

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Liza Ghassan Riachi

**ESTUDO DAS BEBIDAS CONSUMIDAS NO BRASIL. ESTUDO DA FRAÇÃO
VOLÁTIL DO CHÁ DA HORTELÃ PIMENTA (*Mentha piperita*) E ANÁLISE
REVISADA DO RISCO DE CONTAMINAÇÃO DA CACHAÇA POR CARBAMATO
DE ETILA E HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

Rio de Janeiro/RJ

2014

Liza Ghassan Riachi

ESTUDO DAS BEBIDAS CONSUMIDAS NO BRASIL. ESTUDO DA FRAÇÃO
VOLÁTIL DO CHÁ DA HORTELÂ PIMENTA (*Mentha piperita*) E ANÁLISE REVISADA
DO RISCO DE CONTAMINAÇÃO DA CACHAÇA POR CARBAMATO DE ETILA E
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal
do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do
título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bastos de Maria

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira

Rio de Janeiro/RJ

2014

Liza Ghassan Riachi

ESTUDO DAS BEBIDAS CONSUMIDAS NO BRASIL. ESTUDO DA FRAÇÃO
VOLÁTIL DO CHÁ DA HORTELÂ PIMENTA (*Mentha piperita*) E ANÁLISE REVISADA
DO RISCO DE CONTAMINAÇÃO DA CACHAÇA POR CARBAMATO DE ETILA E
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em _27_/_03/_2014_

Prof. Dr. Carlos Alberto Bastos de Maria
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dra. Teresa Tonini
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Geraldo Ceni Coelho
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS/Chapecó

Dedico este trabalho aos meus pais, Renée e Ghassan, e ao meu irmão Wissam por seu essencial apoio ao longo de minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Bastos de Maria pelos anos de apoio, orientação, ensinamentos, dedicação, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira pelos anos de apoio, amizade e ajuda.

À velha companheira de laboratório Iara Elizabeth por todo tempo de trabalho em conjunto e cooperação.

Aos companheiros de laboratório mais recentes, Ândria e Daniel, pela ajuda e apoio.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Teresa Tonini, Prof. Dr. Geraldo Coelho, Profa. Dra. Claudia Cardoso Neto e Prof. Dr. Altemir José Mossi.

A todos os professores da Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição e aos professores da Escola de Nutrição da UNIRIO que fizeram parte da minha formação e torceram pelo meu ingresso no mestrado.

Aos amigos da faculdade que sempre ajudaram e torceram por mim: Alex Camara, Mariana Luiz Marques, Carolina Leite e Iara Elizabeth.

À minha família e aos meus amigos Marina Marandino, Anna Beatriz Meireles, Daniel Garcez, Rafael Camilo e Pamela Kfoury pelo essencial apoio e carinho.

À todos os colegas do mestrado.

À todos os funcionários da UNIRIO.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

RESUMO

Foi investigada a fração volátil do extrato aquoso de sachês comerciais de hortelã pimenta usando cromatografia gasosa com detectores de ionização em chama e de massas (CG/DIC e CG/EM). As amostras foram preparadas em condições similares às usadas para o preparo do chá caseiro. Os compostos voláteis foram isolados via método de extração em fase sólida com adsorvente Porapak Q e eluídos com acetona. Os valores médios estimados dos ácidos carboxílicos de cadeias média e curta ficaram na faixa de 50-63 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto os álcoois alifáticos e hidrocarbonetos acíclicos apresentaram valores menores do que 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os terpenos foram os compostos majoritários (275-385 $\mu\text{g kg}^{-1}$), alcançando 89 % dos sólidos totais. Um total de 16 compostos voláteis, entre eles, dodecano, acetoina, acetol, citral, geraniol e ácido octanóico foram descritos pela primeira vez no chá de hortelã pimenta. Esses resultados poderiam ser atribuídos aos diferentes métodos analíticos empregados, principalmente devido ao uso de diferentes técnicas de extração e pré-concentração. Em função da proporção menor de terpenos no extrato aquoso é razoável especular que as propriedades químicas do óleo essencial da hortelã pimenta não sejam totalmente reproduzidas com o consumo do chá caseiro. Um total de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tem sido identificado na cachaça e na aguardente de cana brasileira. As principais fontes de contaminação desses compostos incluem a queima da cana de açúcar antes da colheita e a contaminação do produto com derivados do petróleo. A concentração de HPAs nas bebidas produzidas a partir da cana queimada tem sido cerca de 2 a 3 vezes maior do que as produzidas com a planta não queimada. A concentração de benzo(a)pireno (BaP) representa apenas 1% do total de HPAs, portanto, não é indicado para ser marcador representativo da contaminação da cachaça e de outras aguardentes de cana por HPAs. O carbamato de etila (CE) é produzido tanto durante a fermentação do caldo de cana, quanto no processo de destilação. Durante a destilação, os íons cúpricos podem catalisar a conversão do cianeto a CE. No processo descontínuo de destilação, o uso da fração coração como produto final para engarrafamento diminui consideravelmente a concentração do CE na bebida. Já no processo contínuo de destilação, o qual não há separação das frações do destilado, é altamente recomendado o uso de dispositivos de refrigeração e de refluxo na coluna. Os consumidores de cachaça e aguardente de cana estão mais expostos à contaminação por CE do que os consumidores de outras bebidas alcoólicas fermento-destiladas.

Palavras-chaves: Hortelã pimenta. CG/EM. Terpenos. Cachaça. HPAs. Carbamato de etila.

ABSTRACT

The investigation of the volatile fraction from the aqueous extract of commercial sachets of peppermint was performed using gas chromatography with flame ionization and mass detectors. This work used similar general conditions as in the homemade tea that is usually done by means of non-exhaustive extraction with boiling water. The enrichment of volatiles was made through adsorptive chromatography with Porapak Q polymer followed by desorption with acetone. Estimated mean values for short and medium chain acids and ketones were 50-63 $\mu\text{g kg}^{-1}$ whilst alcohols and acyclic hydrocarbons had values lower than 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Major volatiles were terpenes (275-385 $\mu\text{g kg}^{-1}$) that reached 89 % of the total. A total of 16 compounds (acetoin, acetol, citral, geraniol and octanoic acid, among others) were definitively identified and reported as peppermint tea constituents for the first time. These findings could be due to the different analytical approach employed mainly to the use of different pre-concentration technique. Given the apparently lower proportion of terpenes in the aqueous extract it may be that the chemical properties of the peppermint oil are not entirely reproduced with tea. Sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been identified in Brazilian sugarcane spirits. Contamination sources are: sugarcane burn before harvest and petroleum derivatives. PAHs concentration in spirits produced from burned cane was about 2–3 times higher than those from unburned cane. Benzo(a)pyrene (BaP) is present at less than 1%, and therefore is not a representative marker of cachaça contamination by PAHs. Ethyl carbamate (EC) is produced during both fermentation and distillation. During distillation, cupric ions may catalyse the conversion of cyanide to EC. In discontinuous distillation, the use of the heart fraction for bottling cachaça considerably decreases its concentration. In the continuous process, in which there is no separation of distillate, it is highly recommended to couple cooling devices and reflux systems to the distillation column. Consumers are at a greater risk of EC exposure from cachaça than from any other spirit.

