 |
| Figura 27 | Cromatograma da cachaça produzida com fubá de milho, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)..... | 111 |
| Figura 28 | Cromatograma da cachaça produzida com farelo de arroz, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE).... | 112 |
| Figura 29 | Cromatograma da cachaça produzida com fubá de milho + farelo de arroz, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)..... | 113 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|-----|
| Tabela 1 | Quadro dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para cachaça e aguardente de cana (BRASIL, 2005b)..... | 35 |
| Tabela 2 | Fermentação utilizando levedura selecionada (LNF - CA11) | 53 |
| Tabela 3 | Fermentação utilizando fubá de milho..... | 54 |
| Tabela 4 | Fermentação utilizando farelo de arroz..... | 55 |
| Tabela 5 | Fermentação utilizando fubá de milho + farelo de arroz..... | 56 |
| Tabela 6 | Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila..... | 66 |
| Tabela 7 | Resultados correspondentes às análises físico químicas das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” * das bebidas produzidas com levedura selecionada, fubá de milho, farelo de arroz e fubá de milho + farelo de arroz..... | 70 |
| Tabela 8 | Valores de carbamato de etila referente ao caldo de cana, mosto fermentado, frações da bebida e ao vinhoto, dos quatro experimentos realizados..... | 100 |
| Tabela 9 | Resultados da análise cromatográfica de CE referente aos seis meses de armazenamento em carvalho e vidro das frações “corações” dos quatro experimentos realizados..... | 108 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------|--|
| CE | Carbamato de etila |
| CV | Coefficiente de Variação |
| DAD | Diode Array Detector |
| DIC | Delineamento Inteiramente Casualizado |
| DMAB | Dimetilaminobenzaldeído |
| FID | Flame Ionization Detector |
| FLD | Fluorescence Detector |
| GC | Gas Chromatography |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IARC | International Agency For Research On Cancer |
| IBRAC | Instituto Brasileiro da Cachaça |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MOE's | Margin of Exposure |
| NEPA | Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação |
| PIQ's | Padrões de Identidade e Qualidade |
| SEBRAE | Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas |
| SIAMIG | Associação das Indústrias Sucroenergéticas do Estado de Minas Gerais |
| UFLA | Universidade Federal de Lavras |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas |
| % v/v | Porcentagem de um líquido compreendido em outro |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 18 |
| 2.1 | Aspectos gerais da cachaça..... | 18 |
| 2.2 | Definições: cachaça e aguardente de cana..... | 19 |
| 2.3 | Processo produtivo da cachaça..... | 20 |
| 2.3.1 | Matéria-Prima..... | 22 |
| 2.3.2 | Fermentação..... | 24 |
| 2.3.3 | Destilação..... | 30 |
| 2.3.4 | Armazenamento/ envelhecimento..... | 33 |
| 2.4 | Compostos secundários e contaminantes presentes na aguardente..... | 34 |
| 2.4.1 | Carbamato de etila | 40 |
| 2.4.2 | Formação e mecanismos do CE..... | 45 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 52 |
| 3.1 | Produção e obtenção das amostras..... | 52 |
| 3.2 | Análises físico-químicas..... | 57 |
| 3.2.1 | Teor alcoólico..... | 57 |
| 3.2.2 | Acidez volátil..... | 58 |
| 3.2.3 | Ésteres..... | 58 |
| 3.2.4 | Aldeídos..... | 59 |
| 3.2.5 | Álcoois superiores totais..... | 59 |
| 3.2.6 | Furfural..... | 60 |
| 3.2.7 | Metanol..... | 61 |
| 3.2.8 | Extrato seco..... | 62 |
| 3.2.9 | Cobre..... | 63 |
| 3.3 | Análises cromatográficas das cachaças..... | 64 |
| 3.3.1 | Condições cromatográficas..... | 64 |
| 3.3.2 | Derivação do padrão de carbamato de etila..... | 64 |
| 3.3.3 | Derivação das amostras..... | 65 |
| 3.3.4 | Condições cromatográficas..... | 65 |
| 3.3.5 | Limite de detecção (LD)..... | 67 |
| 3.3.6 | Limite de quantificação (LQ)..... | 67 |
| 3.3.7 | Delineamento experimental..... | 68 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 69 |
| 4.1 | Análises físico-químicas..... | 69 |
| 4.2 | Análises cromatográficas..... | 97 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 116 |
| | REFERÊNCIAS..... | 117 |

1 INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida fermento-destilada cuja origem vem desde o tempo da escravidão. Por ser produzida em todas as regiões do país, a bebida torna-se diferenciada pelos métodos de produção, pelas características culturais e históricas que caracterizam cada região.

Durante a produção da cachaça de alambique, todas as etapas do processo são importantes, desde o plantio da matéria-prima até a mesa dos consumidores; porém alguma dessas etapas merece uma atenção especial, como a fermentação, etapa na qual ocorre a formação do álcool etílico, CO₂ e componentes secundários (responsáveis pelo aroma típico da bebida). Ainda é muito comum os produtores utilizarem fermentos “caipira”, em que o pé de cuba é formado por micro-organismos naturalmente presentes no substrato, assim como aqueles presentes no ambiente. A constituição desse tipo de fermento varia de região para região, mas, em geral, a formação do pé de cuba consiste de uma mistura de caldo de cana diluído com fubá de milho, canjiquinha, farelo de arroz, limão, entre outros produtos adicionados, que servirão como nutrientes para as leveduras durante essa etapa.

O preparo desse tipo de fermento está sujeito a variações constantes; apesar da tradição, a cadeia produtiva da cachaça não é homogênea, a utilização de nutrientes como fubá de milho e farelo de arroz podem contribuir para a formação do carbamato de etila, uma vez que nesses tipos de nutrientes existem a presença de compostos cianogênicos, que são considerados possíveis precursores desse contaminante na bebida.

O carbamato de etila é um contaminante orgânico presente em diversos alimentos e bebidas, incluindo a cachaça, o qual merece atenção especial devido à sua toxicidade. A Legislação brasileira estabeleceu um limite máximo de 150,0 µg L⁻¹ para essa substância presente na bebida, assim, é necessário aprofundar os

estudos sobre a origem e formação do carbamato de etila nas diversas etapas da produção, uma vez que pesquisas nessa área ainda encontram-se insuficientes.

Uma alternativa que vem sendo empregada pelos produtores é a utilização de cepas de leveduras selecionadas, para a produção do fermento, permitindo aos produtores um maior controle na qualidade e padronização da bebida.

Diante do exposto, no presente trabalho objetivou-se realizar um acompanhamento periódico da qualidade físico-química e do perfil cromatográfico (em relação aos teores de carbamato de etila) no processo de produção da bebida, na etapa de fermentação (utilizando de diferentes tipos de fermentações) e no armazenamento da cachaça.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cachaça

A produção de cachaça baseia-se na transformação dos açúcares presentes no mosto da cana em álcool etílico, componentes secundários e dióxido de carbono, devido à ação de determinadas leveduras que catalisam essa etapa, seguida por processos de destilação, durante a qual é obtida a bebida propriamente dita (CARDOSO, 2013).

A cachaça surge juntamente com a história do Brasil no século XVI, com a vinda dos portugueses e as primeiras plantações de cana-de-açúcar. Os escravos que trabalhavam nos engenhos começaram a perceber que os restos deixados nos tachos utilizados para a fabricação de açúcares fermentavam e vaporizavam produzindo um líquido, que quando ingerido, os alegravam e animavam, fazendo-os esquecer dos maus tratos sofridos dos senhores de engenho. Atualmente a bebida, genuinamente brasileira atinge 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).

No Brasil, o mercado de bebidas alcólicas é dividido em bebidas fermentadas (cerveja e vinho) e bebidas fermento-destiladas (cachaça, uísque e vodca). 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, 2012).

A capacidade de produção instalada da bebida no país é de 1,2 bilhão de litros por ano. Atualmente, existem no mercado nacional cerca de 40.000 produtores, com 4000 marcas. 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 (IBRAC, 2013a). Internacionalmente, menos de 1% da produção é exportada, a cachaça é comercializada para mais de 60 países. Em 2012, 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, 2013 b).

2.2 Definições: cachaça e aguardente de cana

O Decreto Federal 4.851 de 2003, baseado na portaria 371 do Decreto original n° 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 n° 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⁻¹, expressos em sacarose. **Cachaça** é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica entre 38% e 48% v/v a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares em até 6,0 g L⁻¹, expressos em sacarose (BRASIL, 2005 a).

2.3 Processo produtivo da cachaça

No processo produtivo da cachaça de alambique, têm-se as seguintes etapas: colheita da matéria-prima (cana-de-açúcar), moagem, 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.

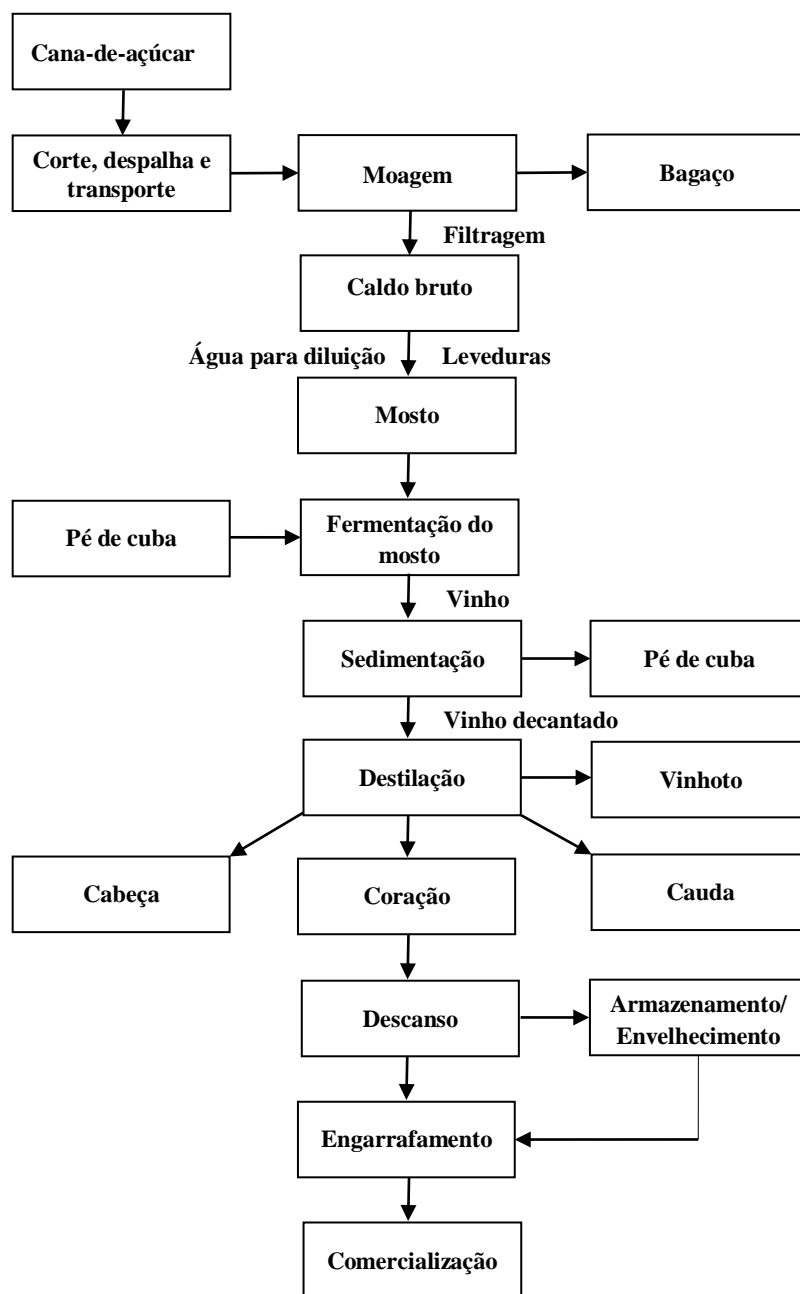


Figura 1 Fluxograma do processo produtivo da cachaça de alambique
Fonte: Cardoso, 2013.

2.3.1 Matéria-prima

A matéria prima utilizada para produção de cachaça é a cana-de-açúcar. Relatos históricos datam que a cana-de-açúcar é conhecida pelas mais antigas civilizações, sendo as principais espécies conhecidas com origem na Oceania (Nova Guiné) e Ásia (Índia e China) (ANDRADE 2013; SIAMIG, 2013). 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 (SIAMIG, 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 escolha das variedades de cana-de-açúcar para a produção de aguardentes de alambique é feita levando em consideração os principais fatores que influenciam a qualidade e a produtividade da matéria-prima, que são: local de plantio, ambiente, pragas, doenças, variedade e planejamento agrícola. Ao longo do ano, as condições climáticas irão influenciar o desenvolvimento, já que a planta precisa encontrar condições de temperatura e umidade adequadas que permitam um desenvolvimento suficiente durante a fase vegetativa, seguida de um período com restrição hídrica e/ou térmica para forçar o repouso vegetativo e o enriquecimento em sacarose na época do corte (CASTRO et al., 2009a, MARTINI et al., 2011; ANDRADE, 2013).

Quantitativamente, 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 moagem de 1 tonelada de colmos gera um rendimento de aproximadamente 60 a 80 litros de bebida, o bagaço, sub produto da produção da cachaça, após seco, pode ser queimado nas caldeiras, e a vinhaça, aplicada à cana soca ou usada para alimentação animal (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 pouco 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).

A queima prévia do canavial ocasiona danos não só na produtividade da bebida, mas também nas características 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, 2012).

Outro fator a considerar é que o intervalo entre o corte e a moagem não seja superior a 48 horas. O ideal é que a cana colhida seja usada no mesmo dia, pois a matéria-prima pode sofrer deterioração fisiológica, resultante da transpiração e respiração, causando depreciação do produto e favorecendo a ação microbiológica. É importante os colmos estarem 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 (SEBRAE, 2012; CARDOSO, 2013).

2.3.2 Fermentação

A fermentação é o processo de transformação do açúcar em etanol e CO₂, um processo anaeróbico catalisado por enzimas, realizado principalmente por leveduras (Figura 2). Na produção de cachaça, a *Saccharomyces cerevisiae* é a predominante, sendo responsável pela maior parcela da fermentação. Além disso, metabólitos secundários são produzidos, como glicerol, ácidos orgânicos, acetoína, álcoois superiores, acetaldeído, butilenoglicol etc. O cheiro e o sabor característico na cachaça de alambique devem-se à presença desses metabólitos e de outras substâncias voláteis encontrados na mistura complexa da bebida (SCHWAN; DIAS; DIAS, 2013; VIDAL et al., 2013).

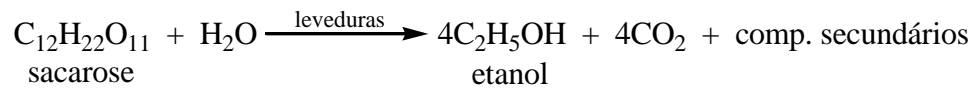


Figura 2 Equação simplificada do processo fermentativo

Ao iniciar o processo fermentativo, é desejável uma fermentação sadia, regular, e que apresente altos rendimentos. Com a finalidade de obter essas características, realiza-se o chamado “pé de cuba”, “inóculo”, “pé de fermentação” ou “levedo”. Esse processo consiste na introdução de quantidades grandes de fermentos de qualidade reconhecidamente boa ao caldo a ser fermentado, podendo o pé de cuba ser selvagem ou com levedura selecionada (SCHWAN; DIAS; DIAS, 2013).

A utilização de leveduras selvagens, ou seja, aquelas trazidas do campo com a própria cana, e presentes em equipamentos utilizados na moagem da cana de açúcar, pode interferir de maneira negativa na qualidade do produto final. A maioria dos produtores que fabrica cachaça de alambique faz a produção do inóculo de forma natural, utilizando-se do fermento caipira, que consiste na utilização de leveduras fermentativas presentes naturalmente no meio ambiente, podendo esse fermento ser preparado de diferentes formas, estando presente nesse tipo de fermento farelo de arroz, fubá de milho e, caso necessário, limão, laranja, para diminuir o pH do mosto (SCHWAN et al., 2001; CAMPOS et al., 2010).

A adição de farelo de arroz e fubá junto ao caldo de cana no processo fermentativo tem a finalidade de fornecer nutrientes para um bom desenvolvimento da fermentação, afetando a velocidade e a multiplicação da levedura, porém, é necessário que ocorra uma quantidade adequada da presença de nutrientes ao mosto, pois se presentes em quantidades insuficientes ou

exageradas, irão refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo (SOUSA; MONTEIRO, 2011).

O farelo, obtido após o descascamento do arroz, apresenta aproximadamente de 5 a 8% do grão. Nele estão presentes fibras, aminoácidos e sais minerais, como ferro, fósforo e magnésio. Entre os nutrientes, o farelo de arroz contém entre 11 e 13% de proteína bruta, aproximadamente 11,5% de fibras e quantidades consideráveis de lipídios; além disso, esse possui componentes antioxidantes e funcionais, a exemplo, o orizanol e tocotrienol. (FEDDERN; FURLONG; SOARES, 2007).

SILVEIRA e FURLONG (2007) procuraram caracterizar compostos nitrogenados presentes em biomassa fúngica produzida por fungos *Rhizopus* sp. e *Aspergillus oryzae*, tendo como substratos farelo de arroz desengordurado e farelo de trigo. Foi determinado o conteúdo proteico de aminoácidos totais, aminoácidos digeríveis e de metionina (aminoácido sulfurado) disponíveis. Os maiores aumentos nos teores proteicos dos farelos foram observados com o micro-organismo *Rhizopus* sp. Os teores de aminoácidos totais, digeríveis e metionina disponíveis foram aumentados nos farelos fermentados com a utilização desses fungos.

O milho comum apresenta qualidade proteica inferior à do arroz e uma limitação em alguns aminoácidos essenciais, como a lisina e triptofano (NAVES et al., 2004; CASTRO et al., 2009b). No processamento do milho por meio da moagem a seco, os melhores produtos são aqueles gerados após o processo de retirada do gérmen; antes da moagem, tem a obtenção da canjica e o canjição. No procedimento de separação por granulometria que é realizado depois de moído, são obtidos produtos mais finos, como o fubá, que apresenta menores valores comerciais (CASTRO et al., 2009b). Em trabalhos realizados pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), observou-se que, em 100 gramas de fubá

de milho, encontram-se proteínas (7,2 g), lipídeos (1,9 g), carboidratos (78,9 g), além de ácidos graxos saturados (0,4 g), monoinsaturados (0,9 g) e poli-insaturados (1,3 g) (NEPA, 2011).

Cleto, Ravaneli, Mutton. (2009), estudando o efeito da ação do ácido sulfúrico e fubá de milho em leveduras e bactérias no processo de fermentação, bem como na composição da cachaça, observaram que a adição do ácido sulfúrico no pé de cuba transferiu a acidez para o vinho, não influenciando a viabilidade das leveduras, rendimento e composição da bebida. A acidificação do meio controlou as bactérias lácticas no pé de cuba. Já a adição do fubá aumentou a concentração de bactérias lácticas ao final do processo fermentativo. Os autores concluíram que a adição de ácido e fubá de milho ao mosto fermentado não influenciaram a composição e o rendimento da cachaça e que a adição de ambos na fermentação provoca um aumento e diminuição, respectivamente, na população de bactérias lácticas; além disso, as destilarias que trabalham de forma adequada não precisam usar fubá de milho e nem aditivos ácidos na fermentação.

A fermentação pode ser dividida em três fases: a fermentação inicial ou pré-fermentação, é a fase em que o mosto tem uma quantidade de O₂ necessária para multiplicação das leveduras, têm-se o crescimento no número de células dos micro-organismos, e os teores de açúcares estão próximos de 5 °Brix. Nessa etapa, na maioria das vezes é usado o fermento caipira ou então o inóculo é preparado com a utilização de fermentos prensados usados na panificação. (SCHWAN; DIAS; DIAS, 2013).

A segunda fase, denominada fermentação principal ou tumultuosa, ocorre com o fim de O₂ no mosto, caracterizado pela diminuição da multiplicação celular das leveduras, que começam a transformar os açúcares em álcool e CO₂; o caldo deve apresentar teores de açúcares próximos de 14 e 16 °Brix. Concentrações acima de 16 °Brix resultam em um processo fermentativo

mais lento e incompleto. Nessa fase, ocorre a formação de compostos secundários (álcoois superiores, aldeídos e ésteres) (SCHWAN; DIAS; DIAS, 2013).

Na última fase, conhecida de fermentação final, lenta ou pós-fermentação, cessa a liberação de CO₂; como consequência, ocorre o desaparecimento de bolhas no mosto causado pelo desprendimento de CO₂ e o retorno à temperatura ambiente com a estabilização do valor de °Brix, que tende ser zero; enfim, é o término do processo fermentativo. A média de duração do processo é de 24 horas; decorrido esse tempo, as leveduras depositam-se no fundo da dorna. O sobrenadante, onde o Brix deve ser igual a zero, é retirado e levado para destilação. As leveduras são recicladas com adição de um novo mosto diluído a uma temperatura em torno de 30 °C, iniciando novamente o processo (SCHWAN; DIAS; DIAS, 2013).