Key-words: Peppermint. GC/MS. Volatiles. Cachaça. PAHs. Ethyl carbamate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Monoterpenos (A) e sesquiterpenos (B) do óleo essencial de hortelã pimenta.	2
Figura 2. Alguns dos principais compostos fenólicos e flavonóides da hortelã pimenta.....	11
Figura 3. Perfil cromatográfico de uma amostra de chá e de alguns padrões utilizados.....	27
Figura 4. Estrutura do carbamato de etila.....	38
Figura 5. Alambique e sistemas de resfriamento.....	45
Figura 6. Destilador industrial – Sistema contínuo de destilação.	46
Figura 7. Estrutura de alguns HPAs.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos de impacto para o aroma.....	7
Tabela 2. Compostos fenólicos da hortelã pimenta.....	12
Tabela 3. Capacidade antioxidante da hortelã pimenta.....	19
Tabela 4. Compostos voláteis do chá de hortelã pimenta. Valores expressos em $\mu\text{g Kg}^{-1}$	26
Tabela 5. Compostos voláteis do chá de hortelã pimenta detectados através da CG/O.....	28
Tabela 6. Concentração de CE em cachaça e outras aguardentes de cana brasileiras.....	41
Tabela 7. Concentração de HPAs em amostras de cachaça e outras aguardentes de cana. Valores expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	Ácido Ascórbico Equivalente
ABTS	Atividade de Descoloração do Radical Cátion
AC	Acenafteno
AEDA	Análise de Diluição do Extrato do Aroma
AESA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
NA	Naftaleno
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluoranteno
BeP	Benzo(e)pireno
BghiP	Benzo(ghi)pireno
BjF	Benzo(j)fluoranteno
BkF	Benzo(k)fluoranteno
CCAH	Comitê Científico para Alimentação Humana
CE	Carbamato de Etila
CEC ₅₀	Poder quelante do íon ferroso em 50%
CG/DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chamas
CG/EM	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas
CG-EM-EM	Cromatografia Gasosa em Tandem
CG-FTIR	Cromatografia Gasosa com infravermelho com transformada de <i>Fourier</i>
CG-O	Cromatografia Gasosa acoplada à Olfatometria
CLAE-DF	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência

CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ultra Violeta
CR	Criseno
DBahA	Dibenzo(ah)antraceno
DBaiP	Dibenzo(ai)pireno
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EFS	Extração em fase sólida
EFSA	European Food Safety Authority
ELL	Extração líquido líquido
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
F	Fluoranteno
FE	Fenantreno
FIC	Poder quelante do íon ferroso
FL	Fluoreno
GAE	Ácido gálico equivalente
HOSC	Capacidade sequestradora de radicais hidroxila
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IARC	International Agency for Research on Cancer
IP	Indeno(1,2,3-c,d)pireno
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MCR	Metilcriseno
MEP	Via 2C-metil-D-eritrol 4-fostato
MM	Massa Molecular
MOE	Margem de exposição

MRM	Monitoramento de reação múltipla
NA	Naftaleno
NIST	National Institute of Standards and Technology
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio
PCA	Análise de Componentes Principais
PI	Pireno
RDSC	Capacidade sequestradora de radicais relativa ao DPPH
SCF	Scientific Committee on Food
SIM	Monitoramento seletivo de íon
SPME	Microextração em Fase Sólida

SUMÁRIO

PARTE I. ESTUDO DA FRAÇÃO VOLÁTIL DO CHÁ DA HORTELÃ PIMENTA.....	1
1. REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. FRAÇÃO AROMÁTICA DA HORTELÃ PIMENTA	1
1.2. COMPOSIÇÃO DE FENÓLICOS	10
1.3. VITAMINAS E MINERAIS	14
1.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	16
2. INTRODUÇÃO	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. MATERIAIS	22
4.2. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL.....	23
4.3. ANÁLISE CROMATROGRÁFICA	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO	29
PARTE II. ANÁLISE REVISADA DO RISCO DE CONTAMINAÇÃO DA CACHAÇA POR CARBAMATO DE ETILA E HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	30
7. INTRODUÇÃO	30
8. OBJETIVOS	32
8.1. OBJETIVO GERAL	32
8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
9. MÉTODOS DE ANÁLISE.....	32
10. CARBAMATO DE ETILA	34
10.1. OCORRÊNCIA E EXPOSIÇÃO	34
10.2. FORMAÇÃO	35
10.3. RESULTADOS	39
11. HPAs.....	48
11.1. OCORRÊNCIA E EXPOSIÇÃO	48
11.2. FORMAÇÃO	49
11.3. RESULTADOS	50
12. CONCLUSÃO	54
13. REFERÊNCIAS.....	57

PARTE I. ESTUDO DA FRAÇÃO VOLÁTIL DO CHÁ DA HORTELÃ PIMENTA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. FRAÇÃO AROMÁTICA DA HORTELÃ PIMENTA

1.1.1. PERFIL DE VOLÁTEIS

A produção de grande quantidade de monoterpenos do tipo p-mentano pelo metabolismo da hortelã pimenta, confere ao seu óleo essencial um aroma agradável de considerável valor econômico, uma vez que é utilizado na manufatura de diversos produtos alimentícios e farmacêuticos (GERSHENZON; MCCONKEY; CROTEAU, 2000; LAWRENCE, 2006). Em geral, as folhas possuem entre 1,2% e 3,9% (p/v) de óleo essencial, o qual contém mais de 300 compostos voláteis identificados (BENN, 1998; FRÉROT; BAGNOUD; VUILLEUMIER, 2001; GÜNTERT et al., 2001; MCKAY; BLUMBERG, 2006; LAWRENCE, 2006; SCHMIDT et al., 2009; CHEN et al., 2011). Os terpenos constituem a classe de compostos majoritários do óleo essencial, incluindo mono e sesquiterpenos (GÜNTERT et al., 2001; CHEN et al., 2011). Dentre os monoterpenos, o mentol é o principal constituinte (35-60%), seguido pela mentona (2-44%) e outros compostos minoritários [acetato de mentila (0,7-23%), 1,8-cineol (1-13%), mentofurano (0,3-14%), isomentona (2-5%), neomentol (3-4%), limoneno (0,1-6%), β -pineno (0,9-1,5%), α -pineno (0,7-0,8%), linalol (0,2-0,7%) e α -terpineol (0,1-0,3%)], enquanto o β -cariofileno representa o principal sesquiterpeno (1,6-1,8%) (CLARK; MENARY, 1981; GÜNTERT et al., 2001; VERMA et al., 2011).

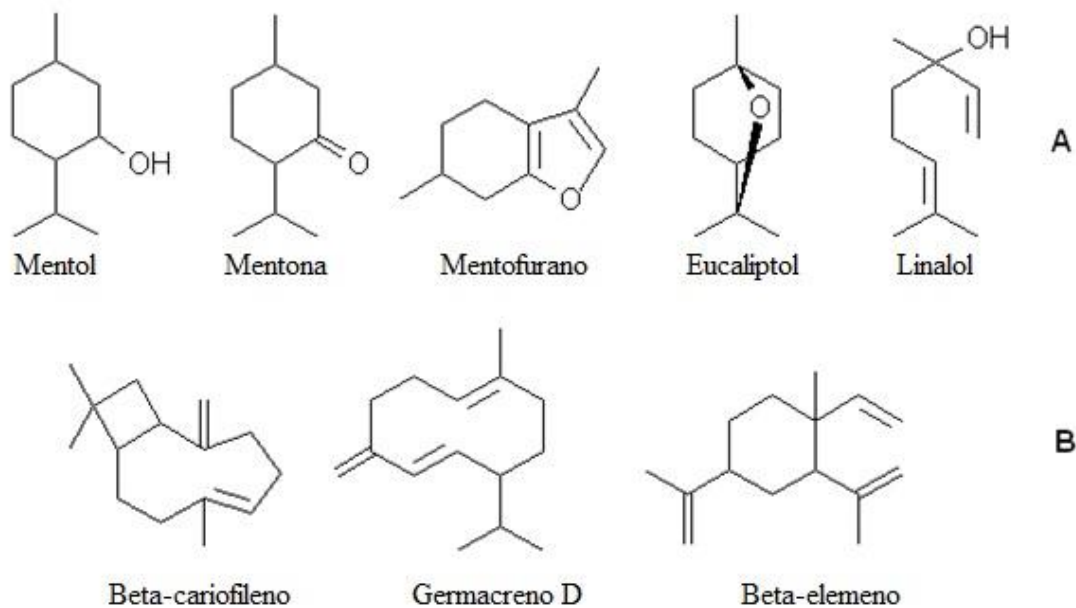


Figura 1. Monoterpenos (A) e sesquiterpenos (B) do óleo essencial de hortelã pimenta.