Ao usar o inóculo com leveduras selvagens, como é feito pela maioria dos produtores da cachaça de alambique, podem ocorrer fermentações totalmente aleatórias, devido à presença de diferentes espécies de linhagens de leveduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Pichia heimi*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia subpelliculosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia methanolica*, and *Saccharomyces cerevisiae*) (DUARTE et al., 2011; ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012). A realização de um pé de cuba com linhagens de leveduras selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* tem garantido certa padronização na qualidade da bebida, pois essas apresentam capacidade de dominar a fermentação e diminuir as contaminações bacterianas (PATARO et al., 2002; SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011). Outras características dessas leveduras é que elas aceleram o início do processo fermentativo, reduzem as concentrações de açúcares residuais, aumentam a produtividade do processo, diminuem a competição por nutrientes essenciais e contribuem na sua qualidade, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de álcoois

superiores (ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012; DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2012).

Silva et al. (2009a) avaliaram compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências, com objetivos de produzir cachaças em escala de laboratório a partir de leveduras isoladas de alambiques de diferentes regiões de Minas Gerais, bem como avaliar e comparar a composição química dessas em relação a cachaças de marcas comerciais. Eles verificaram que as cachaças produzidas com diferentes leveduras, comparadas quimicamente e sensorialmente com aguardentes comerciais, apresentaram diferenças bastante variáveis dos compostos analisados ao final da fermentação, (acetaldeído, acetato de etila, álcool metílico, álcool propílico, álcool isobutílico, álcool isoamílico, furfural e ácido acético). Além disso, os rendimentos em etanol e a produção de ácido acético no processo fermentativo variaram bastante, demonstrando a influência de diferentes linhagens de levedura no processo fermentativo e na composição da cachaça.

Em seus estudos, Souza et al. (2012) constataram os efeitos do uso de leveduras selecionadas na produção de cachaça. Os autores observaram um aumento na concentração do álcool superior (isoamílico) e dos ésteres (octanoato e decanoato de etila), melhorando a qualidade da bebida.

Avaliando características como a dominância e persistência de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo fermentativo para a produção de cachaça de alambique, e analisando os componentes microbianos produzidos nesse processo, Campos et al. (2010) estudaram lotes das cepas UFLA CA 116, UFLA CA 1162 e UFLA CA 1183. Os autores observaram que a concentração de aldeídos, ésteres, metanol, álcool e ácidos voláteis nas bebidas finais estavam dentro dos limites permitidos. Além disso, eles concluíram que as cepas UFLA CA 1162 e UFLA CA 116 isolados de *S. cerevisiae* são as mais indicadas para a produção de cachaça de alambique.

Diversos fatores são levados em conta quando se utiliza a seleção de linhagens de *Saccharomyces*. Entre esses, alguns estão relacionados às propriedades fisiológicas específicas, como início rápido da fermentação, boa taxa de fermentação; baixo requerimento de vitaminas, ácidos graxos e oxigênio; tolerância à alta concentração de etanol; tolerância à alta pressão osmótica e a altas temperaturas; fermentação completa do caldo; não produzir espuma excessiva; ser eficiente na utilização dos açúcares; produção mínima de SO₂; não produzir ácido acético; produzir componentes do aroma, a exemplo, ácidos orgânicos e glicerol, alto rendimento de álcool e boa produção de etanol e relativa resistência a baixos valores de pH (GOMES et al., 2009; SILVA et al., 2009b; SCHWAN; DIAS; DIAS, 2013).

2.3.3 Destilação

A destilação consiste, sob uma determinada temperatura, na passagem de substâncias ou misturas da fase líquida para a fase gasosa; em seguida, essas são resfriadas, retornando à fase líquida. Trata-se de separações químicas realizadas por um processo físico (DIAS, 2013). De acordo com a legislação vigente, a destilação da cachaça deve ser efetuada de forma que o produto obtido preserve o aroma e o sabor dos principais componentes contidos na matéria-prima e naqueles formados durante a fermentação (BRASIL, 2005a).

Na produção de aguardente industrial, elas são destiladas 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).

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 processo de destilação é uma etapa que também está relacionada com a qualidade da bebida. Nessa etapa, ocorre a concentração do etanol presente no vinho (mosto) e dos componentes do vinho (etanol, água e congêneres, como ácidos, alcoóis, ésteres, compostos carbonilados, acetais, fenóis, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, compostos sulfurados e açúcar), que apresentam diferentes graus de volatilidade. Assim, é possível realizar a separação por destilação, onde esses compostos serão concentrados, caracterizando e qualificando a bebida. Os compostos mais voláteis são destilados na primeira fração da destilação, denominada de “cabeça”; em seguida, tem-se a fração “coração” e os compostos menos voláteis saem na última fração da destilação denominada de “cauda” ou “água fraca” (SCANAVINI; CERIANI; MEIRELLES, 2012; CARDOSO, 2013).

A destilação influenciará as características sensoriais do produto final devido às alterações ocorridas nas quantidades de compostos voláteis, e pelas

reações químicas envolvidas no aquecimento. Na primeira fração, o teor alcoólico varia entre 55 e 65% em volume, a 20°C, sendo coletados 5 a 8% do volume total do destilado. Essa fração contém altos teores de componentes secundários que são indesejáveis em termos quantitativos. Além disso, substâncias, como metanol, acetaldeído, estão presentes; portanto, essa fração deve ser desprezada. A segunda fração é a parte da bebida a ser comercializada; é a cachaça propriamente dita, corresponde de 75 a 80% do volume destilado; é recolhida até que o teor alcoólico atinja de 1,0 a 1,5 °GL acima do que é estabelecido para ser engarrafada, a fim de compensar perdas futuras, caso deseje armazenar em barris ou envelhecer. É importante assegurar que essa fração apresente uma baixa concentração de substâncias tóxicas e compostos que diminuam a qualidade sensorial da bebida, bem como apresente concentrações aceitáveis de etanol e de compostos que sejam favoráveis ao sabor e aroma da cachaça. A terceira fração corresponde 8 a 10% do volume total do destilado, devendo ser descartada (CARDOSO, 2013).

O resíduo da destilação conhecido como vinhoto ou vinhaça é pobre em etanol e rico em água, pode ser reutilizado como repositores de minerais e água na fertilização do solo bem como na alimentação animal (SERAFIM et al., 2011; DIAS, 2013).

Terminada a destilação, a cachaça ainda não está pronta para o consumo, pois apresenta um buquê irregular; portanto, há necessidade de um período de descanso de dois a três meses para completar sua qualidade, devendo ser guardada em recipientes apropriados, em local protegido, evitando altas temperaturas (CARDOSO, 2013).

2.3.4 Armazenamento/ envelhecimento

Após a etapa de destilação, a cachaça pode ser armazenada ou envelhecida em tonéis de madeira. O envelhecimento não é uma etapa obrigatória do processo; porém, ela se torna importante na produção de bebidas destiladas, agregando valor econômico e influenciando a qualidade, pois altera acentuadamente a composição química, aroma, sabor e cor dessas bebidas (CATÃO et al., 2011).

O armazenamento da cachaça deve ser feito em recipientes fabricados com madeira, aço inoxidável ou aço carbono isolado internamente, de maneira que não permita a contaminação do produto; além disso, as áreas de estocagem devem obedecer à legislação vigente, quanto aos padrões de umidade e temperatura, entre outros (INMETRO, 2005). É importante que a bebida recém-distilada seja estocada, amaciada, armazenada ou maturada por um período geralmente de três a seis meses em tonel de madeira o que é necessário para suavizar o aroma e o sabor (MAIA; CAMPELO, 2006).

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, 2005a).

Os tonéis de madeira feitos para o envelhecimento e armazenamento contribuem qualitativamente e quantitativamente com substâncias adicionadas à bebida, variando de acordo com o tipo de madeira e com as substâncias químicas nelas contidas, tornando a cachaça mais suave e agradável (ALCARDE;

SOUZA; BELLUCO, 2010; CATÃO et al., 2011). Óleos voláteis, compostos fenólicos, açúcares, glicerol, ácidos orgânicos não voláteis, substâncias tânicas são os principais compostos extraídos pelos destilados da madeira do tonel, os quais modificam o sabor, o aroma e a coloração da bebida. (CARDELLO; FARIA, 1998; ANJOS et al., 2011b).

2.4 Compostos secundários e contaminantes presentes na aguardente

Durante o processo fermentativo, ocorre a transformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono, outros componentes são formados em pequenas quantidades denominados de produtos secundários (CARDOSO, 2013).

Com a crescente importância e participação na economia do país tanto no mercado interno e externo, cada vez mais tem-se exigido que o processo de fabricação de aguardente seja baseado em práticas criteriosamente determinadas para obtenção de um produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais. A legislação estabelecida pelo MAPA determina os seguintes limites para os compostos secundários e contaminantes presentes em aguardentes de cana/ cachaça (Tabela 1):

Tabela 1 Quadro dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para cachaça e aguardente de cana (BRASIL, 2005b).

| Componente | Unidade | Limites |
|-------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| Teor de etanol em aguardente | % em v/v de etanol a 20 °C | 38 - 54 |
| Teor de etanol em cachaça | % em v/v de etanol a 20 °C | 38 - 43 |
| Sacarose em açúcar cristal, | g/L | 6,0 - 30 |
| Acidez volátil em ac. acético | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 150 |
| Ésteres, em acetato de etila | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 200 |
| Aldeídos, em aldeído acético | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 30 |
| Soma de furfural e HMF | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 5 |
| Álcoois superiores* | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 360 |
| Congêneres** | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 200-650 |
| Álcool metílico | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 20 |
| Cobre | mg L ⁻¹ | 5 |
| Chumbo | µg L ⁻¹ | 200 |
| Arsênio | µg L ⁻¹ | 100 |
| Extrato seco | g L ⁻¹ | 6*** |
| Carbamato de etila | µg L ⁻¹ | 150 |
| Acroleína | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 5 |
| Butanol-2 | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 10 |
| Butanol-1 | mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro | 3 |

*Álcoois superiores = (isobutílico + isoamílico + propílico),

HMF = hidroximetilfurfural,

**Congêneres = (Acidez volátil + Ésteres + Aldeídos + Furfural + Álcoois Superiores),

***Aguardente de cana e cachaça “adoçada” = máximo 30,0 g L⁻¹

Fonte: BRASIL, 2005b.

O ácido acético tem sido quantitativamente o principal componente da fração ácida das aguardentes. A alta acidez presente em aguardentes pode ser atribuída à contaminação da matéria-prima ou do próprio mosto fermentativo por bactérias acéticas e outras, fazendo com que parte do substrato sofra fermentação acética, elevando-se, assim, a acidez e diminuindo o rendimento da produção de etanol. Além das más condições higiênicas que geram contaminações por bactérias acéticas e lácticas, fatores que têm contribuído para uma acidez volátil elevada são o tempo e as condições de estocagem da cana no período compreendido entre a colheita e a moagem (CARDOSO, 2013). Além disso, na produção da cachaça durante o processo fermentativo, deve-se evitar a areação do mosto, uma vez que o aumento de oxigênio faz com que o levedo transforme o açúcar em ácido acético, em vez de etanol (CARDOSO, 2013).

Os aldeídos podem ser originados durante o processo de fermentação alcoólica pela ação das leveduras em estágios preliminares no processo fermentativo. O principal aldeído formado é o acetaldeído, que tende a desaparecer no final pela oxidação a ácido acético. Esses são compostos muito voláteis, de odor penetrante, que afetam o aroma das bebidas alcólicas; durante a destilação, encontram-se presentes em maiores concentrações na fração “cabeça”, e apenas pequenas concentrações compõem a bebida na fração “coração” (ALCARDE et al., 2009; CARDOSO, 2013).

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 (CARDOSO, 2013).

O furfural e o hidroximetilfurfural são indesejáveis na cachaça, sendo resultados da decomposição química de carboidratos. A temperatura elevada 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).

Ao avaliar a presença desse contaminante em aguardentes de cana queimada e não queimada oriundas de um mesmo processo de produção, Masson et al. (2007) observaram aumento dos valores de furfural para as aguardentes produzidas a partir de cana queimada, em relação às aguardentes onde foram usadas cana sem queima prévia. Assim, para a produção de cachaça, o ideal é a utilização de cana, sem que essa passe por um processo de queima.

Determinando a concentração de furfural e hidroximetil furfural em 12 aguardentes envelhecidas em diferentes madeiras na região sul de Minas Gerais, Zacaroni et al., 2011 observaram que 83,33% das amostras de cachaças apresentavam níveis superiores desses contaminantes. Em 2012, estudando 54 amostras de cachaça em todo o estado de Minas Gerais, Cardoso et al. (2012) verificaram que apenas uma amostra encontrava-se com valores acima do exigido pela legislação vigente, que é $5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool anidro, mostrando um maior cuidado dos produtores em relação à queima e requeima da cana-de-açúcar antes do corte.

O acetato de etila, proveniente do processo fermentativo, é o principal éster responsável pelo aroma típico, agradável, pungente e suave, que lembra frutas maduras quando em quantidades limitadas. Quando em excesso, confere à aguardente um sabor enjoativo e indesejável. 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).

A formação desses compostos é dependente de fatores como o tipo e quantidade de fermento, temperatura, areação e a qualidade do caldo. Pereira et al. (2003) citam que a formação do acetato de etila pode ser favorecida pelo abaixamento da temperatura do mosto durante o processo de fermentação. Procedimentos, como adição de água aquecida ao caldo para diminuição do °Brix ou mesmo aquecimento do caldo de cana, muitas vezes, antes de ser transferido às dornas de fermentação, podem contribuir para minimizar a sua formação.

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 (MIRANDA et al., 2008; CARDOSO, 2013).

Cardoso et al. (2012) estudando 54 amostras de cachaças produzidas no sul do estado de Minas Gerais, verificaram que nenhuma delas continha valores acima dos exigidos pela legislação para ésteres (200 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro). Resultados semelhantes foram encontrados por Santiago et al. (2012) ao estudarem seis amostras de cachaças mineiras em diferentes madeiras. Para eles no envelhecimento, ocorre a presença de ésteres aromáticos gerados pela intercomposição de compostos fenólicos oriundos da madeira, tais como siringato de etila, valinato de etila, homovalinato de metila e o siringato de metila.

Quantitativamente, os álcoois superiores são o maior grupo de substâncias voláteis em bebidas destiladas, formados por mais de dois átomos de carbono, originados durante o processo oxidativo. Esses também podem ser provenientes das transformações dos aminoácidos durante o processo de fermentação, devido à baixa atividade das leveduras, às altas temperaturas e ao baixo pH do mosto. Os álcoois frequentemente encontrados em bebidas

alcoólicas destiladas possuem de três a cinco átomos de carbono, sendo esses conhecidos como óleo fúsel. Apresentam um odor característico de flores, e juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo buquê da aguardente. 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 últimos devem ser quantificados separadamente e possuem limites permitidos de 3 e 10 mg 100 mL de álcool anidro, respectivamente (BRASIL, 2005b).

Algumas medidas podem ser adotadas de forma que evite a formação dos álcoois superiores em excesso. Entre elas recomenda-se aos produtores a não armazenar a cana por longo período após o corte, 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).

O metanol é um álcool particularmente indesejável na aguardente, pois é originado pela degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar. A formação do metanol é acentuada quando a fermentação ocorre na presença de sucos, ou polpas de frutas ricas em pectina, tais como laranja, limão, maçã, abacaxi e outros. A molécula de pectina é um composto formado pela associação de centenas de moléculas de ácidos galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o processo de fermentação por meio de hidrólise (ácida ou enzimática). No organismo, o metanol é oxidado a ácido fórmico e, posteriormente, a CO₂, 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 (CARDOSO, 2013).

Entre os contaminantes inorgânicos encontrados nas aguardentes, os principais são os íons metálicos, como o cobre, o chumbo e o arsênio. O chumbo e o arsênio 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^{-1} (BRASIL, 2005a). 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).

2.4.1 Carbamato de etila

É um contaminante que tem despertado o interesse de estudiosos, visto que, em grandes quantidades na bebida, pode 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 3. 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 °C e de 182-184 °C, respectivamente. Encontra-se na forma de cristal incolor, inodoro, 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).

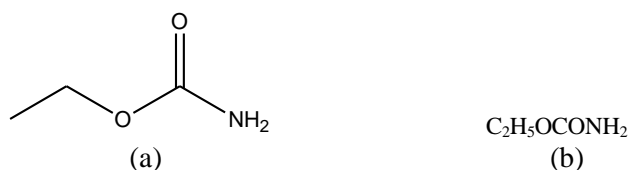


Figura 3 Fórmula estrutural (a) e molecular (b) do CE

O CE pode ser encontrado naturalmente em alimentos, bebidas fermentadas e destiladas. A ocorrência desse contaminante em bebidas alcoólicas surgiu no início de 1985, quando, no Canadá, detectaram níveis relativamente altos em aguardentes e outras bebidas (LACHENMEIER et al., 2006). Assim, as autoridades do 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).

No Brasil, a presença de carbamato de etila em aguardentes de cana / cachaça foi regulamentada pela Instrução Normativa N° 13, de 20 de junho de 2005 (BRASIL, 2005a), sendo o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira igual a $150,0 \mu\text{L}^{-1}$.

Na produção de cachaça, a sua formação pode ocorrer antes, durante e depois do processo de destilação, incluindo o armazenamento da bebida, podendo ter um aumento potencial tanto na bebida armazenada em recipientes de madeira (tonéis) quanto armazenada em vidros (ANJOS, et al., 2011a). A formação do CE em etapas posterior à destilação é dependente da concentração, temperatura, pH, luz e tempo de armazenamento (NAGATO et al., 2003).

Estudando a correlação e a contribuição do cobre para o aparecimento de carbamato de etila em cachaças, Aresta, Boscolo e Franco (2001) relataram o papel do metal na oxidação do cianeto inorgânico para cianato e a conversão de cianato ou ureia em carbamato de etila. Nesse trabalho; os autores usaram a técnica de espectroscopia de infravermelho, na qual conseguiram observar a formação de um carbonato básico de cobre $\text{Cu}(\text{OH})\text{CO}_3$, no processo de oxidação de cianeto para cianato em água / etanol. A complexação de Cu^{2+} com o cianato formado a partir da oxidação faz com que o cianeto seja mais susceptível ao ataque nucleofílico a partir de etanol, com a conversão em carbamato de etila. Comparativamente, a ureia apresentou uma contribuição menor em relação ao cianeto na formação do carbamato de etila; portanto, a ureia presente em algumas amostras de cachaça apresentou quase nenhuma influência sobre o conteúdo do contaminante. Outra questão mostrada pelos autores foi que Fe^{2+} ofereceu resultados semelhantes aos encontrados com Cu^{2+} .

O método mais utilizado e tido como oficial para determinação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas é cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). Porém alguns autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-

FLD). A derivação prévia do CE (Figura 4) permite sua detecção em diferentes matrizes, a qual vem surgindo como uma alternativa e vem sendo usada para determinação desse contaminante em cachaças. Os níveis de detecção obtidos são parecidos com os obtidos em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (ANJOS et al., 2011a ; MACHADO et al, 2012).

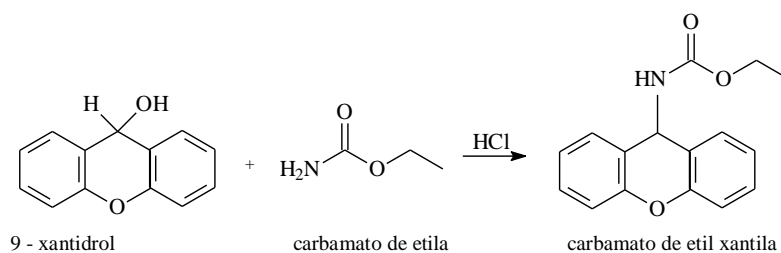


Figura 4 Formação do carbamato de etil xantila por meio da reação entre 9-xantidrol e carbamato de etila sob condições ácidas
 Fonte: ANJOS, 2011a.

Abreu et al. (2005) determinaram o CE em bebidas por diferentes métodos (HPLC-FLD e GC-MS). Os autores procuraram melhorar o conhecimento sobre a precisão e exatidão dos parâmetros do novo método proposto (HPLC-FLD), comparando o desempenho de ambos os métodos. Cinco diferentes amostras representativas de vinhos de mesa fortificados, vinhos (tinto e branco) e aguardentes de vinho foram utilizadas na análise. Apesar do baixo número de amostras, os resultados obtidos utilizando o método de HPLC-FLD foram comparáveis aos obtidos por GC-MS, enfatizando a possibilidade de usar, como rotina, um método muito mais simples para determinar CE em bebidas alcoólicas.

Machado et al. (2013) determinaram CE em cachaça produzida por alambiques de cobre utilizando HPLC- FLD. O método otimizado pelos autores apresentou excelentes resultados para os parâmetros de validação em termos de linearidade, detecção, limites de quantificação e precisão, demonstrando que o método é adequado para a análise de CE em cachaça.