Compostos voláteis são geralmente isolados do óleo essencial, a partir da hidrodestilação das folhas secas ou frescas da hortelã; no entanto, alguns estudos analisaram a fração volátil da planta, através do seu extrato aquoso (DUBAND et al., 1992; ORAV; KANN, 2001; RIACHI et al., 2012). Em dois desses trabalhos, os voláteis foram obtidos através da fração oleosa, extraída de um tisano (DUBAND et al., 1992; ORAV; KANN, 2001), enquanto que no terceiro estudo, os compostos foram diretamente isolados da infusão da erva, sem a separação do óleo (RIACHI et al., 2012). Duband et al. (1992) observaram que o tisano continha 21% do óleo original e identificaram 21 compostos, dos quais 81% eram monoterpenos, 14% sesquiterpenos e 5% álcoois. Alguns monoterpenos e sesquiterpenos, como o limoneno, 1,8-cineol, germacreno D e viridiflorol, não foram detectados. Orav e Kann (2001) identificaram 41 terpenos, representados por monoterpenos (90,6%) e sesquiterpenos (5,8%); no entanto, os compostos foram apenas identificados por tentativa, uma vez que a técnica de CG/EM não foi utilizada. No último estudo, 31 compostos voláteis foram identificados no chá, dentre eles a maior parte foi representada por terpenos (45%), seguido por hidrocarbonetos acíclicos (26%), ácidos carboxílicos (13%), e em menor proporção, cetonas (6%), álcoois alifáticos (7%) e cumarina (3%) (RIACHI et al., 2012).

A composição química do óleo recuperado da hidrodestilação também foi analisado e comparado com o óleo original (decantado) (VERMA et al., 2011). O óleo recuperado

apresentou maior quantidade de terpenos oxigenados (82,2-85,6%), especialmente de álcoois terpênicos (58,2%), como mentol, terpinen-4-ol, α -terpineol, linalol, isopulegol e isomentol que o óleo essencial original (41%), representado por maiores quantidades de mono e sesquiterpenos. Uma vez que a composição volátil do óleo essencial difere da composição do extrato aquoso, é esperado que as propriedades fisiológicas também sejam diferenciadas entre os dois produtos. É importante ressaltar que, além das diferenças entre a composição de amostras de hortelã pimenta submetidas a diferentes métodos de extração, existe, também, grande variação na proporção dos compostos, oriunda de influências edafoclimáticas sobre o metabolismo da planta (MAFFEI et al., 1999; ROHLOFF et al., 2005; ZHELJAZKOV et al., 2010). Geralmente, o óleo essencial de hortelã pimenta de boa qualidade contém maiores quantidades de (-)-mentol e (-)-mentona do que (+)-pulegona e (+)-mentofurano, e essa proporção varia de acordo com as respostas metabólicas da planta em relação ao meio ambiente (MAHMOUD; CROTEAU, 2003). Dependendo da condição ambiental, tanto a via redutora quanto a oxidativa podem ser estabelecidas. A (-)-pulegona representa o intermediário central na formação do (-)-mentol. Quando a via redutora predomina, ela é reduzida a (-)-mentona e, posteriormente, a (-)-mentol; enquanto que na via oxidativa, a concentração de (+)-mentofurano e (+)-pulegona é maior que a de (-)-mentol. O acúmulo de (-)-pulegona e (-)-mentofurano foi observado em plantas cultivadas sobre baixa intensidade de luz ou em grande deficiência hídrica e altas temperaturas noturnas (BURBOTT; LOOMIS, 1967; COURT; ROY; POCS, 1993), enquanto longo fotoperíodo favoreceu o acúmulo de mentol (VOIRIN; BRUN; BAYET, 1990). Portanto, é esperado que características peculiares agroclimáticas de áreas produtoras de hortelã pimenta influam drasticamente na composição do óleo essencial (CLARK; MENARY, 1981; TELCI et al., 2011). A utilização de radiação UVA (radiação ultravioleta A) com luz branca, durante o período noturno, estimulou o aumento de mentol, porém aumentou a produção de mentofurano (MAFFEI et al., 1999). Adicionalmente, folhas jovens de hortelã pimenta tendem a apresentar menores concentrações de mentol (20%), enquanto folhas mais velhas possuem maior quantidade desse composto (50%), indicando que a época de colheita é de grande importância para a obtenção de um óleo essencial de qualidade superior (CLARK; MENARY, 1981; ROHLOFF et al., 2005). Portanto, deve-se evitar tanto o estresse hídrico e altas temperaturas noturnas, quanto a utilização de folhas mais jovens.

Além da influência de práticas agrícolas na qualidade do óleo essencial, a engenharia metabólica também vem emanando esforços para melhorar tanto o rendimento do óleo,

quanto sua composição (MAHMOUD; CROTEAU, 2003; LANGE et al., 2011). O aumento do rendimento do óleo foi observado, através da superexpressão de genes selecionados, envolvidos na via 2C-metil-D-eritrol 4-fostato (MEP), responsável pelo provimento de precursores para a biossíntese de monoterpenos. Além disso, foi obtido óleo com concentração reduzida de (+)-mentofurano e (+)-pulegona, a partir da expressão da (+)-mentofurano sintase na orientação antisense (MAHMOUD; CROTEAU, 2003; LANGE et al., 2011). A aplicação de água residual, oriunda da destilação de algumas plantas, incluindo a da própria hortelã pimenta ou hormônios em plantas de hortelã, também promovem a alteração da composição do seu óleo. A utilização de extratos de hortelã pimenta, na forma de *spray* foliar, promoveram o decréscimo de L-mentona e o aumento de acetato de mentila. No entanto, observou-se o aumento da concentração de L-mentol, quando extratos de jasmonato de metila, na concentração de 10, 100 e 1000 mg L⁻¹ ou extrato de *Mentha gracilis* foram aplicados (ZHELJAZKOV; ASTATJIKIE, 2012).

1.1.2. COMPOSTOS DE IMPACTO PARA O AROMA

O uso de técnicas olfatométricas, permitiu que houvesse melhor compreensão sobre a impressão sensorial global do óleo essencial de hortelã pimenta. Nesse sentido, no entanto, apenas alguns estudos avaliaram a contribuição dos principais compostos, bem como dos constituintes minoritários para o impacto do aroma da hortelã pimenta (BENN, 1998; GÜNTERT et al., 2001; FRÉROT; BAGNOUD; VUILLEUMIER, 2002; SCHMIDT et al., 2009). A Tabela 1, apresenta uma compilação dos compostos aromáticos da hortelã. A classe dos terpenos foi a mais representativa, composta por monoterpenos (cerca de 52%) e sesquiterpenos (9%), enquanto outros grupos se apresentaram em menor proporção, como o dos aldeídos (9%), o dos hidrocarbonetos aromáticos (9%), miscelâneos (8%), das lactonas (7%) e dos álcoois (6%). Os valores de *threshold* de cada composto em diferentes meios (ex.: água, ar) foram apresentados, quando possível, bem como as informações de percepção do odor. No entanto, o impacto de cada composto para o aroma não pôde ser precisamente determinado, pois existem poucas informações sobre o valor de odor ativo dos compostos voláteis da hortelã pimenta.

O *flavor* característico de menta, bem como a sensação de frescor da hortelã pimenta, são associados, principalmente, ao mentol e, em menor proporção, a seus derivados (ex.: mentona). Apesar disso, alguns estudos vem demonstrando que outros compostos podem desempenhar papel importante para o aroma. Em estudo prévio, foi utilizado pela primeira vez a ADEA para caracterizar os compostos de odor ativo na hortelã pimenta de Yakima (BENN, 1998). O mentofurano foi o odorante mais potente detectado, pois apresentou notas odoríferas após diluição de 20480 vezes. Outros compostos importantes também foram detectados, como o 1,8-cineol, a pulegona e a (*E*)- β -damascenona. Estudos subsequentes, identificaram compostos tão importantes quanto o mentofurano, com menor valor de *threshold* no ar, como: 1, (3*E*, 5*Z*)-undecatrieno, (*E*)- β -damascenona, (*E*, *Z*)-2,6-nonadienal, eugenol e mentofuro lactona (BLANK, 1996; GÜNTERT et al., 2001; FRÉROT; BAGNOUD; VUILLEUMIER, 2002). Os isômeros Ocimenos, (*Z*, *Z*)-8-Ocimenol, (*E*, *Z*)-8-Ocimenol e seus respectivos acetatos [acetato de (*Z*, *Z*)-8-Ocimenila e acetato de (*E*, *Z*)-8-Ocimenila] foram descritos pela primeira vez no óleo essencial da hortelã pimenta (GÜNTERT et al., 2001). Os dois acetatos foram considerados importantes componentes do aroma, mais especificamente, o acetato de (*E*, *Z*)-8-Ocimenila foi o mais relevante, uma vez que apresentou menor valor de *threshold* (0,4 $\mu\text{g L}^{-1}/\text{ar}$) e maior concentração no óleo (30 ppm), do que o acetato de (*Z*, *Z*)-8-Ocimenila (0,5 $\mu\text{g L}^{-1}/\text{ar}$; 20 ppm).