Em relação à toxicidade do CE, Lachenmeier et al. (2010) observaram que ele causou em ratos um aumento dose dependente de carcinomas no fígado, pulmões, pele e estômago, além de tumores no ovário e na glândula mamária, sendo classificado no grupo 2A, pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer), como provável carcinogênico para humanos. A exposição desse composto a partir do consumo de alimentos e bebidas não alcoólicas foi estimada para humanos em 1 µg/ kg peso corporal/dia, exposição que se eleva a 5 µg/pessoa/dia, quando considerados cenários de elevado consumo de bebidas alcoólicas. Nesses casos, as margens de exposição (MOEs) correspondentes são de 16.600 e 3.125, respectivamente, representando sérios riscos a tais consumidores (SCHLATTER; DINOVI; SETZER, 2010).

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 CO₂, NH₃ e H₂O (IARC, 2010).

2.4.2 Formação e mecanismos do CE

A formação de CE em diferentes tipos de bebidas alcoólicas envolvem pelo menos cinco precursores principais, incluindo ureia, citrulina, fosfato de carbamila, compostos cianogênicos e o dietilpirocarbonato, como mostrado na Figura 5 (ZHAO et al., 2013).

Entre esses precursores, ureia, citrulina e fosfato de carbamila são acumulados principalmente por micro-organismos, tais como leveduras e bactérias de ácido láctico (BAL), ao passo que os outros dois precursores são produzidos por várias reações enzimáticas durante o processo de fermentação (ZHAO et al., 2013).

Em vinhos, o CE pode ser formado durante e depois da fermentação, e durante o processo fermentativo, as reações de formação do CE são influenciadas pelo tipo de levedura, nutrientes adicionados ao mosto, temperatura e acidez da fermentação (LABANCA; GLORIA; AFONSO, 2008; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009).

Em bebidas alcoólicas, incluindo saquê, vinho de arroz e vinho de uva, têm-se a uréia como o principal precursor do CE, sendo essa acumulada principalmente pela levedura. Nas células, a ureia vem da arginina pela degradação da arginase através do ciclo da ureia, sendo degradada em amônia e dióxido de carbono pela ação da ureia amidoliase Figura 5 (ZHAO et al., 2013).

Segundo Zhao et al. (2013), a ureia não é a fonte de nitrogênio preferida para a levedura, em relação a outras fontes existentes no meio, tais como a glutamina ou asparagina. Como a concentração de ureia acumulada nas células é alta, e é prejudicial para o fermento, ela é levada para o meio circundante. Segundo os autores Aresta; Boscolo e Franco (2001), essa é a forma mais comum e espontânea da formação do contaminante que ocorre em meio ácido, envolvendo a reação da ureia com etanol (equação 1):

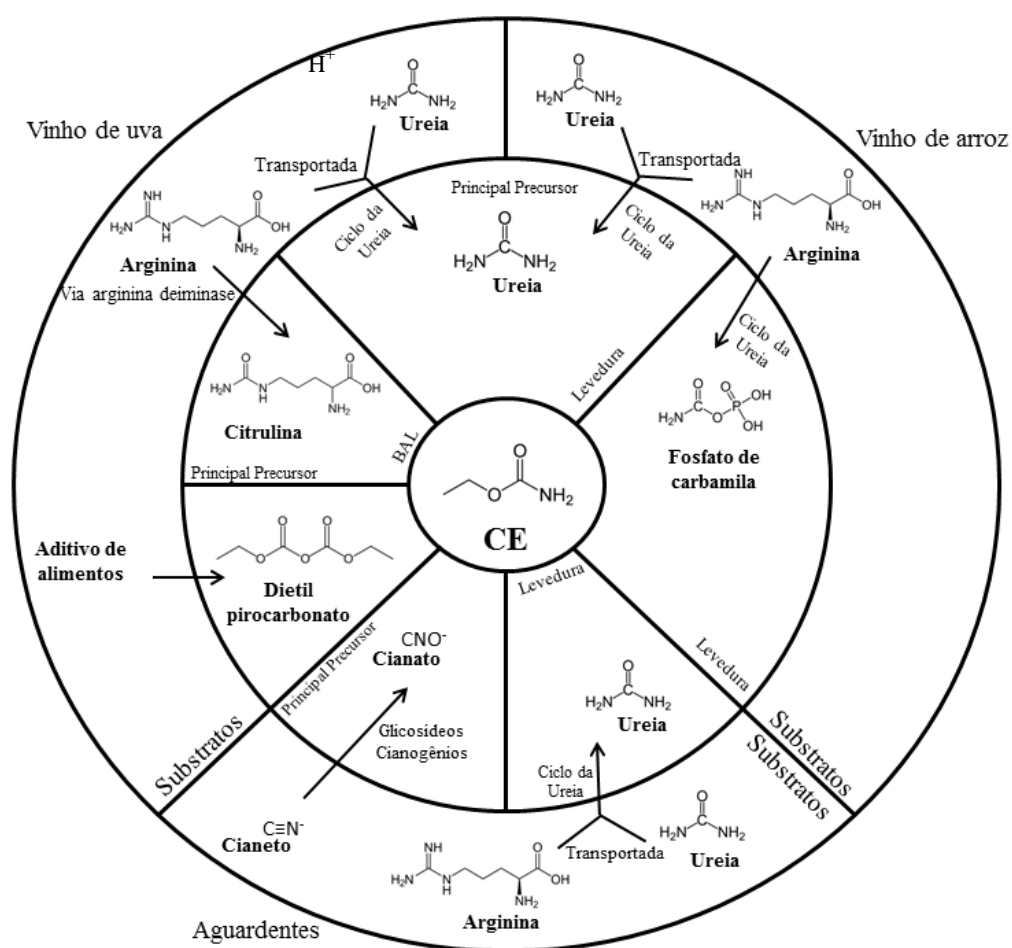


Figura 5 Principais precursores do CE em bebidas alcoólicas
 Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2013.

compostos estão presentes em bebidas alcoólicas, como o vinho e podem reagir com etanol em pH ácido, formando CE (equação 5) (NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003).



No mosto, o FC produzido pela *Saccaromyces cerevisiae* pode reagir com o etanol para formar o CE, sendo esse proveniente da síntese da arginina catalisado pela carbamila sintase (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; HASNIP et al., 2007). A formação acaba por ser favorecida pela presença de compostos nitrogenados durante o processo de destilação e por altas temperaturas, resultante do mau dimensionamento do sistema de destilação ou operação, tendo níveis de refluxo impróprios (POLASTRO et al., 2001; BRUNO et al., 2007).

A citrulina é proveniente da arginina pela ação da arginina deiminase, podendo a citrulina ser acumulada principalmente por bactérias lácticas (AZEVEDO; COUTO; HOGG, 2002; ZHAO et al., 2013) (FIGURA 5). Como a arginina é responsável por altas concentrações dos aminoácidos totais presentes no vinho, no final da fermentação alcoólica, quantidades consideráveis estarão presentes após o metabolismo das leveduras. Assim, a arginina pode ser metabolizada pelas bactérias lácticas durante a fermentação maloláctica. Pela via da arginina deiminase, a arginina acaba sendo convertida para amônia, ornitina, ATP e dióxido de carbono, seguida pela transformação de ornitina em citrulina. A citrulina é excretada no caldo de fermentação, onde pode reagir espontaneamente com etanol, formando CE. Assim como a citrulina, o fosfato de carbamila é outro intermediário presente no catabolismo de arginina, que

pode reagir com etanol, originando esse contaminante. (ROMERO et al., 2009; ZHAO et al., 2013).

Outra forma natural da formação do CE é aquela que envolve o ânion do ácido cianídrico, o íon cianeto (CN^-). Na maioria dos casos, o CE é formado a partir do cianeto pela ação enzimática e clivagem térmica dos glicosídeos cianogênicos (Figura 5) presentes em alguns vegetais, como cevada, mandioca, aveia, arroz, centeio, trigo, maçã e manga (Figura 6). Esse cianeto degradado enzimaticamente pode ser oxidado a cianato (OCN), o qual reage com o etanol para formar o CE (LACHENMEIER et al., 2005; GALINARO et al., 2011).

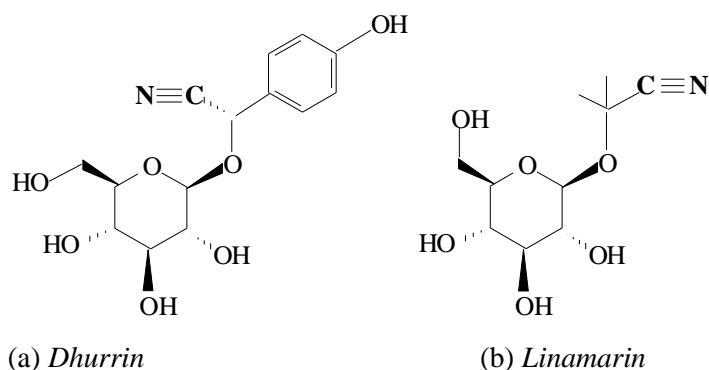
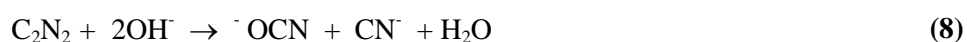
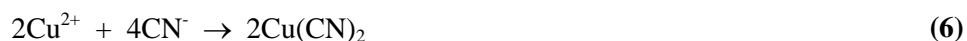


Figura 6 Glicosídeos cianogênicos encontrados no centeio e trigo (a) e na mandioca, aveia e cereais (b)

Fonte: Adaptado de Galinaro e Franco (2011).

Duas prováveis rotas propostas para formação de carbamato de etila a partir do íon cianeto foram relatadas por Mackenzie; Clyne; Macdonald. (1990) e Riachi et al. (2014). A primeira trata de um mecanismo químico em que há a formação de CE a partir de cianeto ou cianato. Essa baseia-se na complexação do cianeto com Cu^{2+} , proveniente do aparelho destilador (equação 6), seguido

pela oxidação a cianogênio (equação 7) e com subsequente desproporcionamento a cianato, que ocorre em meio básico (equação 8). O cianato pode reagir com etanol para formar carbamato de etila (equação 9). O cobre, provavelmente, é liberado a partir do aparelho de destilação, sobre a corrosão.

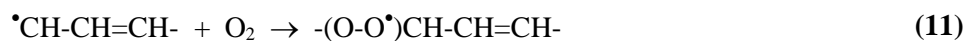


A segunda rota baseia-se na auto-oxidação induzida por radiação ultravioleta de compostos insaturados presentes nas bebidas alcoólicas, os quais produzem radicais livres que catalisam a oxidação do cianeto a cianato, como descrito nas equações 10 a 18 (ARESTA et al., 2001; RIACHI et al., 2014).

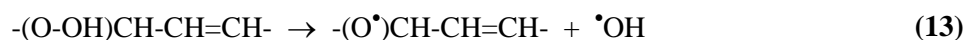
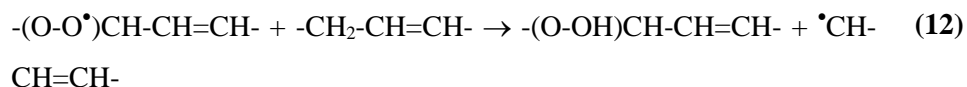
Iniciação

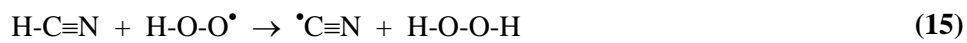


Propagação



Auto-oxidação



Formação de carbamato de etila

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produção e obtenção das amostras

As cachaças utilizadas neste trabalho foram produzidas no alambique da empresa Cachaça Artesanal João Mendes (JM), situada no município de Perdões/MG, no período da safra de 2013. A variedade de cana empregada foi a SP80-1842.

No processo fermentativo, realizaram-se quatro diferentes tipos de fermentação. O seu preparo está descrito detalhadamente nas Tabelas 2,3,4 e 5.

A primeira foi conduzida utilizando de fermento selecionando (LNF CA11) conforme descrito pelo fabricante.

Tabela 2 Fermentação utilizando levedura selecionada (LNF - CA11).

| | |
|---|--|
| Etapa 1: Determinação da quantidade de levedura a utilizar. | Em uma dorna com capacidade de 500 litros, utilizaram-se 500 gramas de fermento CA 11. |
| Etapa 2: Reidratação do fermento. | Com auxílio de um balde, adicionaram-se 5 litros de água potável, cuja temperatura foi aproximadamente 35 °C. Dissolveram-se com agitação 500g de CA-11, esperando por 30 minutos. |
| Etapa 3: Preparação do pé de cuba. | Decorridos 30 minutos, dobrou o volume adicionando, 5 litros de garapa para fermentar a 8 °Brix, cuja temperatura foi de aproximadamente 35°C. Esperou-se até o abaixamento do °Brix dos 10 litros para 2 °Brix. Em seguida, adicionou-se 20 litros de garapa, a 10 °Brix e 35 °C, sob aeração. Aguardou-se até que ocorresse o abaixamento para 2 °Brix. Após o abaixamento do °Brix, adicionou-se mais 35 litros de garapa a 12 °Brix, quando o °Brix no interior da dorna atingiu o valor de 2 °Brix, adicionou-se 75 litros de caldo de cana a 15 °Brix, a uma temperatura de 30 °C e aguardou-se que o °Brix reduzissem para 2. Após essa última etapa iniciou-se a alimentação normal da dorna com caldo de cana para a produção da cachaça. |
| Etapa 4: Alimentação normal do mosto, produção da cachaça. | Adicionou-se nesta etapa caldo de cana padronizado a 15 °Brix a uma temperatura de 30 °C, completando os 500 litros da dorna com garapa. Realizou-se a alimentação da dorna 2 vezes ao dia, pela manhã e pela tarde, adicionando-se caldo de cana a 15 °Brix a 30 °C. Zerado o °Brix, realizou-se a destilação, para obtenção da cachaça. |

A fermentação para a produção de cachaça utilizando como nutriente fubá de milho foi realizada seguindo as orientações do funcionário da empresa JM.

Tabela 3 Fermentação utilizando fubá de milho.

| | |
|--|--|
| Etapa 1: Preparação do pé de cuba (Caldo de cana a 5 °Brix). | Em uma dorna de fermentação, com capacidade de 500 litros, iniciou-se o pé de cuba com 14 Kg de fubá de milho, junto com caldo de cana aquecido a 30 °C. A quantidade de caldo adicionado foi de forma que cobrisse todo o fubá. |
| Etapa 2: Preparação do pé de cuba. | Após o °Brix ter zerado, adicionou-se novamente caldo de cana, agora a 7 °Brix, aquecido a 30 °C. Após o °Brix ter zerado adicionou-se novamente caldo de cana agora a 9 °Brix, aquecido a 30 °C. Após o °Brix ter zerado, adicionou-se novamente caldo de cana, agora a 13 °Brix, aquecido a 30 °C. Realizou-se esse procedimento duas vezes. |
| Etapa 3: Alimentação normal do mosto, produção da cachaça. | Adicionou-se nesta etapa caldo de cana padronizado a 15 °Brix, a uma temperatura de 30 °C. Realizou-se a alimentação da dorna 2 vezes ao dia, pela manhã e pela tarde, adicionando-se caldo de cana a 15 °Brix a 30 °C. Quando o °Brix foi zerado, realizou-se a destilação, para obtenção da cachaça. |

A fermentação utilizando como nutriente farelo de arroz foi realizada seguindo as orientações do funcionário da empresa JM.

Tabela 4 Fermentação utilizando farelo de arroz.

| | |
|--|---|
| Etapa 1: Preparação do pé de cuba (Caldo de cana a 5 ° brix) | Em uma dorna de fermentação, com capacidade de 500 litros, iniciou-se o pé de cuba com 14 Kg de farelo de arroz, com adição de caldo de cana aquecido a 30 °C. A quantidade de caldo adicionado foi de forma que cobrisse todo o farelo. |
| Etapa 2: Preparação do pé de cuba. | Após o °Brix ter zerado, adicionou-se novamente caldo de cana a 7 °Brix, aquecido a 30°C. Após o °Brix ter zerado, adicionou-se novamente caldo de cana a 9 °Brix, aquecido a 30°C. Após o °Brix ter zerado, adicionou-se novamente caldo de cana a 13 °Brix, aquecido a 30°C. Realizou-se esse último procedimento duas vezes. |
| Etapa 3: Alimentação normal do mosto, produção da cachaça. | Adicionou-se nesta etapa caldo de cana padronizado a 15 °Brix, a uma temperatura de 30 °C. Realizou-se a alimentação da dorna 2 vezes ao dia, pela manhã e pela tarde, adicionando-se caldo de cana a 15 °Brix a 30°C. Zerado o °Brix, realizou-se a destilação, para obtenção da cachaça. |

A fermentação utilizando como nutriente fubá de milho junto com farelo de arroz foi realizada seguindo as orientações do funcionário da empresa JM.

Tabela 5 Fermentação utilizando fubá de milho + farelo de arroz.

| | |
|---|---|
| Etapa 1: Preparação do pé de cuba (Caldo de cana a 5 ° brix). | Em uma dorna de fermentação, com capacidade de 500 litros, iniciou-se o pé de cuba com 7 Kg de fubá de milho e 7 Kg de farelo de arroz, com adição de caldo de cana aquecido a 30 °C. A quantidade de caldo adicionado foi de forma que cobrisse todo o fubá com farelo. |
| Etapa 2: Preparação do pé de cuba. | Após o °Brix ter zerado, adicionou-se novamente caldo de cana a 7 °Brix, aquecido a 30 °C. Após o °Brix ter zerado, adicionou-se novamente caldo de cana a 9 °Brix, aquecido a 30 °C. Após o °Brix ter zerado adicionou-se novamente caldo de cana a 13 °Brix, aquecido a 30 °C. Realizou-se esse último procedimento duas vezes. |
| Etapa 3: Alimentação normal do mosto, produção da cachaça. | Adicionou-se nesta etapa caldo de cana padronizado a 15 °Brix a uma temperatura de 30 °C. Realizou-se a alimentação da dorna 2 vezes ao dia, pela manhã e pela tarde, adicionando-se caldo de cana a 15° Brix a 30 °C; zerado o °Brix, realizou-se a destilação, para obtenção da cachaça. |

Inicialmente, foram coletadas frações do caldo de cana (15 °Brix) e do mosto fermentado (°Brix zerado) de cada dorna, para análise de carbamato de etila (CE). Após o processo de destilação de cada um dos quatro experimentos, foram coletadas partes das frações “cabeça”, “coração” (denominada de cachaça nova) e “cauda” dos destilados para as análises físico-químicas (FQ) e de CE.

Além dessas frações, foi coletado o vinhoto (resíduo da destilação) para análise CE.

Cada fração do “coração” foi armazenada separadamente em tonéis de carvalho (*Quercus* sp) com capacidade de 20 L. Os tonéis foram mantidos em galpão fechado com temperatura e umidade do ar não controladas, distanciados uns dos outros para possibilitar as trocas gasosas. A cachaça produzida também foi armazenada em garrações de vidro com capacidade de 5 L.

Após o período de 3 e 6 meses de armazenamento das cachaças, foi coletado 1,5 L das bebidas para realização das análises físico-químicas. A análise de carbamato de etila foi realizada retirando-se alíquotas de 50 mL mensalmente durante 6 meses.

3.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardentes (LAFQA) – UFLA-MG, segundo a metodologia estabelecida pela Instrução Normativa nº 24, de 08/09/2005, do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005b). Foram redestilados 250 mL das amostras para a análise dos seguintes parâmetros: teor alcoólico, álcoois superiores, aldeídos, ésteres, furfural e metanol. A determinação da acidez volátil, do extrato seco e do cobre foi realizada sem a redestilação da cachaça.

3.2.1 Teor alcoólico

Foi determinado por densitometria utilizando o densímetro digital DensiMat Gibertini, sendo o resultado expresso em % v/v.

3.2.2 Acidez volátil

Foi determinada por meio da extração por arraste de vapor dos ácidos voláteis, utilizando um destilador eletrônico Enochimico Gibertini. Foram recolhidos 250 mL do extrato obtido; posteriormente, esses foram titulados com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de fenolftaleína 1% como indicador. Os resultados foram expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra ou por 100 mL de álcool anidro.

3.2.3 Ésteres

Foram determinados por meio da titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas amostras, conforme demonstrado na Figura 7. A titulação foi realizada com solução padronizada de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de fenolftaleína 1% como indicador. A quantidade total dos ésteres foi expressa em gramas de acetato de etila por 100 mL de amostra.

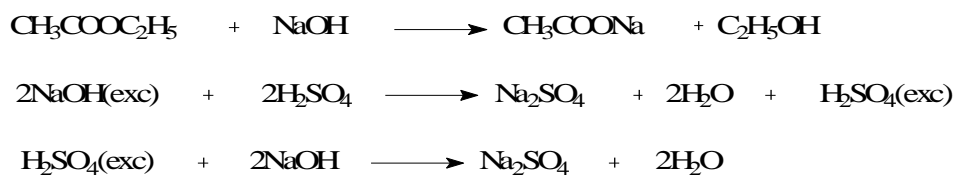
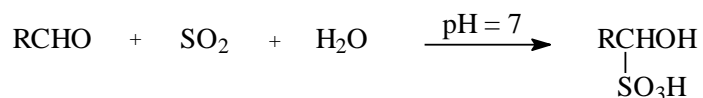


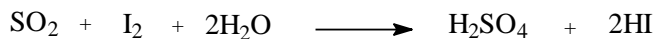
Figura 7 Reações envolvidas na análise de ésteres
Fonte: Cardoso, 2013.