As *p*-mentano lactonas, compreendem uma classe de compostos odoríferos importantes que foram detectados em menores quantidades, no óleo essencial (NÄF; VELLUZ, 1998; GAUDIN, 2000; GÜNTERT et al., 2001; FRÉROT; BAGNOUD; VUILLEUMIER, 2002; DAMS et al., 2012). As principais lactonas monoterpênicas são: mentofurano, mentalactona, isomentalactona e dehidro-mentalactona. Esses quatro componentes são conhecidos por contribuir para as notas odoríferas de côco, doce, de feno e tipo cumarínico do óleo essencial de hortelã pimenta. Outros estudos, detectaram compostos com impressão odorífera similar. A mentofuro lactona, por exemplo, era conhecida como subproduto formado durante a foto-oxidação do mentofurano. Frérot, Bagnoud e Vuilleumier (2002) relataram, pela primeira vez, a presença desse composto, em um produto natural, quando analisaram a hortelã pimenta. O valor de *threshold* da mentofuro lactona (0,0004 $\mu\text{g L}^{-1}/\text{ar}$) se apresentou tão baixo quanto o da cumarina (0,00023 $\mu\text{g L}^{-1}/\text{ar}$) que é considerada um ingrediente popular para fabricação de perfumes. Outra lactona importante encontrada foi a 3,6-dimetilbenzo-[b]-furan-2-ona, trivialmente chamada de furanomentona (NÄF;

VELLUZ, 1998; GÜNTERT et al., 2001). Essa lactona também apresentou baixo valor de *threshold* ($0,0008 \mu\text{g L}^{-1}/\text{ar}$) e notas odoríferas doces, similares ao côco e cumarina.

Tabela 1. Compostos de impacto para o aroma.

Compostos	IR	Valores de <i>threshold</i> (ppb)	Impressão odorífera
Sulfato de dimetila ¹	498 ⁴	0,16–12 ^{A, 10}	milho ¹
2-Metilpropanal ¹	789 ⁶	0,1–2,3 ^{A, 10}	doce ¹ , cacau ¹ , malte ¹
Butirato de etil-2-metila ¹	832 ⁴	0,1–0,3 ^{A, 10}	fruta ¹ , folhas ¹ , maçã ¹
Isovalerato de etila ¹	835 ⁴	n/e	fruta ¹ , morango ¹
(Z)-3-Hexenol ¹	838 ⁴	70 ^{A, 10}	folhas ¹ , mato ¹
Ácido 2-metilbutírico ¹	856 ⁵	n/e	fruta ¹ , suor ¹ , butírico ¹
Metional ¹	864 ⁵	0,2 ^{A, 10}	sulfuroso ¹ , cozido ¹ , batata ¹
(Z)-4-Heptenal ¹	885 ⁵	0,8 ^{A, 10}	pungente ¹ , ardido ¹ , gordura ¹ , vegetais ¹
2,5-Dietil tetrahydrofurano ¹	890 ⁴	n/e	pungente ¹ , solvente ¹ , éter ¹
α -Tujeno ²	923 ⁴	n/e	erva ² , folha ² , terra ²
α -Pineno ^{1,2}	931 ⁴	62 ^{A, 11}	pinho ^{1,2} , erva ²
Canfeno ²	943 ⁴	1980 ^{A, 11}	cânfora ²
1-Octen-3-ol ¹	964 ⁴	1 ^{A, 10}	terra ¹ , folha ¹ , <i>champignon</i> ¹
Sabineno ²	965 ⁴	37 ^{A, 11}	fruta apimentada ²
β -Pineno ²	971 ⁴	82 ^{A, 11}	resina de pinho ²
Mirceno ^{1,2,3}	981 ³	0,11 ^{B, 3} ; 13–15 ^{A, 10}	floral ¹ , apimentado ¹ , lúpulo ¹ ; limão ² ; madeira ³
Octanal ¹	982 ⁵	0,7 ^{A, 10}	cítrico ¹ , aldeído ¹
3-Octanol ²	983 ⁴	n/e	queijo ² , menta ² , erva ²
α -Felandreno ²	996 ⁴	200 ^{A, 11}	cítrico ² , apimentado ²
1,8-Cineol ^{1,2,3}	1021 ⁴	0,0031 ^{B, 3}	refrescante ^{1,2,3} , eucalipto ^{1,2,3}
Limoneno ^{1,2}	1023 ⁴	10 ^{A, 11}	limpeza ¹ , cítrico ^{1,2} , refrescante ²
(Z)- β -Ocimeno ³	1027 ³	0,01 ^{B, 3}	terpeno ³
(E)- β -Ocimeno ^{2,3}	1038 ³	0,02 ^{B, 3}	erva ² , floral ² ; terpeno ³ , manga ³
γ -Terpineno ²	1051 ⁴	n/e	cítrico ² , erva ² , terpeno ²
Hidrato de (E)-Sabineno ²	1055 ⁴	n/e	erva ² , bagas de zimbório ²
Guaiacol ¹	1056 ⁵	3–21 ^{A, 10}	doce ¹ , fumaça ¹ , fenólico ¹
Terpinoleno ²	1076 ⁴	200 ^{A, 10}	pinho doce ² , terpeno ²
2-Feniletanol ¹	1078 ⁷	1000 ^{A, 12}	floral ² , rosa ¹

Tabela 1. Continuação.

Compostos	RI	Valores de Threshold (ppb)	Impressão odorífera
Hidrato de (Z)-sabineno ²	1083 ⁴	n/e	apimentado ² , fruta ²
Linalol ^{1,2,3}	1085 ⁴	0.002 ^{B, 3} ; 6 ^A ; 11	floral ^{1,2,3} , doce ¹ , creme ¹ , refrescante ² , fruta ³ , cítrico ³
Mentona ^{1,2}	1134 ⁴	170 ^{A, 13}	menta ^{1,2} , limpeza ¹ , refrescante ¹
(E, Z)- 2,6-nonadienal ¹	1137 ⁵	0,0001–0,0004 ^{B, 18} 0.01 ^{A, 14}	folha, floral, pepino ¹
Isomentona ²	1143 ⁴	n/e	refrescante ² , menta ²
Isopulegol ²	1148 ²	n/e	erva ² , menta, cânfora ²
Mentofurano ^{1,2,3}	1150 ³	0,0004 ^{B, 3}	borracha ¹ , plástico ¹ , erva ² , refrescante ² , doce ³ , menta ^{2,3} , lactona ³ , feno ³
Neomentol ²	1153 ⁴	500–600 ^{C, 15}	menta ²
Mentol ^{1,2}	1161 ⁴	300–400 ^{C, 16}	refrescante ^{1,2} , menta ^{1,2} , limpeza ¹
Terpinen-4-ol ¹	1164 ⁴	6400 ^A ; 11	bolor ¹
1,(3E, 5Z)-Undecatrieno ³	1166 ³	0,000125 ^B ; 3	erva ³ , gálbano ³
Neoisomentol ²	1174 ⁴	200–1000 ^{C, 15}	menta ²
α -Terpineol ²	1177 ⁴	330 ^{A, 11}	floral ² , lírio ²
2,4-Nonadienal ¹	1183 ⁵	0,09 ^{A, 19}	folha ¹ , gordura ¹
Furamintona ³	1196 ³	0,0008 ^{B, 3}	côco ³ , cumarina ³ , doce ³
2-Metil-6-metileno (2Z), 7-octadienol ³	1206 ³	n/e	floral ³ , lírio ³
Anisaldeído ¹	1213 ⁴	33.1 ^{B, 20}	doce ¹ , plástico ¹ , floral ¹
Pulegona ^{1,2}	1216 ⁴	n/e	menta ^{1,2} , sujeira ¹ ; cânfora ²
Carvona ^{1,2}	1216 ⁴	50 ^A ; 17	hortelã verde ¹ , fruta ¹ , erva ^{1,2} , pimenta ² , menta ²
Pulegol ²	1220 ²	n/e	erva ² , cânfora, menta ²
Piperitona ²	1235 ⁴	n/e	erva ² , menta ²
(Z, Z)-8-Ocimenol ³	1250 ³	n/e	madeira ³ , mofo ³ , resina ³
Isopulegona ²	1252 ²	n/e	erva ² , menta ²
Acetato de neomentila ²	1260 ⁴	n/e	menta ² , fruta ²
Timol ¹	1264 ⁴	1700 ^{A, 21}	erva ¹ , fenólico ¹ , tomilho ¹
Acetato de mentila ^{1,2}	1278 ⁴	n/e	fruta ¹ , floral ¹ , madeira ¹ , éter ² , quase sem cheiro ²

Tabela 1. Continuação.