3.2.4 Aldeídos

A determinação da concentração de aldeídos foi realizada por meio de métodos iodométricos, titulando-se o SO_2 produzido durante a sequência de reações envolvidas nesse tipo de análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro. As reações referentes a esse processo estão representadas na Figura 8.



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



em meio alcalino, o aldeído é então determinado:

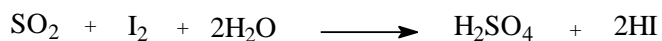


Figura 8 Reações envolvidas na determinação dos aldeídos
Fonte: Cardoso, 2013.

3.2.5 Álcoois superiores totais

Foram determinados por meio da adição de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e posterior acidificação das amostras com ácido sulfúrico concentrado (Figura 9). Os álcoois reagem por adição nucleofílica com a carbonila do

aldeído, em meio ácido com formação de acetais. A quantidade total foi determinada por meio de medidas espectrofotométricas efetuadas a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. A quantificação desse composto foi determinada por meio da construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1, sendo a quantidade total desses compostos expressa em miligrama por 100 mL de álcool anidro.

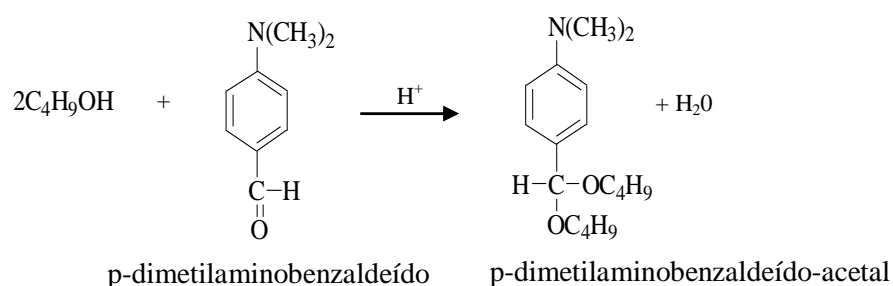


Figura 9 Reações envolvidas na determinação dos álcoois superiores totais

3.2.6 Furfural

A quantificação do furfural foi realizada pela adição de anilina e ácido acético glacial às amostras, efetuando-se medidas espectrofotométricas a 520 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC. As quantidades desse composto foram obtidas pela construção de curvas analíticas de soluções-padrão de etanol/furfural. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de furfural por 100 mL de álcool anidro. A reação colorimétrica envolvida nesse processo está descrita na Figura 10.

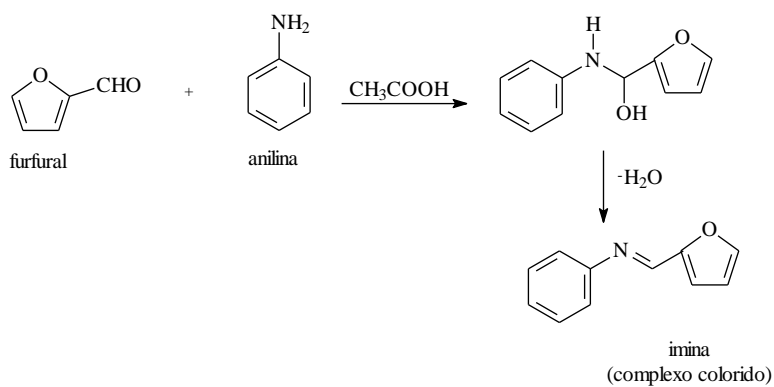


Figura 10 Reação envolvida na análise de furfural
Fonte: Cardoso, 2013.

3.2.7 Metanol

As análises foram realizadas por meio de medidas espectrofotométricas efetuadas a 575 nm utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, após adição de permanganato de potássio 3%, e posterior resfriamento das amostras. O método baseia na oxidação a formaldeído, o qual reage com o ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico concentrado, formando um composto colorido (Figura 11). As quantidades foram determinadas pela construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol.

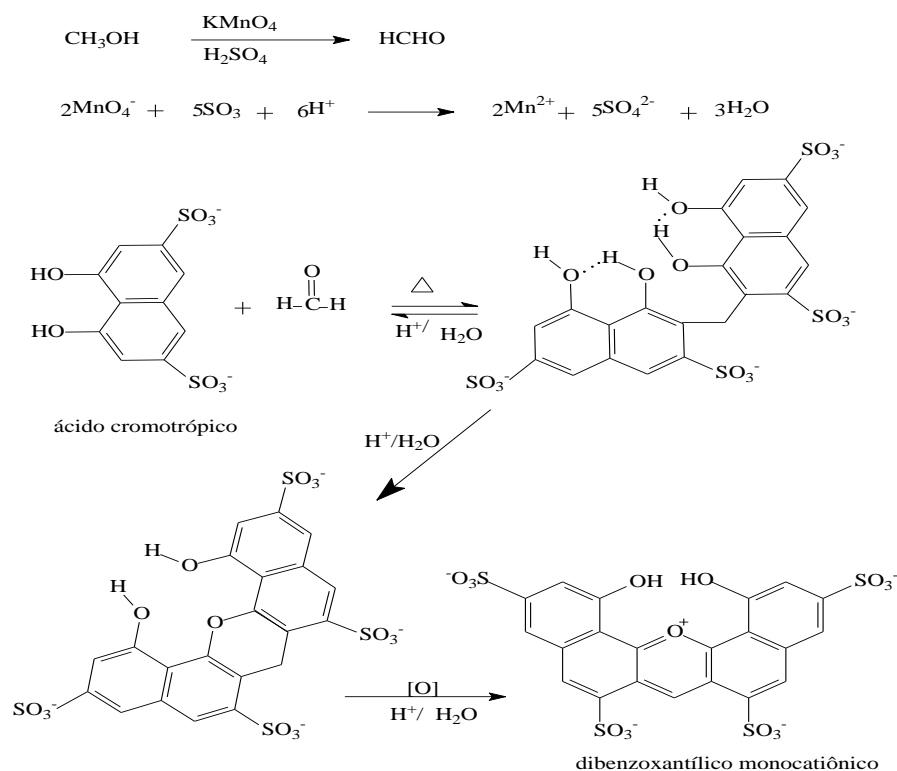


Figura 11 Reações envolvidas na determinação de metanol
 Fonte: Cardoso, 2013.

3.2.8 Extrato seco

A análise de extrato seco foi realizada por meio de métodos gravimétricos. Inicialmente, uma cápsula de alumínio 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. Após esse período, levou-se à estufa a 100°C por 30 minutos e, posteriormente, o material foi resfriado em dessecador. O

resíduo sólido remanescente foi pesado em balança analítica (Marte/ AM - 220) e os resultados obtidos foram expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra.

3.2.9 Cobre

A quantificação do cobre foi realizada por meio da adição de cloridrato de hidroxilamina e acetato de sódio para promover uma redução do Cu^{2+} presente nas amostras, para 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 12). 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. As quantidades de cobre foram determinadas por meio da construção de uma curva analítica utilizando-se sulfato de cobre como padrão.

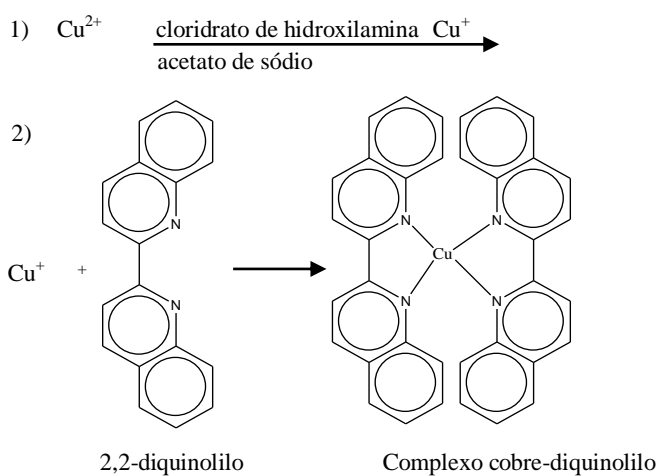


Figura 12 Reação envolvida na análise do cobre

3.3 Análises cromatográficas das cachaças

As análises do CE foram realizadas utilizando 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.

3.3.1 Condições cromatográficas

O CE foi identificado e quantificado a partir do caldo de cana até o armazenamento (ao longo de seis meses) nos tonéis de carvalho e garrafas de vidro.

A metodologia utilizada para a análise do CE nas frações do caldo de cana, fermentação e nas cachaças armazenadas foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anjos et al. (2011a) e Machado et al. (2013). Essa consiste na derivação prévia da amostra para a análise dessa substância.

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).

3.3.2 Derivação do padrão de carbamato de etila

Em um frasco âmbar, preparou-se a solução de 9-xantidrol ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em 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 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 $160,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.3 Derivação das amostras

Em um frasco âmbar, adicionaram-se $4,0 \text{ mL}$ de cachaça, seguidos de $0,8 \text{ mL}$ de solução de xantidrol ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) (preparada em propanol). Após agitação, adicionou-se $0,4 \text{ mL}$ 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.

As amostras do caldo de cana, do mosto fermentado ($^{\circ}\text{Brix}$ zerado) e vinhoto passaram por um processo de coluna aberta (coluna C18), para retirar possíveis interferentes. Santiago. (2013) realizou em seu trabalho um teste para observar o funcionamento dessa coluna aberta, obtendo resultados eficientes, não ocorrendo perda do analito (CE) na passagem pela coluna aberta.

3.3.4 Condições cromatográficas

Para a determinação do carbamato de etila nas amostras estudadas, foi utilizada uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse AAA 4-Pack ($4,6 \times 12,5 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) 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 $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$. As amostras e os padrões foram injetados em triplicata. A eluição foi realizada em sistema do tipo gradiente (Tabela 6), sendo a fase móvel composta por solução de acetato de sódio 20 mmol L^{-1} (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B).

Tabela 6 Gradiente de eluição da fase móvel para a determinação do carbamato de etila.

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

*Fase móvel: Solvente A: solução de acetato de sódio 20 mmol L^{-1} .
Solvente B: acetonitrila.

3.3.5 Limite de detecção (LD)

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).

3.3.6 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 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).

3.3.7 Delineamento experimental

No experimento realizado, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as variáveis qualitativas significativas pelo teste de F foram comparadas pelo teste de Scott Knott (1974). Na avaliação dos dados referente à análise físico-química das frações com diferentes tipos de fermento, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (4X3), sendo 4 tipos de fermentação (levedura selecionada, fubá, farelo de arroz e farelo de arroz + fubá) e 3 frações (cabeça, coração e cauda). Para as análises físico-químicas dos dados referentes ao armazenamento da bebida ao longo de seis meses, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (8X3) com parcelas subdivididas no tempo, sendo 8 tipos de fermentação + armazenamento e 3 meses (0,3 e 6). Já para análise dos dados do carbamato de etila, procedeu-se da mesma forma que anteriormente, mudando apenas os meses de análise (0,1,2,3,4,5 e 6). Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – Sisvar, segundo Ferreira (2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas correspondentes às frações “cabeça”, “coração” e “cauda” e do armazenamento dos quatro experimentos encontram-se na Tabela 7, e nas Figuras 13 a 20, respectivamente, sendo os resultados das figuras centrados em médias para a construção dos gráficos.

Tabela 7 Resultados correspondentes às análises físico químicas das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” * das bebidas produzidas com levedura selecionada, fubá de milho, farelo de arroz e fubá de milho + farelo de arroz.

| Análises físico-químicas | Frações* | Experimento | | | | Limites permitidos** |
|------------------------------|----------|----------------------|------------------|------------------|---------------------------------|--|
| | | Levedura selecionada | Fubá de milho | Farelo de arroz | Fubá de milho + farelo de arroz | |
| Acidez ² | Cabeça | 75,61 Ca ± 1,83 | 20,124 Cc ± 0,01 | 63,12 Cb ± 0,01 | 21,20 Cc ± 0,01 | 150,0 |
| | Coração | 93,33 Ba ± 2,16 | 42,81 Bb ± 0,02 | 88,62 Ba ± 0,63 | 38,55 Bb ± 0,02 | |
| | Cauda | 222,45 Ab ± 4,94 | 136,51 Ad ± 4,17 | 291,72 Aa ± 3,42 | 146,13 Ac ± 5,54 | |
| Grau alcoólico ¹ | Cabeça | 38,95 Ad ± 0,06 | 52,54 Ab ± 0,02 | 50,25 Ac ± 0,01 | 56,99 Aa ± 0,01 | 38,0 – 48,0 38,0 – 54,0 |
| | Coração | 34,79 Bd ± 0,01 | 38,82 Bc ± 0,02 | 42,62 Bb ± 0,31 | 43,11 Ba ± 0,026 | |
| | Cauda | 19,43 Cb ± 0,17 | 17,15 Cc ± 0,03 | 19,94 ± 0,03 Ca | 17,06 Cc ± 0,13 | |
| Álcool superior ² | Cabeça | 565,95 Aa ± 5,40 | 325,67 Ab ± 0,05 | 278,65 Ac ± 0,03 | 277,61 Ac ± 1,84 | 360,0 |
| | Coração | 342,97 Ba ± 4,05 | 219,18 Bb ± 2,04 | 178,04 Bc ± 4,35 | 182,85 Bc ± 3,08 | |
| | Cauda | 163,28 Ca ± 2,45 | 65,27 Cb ± 2,17 | 62,85 Cb ± 3,40 | 54,48 Cc ± 1,27 | |
| Ésteres ² | Cabeça | 68,11 Ab ± 1,25 | 40,23 Ad ± 0,87 | 79,64 Aa ± 0,89 | 47,34 Ac ± 0,01 | 200,0 |
| | Coração | 21,97 Cb ± 1,29 | 16,22 Bc ± 0,01 | 27,44 Ca ± 0,20 | 13,56 Cd ± 1,04 | |
| | Cauda | 34,85 Ba ± 2,16 | 15,73 Bc ± 0,03 | 33,84 Ba ± 2,29 | 18,47 Bb ± 2,78 | |

Continua...

Tabela 7, continuação

| Análises físico-químicas | Frações* | Experimento | | | | Limites permitidos** |
|--------------------------|----------|----------------------|------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|
| | | Levedura selecionada | Fubá de milho | Farelo de arroz | Fubá de milho + farelo de arroz | |
| Aldeídos ² | Cabeça | 73,89 Aa ± 0,18 | 59,16 Ab ± 0,02 | 30,93 Ac ± 0,01 | 21,51 Ad ± 0,01 | 30,0 |
| | Coração | 25,16 Bb ± 0,01 | 34,68 Ba ± 0,27 | 10,27 Bd ± 0,07 | 13,46 Bc ± 0,25 | |
| | Cauda | 6,79 Ca ± 0,03 | 5,72 Cb ± 1,67 | 3,29 Cc ± 0,01 | 3,85 Cc ± 0,03 | |
| Furfural ² | Cabeça | 0,27 Cb ± 0,02 | 0,07 Bc ± 0,01 | 0,45 Ca ± 0,01 | 0,07 Cc ± 0,01 | 5,0 |
| | Coração | 0,802 Bb ± 0,033 | 0,133 Bc ± 0,019 | 1,31 Ba ± 0,15 | 0,20 Bc ± 0,04 | |
| | Cauda | 2,12 Ac ± 0,13 | 1,57 Ad ± 0,03 | 5,13 Ab ± 0,15 | 6,12 Aa ± 0,12 | |
| Metanol ² | Cabeça | 2,12 Ac ± 0,83 | 1,51 Ad ± 0,01 | 4,90 Ab ± 0,01 | 5,59 Aa ± 0,35 | 20,0 |
| | Coração | -ND- | -ND- | -ND- | -ND- | |
| | Cauda | -ND- | -ND- | -ND- | -ND- | |

*Média ± desvio-padrão; Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula na coluna e a minúscula na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; ¹ % v/v; ² mg 100 mL⁻¹álcool anidro; ³ mg L⁻¹; ⁴ g L⁻¹; ND = não detectado; ** Brasil, 2005a.

Analisando a graduação alcoólica de todas as bebidas produzidas, observa-se que os maiores teores encontram-se na fração “cabeça”, seguida do “coração” e “cauda”. Na fração “cabeça”, encontram-se os primeiros vapores; o teor alcoólico é geralmente alto em razão da volatilidade do etanol presente no mosto; dessa forma nessa, fração, estão presentes os compostos mais voláteis da bebida, com maiores afinidades em álcool/ àgua. No final da destilação da fração “cabeça” e início da destilação do “coração”, estão presentes os compostos com baixa temperatura de ebulição (aldeído acético, acetato de metila, metanol, acetato de etila). A fração “cauda” é a que apresenta menores teores na graduação alcoólica, podendo estar presente nessa fração compostos com altas temperaturas de ebulição (ácido acético, ácido butírico e furfural). Após essa fração, tem-se o vinhoto, que contém bagacilhos, minerais, açúcares não fermentáveis, células de fermento e ácidos não voláteis e voláteis não solúveis em água e álcool, compostos indesejáveis que podem estar presentes nas cachaças (DIAS, 2013).

Com exceção da bebida produzida por levedura selecionada, que apresentou na fração “coração” uma graduação alcoólica igual a 34,79 v/v, as demais bebidas podem ser denominadas cachaça. O baixo teor alcoólico para essa bebida pode ser resultante de cortes incorretos das frações durante a destilação, uma vez que a bebida ainda não passou por nenhum processo de armazenamento (ZACARONI et al., 2011).

A graduação alcoólica das bebidas armazenadas por um período de seis meses é apresentada pela Figura 13.

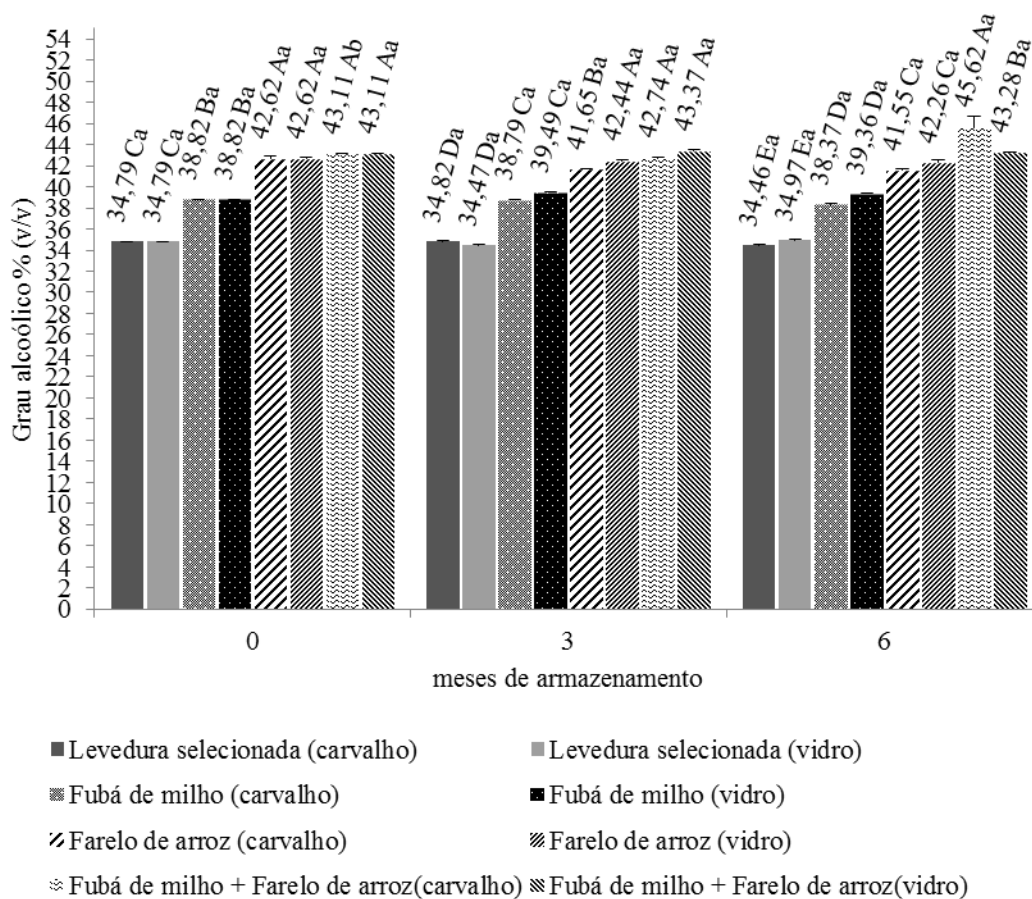


Figura 13 Graduação alcoólica em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula comparação dentro de cada mês e a minúscula comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Pelos dados da Figura 13, observa-se que durante o armazenamento a bebida produzida com levedura selecionada manteve a graduação alcoólica inferior às demais, estando abaixo dos limites exigidos pela legislação vigente. Ao analisar separadamente cada bebida produzida (armazenada em carvalho e vidro), observou-se que não houve diferença estatística na graduação alcoólica delas ao longo dos seis meses de armazenamento. Resultados similares foram encontrados por Parazzi et al. (2008), que observaram que o teor alcoólico não 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 graduação alcoólica em função das condições do armazenamento, que está relacionado à umidade, temperatura e porosidade do barril, fato que não foi observado neste estudo.

A bebida produzida por fubá de milho + farelo de arroz armazenada em carvalho foi a única em que se observou um aumento na graduação alcoólica ao fim do armazenamento (sexto mês), quando comparado com o início do processo (mês zero), sendo que este possa estar relacionado à umidade. Miranda et al. (2008) disseram que no Brasil são comuns perda de água e álcool, em torno de 3 a 4% ao ano, seja pela qualidade dos tonéis usados, seja pela idade da madeira. Segundo os autores, em ambientes de baixa umidade, a perda de água é favorecida, ao passo que, em alta umidade, favorece a perda de álcool através dos tonéis. Dessa forma, um aumento na graduação alcoólica, é indício de que se perdeu mais água do destilado que álcool durante o armazenamento.

Pelos resultados da Tabela 7, observa-se que os maiores teores de acidez volátil encontram-se nas frações “cauda”, o que era de se esperar, pois essa fração é rica em ácidos carboxílicos de altas temperaturas de ebulição (MOREIRA; NETTO; MARIA, 2012).

Os menores valores de acidez encontrados para as frações “coração” foram para as bebidas produzidas na presença de fubá de milho e fubá de milho + farelo de arroz (42,81 e 38,55 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro) respectivamente, ao passo que os maiores teores de acidez da fração “coração” foram para as bebidas produzidas por levedura selecionada e por farelo de arroz, (93,33 e 84,6 mg100 mL⁻¹ de álcool anidro), respectivamente. Mesmo apresentando valores altos, essas bebidas encontram-se dentro do limite estabelecido.

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⁻¹ de álcool anidro, sendo que apenas 3 amostras apresentavam valores fora dos padrões exigidos pela legislação vigente. Segundo os autores, o tempo e a temperatura de fermentação, manejo do mosto e higienização adequada são fatores importantes que podem minimizar altos valores de acidez.

Silva et al. (2009a), 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 a autora, são totalmente com características artesanais, e o tipo de fermentação é caipira, observaram diferenças significativas em relação aos teores de ácido acético, demonstrando a influência de diferentes linhagens de levedura.

Alcarde, Monterio e Belluco (2012), estudando a composição química de aguardentes de cana-de-açúcar produzidas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, encontraram para a cachaça bidestilada produzida com levedura selecionada CA 11 valores de acidez volátil de 14,20; 23,67 e 124,51 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para as frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, respectivamente, não corroborando com os valores encontrados neste trabalho, que foram superiores.

Duarte et al. (2011), estudando a qualidade da cachaça de alambique, avaliaram o efeito ocasionado quando *Lactobacillus fermentum* era inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* presente no fermento UFLA CA 11. Eles observaram que a menor concentração de ácido acético, responsável por grande parte da acidez volátil, foi encontrada na cachaça obtida quando era utilizada somente a levedura UFLA CA11 (28,72 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), ao passo que, na bebida produzida por levedura CA11 inoculada com lactobacilos, foi de 33,79 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Nesta pesquisa, o valor da acidez volátil para fração “coração” foi 93,33 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro.

A utilização de cepas selecionadas pode melhorar a qualidade, produtividade e obter certa padronização na produção da bebida de alambique. Além disso, essas cepas de leveduras podem fornecer condições durante a fermentação que impedem ou diminuem a contaminação bacteriana, contribuindo significativamente com os teores de acidez. Além de questões higiênicas, o teor de acidez elevado para a fração coração da bebida produzida por levedura selecionada pode ser resultante de uma aeração excessiva durante a fermentação, contribuindo, assim, para o aumento da acidez na bebida (CARDOSO, 2013).

Observa-se pelos dados descritos na Figura 14 que, ao longo dos seis meses de armazenamento das bebidas, houve diferenças significativas para a acidez volátil.

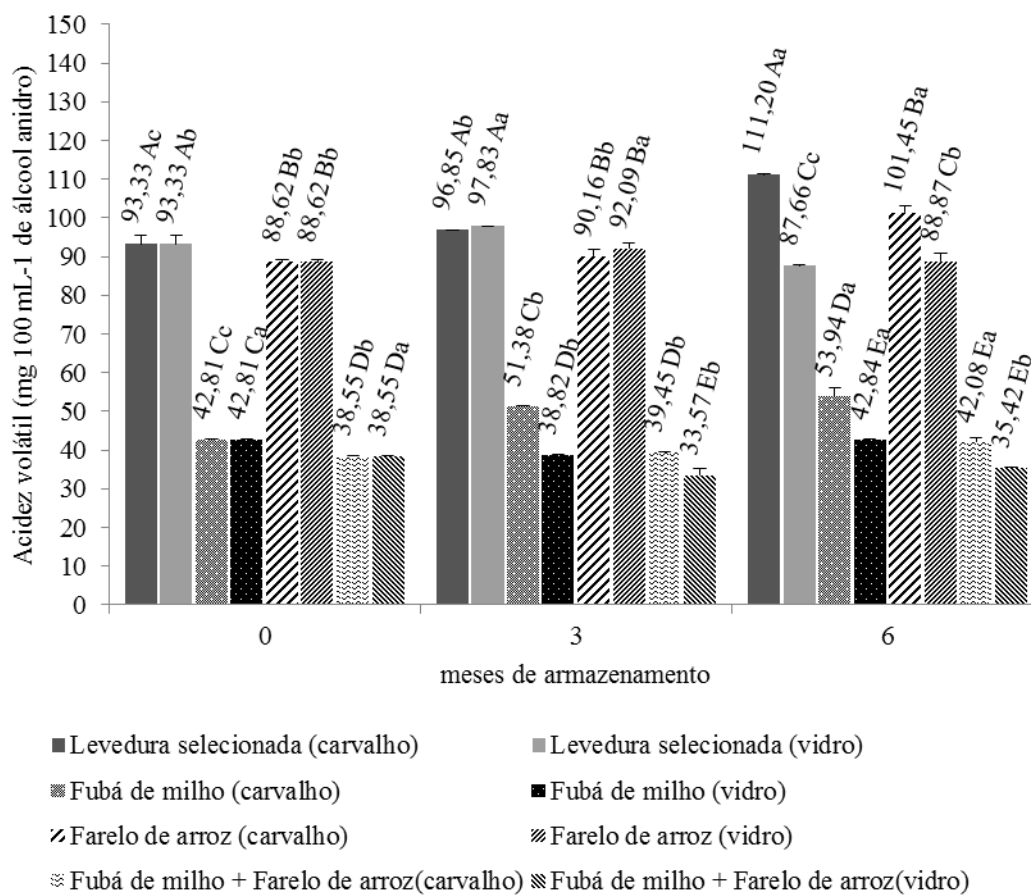


Figura 14 Avaliação da acidez volátil em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrafões de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

A variação da acidez volátil das bebidas armazenadas foi de 38,55 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para a cachaça produzida com fubá de milho + farelo de arroz (mês zero), e o maior valor de 111,21 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro para a bebida produzida com levedura selecionada armazenada em carvalho (sexto mês).

Observou-se também para as bebidas armazenadas em carvalho um aumento significativo para todas as amostras em relação à acidez volátil, correlação que não foi evidenciada para a bebida armazenada em recipiente de vidro. De acordo com Alcarde, Souza, Belluco. (2010), a incorporação de alguns compostos da madeira, tais como ácidos orgânicos não voláteis, componentes secundários, taninos e compostos fenólicos favorecem o aumento da acidez em cachaças submetidas ao processo de armazenamento/envelhecimento.

Em relação ao álcoois superiores (Tabela 7), observa-se que os valores foram altos em todas as frações “cabeça” (565,95; 325,67; 278,65 e 277,61 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro acima do permitido). Isso pode ser explicado pelo arraste deles por vapores hidroalcoólicos durante o processo de destilação (CARDOSO, 2013).

O limite máximo permitido para os álcoois superiores totais (soma dos álcoois isobutílico, isoamílico e propílico) para aguardentes de cana/ cachaça é 360 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro (BRASIL, 2005a). A sua presença em altas quantidades é indesejável, comprometendo a qualidade sensorial e físico-química da bebida.

Estudando o perfil químico entre cachaças de mesmo vinho destiladas em alambiques e em colunas, Serafim et al. (2012) encontraram teores de álcoois superiores nas frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da bebida produzida por alambique de (500; 216; 62 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro), respectivamente. Santiago (2013) detectou a presença de álcoois superiores para as frações “cabeça”, “coração” e “cauda” (416,698; 224,193 e 36,237 mg 100

mL⁻¹ álcool de anidro), respectivamente, de forma similar aos resultados encontrados neste estudo, em que todas as amostras analisadas apresentaram maiores teores de álcoois superiores nas frações “cabeça”, seguida das frações “coração” e “cauda”.

Estudando a composição química de aguardentes de cana produzidas por diferentes cepas de levedura, Alcarde, Monteiro e Belluco (2012) observaram o mesmo comportamento das frações para as seis bebidas analisadas. Além disso, para a bebida produzida utilizando a levedura CA11, os valores encontrados pelos autores foram respectivamente 223,79; 195,72 e 57,90 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para “cabeça”, “coração” e “cauda”. Os autores utilizaram a cromatografia em fase gasosa para a determinação dos álcoois superiores, sendo que os álcoois superiores totais foram determinados pela soma dos álcoois propílico, isobutílico, isoamílico. Além disso, segundo os autores, essa levedura foi a que apresentou as maiores relações entre os três álcoois analisados, sendo considerada por eles a mais indicada para a produção de aguardentes com características sensoriais diferenciadas.

Na fração “coração” da bebida produzida por levedura selecionada CA11, o valor encontrado para análise de álcoois superiores (Tabela 7) foi de 342,97 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. É importante salientar que neste estudo a determinação dos álcoois superiores foi feita utilizando a técnica de espectrofotometria; ao utilizar essa técnica, pode-se ter a presença de outros álcoois, além do isobutílico, isoamílico, e propanol-1.

Duarte et al. (2011), trabalhando com a levedura CA11, encontraram para a bebida um valor de aproximadamente 231,52 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro, análise de álcoois superiores totais, sendo que esses foram determinados por espectrofotometria, estando esses resultados um pouco abaixo dos encontrados no presente estudo (342,97 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro). Além de fatores relacionados à fermentação, a presença de altos teores de álcoois superiores é

relacionada em função da estocagem da cana-de-açúcar para depois ser moída, um longo intervalo que pode ter ocorrido entre a fermentação e início da destilação, ocasionando, assim, a degradação de aminoácidos, aumentando os teores de álcoois superiores na cachaça (CARDOSO, 2013).

Para as bebidas produzidas utilizando como nutrientes fubá de milho, farelo de arroz e fubá de milho + farelo de arroz, foram encontrados para as respectivas cachaças os seguintes teores de álcoois superiores: 219,18; 178,04 e 182,85 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, respectivamente.

Gabriel et al. (2012), avaliando o processo de fermentação natural de cachaças, encontraram teores de álcoois superiores de 194,73 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, para a cachaça produzida com fermento natural e 217,08 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, para cachaça produzida com fermento comercial. Fernandes et al. (2007) estudaram os parâmetros físico-químicos de 16 amostras de cachaças de alambique, encontrando um valor de 117,00 até 233,00 para álcoois superiores. Nessa mesma época, Vilela et al. (2007) estudaram 21 amostras da mesma região (sul de Minas Gerais), encontrando valores de 118,78 até 296,31 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para álcoois superiores. Os resultados de ambos os pesquisadores corroboram com os valores de álcoois superiores encontrados neste estudo para as bebidas produzidas por fubá de milho, farelo de arroz e fubá de milho com farelo de arroz, que se encontram dentro da faixa dos valores relatados por esses autores.

Citações anteriores de Barcelos et al. (2007) mostraram que os álcoois superiores são produtos metabólicos decorrentes de crescimento de leveduras e aproveitamento de aminoácidos como fonte de nutrientes amoniacais, sendo dependentes das condições do meio de fermentação, da qualidade, quantidade e viabilidade do inóculo, da temperatura de fermentação e do teor alcoólico do vinho.

A utilização de cepas de leveduras selecionadas torna-se interessante, pois elas visam à padronização, a um maior controle e à qualidade durante a etapa de fermentação, devendo também atentar para as demais etapas de produção, pois outros fatores podem aumentar os teores de álcoois superiores, como as altas temperaturas e pH baixos (3,5-4,0) do mosto, além do corte incorreto das frações da bebida (CARDOSO,2013).

Durante o armazenamento da cachaça (Figura 15), observou-se que as bebidas armazenadas em carvalho e em vidro apresentaram uma redução nos teores de álcoois superiores entre os meses zero e três. Entre o terceiro e o sexto mês, observou-se um aumento na concentração dos álcoois superiores, sendo os maiores valores encontrados para a bebida produzida por levedura selecionada quando armazenada em vidro, diferentemente das demais, que apresentaram maiores quantidades para as bebidas armazenadas em carvalho. Porém, ao final do sexto mês, observa-se que os valores de álcool superior para todas as amostras foram abaixo dos encontrados para o mês zero.

A formação dos álcoois superiores está relacionada à etapa de fermentação; porém, em trabalhos de Catão et al. (2011), foi observado um pequeno acréscimo desses durante o envelhecimento. Gabriel et al. (2012) observaram as mesmas características para bebidas envelhecidas quando comparadas com as não envelhecidas. Outros autores, como Parazzi et al. (2008) e Miranda et al. (2008), também observaram o aumento desse parâmetro para bebidas envelhecidas em carvalho, fato não observado por esses pesquisadores em relação ao armazenamento em recipientes de vidro, resultados que diferem daqueles encontrados neste estudo.

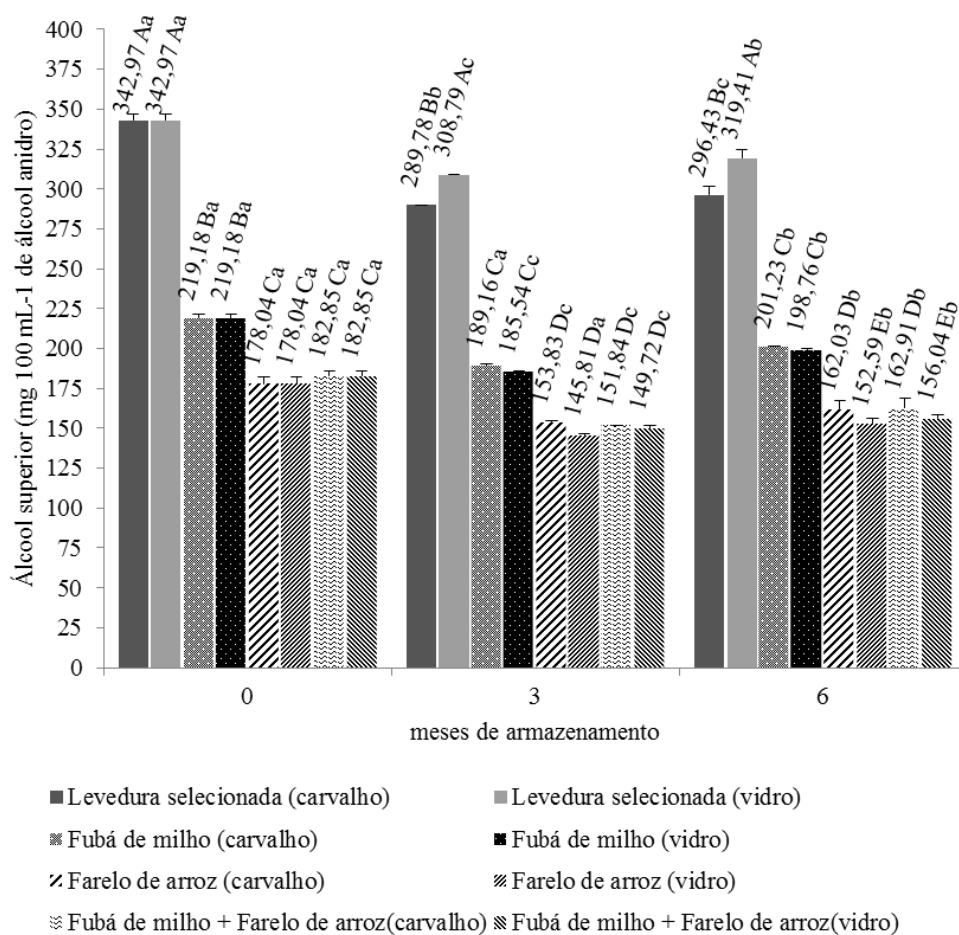


Figura 15 Análise de álcoois superiores em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrafões de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula comparação dentro de cada mês e a minúscula comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Os valores de ésteres encontrados neste trabalho (Tabela 7) para frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da bebida produzida com CA11 foram respectivamente 68,11; 21,97 e 34,85 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Todos os valores encontrados apresentam-se com os limites abaixo do estabelecido (200 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), sendo que os valores para as frações “coração” dos quatros experimentos variaram entre 13,56 até 27,44.

Alcarde, Monteiro e Belluco (2012) encontraram para a cachaça produzida com a levedura selecionada CA11 15,65 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro correspondendo aos ésteres, valor um pouco acima do encontrado no presente estudo. Cabe ressaltar que possivelmente as condições durante a produção da cachaça foram diferentes, o que pode estar relacionado a essa pequena variação nos teores de ésteres deste experimento com o relatado pelos autores citados anteriormente.

A formação dos ésteres no processo fermentativo ocorre no metabolismo secundário intracelular das leveduras. Outra rota para a formação de ésteres ocorre durante a destilação e no armazenamento por meio das reações de esterificação entre os álcoois e os ácidos carboxílicos. O acetato de etila é o principal éster formado; em baixas concentrações, proporciona um aroma agradável de frutas, porém, em quantidades elevadas, confere à bebida um sabor enjoativo e indesejado, sendo essas características dependentes de fatores como tipo e quantidade de fermento, aeração e agitação na fermentação e qualidade do caldo (CARDOSO, 2013).

Na etapa de destilação, é importante o corte adequado das frações da bebida, sendo a temperatura de ebulição do acetato de etila de 77°C, fazendo com que a concentração desse composto seja elevada na fração “cabeça” e no início da fração “coração” (ALCARDE, MONTEIRO e BELLUCO, 2012; CARDOSO, 2013).

Os valores de ésteres encontrados neste trabalho para as respectivas frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da bebida produzida, tendo como nutriente fubá de milho foram 40,23; 16,22 e 15,73; para a cachaça produzida com farelo de arroz 79,64; 27,44 e 33,84; e com fubá + farelo de arroz 47,34; 13,56 e 18,47 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, respectivamente.

Comportamento similar ao que ocorreu com a formação dos ésteres nas frações da bebida produzida por fubá de milho foram observados em trabalhos realizados por Serafim et al. (2012). Eles obtiveram na produção de cachaça de alambique os maiores teores de ésteres na fração “cabeça”, seguida do “coração” e “cauda” (79,0; 29,0 e 26,0 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), respectivamente.

Nas bebidas produzidas com farelo de arroz e fubá com farelo de arroz, os maiores teores de ésteres foram encontrados para fração “cabeça”, seguida “cauda” e “coração”. Anjos et al. (2011a) encontraram nas frações da bebida recém-distilada quantidades de ésteres de 79,25; 19,54; e 50,15 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para as frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, respectivamente. Padrão semelhante do teor de ésteres foi encontrado neste trabalho, sendo a fração “coração” a que se apresentou com menores quantidades, fato também verificado em trabalhos realizados por Santiago (2013).

Silva et al. (2009a), estudando cachaças produzidas por leveduras de diferentes alambiques mineiros, cuja fermentação é realizada de forma tradicional (“caipira”), encontraram valores de ésteres de (27,62 a 59,76 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro), faixa de valores acima dos resultados obtidos. Essa variação pode ocorrer devido à levedura empregada bem como ao tipo de cana e a todo o processo de fabricação da bebida. Todas as amostras armazenadas por até seis meses estavam em conformidade com a legislação (Figura 16).