Compostos	IR	Valores de <i>Threshold</i> (ppb)	Impressão odorífera
(<i>E</i>)-Anetol ²	1287 ²	n/e	doce ² , anis ²
Acetato de isomentila ²	1291 ⁴	n/e	éter ² , quase sem cheiro ²
4-Vinilguaicol ¹	1306 ⁵	0,0004–0,0008 ^{B, 18} 3 ^{A, 10}	fumaça ¹ , madeira ¹ , doce ¹
Mentofuro lactona ¹⁹	1315/ 1317 ⁹	0,00004 ^{B, 22}	erva ²² , menta ²² , cumarina ²² , doce ²² , creme ²² , côco ²²
Eugenol ¹	1332 ⁴	0,0002–0,0004 ^{B, 9} 150 ^{A, 11}	apimentado ¹ , cravo ¹ , doce ¹
4-Metilquinolina ¹	1357 ⁸	n/e	animal ¹ , almíscar ¹
Acetato de (<i>Z, Z</i>)-8- Ocimenila ³	1363 ³	5 ^{B, 3}	erva ³ , gálbano ³ , abacaxi ³ , fruta ³
(<i>E</i>)- β -Damascenona ^{1,3}	1364 ⁴	0,000125 ^{B, 3}	fruta ¹ , madeira ¹ , grãos ¹ , flor ³ , chá ³ , ameixa seca ³ , erva ³
Acetato de (<i>E, Z</i>)-8- Ocimenila ³	1375 ³	0,4 ^{B, 3}	erva ³ , terra ³ , fruta ³ , abacaxi ³ , pinheiro ³
β -Bourboneno ²	1388 ²	n/e	madeira verde ² , apimentado ²
β -Elemeno ²	1388 ⁴	n/e	terpeno ²
β -Cariofileno ²	1422 ⁴	64 ^{A, 11}	madeira, apimentado ²
Dehidromentalactona ³	1448 ³	0,0031 ^{B, 3}	côco ³ , cumarina ³ , feno ³
(<i>E</i>)- β -Farneseno ²	1453 ⁴	n/e	bálsamo ²
Mentalactona ³	1455 ³	0,0028 ^{B, 3}	côco ³ , doce ³ , cumarina ³
β -Ionona ¹	1466 ⁵	0,1 ^{A, 11}	madeira ¹ , fruta ¹
Isomentalactona ³	1476 ³	0,00125 ^{B, 3}	côco ³ , cumarina ³
Germacreno D ²	1481 ⁴	n/e	madeira ² , apimentado, erva ²

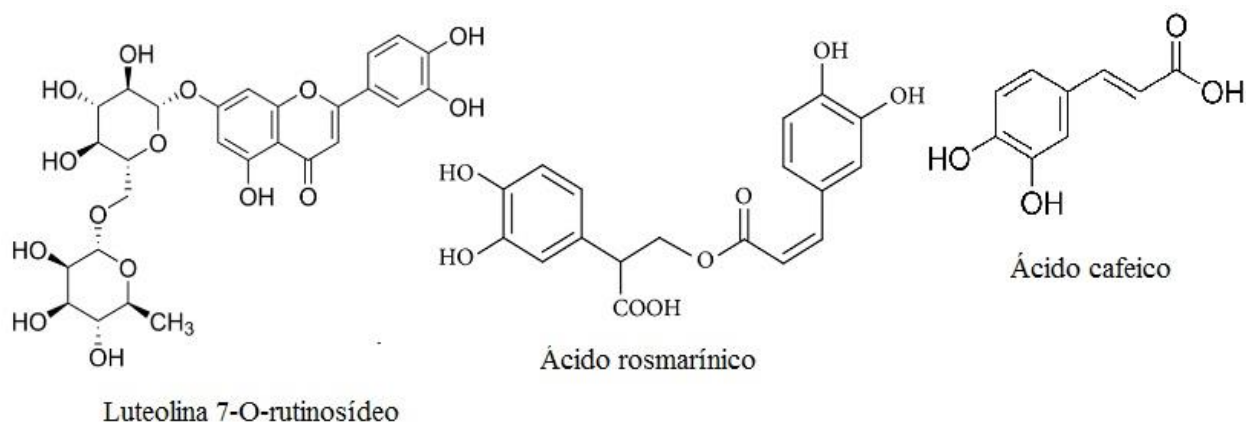
Threshold na água^A, *threshold* no ar^B and *threshold* do paladar^C, n/e: não encontrado. Benn (1998)¹; Schmidt et al. (2009)²; Güntert et al. (2001)³; Chen et al. (2011)⁴; Acree e Arn (2004)⁵; Adedeji, Hartman, Rosen e Ho (1991)⁶; Ong e Acree (1999)⁷; Dmitrikov e Nabivach (1995)⁸; Tomi e Bradesi (2010)⁹; Leffingwell e Leffingwell (1991)¹⁰; Qian e Wang (2005)¹¹; Yilmaz (2001)¹²; Amoore e Venstrom (1966)¹³; Boelens e van Gemert (1987)¹⁴; Enberger e Hopp (1988)¹⁵; Leffingwell e Shackelford (1974)¹⁶; Ohloff, G. (1978)¹⁷; Blank (1996)¹⁸; Song e Cadwallader (2008)¹⁹; Castro-Vázquez, Díaz-Maroto e Pérez-Coello (2006)²⁰; Wilson III e Shaw (1981)²¹; Frérot, Bagnoud e Vuilleumier (2002)²².

1.2. COMPOSIÇÃO DE FENÓLICOS

Os compostos fenólicos representam um importante grupo de compostos alimentares bioativos, conhecidos por promover inúmeros benefícios ao corpo humano. Os chás são uma boa fonte alimentar de fenólicos, sendo considerado a forma mais comum de consumo desses compostos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010). Uma infusão de hortelã pimenta fornece, aproximadamente, 750 mg L⁻¹ de compostos fenólicos, ou seja, o consumo diário de uma ou duas xícaras de chá (250-500 mL), fornece cerca de 200 mg L⁻¹ a 400 mg L⁻¹, respectivamente (DUBAND et al., 1992). Como mencionado anteriormente, a infusão também contém cerca de 21% de óleo essencial, representado principalmente por terpenos oxigenados que, em conjunto com os compostos fenólicos, podem ser considerados compostos bioativos do chá de hortelã pimenta. Kapp et al. (2013), por exemplo, associaram o efeito bacteriostático da hortelã pimenta contra *Chlamidia pneumonia* com a presença dos compostos fenólicos luteína e apigenina glicosídeo e com a presença de óleo essencial no extrato.

Na Tabela 2 são listados os compostos fenólicos identificados e quantificados ou não, no chá de hortelã pimenta. Cerca de 49 compostos fenólicos foram identificados, incluindo aqueles representados por diferentes glicosídeos (ex.: glucuronídeo, rutinosídeo). O principal composto detectado foi o ácido rosmarínico (0,76 – 60,214 mg g⁻¹), seguido do eriodictiol-glicopiranosil-ramnopiranosídeo (0,006 – 18,083 mg g⁻¹), luteolina 7-O-rutinosídeo (4,1 – 15,5 mg g⁻¹), luteolina glicopiranosil-ramnopiranosídeo (0,012 – 8,883 mg g⁻¹), luteolina 7-O-β-glucuronídeo (1,5 – 4,4 mg g⁻¹), naringenina 7-O-β-glicosídeo (0,2 – 3,8 mg g⁻¹) e ácido cafeico (0,1 – 3,45 mg g⁻¹). Kapp et al. (2013) identificaram pela primeira vez, na família Lamiaceae, seis compostos fenólicos, como o ácido prolitospermico, ácido salvianólico H/I, ácido salvianólico E, ácido isosalvianólico A, medioresinol e sulfato de medioresinol. Adicionalmente, os autores reportaram pela primeira vez, na hortelã pimenta, o composto fenólico *danshensu* (3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidroxiopropanoato de sódio), previamente identificado na *Mentha haplocalyx*. Esse composto é comumente utilizado na medicina tradicional chinesa pelos seus efeitos cardioprotetores (WANG et al., 2013; YEUNG, 2013). A luteolina 7-O-β-glucuronídeo e o ácido litospermico também foram descobertos e designados como novos constituintes da hortelã pimenta (FECKA; TUREK, 2007).

Figura 2. Alguns dos principais compostos fenólicos e flavonóides da hortelã pimenta



O perfil de compostos fenólicos da hortelã pimenta orgânica e da convencional foi analisado, utilizando as técnicas de CLAE-UV e CLAE com espectrometria de massas por injeção em fluxo (GAO et al., 2012). Os métodos foram comparados, através de análise multivariada (análise de componentes principais). Foram identificados os seguintes compostos: pebrelina, eriodictiol 7-O-rutinosídeo, tricetina 3'-O-glicosídeo 5'-O-ramnosídeo, eriocitrina, canferol 7-O-rutinosídeo, luteolina 7-O-neoheperidosídeo, narirutina, 4'-metoxicanferol-7-O-rutinosídeo, hesperidina, isosafrol, ácido ciclohexanocarboxílico, gardenina D, 5,6-dihidroxi-4',7,8-trimetoxiflavona e gardenina B. Em geral, as áreas absolutas dos picos, correspondentes à planta orgânica foram maiores do que os picos da planta convencional, indicando que pode haver diferenças significativas no perfil químico das duas hortelãs. Além disso, as duas técnicas utilizadas no estudo mostraram-se eficientes na diferenciação das plantas (GAO et al., 2012). Lv et al. (2012) por outro lado, quantificaram os compostos fenólicos na planta orgânica e convencional, baseado nas áreas dos picos de padrões externos. Com exceção dos ácidos ferúlico e siríngico, todos os outros compostos analisados (catequina, epigallocatequina galato, ácidos vanílico, cafeico e p-cumárico) estavam em maior concentração, porém não em quantidade significativa ($p < 0,05$). Baseado nos resultados, os autores não conseguiram observar uma tendência geral que favorecesse uma ou outra planta e apontaram a necessidade da realização de um desenho experimental sistemático mais elaborado, analisando as duas plantas cultivadas sobre diferentes condições ambientais.

Tabela 2. Compostos fenólicos da hortelã pimenta.

Compostos	Concentração
Ácidos fenólicos	
Ácido rosmarínico ^{1,2,3,4,5,6,7}	0.76 – 60.214 mg g ⁻¹
Ácido cafeico ^{2,6,7,8}	0.1– 3.45 mg g ⁻¹
Ácido salvianólico ³	0.389 mg g ⁻¹
Ácido salvianólico B ⁵	0.034 – 0.218 mg g ⁻¹
Ácido dehidro-salvianólico ³	0.087 – 1.089 mg g ⁻¹
Ácido gálico ⁸	0.0024 – 0.0027 mg g ⁻¹
Ácido vanílico ⁸	0.04 – 0.11 mg g ⁻¹
Ácido siríngico ⁸	0.03 – 0.24 mg g ⁻¹
Ácido p-cumárico ⁸	0.02 – 0.38 mg g ⁻¹
Ácido ferúlico ⁸	0.18 – 0.51 mg g ⁻¹
Ácido litospermico ⁶	-
Flavonas	
Luteolina ⁹	0.025 mg g ⁻¹
Luteolina O-diglucuronídeo ^{3,5}	2.039 – 3.088 mg g ⁻¹ ;
Luteolina O-glucuronídeo ^{3,5}	0.011 – 1.153 mg g ⁻¹ ;
Luteolina O-rutinosídeo ⁵	0.101 – 2.79 mg g ⁻¹
Luteolina 7-O-glucuronídeo ⁶	-
Luteolina 7-O-β-glucuronídeo ⁷	1.5 – 4.4 mg g ⁻¹
Luteolina 7-O-rutinosídeo ^{1,4,7}	4.1 – 15.5 mg g ⁻¹
Luteolina 7-glicosídeo ⁴	0.038 – 0.211 mg g ⁻¹
Luteolina-glicopiranosil-ramnopiranosídeo ³	0.012 – 8.883 mg g ⁻¹
Isorhoifolina (Apigenina 7-O-rutinosídeo) ^{1,4}	0.025 – 0.269 mg g ⁻¹
Pebrelina ^{4,10}	0.209 – 0.683 mg g ⁻¹
Metoxiflavonas	
Gardenina B ⁴	69 – 336 mg g ⁻¹
Diosmina ^{1,5}	0.007 – 0.109 mg g ⁻¹
Flavanonas	
Eriodictiol ⁵	0.1 – 2.2 mg g ⁻¹
Eriodictiol 7-O-glicosídeo ¹	0.0545 – 0.543 mg g ⁻¹
Eriodictiol 7-O-β-glicosídeo ⁷	0.1 – 0.4 mg g ⁻¹
Eriodictiol-glicopiranosil-ramnopiranosídeo ³	0.006 – 18.083 mg g ⁻¹
Hesperidina ^{1,7,10}	0.615 – 2.6 mg g ⁻¹
Eriocitrina ^{1,7,5,10}	1.085 – 53.3 mg g ⁻¹
Narirutina ^{1,7,5,10}	0.1 – 0.9 mg g ⁻¹
Naringenina 7-O-β-glicosídeo ⁷	0.2 – 3.8 mg g ⁻¹
Flavonóis	
Catequina ⁸	0.06 – 0.64 mg g ⁻¹
(-)-Epigallocatequina galato ⁸	0.08 – 0.36 mg g ⁻¹

Tabela 2. Continuação.

Compostos	Concentração
	Total
Fenólicos	1.64 – 66.21 mg g ⁻¹
Flavonóides ⁷	79.47 – 455,91 mg g ⁻¹
Compostos apenas identificados	
Ácidos fenólicos	
Ácido protocatecuico glicosídeo ⁵	-
Ácido 5-cafeoilquínico ⁵	-
Ácido isosalvianólico ⁵	-
Ácido salvianólico (E e H/I) ⁵	-
Ácido prolitospermico ⁵	-
<i>Danshensu</i> ⁵	-
Flavonas	
Luteolina 7-O-neohesperidosídeo ¹⁰	-
Tricetina 3'-O-glicosídeo 5'-O-ramnosídeo ¹⁰	-
Metoxiflavonas	
Gardenina D ¹⁰	-
Isosafrol ¹⁰	-
Flavonóis	
Miricetina O-glicosídeo ⁵	-
Canferol 7-O-rutinosídeo ¹⁰	-
4'-metoxicanferol-7-O-rutinosídeo ¹⁰	-
Lignanas	
Medioresinol ⁵	-
Sulfato de medioresinol ⁵	-

Guedón and Pasquier, (1994)¹; Lee, (2010)²; Zrzyzanowska et al. (2011)³; Areias et al. (2001)⁴; Kapp et al. (2013)⁵; Fecka, Raj e Krauze-Baranowska (2007)⁶; Fecka and Turek, (2007)⁷; Lv et al. (2012)⁸; Hadjmohammadi et al. (2013)⁹; Gao et al. (2012)¹⁰.