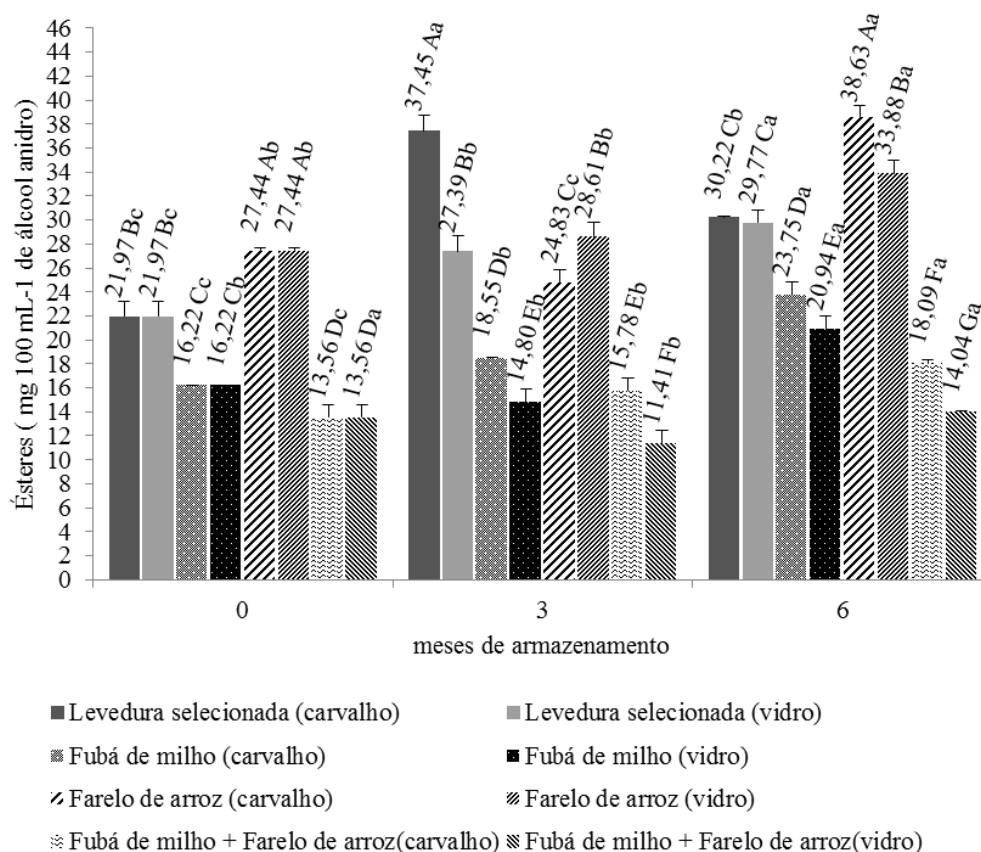


Figura 16 Análise de ésteres em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Pelos resultados obtidos, constatou-se que os maiores teores de ésteres, em todos os meses de armazenamento, foram para as bebidas produzidas com levedura selecionada e fubá de milho + farelo de arroz.

Relacionando o sexto mês de armazenamento com o mês zero, observa-se um aumento significativo dos ésteres para todas as bebidas, com exceção apenas da bebida produzida com fubá de milho + farelo de arroz armazenada em vidro, a qual não apresentou diferença estatística.

O aumento na concentração desse congêneres no período de armazenamento e/ ou envelhecimento da cachaça provavelmente é oriundo da reação entre os álcoois e os ácidos orgânicos presentes na bebida. Esses, juntamente com álcoois superiores, aldeídos e ácidos, são responsáveis pelo aroma e sabor das mesmas, compondo o chamado buquê da cachaça (PEREIRA, et al., 2003; SANTIGO et al., 2012).

Anjos et al. (2011a) avaliaram os teores de ésteres em cachaças envelhecidas em carvalho no período de 12 meses e observaram um aumento expressivo, sendo que esse aumento foi observado principalmente a partir do sétimo mês, concluindo que esse aumento ocorreu principalmente pela extração de outros ésteres presentes nas madeiras dos tonéis.

Para bebidas armazenadas em carvalho e em vidro, Miranda et al. (2008) observaram maiores concentrações de ésteres para a bebida armazenada em carvalho. Segundo os autores, além das reações de esterificação entre os álcoois e ácidos da bebida, os ésteres são um dos principais compostos extraídos da madeira pelos destilados, sendo o acetato de etila em conjunto com outras substâncias o componente responsável pelo odor agradável das bebidas envelhecidas.

Os aldeídos têm grande influência sobre o aroma e sabor das cachaças; além disso, vários desses compostos (por exemplo, acetaldeído, furfural e hidroximetil furfural) são considerados tóxicos para os seres humanos

(MOREIRA; NETTO; MARIA, 2012). O acetaldeído é o principal componente dos aldeídos presente na cachaça, podendo representar até 90% da concentração dos aldeídos totais. Esse é solúvel em álcool e apresenta uma temperatura de ebulição relativamente baixa (21°C); assim, espera-se que os valores mais altos de aldeídos apareçam na fração correspondente à “cabeça” (CARDOSO, 2013).

Os valores de aldeídos presentes na fração “cabeça” da cachaça produzida com levedura selecionada, com fubá de milho, com farelo de arroz e fubá de milho + farelo arroz foram respectivamente 73,89; 59,16; 30,93 e 21,51 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, sendo esses valores superiores às demais frações dessas bebidas.

Pela legislação vigente (Brasil, 2005a), o valor máximo permitido de aldeídos na cachaça é de 30 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. A fração “coração” da cachaça produzida com fubá de milho foi a única que apresentou concentrações acima do permitido (34,68 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro). Segundo Cardoso (2013), um corte errado nas frações da cachaça e uma aeração ao final da fermentação podem resultar um excesso de aldeídos na bebida.

Pelos resultados de aldeídos durante os seis meses de armazenamento (Figura 17), observa-se que a bebida produzida com fubá de milho manteve os teores acima do limite estabelecido.

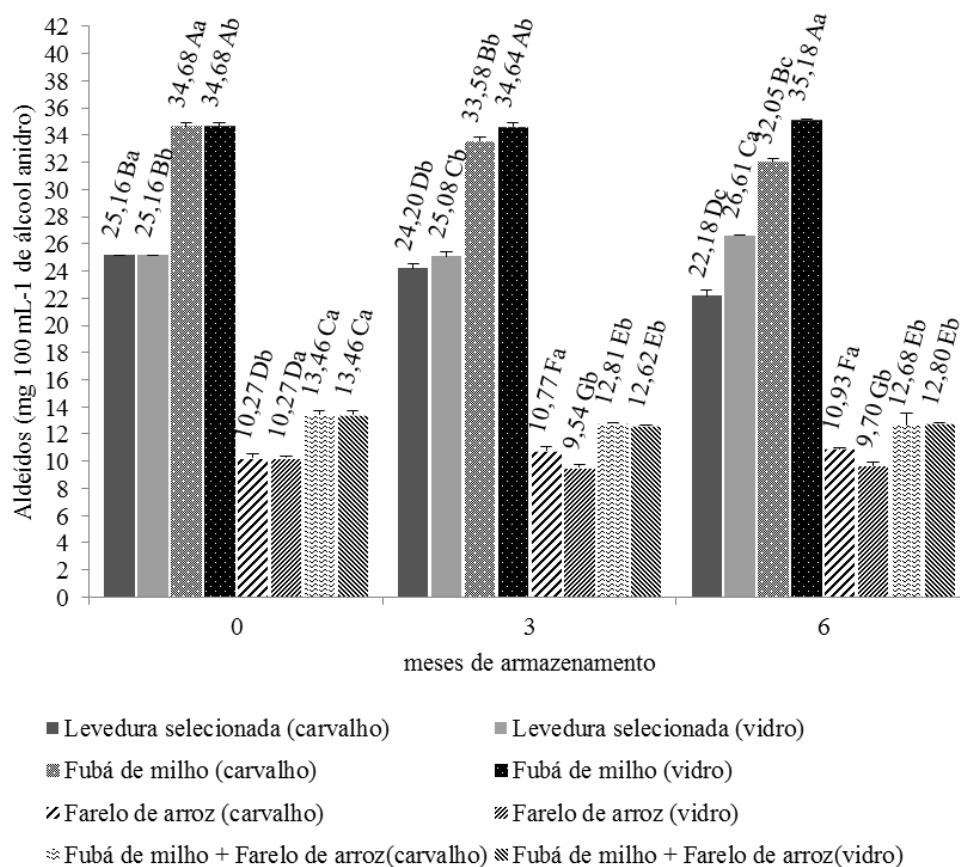


Figura 17 Análise de aldeídos em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrafões de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Estatisticamente, durante o armazenamento, a bebida produzida por levedura selecionada armazenada em carvalho apresentou uma diminuição nos teores de aldeídos, ao passo que, na mesma amostra armazenada em vidro ocorreu um aumento. Por sua vez, para a bebida produzida com farelo de arroz,

ocorreu o contrário; na bebida armazenada em carvalho, o teor de aldeídos aumentou, e em vidro houve uma redução. Para a bebida produzida com fubá de milho + farelo de arroz, observa-se que em ambos os armazenamentos (carvalho e vidro) houve uma redução nos teores de aldeídos, em relação ao início do armazenamento.

Parazzi et al. (2008) observaram um pequeno aumento dos aldeídos (em média $1,73 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ álcool anidro) ao longo de trinta e seis meses para as cachaças armazenadas em carvalho, enquanto para a bebida armazenada em vidro o aumento não foi estatisticamente significativo.

Catão et al.(2011) observaram ao final de seis meses um aumento no teor de aldeídos para todas as amostras armazenadas em diferentes madeiras, inclusive em carvalho, enquanto que a bebida armazenada em vidro não sofreu alterações significativas em relação aos aldeídos. Entre as reações químicas, a mais importante que ocorre com os aldeídos durante a maturação e que altera os componentes da bebida destaca-se a formação de acetaldeído e ácido acético a partir do etanol. Os equilíbrios entre acetal e acetaldeído são estabelecidos também para muitos aldeídos e são particularmente importantes para um aroma específico, pois aldeídos têm, frequentemente, odor desagradável e pungente enquanto os acetais são agradáveis e frutados. O equilíbrio entre aldeídos livres, hemiacetal e acetal é influenciado pelo pH e pela concentração de álcool etílico e também pelo tipo de madeira do tonel (PIGGOTT; CONNER, 2003).

Considerando os limites estabelecidos pela Legislação brasileira quanto à concentração de furfural e hidroximetil furfural na bebida ($5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool anidro) (BRASIL2005a), todas as frações “coração” produzidas neste trabalho (Tabela 7) encontram-se dentro do limite.

O furfural e o hidroximetilfurfural são indesejáveis na bebida, e resultam da decomposição química de carboidratos. A temperatura elevada associada ao baixo pH do mosto acarreta desidratação dos açúcares e hidrólise

de polissacarídeos dos bagacilhos (celulose, hemicelulose, pectina e outros) formando o furfural e o hidroximetilfurfural. Outros fatores, como a colheita da cana precedida de queima, a adição de caramelo, açúcar residual, bagacilhos no mosto e pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques, também podem contribuir para o aumento no teor destes componentes (MASSON et al., 2007 e ZACARONI et al., 2011).

Os valores para furfural durante o período de armazenamento apresentados na Figura 18 variaram de 0,803 a 2,630 mg 100 mL⁻¹ álcool anidro.

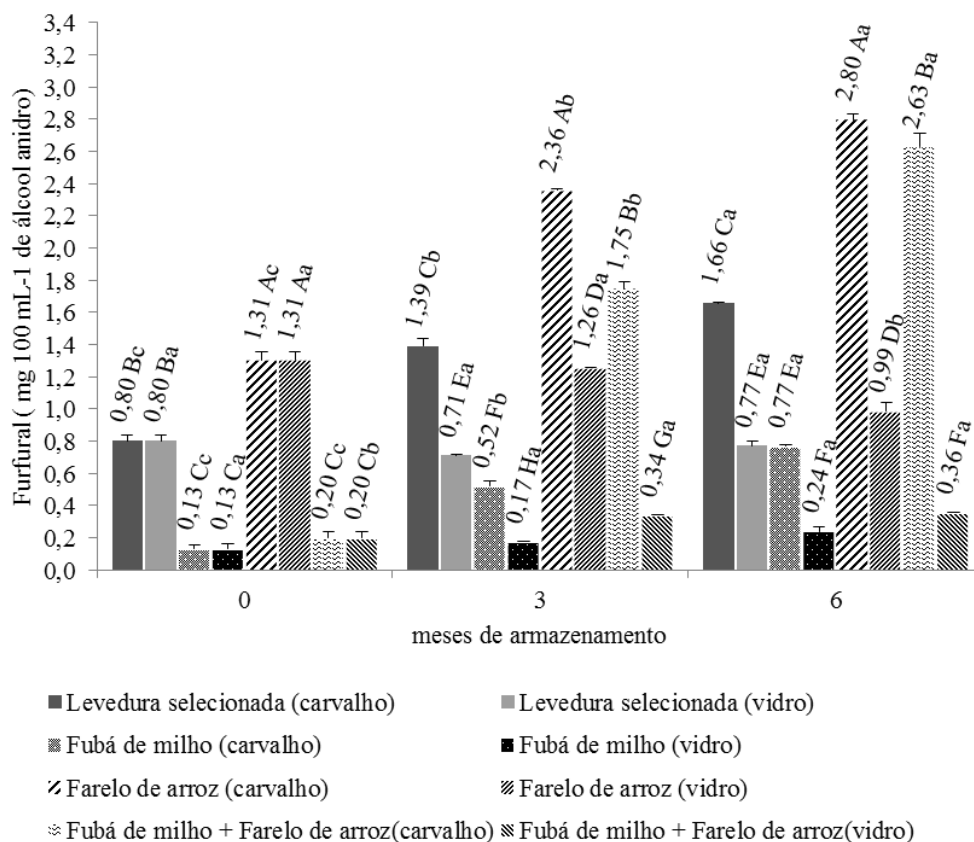


Figura 18 Análise de furfural em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrafões de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Os valores mais altos de furfural (acima de 2 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro) foram para as bebidas produzidas com farelo de arroz e fubá de milho + farelo de arroz, ambas armazenadas em carvalho. Em geral, observou-se um aumento nos valores de furfural ao longo do tempo de armazenamento para todas as bebidas estocadas em tonel de carvalho, o que não foi constatado para as bebidas armazenadas em vidro.

Miranda et al. (2008) observaram um aumento do furfural ao longo do tempo para cachaça armazenada em tonel de carvalho, sendo que no final de 390 dias de armazenamento, houve um aumento significativo nos teores de furfural, enquanto que a bebida armazenada em vidro não apresentou alterações na quantidade deste contaminante. Segundo os autores, esse aumento durante o envelhecimento, provavelmente ocorreu devido à degradação das pentoses presentes na madeira do tonel.

Zacaroni et al. (2011) citaram que outra possível forma da contaminação da cachaça por furfural e hidroximetilfurfural durante o armazenamento da bebida em toneis de madeira possa ocorrer pelo tratamento térmico que estes recebem, em outras palavras pela requeima dos barris.

Pelos dados da Tabela 7, observa-se a presença de metanol apenas nas frações “cabeça” dos experimentos com CA11, fubá de milho, farelo de arroz e fubá de milho + farelo de arroz (2,12; 1,51; 4,90 e 5,587 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, respectivamente). Durante o armazenamento, todas as amostras de cachaça apresentaram-se com valores abaixo do limite de detecção.

O limite permitido para metanol em cachaças é 20 mg 100 mL⁻¹ (Brasil, 2005a); assim, observa-se que até mesmo as frações cabeças (que devem ser descartadas) encontram-se abaixo do que é exigido.

Cardoso et al. (2012), pesquisando 54 amostras (envelhecidas e não envelhecidas) de cachaças produzidas no sul de Minas Gerais, mostraram que não foi detectada a presença deste contaminante nas bebidas. Anteriormente,

Zacaroni et al. (2011) obtiveram resultados similares ao estudarem amostras de aguardentes produzidas no sul de Minas Gerais. Bispo et al. (2012), estudando amostras de cachaças comercializadas na Bahia, também não encontraram a presença de metanol. Estes resultados corroboram com os encontrados neste trabalho, comprovando os cuidados dos produtores não adicionando frutas cítricas ao fermento, bem como filtrando o caldo antes da fermentação.

Em relação ao cobre, para as frações “coração” das bebidas produzidas apresentaram valores abaixo de $5 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1}$ de álcool anidro, limite exigido pela legislação vigente.

A presença desse contaminante na bebida está relacionada a questões higiênicas, uma vez que a contaminação ocorre pelo carbonato básico de cobre (azinhavre), presente nas partes ascendentes do alambique (CARDOSO, 2013).

Além da higienização adequada, é proposto a utilização de filtros com adsorventes, como o carvão ativado e as resinas de troca iônica, materiais alternativos também têm sido estudados para a remoção do metal, tais como sílicas, aluminossilicatos e argilas; porém, é importante atentar para a não retirada dos congêneres da bebida (NEVES et al., 2007; CANTÃO et al., 2010; DUARTE et al., 2012).

Os valores encontrados para esse metal durante o armazenamento das bebidas encontram-se na Figura 19.

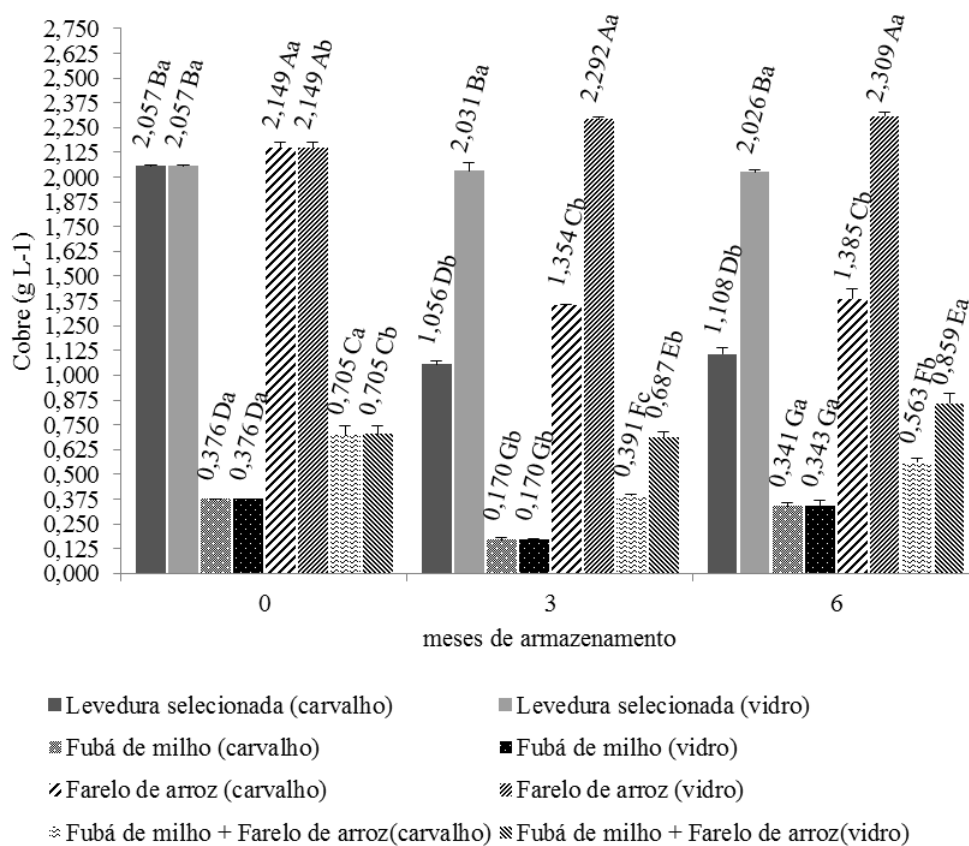


Figura 19 Análise de cobre em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrafas de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Todas as amostras estudadas durante o armazenamento encontram-se com os teores de cobre dentro do limite estabelecido pela Legislação vigente. Em geral, para as bebidas armazenadas em carvalho, constata-se uma diminuição do teor de cobre ao longo do tempo de armazenamento. Alguns autores apontam o processo de envelhecimento para a redução do metal da bebida. Cavalheiro et al.(2003) observaram uma redução significativa em relação aos teores de cobre de 7 amostras de cachaças envelhecidas por um período de seis meses. Santiago et al.(2012) relatam a possibilidade de uma interação dos íons cobre com compostos presentes nas madeiras, ocorrendo um possível processo de absorção ou de dessorção pela madeira durante o envelhecimento.

Neste estudo, os valores de extrato seco descritos na Figura 20 variaram (0,028 - 0,110g L⁻¹). Observa-se um aumento significativo até o terceiro mês de armazenamento (carvalho), exceto para a bebida produzida por fubá de milho, não ocorrendo diferença estatística para o sexto mês, ao passo que as bebidas armazenadas em vidro não apresentaram variações estatísticas.