1.3. VITAMINAS E MINERAIS

A presença de algumas vitaminas e minerais em folhas de hortelã pimenta, despertou o interesse na pesquisa desses nutrientes na planta. De Almeida-Muradian, Rios e Sasaki (1998) encontraram valores de 940 a 1016 de equivalentes retinol por 100 g de β -caroteno, em folhas de hortelã pimenta, cultivadas no Brasil. Dambrauskiene, Viskelas e Karleliene (2008) analisaram a quantidade de carotenóides e ácido ascórbico em plantas de hortelã de origens diferentes, porém não encontraram diferenças significativas ($p < 0,05$). Em geral os valores de ácido ascórbico variaram entre 25,2 e 26,1 mg 100 g⁻¹, enquanto que os de carotenóides estavam entre 2,8 e 3,1%. Capecka, Mareczek e Leja (2005), por outro lado, encontraram valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$) de carotenóides e ácido ascórbico, quando compararam a presença desses nutrientes na hortelã fresca e na desidratada. O conteúdo de ácido ascórbico foi de 52,6 mg 100g⁻¹ e 4,5 mg 100g⁻¹, nas folhas frescas e desidratadas, respectivamente; enquanto a concentração de carotenóides variou de 58.1 mg 100g⁻¹ nas folhas frescas e 32,7 mg 100g⁻¹ na folha seca. Em estudo mais recente, foram avaliadas a presença e a quantidade de carotenóides (luteína e isômeros de β -caroteno) na erva seca e na infusão de hortelã pimenta. Foi observada a presença de luteína (93,4 μ g g⁻¹) e de isômeros do β -caroteno (aproximadamente 18 μ g⁻¹ em peso seco) na erva seca, porém somente a luteína foi detectada na infusão (aproximadamente 11 μ g em 200 mL de infusão) (LORANTY et al., 2010).

O conteúdo de minerais nas folhas de hortelã pimenta também foi analisado. O principal elemento foi o K (40–17216 μ g g⁻¹), seguido por Ca (20–15331 μ g g⁻¹), Mg (8–5778 μ g g⁻¹), P (54–3,600 μ g g⁻¹), Na (4–3467 μ g g⁻¹), Fe (0,7–2390 μ g g⁻¹), Ba (14–254 μ g g⁻¹), Al (238–251 μ g g⁻¹), Mn (0,1–188 μ g g⁻¹), Sr (2–150 μ g g⁻¹), Zn (0.05–75 μ g g⁻¹), B (13–21 μ g g⁻¹), Cu (0.03–12 μ g g⁻¹), Cr (0,9–5 μ g g⁻¹), Ni (1–3 μ g g⁻¹), Ti (3,3 μ g g⁻¹), Pb (0,2–2 μ g g⁻¹), Ce (1,6 μ g g⁻¹), La (0,5 μ g g⁻¹), Li (0,5 μ g g⁻¹), V (0,5 μ g g⁻¹), Co (0,1–0,4 μ g g⁻¹), I (0,3 μ g g⁻¹), Cd (0,004–0,2 μ g g⁻¹), Se (0,1 μ g g⁻¹) e As (0,1 μ g g⁻¹) (LOZAK et al., 2002; GALLAHER et al., 2006; KIZIL et al., 2010; BAGDATLIOGLU; NERGIZ; ERGONUL, 2010; PYTLAKOWSKA et al., 2012). Um estudo investigou a presença de Ca, Ba, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Ni, P, Sr e Zn, em ervas de diferentes espécies de plantas e submeteu os dados para avaliação quimiométrica, usando a análise de componentes principais e a análise de *cluster* para classificar as amostras (KARA, 2009). O trabalho

revelou uma relação entre a concentração dos elementos e as diferentes ervas. A hortelã pimenta foi inserida no grupo da camomila, malva, tília, sálvia e limão, que apresentou maior concentração de Mg, Zn, Cu, Fe, P, K, Ca, Cr, Ce, Co, Sr e Na. O conteúdo de minerais na infusão da erva também foi analisado (LOZAK et al., 2002; PYTLAKOWSKA et al., 2012, SZYMEZYCHA-MADEJA; WELNA; ZYRNICKI, 2013). A extração dos minerais na infusão variou muito em relação ao encontrado na erva seca. O mineral em maior concentração na infusão foi o Ca ($16\text{--}4457 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido do Mg ($129\text{--}3268 \mu\text{g g}^{-1}$), P ($804\text{--}2827 \mu\text{g g}^{-1}$), K ($993\text{--}1584 \mu\text{g g}^{-1}$), Na ($403\text{--}438 \mu\text{g g}^{-1}$), Al ($4,31\text{--}263 \mu\text{g g}^{-1}$), Mn ($0,5\text{--}27 \mu\text{g g}^{-1}$), Fe ($1,6\text{--}20 \mu\text{g g}^{-1}$), Sr ($1,7\text{--}15 \mu\text{g g}^{-1}$), Zn ($2,7\text{--}12 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($0,2\text{--}5,5 \mu\text{g g}^{-1}$), B ($2\text{--}5 \mu\text{g g}^{-1}$), Ba ($0,8\text{--}4 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($1,2\text{--}2,7 \mu\text{g g}^{-1}$), Ti ($0,03\text{--}1 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), As ($0,9 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), Li ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), I ($0,2 \mu\text{g g}^{-1}$), V ($0,1 \mu\text{g g}^{-1}$), Se ($0,08 \mu\text{g g}^{-1}$), Co ($0,06 \mu\text{g g}^{-1}$) e Cd ($0,008 \mu\text{g g}^{-1}$). Pytlakowska et al. (2012) sugeriram que essa variação poderia ser atribuída a formação de um complexo entre os minerais e substâncias orgânicas, bem como a baixa solubilidade de alguns elementos em solução aquosa e pelo processo de hidrólise, no caso de metais como Al, Fe, Cu e Mn. Os autores compararam a eficiência de extração de alguns minerais em diferentes infusões de ervas, incluindo a hortelã pimenta e classificaram o K como altamente extraível ($>55\%$), Mg, Na, P, B, Zn e Cu como moderadamente extraíveis ($20 - 55\%$) e Al, Fe, Mn, Ba, Ca e Sr como pouco extraíveis ($<20\%$).

1.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A presença de compostos bioativos na infusão de hortelã pimenta junto ao fato da bebida ser muito consumida, torna o estudo da sua capacidade antioxidante muito interessante. É bem conhecido que os antioxidantes tem o potencial de diminuir ou retardar a oxidação da matéria orgânica, promovida por espécies reativas do oxigênio (EROs) (O , O_3 , 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO^{\cdot} , ROO^{\cdot} , H_2O_2 and $ONOO^-$) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; BRIEGER et al., 2012). Esses compostos estão envolvidos com a destruição de diversos componentes celulares e com o desenvolvimento de doenças ocasionadas, quando em situações patológicas, há um desequilíbrio oxidante-antioxidante, no qual o sistema antioxidante endógeno celular (ex.: glutathiona, catalase) não consegue remover as quantidades excessivas de EROs (GONZÁLES-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012). O estresse oxidativo vem sendo apontado como um dos principais causadores de doenças, como o câncer, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, e diabetes (BRIEGER et al., 2012). Por outro lado, a ingestão de antioxidantes naturais vem sendo associada com a redução do risco desses problemas (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010).

Os extratos de hortelã pimenta são ricos em compostos fenólicos, principalmente em ácidos e as flavanonas (Tabela 2), e possuem pequena quantidade de terpenos, incluindo mono, sesqui e tetraterpenos (Tabela 1 e tópico vitaminas e minerais). Em contrapartida, o óleo essencial contém, basicamente, mono e sesquiterpenos. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos advém da capacidade de atuarem como sequestradores de elétrons, devido a suas propriedades redutoras; agentes doadores de hidrogênio ou elétrons; supressores de oxigênio singlete; e queladores de metais (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; OH et al., 2013).