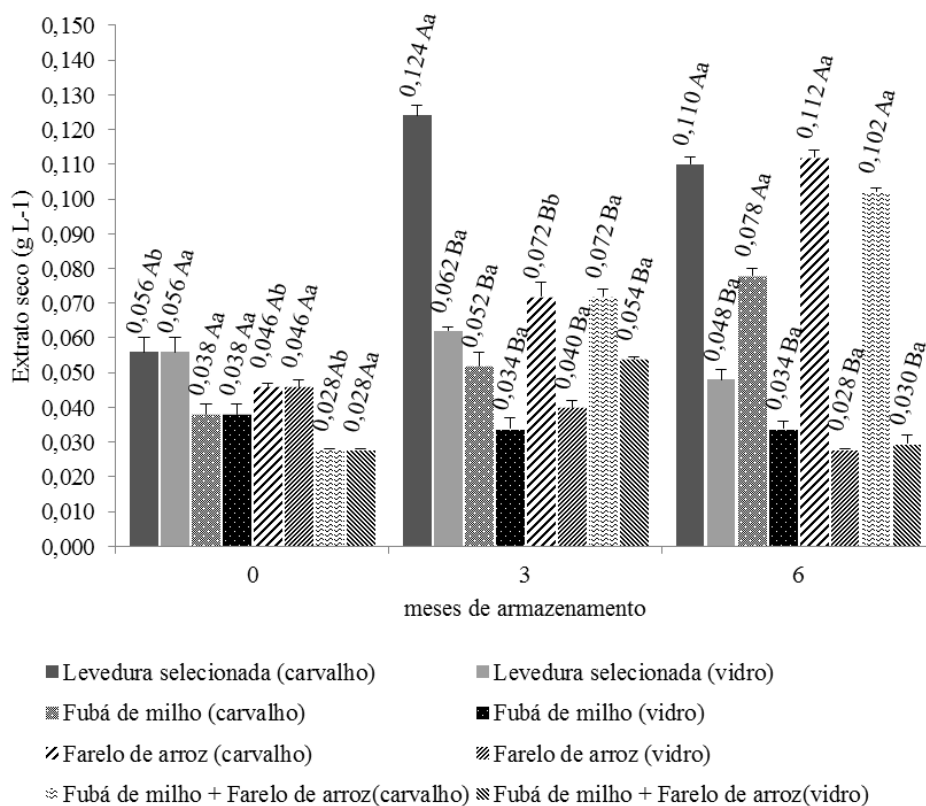


Figura 20 Análise de extrato seco em função do tempo de armazenamento da cachaça em tonéis de carvalho e garrações de vidro. Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula a comparação dentro de cada mês e a minúscula a comparação ao longo dos meses, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Segundo Miranda et al. (2008), a variação do teor de extrato seco durante o armazenamento está relacionado com a degradação da lignina pelo etanol em compostos aromáticos, como vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído. Além desses compostos que são extraídos pelo álcool etílico, podem ocorrer ainda alterações na lignina em decorrência de oxidações e etanolise (PIGGOTT; CONNER, 2003; MIRANDA et al., 2008).

Anjos et al. (2011b) relatam que durante o envelhecimento da bebida, a madeira é degradada pela ação de água e álcool, e os produtos de hidrólise de hemicelulose e lignina são transferidos para o destilado, sendo os principais compostos extraídos da madeira do barril os óleos voláteis, fenóis, açúcares, glicerol e ácidos orgânicos não voláteis e as substâncias tânicas. Esses compostos modificam o sabor, aroma e cor da bebida, e podem contribuir para um aumento do extrato seco.

4.2 Análises cromatográficas

Na Figura 21 encontra-se o cromatograma obtido para o padrão de carbamato de etila.

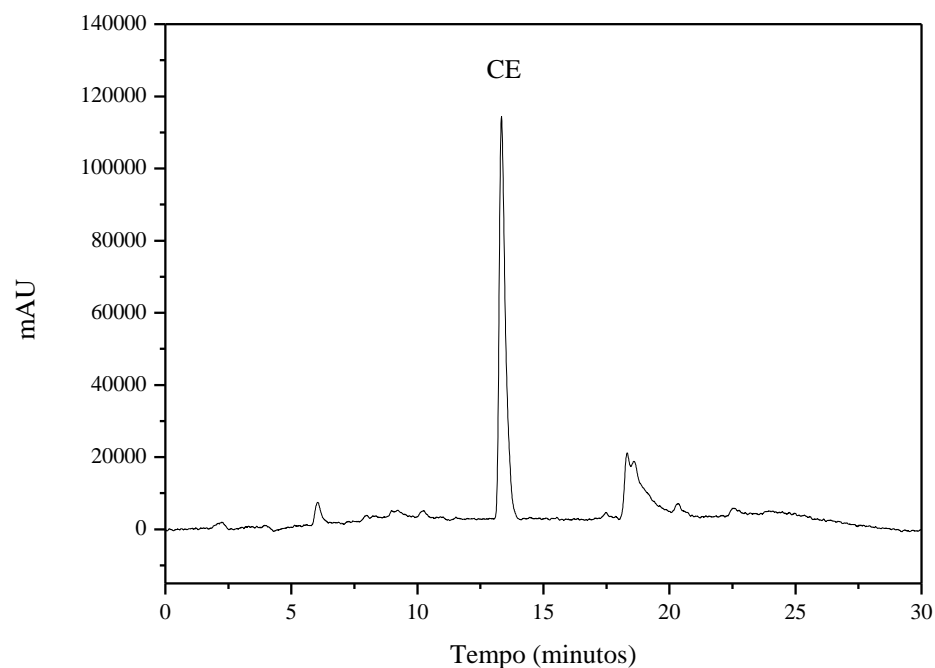


Figura 21 Cromatograma da solução-padrão de carbamato de etila (CE), com detecção de fluorescência. Concentração do padrão injetado: $160,0 \mu\text{g L}^{-1}$

O tempo médio de retenção obtido para o composto analisado neste estudo foi de $13,29 \pm 0,064$ minutos. Santiago (2013) avaliou os 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. (2011a), estudando o carbamato de etila durante o armazenamento de cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro, encontraram um tempo médio de retenção igual á 13,1 minutos para esse composto, valores que corroboram aos encontrados nesta pesquisa.

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 0,99982.

Os valores para o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados foram de 2,48 e 8,26 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

O LD e LQ obtidos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (HPLC-FLD) e derivação prévia do CE apresentam valores inferiores aos encontrados por Santiago. (2013) (3,24 $\mu\text{g L}^{-1}$ LD e 10,83 $\mu\text{g L}^{-1}$ LQ), Anjos et al. (2011a) (3,93LD e 13,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ LQ) e Machado et al. (2013) (6,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ LD e 21,32 $\mu\text{g L}^{-1}$ LQ). Em todos esses trabalhos, a matriz usada pelos autores foi a cachaça.

Os valores encontrados de CE para o caldo de cana (antes da fermentação), para o mosto fermentado (Briz zerado, antes da destilação), para as frações “cabeça”, “coração” e “cauda” (obtidas durante a destilação) e para os vinhotos (após a destilação), encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 Valores de carbamato de etila referentes ao caldo de cana, mosto fermentado, frações da bebida e ao vinhoto, dos quatro experimentos realizados.

| Carbamato de etila ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | | |
|---|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Amostras | Experimentos | | | |
| | Levedura selecionada | Fubá de milho | Farelo de Arroz | Fubá + Farelo |
| Caldo de cana (15 °brix) | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Mosto fermentado (0 °brix) | < LD | < LD | < LD | < LD |
| Cabeça | < LQ | 14.807 Ac $\pm 0,29$ | 50.529 Aa $\pm 1,90$ | 32.047 Ab $\pm 0,06$ |
| Coração | < LQ | < LQ | 9.885 Ba $\pm 0,28$ | 9.838 Ba $\pm 0,13$ |
| Cauda | < LQ | < LQ | 8.924 Ba $\pm 0,33$ | < LQ |
| Vinhoto | < LD | < LD | < LD | < LD |

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

Pelos resultados obtidos, observa-se que a variedade de cana (SP-1842) utilizada para produção da cachaça, assim como o processo de obtenção do caldo, não interferiram para a formação de CE, pois o mesmo estava abaixo do limite de detecção. Na fermentação, foram observados valores abaixo do limite de detecção; porém, mesmo não sendo detectada a presença desse contaminante, o CE pode estar relacionado com a adição de nutrientes no processo fermentativo, uma vez que, na destilação, as bebidas produzidas com farelo de arroz e com a mistura de fubá de milho + farelo de arroz foram as que

apresentaram valores da fração “coração” acima do limite de quantificação ($8,26 \mu\text{g L}^{-1}$).

Uma possível explicação da relação do carbamato de etila com o processo fermentativo relatado por Galinaro e Franco (2011) é que em bebidas destiladas como uísque, rum e destilados de frutas o íon cianeto é tido como o principal precursor na formação de carbamato de etila. Esse seria formado quando glicosídeos cianogênicos (Figura 6) presentes na cevada, mandioca, aveia, cereais, centeio, trigo maçã, manga e no arroz, por exemplo, são degradados, enzimaticamente, liberando o cianeto, que é oxidado a cianato, reagindo, posteriormente, com o etanol, formando o carbamato de etila. No presente trabalho, as bebidas produzidas que continham farelo de arroz como nutriente durante a fermentação foram as que apresentaram na fração “coração” valores altos para CE ($9,885 \mu\text{g L}^{-1}$ para bebida produzida por farelo de arroz e $9,838 \mu\text{g L}^{-1}$ para a bebida produzida com fubá de milho + farelo de arroz). Nas frações do “coração” da bebida produzida por levedura selecionada e fubá de milho, a presença desse contaminante encontrava-se abaixo do limite de quantificação.

Determinando o carbamato de etila nas diferentes etapas da produção de cachaça, Baffa Júnior et al. (2011) estudaram a formação desse contaminante no processo de fermentação do caldo de cana (mosto fermentado), nas frações do destilado e na vinhaça, durante a produção de cachaça. Os resultados médios encontrados pelos autores foram de $122 \mu\text{g L}^{-1}$ no mosto fermentado; $59,7 \mu\text{g L}^{-1}$ na fração cabeça; $52 \mu\text{g L}^{-1}$ na fração coração; $1,57 \mu\text{g L}^{-1}$ na fração cauda e $53,1 \mu\text{g L}^{-1}$ na vinhaça. Santiago. (2013) também observou a presença de carbamato durante a etapa de fermentação, porém esse encontrava-se abaixo dos limites de quantificação. Tanto no primeiro quanto no segundo trabalho, verificou-se que a formação do CE pode ter como precursores substâncias presentes no processo fermentativo.

Na literatura, é relatado que em função da elevada temperatura de ebulição (182-184 °C), o CE não deveria ser transferido ao destilado em uma destilação bem conduzida. 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 (ANDRADE SOBRINHO et al., 2009; ANJOS, et al., 2011a; SERAFIM et al., 2012). Dessa forma, é previsível que a “cabeça” apresente uma maior concentração de carbamato de etila, já que ela apresenta uma maior graduação alcoólica, conforme resultados apresentados na Tabela 8. Essa teoria é justificada ao observar os resultados das bebidas que foram produzidas utilizando-se como nutrientes farelo de arroz e fubá de milho + farelo de arroz. As frações correspondente à “cabeça” nessas bebidas foram as que apresentam maiores teores de carbamato de etila, seguida do “coração” e “cauda”. Além disso, nas bebidas produzidas por levedura selecionada e fubá de milho, observou-se um comportamento semelhante, porém só foi possível quantificar o CE na fração cabeça da bebida produzida por fubá de milho. Assim, a separação eficiente das frações durante a destilação da cachaça de alambique pode ser uma alternativa na redução dos níveis de CE no destilado.

Nas figuras 22 a 25, é possível observar os cromatogramas referentes às frações “cabeça”, “coração” e “cauda” de cada um dos experimentos realizados.

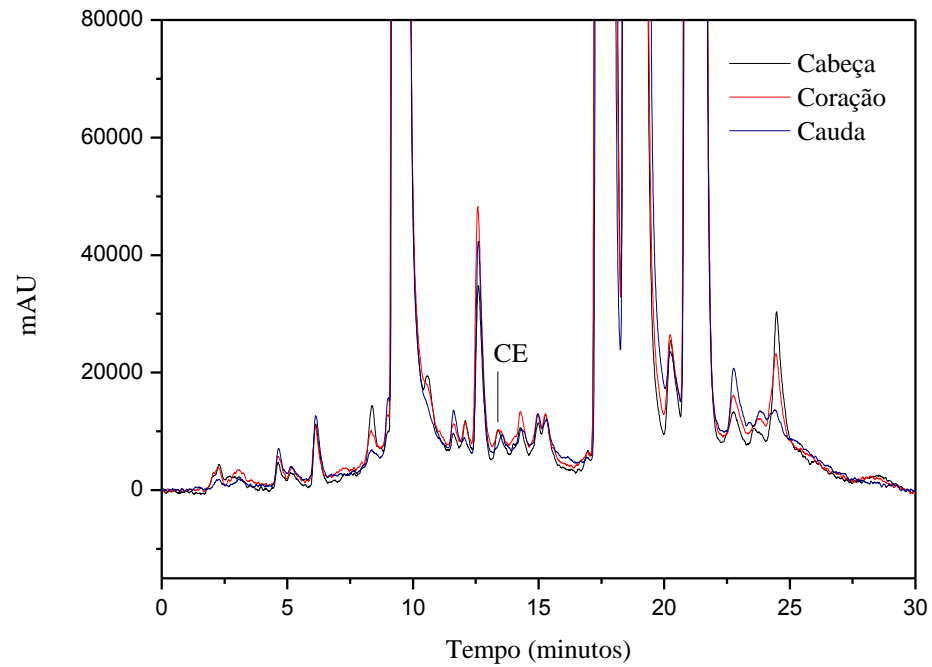


Figura 22 Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida por levedura selecionada, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

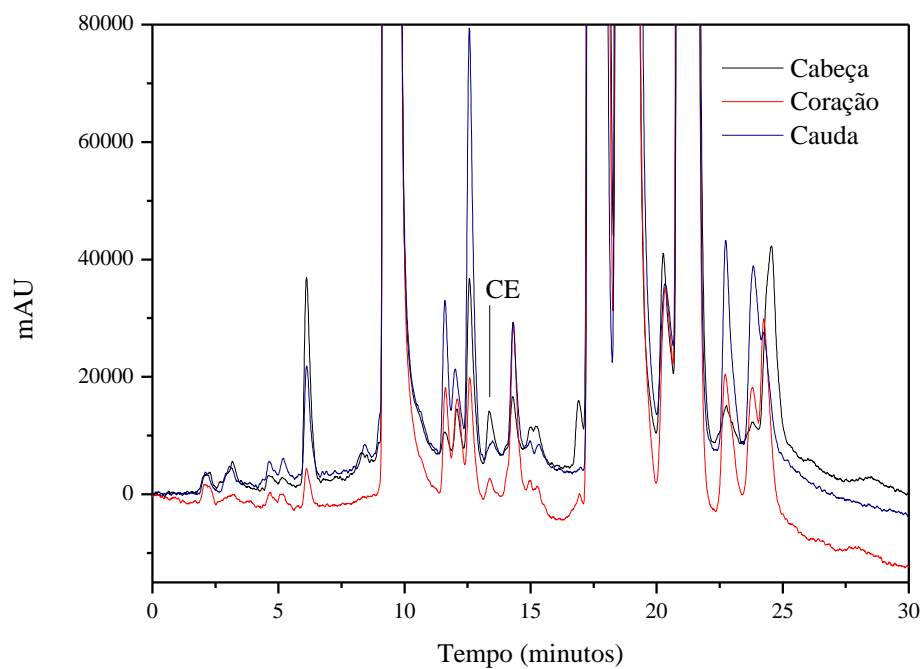


Figura 23 Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida com fubá de milho, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

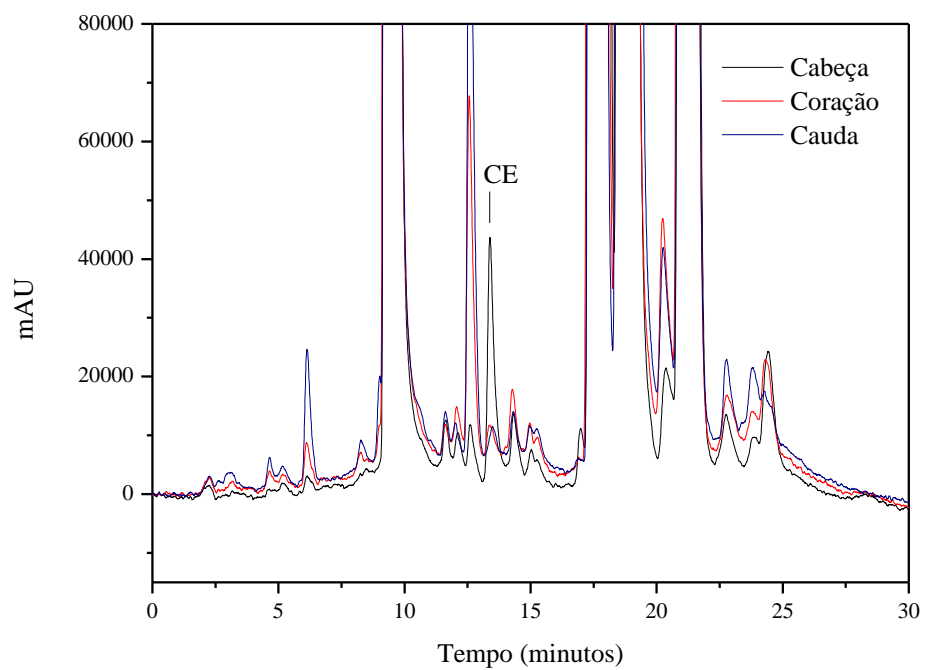


Figura 24 Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida com farelo de arroz, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

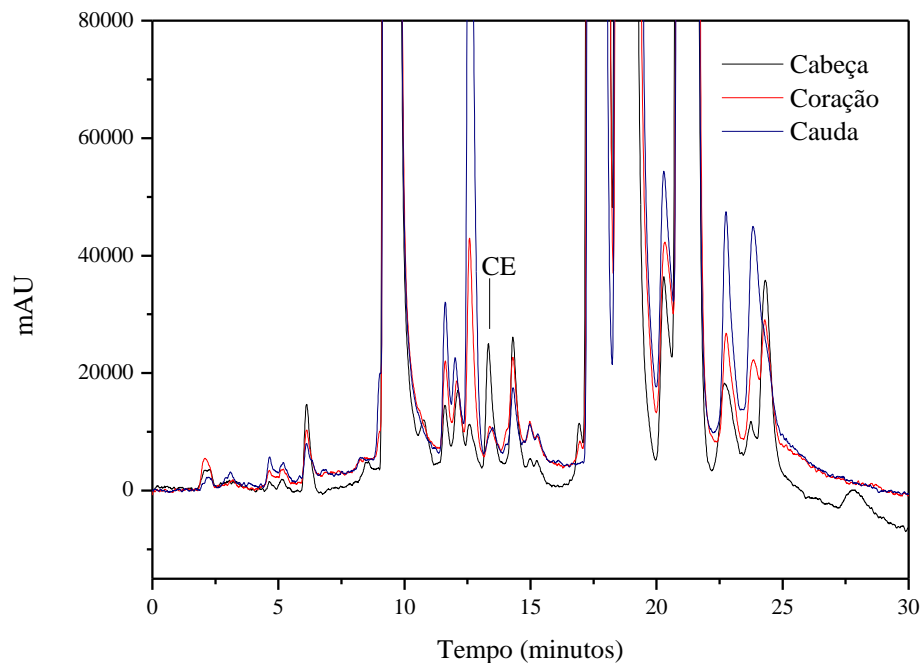


Figura 25 Cromatograma das frações “cabeça”, “coração” e “cauda” da cachaça produzida com fubá de milho + farelo de arroz, mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

Para muitos autores, a destilação da cachaça em alambiques de cobre poderia ser uma agravante na formação do carbamato de etila, pois há a possibilidade desse metal atuar como catalisador nas reações de formação desse contaminante (CARDOSO; LIMA-NETO; FRANCO, 2003; BRUNO et al., 2007, LACHENMEIER et al., 2009; RECHE; FRANCO, 2009). Porém, estudos realizados por Masson (2009) demonstraram que não houve correlação entre as concentrações de cobre e carbamato de etila em cachaça. Nos alambiques contínuos, acredita-se que a formação do carbamato de etila ocorra devido à não separação das frações do destilado (CARDOSO, 2013). Estudando a influência da velocidade e o tempo de destilação, Lima et al. (2012) observaram que, nos

primeiros minutos da destilação, existia uma maior concentração desse contaminante, e com o decorrer do tempo de destilação, houve uma diminuição nos teores de carbamato de etila. Comparando cachaças de mesmo vinho produzidas em alambique de cobre (com separação das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”) e cachaça produzida por coluna, Serafim et al., 2012 observaram que a soma das frações da bebida produzida em alambique apresentava teores de carbamato próximos ao da bebida produzida por coluna, concluindo que a separação eficiente das frações na cachaça de alambique tende a reduzir esse contaminante.

No vinhoto, resíduo da destilação, não foi possível determinar a presença do carbamato de etila, uma vez que esse estava abaixo do limite de detecção.

Na Tabela 9, encontram-se os resultados de CE referentes aos seis meses de armazenamento em carvalho e vidro da fração “coração” das aguardentes produzidas.

Tabela 9 Resultados da análise cromatográfica de CE referente aos seis meses de armazenamento em carvalho e vidro das frações “corações” dos quatro experimentos realizados.

| Amostras | Meses de armazenamento | | | | | | |
|--|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Levedura selecionada (Carvalho) | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | 8,32 Da ± 0,17 |
| Levedura selecionada (Vidro) | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | 8,28 Ca ± 0,02 | 8,38 Da ± 0,01 |
| Fubá de milho (Carvalho) | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | 8,36 Da ± 0,13 |
| Fubá de milho (Vidro) | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ | < LQ |
| Farelo de Arroz (Carvalho) | 9,89 Af ± 0,14 | 10,28 Be ± 0,51 | 10,62 Ad ± 0,23 | 11,20Ac ± 0,01 | 11,99 Ab ± 0,06 | 12,10Ab ± 0,01 | 12,42 Ba ± 0,03 |
| Farelo de Arroz (Vidro) | 9,89 Ac ± 0,14 | 11,01 Ab ± 0,07 | 10,83Ab ± 0,13 | 10,94Bb ± 0,07 | 11,17 Cb ± 0,17 | 11,81Ba ± 0,01 | 11,83 Ca ± 0,08 |
| Fubá de milho/Farelo de Arroz (Carvalho) | 9,84 Af ± 0,12 | 10,16 Be ± 0,27 | 10,11Be ± 0,42 | 10,88Bd ± 0,21 | 11,68 Bc ± 0,01 | 12,15Ab ± 0,05 | 13,06 Aa ± 0,01 |
| Fubá de milho/Farelo de Arroz (Vidro) | 9,84 Ae ± 0,12 | 10,26 Bd ± 0,12 | 10,59Ac ± 0,20 | 11,15Ab ± 0,18 | 11,39 Cb ± 0,12 | 12,00Aa ± 0,02 | 12,00 Ca ± 0,01 |

*Média ± desvio-padrão; Médias seguidas de mesma letra, sendo a maiúscula na coluna e a minúscula na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; ¹ % v/v; ² mg 100 mL⁻¹álcool anidro; ³ mg L⁻¹; ⁴ g L⁻¹; ND = não detectado; ** Brasil, 2005a.

Pelos resultados obtidos no armazenamento, constatou-se que esse contaminante foi detectado em todas as amostras; porém, para as bebidas produzidas por levedura selecionada e por fubá de milho até no quarto mês, o carbamato de etila não foi quantificado. Somente a partir do quinto mês de armazenamento em recipiente de vidro para a bebida produzida por levedura selecionada e sexto mês para a bebida produzida por fubá de milho armazenada em carvalho é que foi constatada a presença do CE, com valores abaixo dos encontrados. Para as bebidas produzidas tendo em sua constituição farelo de arroz (amostras produzidas somente com farelo de arroz e com a mistura de fubá de milho + farelo de arroz), observou-se a presença desse contaminante a partir do mês zero.

A única bebida em que o CE não foi quantificado ao longo dos seis meses de armazenamento foi para a cachaça produzida por fubá de milho armazenada em recipiente de vidro.

Ao longo do tempo de armazenamento, observou-se um aumento gradual do CE em ambos os recipientes, exceto para as bebidas produzidas com levedura selecionada e fubá de milho, pois ambas apresentaram valores abaixo do limite de quantificação até no quarto mês.

Esses resultados podem ser comparados observando os respectivos cromatogramas de cada uma das amostras no mês zero (fração “coração”) com o sexto mês de armazenamento de ambos recipientes.

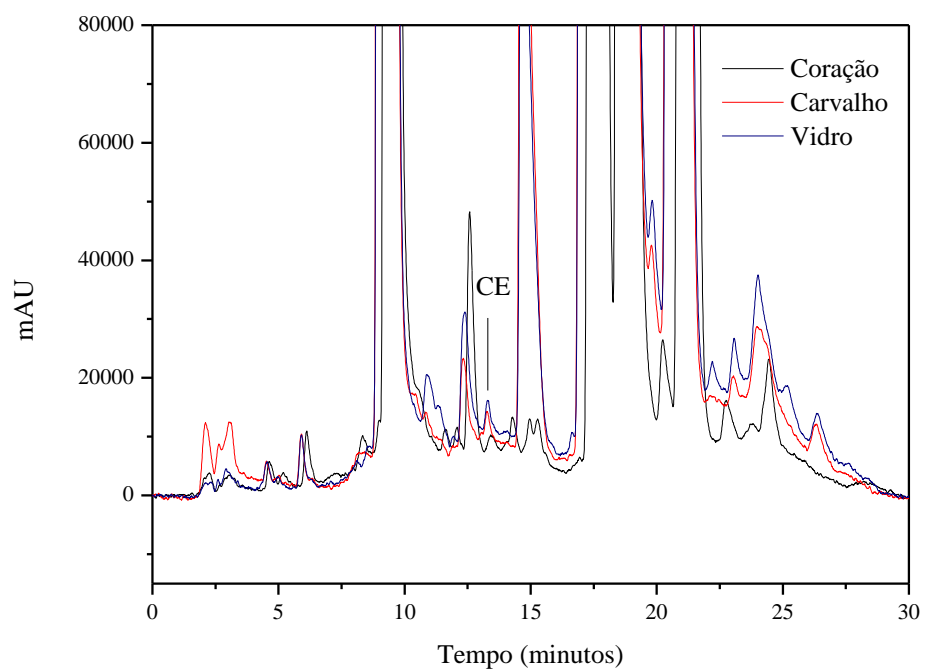


Figura 26 Cromatograma da cachaça produzida por levedura selecionada, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

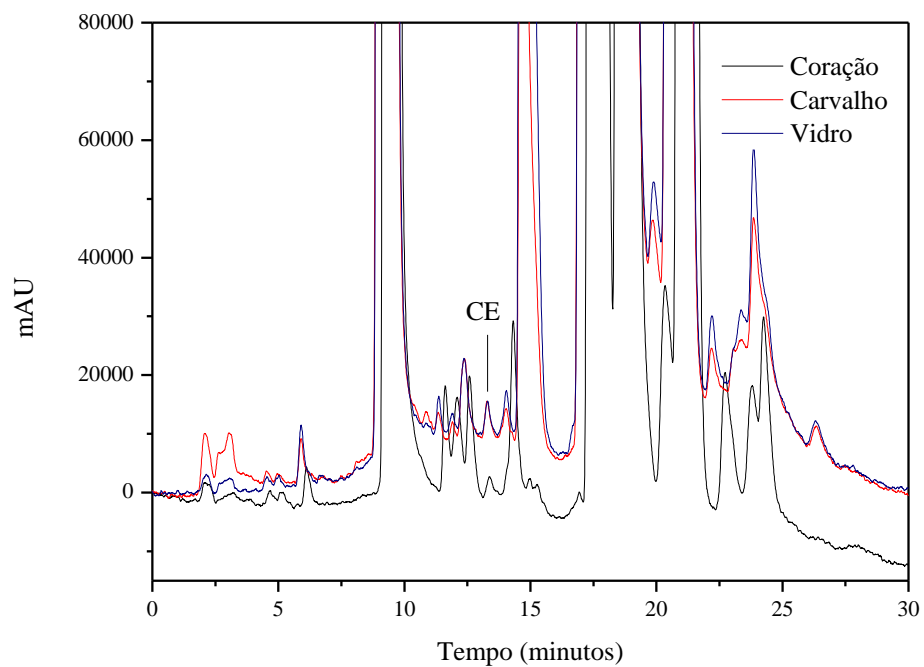


Figura 27 Cromatograma da cachaça produzida com fubá de milho, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

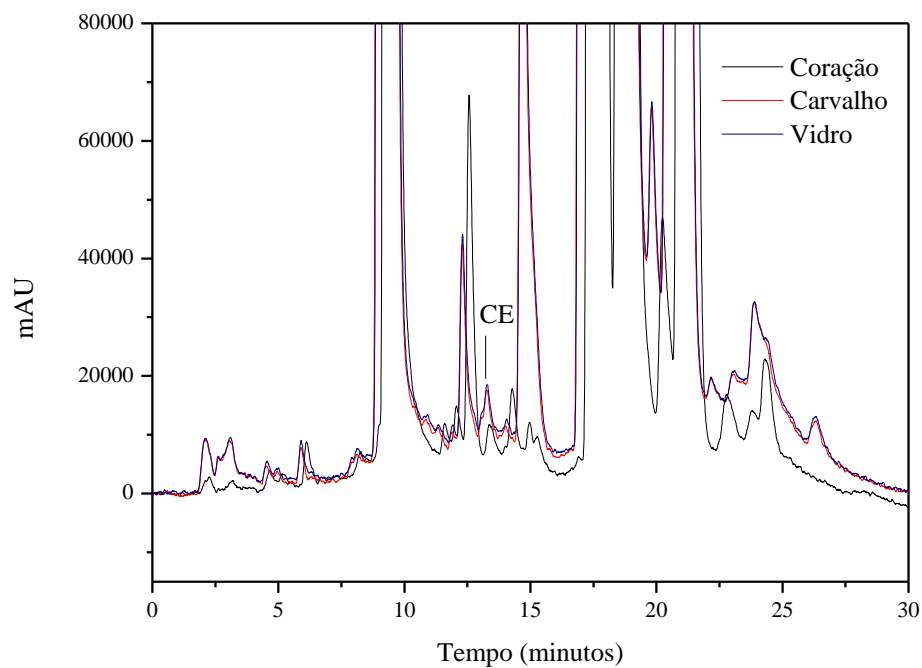


Figura 28 Cromatograma da cachaça produzida com farelo de arroz, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

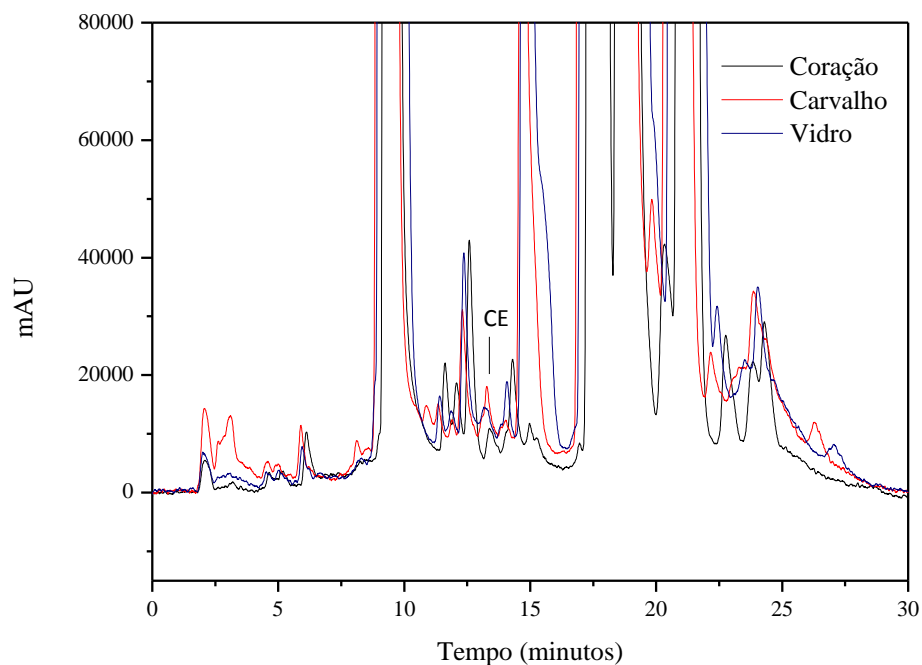


Figura 29 Cromatograma da cachaça produzida com fubá de milho + farelo de arroz, mês zero (fração “coração”) e sexto mês (armazenadas em tonel de carvalho e garrafão de vidro), mostrando a comparação do pico relativo ao carbamato de etila (CE)

Santiago (2013), estudando o envelhecimento da cachaça em dois diferentes barris de madeira ao longo de um ano, conseguiu detectar a presença desse contaminante; porém, os valores encontrados por ele estavam abaixo do limite de quantificação. Apesar da baixa concentração, ao longo dos meses de armazenamento, foi observada uma tendência na estabilização da concentração do CE para as cachaças envelhecidas.

Anjos et al.(2011a) avaliaram a formação desse contaminante em cachaças armazenada em carvalho e em vidro por um período de um ano. Em

ambos os armazenamentos, o autor constatou um aumento na concentração de CE, sendo esse aumento mais expressivo para a cachaça armazenada em recipiente de vidro. Diferentemente desses resultados, neste estudo observou-se que as bebidas produzidas (com farelo de arroz e farelo de arroz + fubá de milho) armazenadas em carvalho apresentaram maiores quantidades do contaminante, quando comparadas com as armazenadas em vidro.

Galinaro e Franco. (2011), estudando a formação do CE em aguardentes recém-destiladas, demonstraram que, na primeira semana após a destilação, ocorreu um aumento gradual na concentração do composto, em aguardentes produzidas com o mesmo vinho destiladas em alambique e em coluna. Acredita-se que o CE formado logo após a destilação é oriundo da presença precursores contidos no destilado.

Alguns autores relatam que durante o período de armazenamento da cachaça, a formação do CE ocorra de maneira gradativa, por meio da reação entre o etanol e a ureia formada pela degradação de precursores nitrogenados, intrínsecos do processo de produção da bebida, sendo os principais deles os aminoácidos arginina, ornitina e citrulina. Além desses, compostos nitrogenados têm sido estudados como possíveis precursores para a formação do carbamato de etila antes e após o processo de destilação, como é o caso do fosfato de carbamila e do íon cianeto (COOK et al., 1990; ZACARONI et al., 2011; Anjos et al., 2011a).

Hasnip et al. (2004), estudando a temperatura e a influência do tempo de estocagem sobre a concentração de carbamato de etila e seus precursores em vinhos, observaram uma diminuição nas concentrações de ureia e citrulina, ao passo que houve um aumento na concentração de CE. Esse fato evidencia a participação desses compostos na formação do CE, possibilitando uma análise cinética da formação dessa substância associada à concentração de etanol, ureia e citrulina em vinhos.

Mesmo ocorrendo um aumento na concentração de CE ao longo do tempo de armazenamento, todas as bebidas no presente estudo encontravam-se com os limites para esses contaminante inferiores ao exigido pela Legislação vigente, que é de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (Brasil 2005a).

5 CONCLUSÃO

Em todas as amostras estudadas, houve diferenças nas frações “cabeça”, “coração” e “cauda” em relação aos parâmetros físico-químicos e carbamato de etila.

A concentração de carbamato de etila não foi detectada no caldo de cana, mostrando que a variedade da cana e a moagem não influenciaram a sua formação. Nos diferentes mostos e nos respectivos vinhotos, os valores de carbamato de etila encontravam-se abaixo do limite de detecção para todas as amostras.

As frações da destilação da bebida realizada com o fermento levedura selecionada apresentaram concentrações de carbamato de etila menor que o LD. Para as bebidas produzidas por fermentação espontânea, tendo como nutriente farelo de arroz, os valores desse contaminante foram superiores ao LQ nas três frações.

O armazenamento das bebidas, tanto em tonel de carvalho quanto em recipiente de vidro, influenciou a formação do carbamato de etila, proporcionando um pequeno aumento na concentração desse contaminante; porém, menor que o limite máximo permitido pela legislação.

O metanol foi detectado apenas na fração “cabeça” de todas as bebidas produzidas. A bebida tendo como nutriente fubá de milho apresentou na análise de aldeídos valores fora dos Padrões de Identidade e Qualidade da bebida.

Durante o armazenamento, houve diferenças em relação aos parâmetros físico-químicos para as bebidas armazenadas em carvalho e vidro.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. de M. et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 2, p. 498-503, May 2005.
- ALCARDE, A. R. et al. Perfil físico-químico de aguardente de cana-de-açúcar produzida por metodologias de dupla destilação em alambique simples. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 499-506, jul./set. 2009.
- ALCARDE, A. R.; MONTEIRO, B. M. S.; BELLUCO, A. E. S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccaromyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, 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**, Campinas, v. 30, p. 226-232, maio 2010. Suplement, 1.
- 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. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca: parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.
- ANJOS, J. P. et al. 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, 2011a.
- ANJOS, J. P. et al. Evolution of the concentration of phenolic compounds in cachaça during aging in an oak (*Quercus* sp.) barrel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 22, n. 7, p. 1307-1314, 2011b.
- ARENA, M. E.; SAGUIR, F. M.; MANCA de NADRA, M. C. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine.

International Journal Food Microbiology, Torino, v. 52, n. 3, p. 155–161, 1999.

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.

ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS SUCROENERGÉTICAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **História** - cana de açúcar. Disponível em: <http://www.siamig.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=16&Itemid=61>. Acesso em: 7 nov. 2013.

AZEVEDO, Z.; COUTO, J. A.; HOGG, T. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 32-36, 2002.

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

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

BISPO, J.L.P. et al. Características físico-químicas de cachaças artesanais envelhecidas e não envelhecidas produzidas e comercializadas na Bahia. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 3, p. 173-180, jul./set. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 13, de 29 de junho de 2005**. Brasília, 2005a. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 24, de 8 de setembro de 2005**. Brasília, 2005b. Disponível em: <<http://www.ivegetal.com.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Referenciada/IN>

%20N%C2%BA%2024%20de%208%20de%20setembro%20de%202005.htm>. Acesso em: 10 dez. 2013.

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

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

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

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, maio/jul.1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000200005>. Acesso em: 15 dez. 2013.

CARDOSO, D. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 165-169, mar./abr. 2003.

CARDOSO, M. G. Análises físico-químicas de aguardente. In: _____. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. rev. e ampl. Lavras: Editora UFLA, 2013. p. 150-188.

CARDOSO, M. G. et al. Cachaça de Minas Gerais/Brasil: produção e qualidade. **Agrotec**: revista técnico-científica agrícola, Lisboa, v. 3, p. 98-101, 2012.

CASTRO, H. S. et al. Rendimentos agrícola e forrageiro de três cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em diferentes épocas de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1336-1341, set./out. 2009a.

CASTRO, M. V. L. et al. Rendimento industrial e composição química de milho de alta qualidade protéica em relação a híbridos comerciais. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 3, p. 233-242, jul./set. 2009b.

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. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-43662011000700013&script=sci_arttext>. Acesso em: 15 dez. 2013.

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

CLETO, F. V.G.; RAVANELI, G. C.; MUTTON, M. J. R. Effects of corn meal and sulphuric acid on the production of cachaça. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1379-1384, set./out. 2009.

COOK, R. et al. Ethyl carbamate formation in grain-based spirits. Part III. The primary source. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 96, n. 4, p. 233-244, July/Aug. 1990.

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

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. 2012.

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

DUARTE, W. F. et al. Effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça. **Journal of Food Science**, London, v. 76, n. 9, p. 1307-1318, 2011.

FEDDERN, V.; FURLONG, E. B.; SOARES, L.A. S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 800-804, out./dez. 2007.

FERNANDES, W. J. et al. Physicochemical quality of a blend of domestic cachaças from the South of Minas Gerais. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3-4, p. 257-261, May 2007.

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

GABRIEL, A. V. M. D. et al. Effect of the spontaneous fermentation and the ageing on the chemo-sensory quality of Brazilian organic cachaça. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 918-925, 2012.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. 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.

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

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

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

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

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).

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. **Mercado interno: capacidade instalada de produção de Cachaça no Brasil**.

Disponível em:

<<http://www.ibraccachacas.org/index.php/servicos/estatisticas/mercado-interno>>. Acesso em: 5 nov. 2013a.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. **Mercado externo: exportação da cachaça**. Disponível em:

<<http://www.ibraccachacas.org/index.php/servicos/estatisticas/mercado-externo>>. Acesso em: 5 nov. 2013b.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Portaria nº 126, de 2005**. Regulamento de avaliação da conformidade da cachaça. Disponível em:

<<http://www.inmetro.gov.br/rtac/pdf/RTAC000955.pdf>>. Acesso em: 6 nov. 2013.

LABANCA, R. A.; GLORIA, M. B. A.; AFONSO, R. Determination of ethyl carbamate in sugar cane spirits by GC-MS. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1860-1864, 2008.

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

LACHENMEIER, D. W. et al. Ethyl carbamate analysis in german fruit spirits and brazilian sugarcane spirits (cachaça): improved sample cleanup with automated parallel evaporation. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Stuttgart, v. 105, n. 8, p. 507-512, 2009.

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

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

LIMA, U. A. et al. Influence of fast and slow distillation on ethyl carbamate content and on coefficient of non-alcohol components in Brazilian sugarcane

spirits. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 118, n. 3, p. 305-308, Nov. 2012.

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

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

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

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

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. 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.

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

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

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

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.

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.

NAVES, M. M. V. et al. Avaliação química e biológica do grão em cultivares de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 1-8, jan./abr. 2004.

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

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2011. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

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.

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

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

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

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

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

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.

RIACHI, L. G. et al. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 149, p. 159-169, Apr. 2014.

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

ROMERO, S. V. et al. Potential formation of ethyl carbamate in simulated wine inoculated with *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 1206-1213, June 2009.

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

SANTIAGO, W. D. **Teores de carbamato de etila e composição fenólica no processo de produção e no envelhecimento de cachaça em tonéis de carvalho (*quercus sp*) e amburana (*amburana cearensis*)**. 2013. 169 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SCANAVINI, H. F. A.; CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A. Cachaça distillation investigated on the basis of model systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 429-440, Apr./June 2012.

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

SCHLATTER, J.; DINOVI, M.; SETZER, W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic Example: Ethyl carbamate (CAS 51-79-6). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. S63-68, Jan. 2010. Supplement, 1.

SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; DIAS, W. R. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. amp. e rev. Lavras: Editora UFLA, 2013. p. 80-101.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

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

SERAFIM, F. A. et al. Ácidos orgânicos em aguardentes produzidas em alambique e em coluna. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2011.

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, 2012. (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. 2013.

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

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, 2009b.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4 p. 805-811, out./dez. 2007.

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

SOUSA, J. L. U; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**, v. 2, 2011. Disponível em: <<http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/view/471>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

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

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

VIDAL, E.E. et al. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food Chemistry**, London, n. 138, n. 1, p. 701–708, May 2013.

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.

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.

ZHAO, X. et al. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge v. 32, p. 97-107, 2013.