A atividade antioxidante está associada com a inibição da oxidação de lipídios, proteínas, DNA ou qualquer outra molécula que bloqueie a etapa de propagação, nas reações oxidativas em cadeia (OH et al., 2013). Os compostos capazes de sequestrar diretamente os radicais livres são considerados antioxidantes primários, enquanto que aqueles que previnem o processo de iniciação e retardam a formação de radicais, através da reação de *Fenton*, são considerados antioxidantes secundários (GONZÁLES-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012; OH et al., 2013). Os terpenos foram descritos por atuarem como antioxidantes, através do sequestro direto de EROs e por apresentarem a capacidade de modular o sistema

antioxidante endógeno (GONZÁLES-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012). Um estudo prévio avaliou a eficácia antioxidante dos terpenos mais comumente encontrados em óleos essenciais, a partir de dois modelos lipídicos. Em geral, os monoterpenos apresentaram baixa atividade antioxidante, com exceção dos compostos terpinoleno, α -terpineno e γ -terpineno que demonstraram atividade similar ao α -tocoferol. A relação entre estrutura e atividade desses compostos tem sido associados com grupos metileno fortemente ativados em suas estruturas (RUBERTO; BARATTA, 2000). Existe também outra hipótese, baseada na estrutura ciclohexadieno dos terpenóides, como a do γ -terpineno e α -felandreno. Isso porque eles podem sofrer autooxidação, caracterizada por um processo de terminação muito rápido, promovendo diminuição da taxa total de oxidação. Esses compostos são denominados antioxidantes expandidores da etapa de terminação para distinguir daqueles antioxidantes quebradores de cadeia (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

Ruberto e Baratta (2000) identificaram os compostos timol e carvacrol como os mais ativos entre os monoterpenos oxigenados, com atividade similar à do α -tocoferol, seguido por álcoois alílicos (nerol, álcool perfílico, geraniol e cis-verbenol), monoterpenos com função aldeídica (citronelol) e cetonas, respectivamente. Em geral, os sesquiterpenos apresentaram atividade antioxidante muito baixa, com exceção de alguns sesquiterpenos oxigenados, principalmente os álcoois alílicos, como o germacrono e o farnesol que apresentaram atividade similar ao dos monoterpenos oxigenados. O grupo dos tetraterpenos, principalmente os carotenóides, como o β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina tem sido apontados como antioxidantes importantes, devido às múltiplas ligações presentes em suas estruturas. Adicionalmente, esses compostos podem exibir maior atividade se apresentarem cadeias longas de duplas ligações conjugadas juntamente com a presença de grupos hidroxila nas duplas ligações dos anéis terminais (GONZÁLES-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Os óleos essenciais naturais são uma mistura de diferentes tipos de compostos que podem ser tanto antioxidantes, quanto oxidantes. Dependendo da composição do óleo e das condições experimentais, interações sinérgicas ou antagônicas podem ocorrer (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Em geral, óleos essenciais com grande conteúdo de compostos fenólicos e modesto conteúdo de terpenos insaturados são mais prováveis de possuírem maior capacidade antioxidante (RUBERTO; BARATTA, 2000; AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Os terpenos insaturados, como o linalol e o α -pineno tem mostrado atividade pró-oxidante. Isso, porque sofrem autooxidação e o processo gera radicais alquila reativos,

provenientes da própria estrutura do terpeno (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). O mentol, composto majoritário do óleo essencial da hortelã pimenta (35 – 60%) e seus derivados (0,3 – 44%) tem apresentado baixa atividade antioxidante (RUBERTO; BARATTA, 2000). Entretanto, é difícil prever exatamente o comportamento antioxidante de uma determinada matriz, seja óleo essencial ou extrato de qualquer natureza, uma vez que existem fatores a serem considerados. Tais fatores incluem a concentração de um composto em particular, uma vez que dependendo da quantidade, o composto pode se comportar tanto como antioxidante, quanto oxidante; o comportamento de um composto individualmente e quando em uma mistura com outros componentes; os fatores ambientais influenciando no perfil de compostos da matriz; e as técnicas de isolamento e extração de compostos (GONZÁLES-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012; AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

A quantidade de compostos fenólicos em extrato acetônico (190,9 – 191,8 GAE/g) foi maior do que em extrato aquoso ($75,31 \pm 3,58$ mg GAE/g) e extrato etanólico ($33,68 \pm 0,44$ mg GAE/g) (LV et al., 2012; OH et al., 2013). Apesar da diferença quantitativa entre os extratos, existe grande dificuldade na interpretação dos resultados, uma vez que não são padronizados e cada estudo realiza uma análise diferente para detecção da capacidade antioxidante. De um modo geral, a capacidade antioxidante do extrato aquoso foi maior do que a do extrato etanólico (Tabela 3). Lv et al. (2012) compararam a capacidade antioxidante dos extratos acetônico de hortelã pimenta convencional com a da planta orgânica, porém não observaram diferenças significativas entre os dois produtos. Zheljzakov et al. (2010) observaram que o óleo essencial de hortelã pimenta possui grande capacidade antioxidante, superior que a da *Mentha arvensis*. Oh et al. (2013) comparam a capacidade antioxidante de diferentes ervas e observaram que o comportamento dos extratos de hortelã foi similar ao do chá verde. Outro estudo detectou maior habilidade quelante do íon ferro da hortelã pimenta quando comparada com a dos chás de *Camellia sinensis* e atribuíram esse fato a presença de ácido cafeico e ácido rosmarínico na hortelã (CHAN et al., 2010).

Tabela 3. Capacidade antioxidante da hortelã pimenta.

Fonte	Ensaio	Resultados	Referências
Óleo essencial	DPPH	59.19 ± 0.65 µg mL ⁻¹	Gharib e Silva (2012)
Óleo essencial	ORAC	1107 µmol TE L ⁻¹	Zheljazkov et al. (2010)
Extrato acetônico	RDSC	999.7 ± 10.1 µmol TE/g	Lv et al. (2012)
Extrato acetônico*	RDSC	892.4 ± 12.3 µmol TE/g	Lv et al. (2012)
Extrato acetônico	HOSC	4252.6 ± 258.5 µmol TE/g	Lv et al. (2012)
Extrato acetônico*	HOSC	4858.9 ± 791.6 µmol TE/g	Lv et al. (2012)
Extrato acetônico	ORAC	4190.3 ± 782.7 µmol TE/g	Lv et al. (2012)
Extrato acetônico*	ORAC	4401.8 ± 294.2 µmol TE/g	Lv et al. (2012)
Extrato acetônico	FRP	37 ± 0.3 mg GAE/g	Chan et al. (2010)
Extrato acetônico	FIC/CEC ₅₀	0.4 ± 0.1 mg/mL	Chan et al. (2010)
Extrato acetônico	DPPH	29.73 ± 0.20 mg AAE/g	Oh et al. (2013)
Extrato acetônico	ABTS	50.08 ± 1.70 mg AAE/g	Oh et al. (2013)
Extrato aquoso	FRP	0.54 ± 0.02 (200 mg/ml)	Oh et al. (2013)
Extrato aquoso	FIC	71.42 ± 0.59 % (1 mg/ml)	Oh et al. (2013)
Extrato etanólico	DPPH	30.56 ± 1.67 mg AAE/g	Oh et al. (2013)
Extrato etanólico	ABTS	40.70 ± 0.42 mg AAE/g	Oh et al. (2013)
Extrato etanólico	FRP	0.73 ± 0.01 (200 mg/ml)	Oh et al. (2013)
Extrato etanólico	FIC	26.72 ± 3.26 % (1 mg/ml)	Oh et al. (2013)

RDSC: capacidade sequestradora de radicais relativa ao DPPH; HOSC: capacidade sequestradora de radicais hidroxila; ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio; GAE: equivalente de ácido gálico; TE: equivalente de trolox; AEAC: capacidade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico; FRP: poder redutor do íon férrico; FIC: poder quelante do íon ferroso; CEC₅₀: poder quelante do íon ferroso em 50%; AAE: ácido ascórbico equivalente; ABTS atividade de descoloração do radical cátion; hortelã pimenta orgânica*.

2. INTRODUÇÃO

A hortelã pimenta é derivada do cruzamento entre a hortelã verde (*Mentha spicata* L.) e a menta aquática (*Mentha aquatica* L.). Seu óleo essencial possui grande valor comercial, pois é utilizado na terapia medicinal complementar e em diversos produtos, como na fabricação de cosméticos, pasta de dente e aditivos alimentares (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; ZHELJAZKOV et al., 2010). O chá de hortelã pimenta é um dos mais consumidos, e também conhecido por apresentar importantes benefícios à saúde. Algumas atividades biológicas baseadas em experimentos *in vitro* foram detectadas e incluem: atividades antioxidante, antiviral, fungicida e antibacteriana. Além disso, o chá de hortelã pimenta tem apresentado efeitos benéficos ao trato gastrointestinal. Na Alemanha, a folha de hortelã pimenta é licenciada pelos órgãos de saúde para uso como chá medicinal para tratar dispepsia, enquanto seu óleo essencial é usado para tratar inflamação de mucosas do trato respiratório (BLUMENTHAL et al., 1998). No entanto, apesar do chá de hortelã pimenta ser muito consumido, pouco se sabe sobre sua fração volátil. A composição química, sobretudo a fração volátil, do óleo essencial de hortelã pimenta já foi objeto de estudo para muitos autores. Entretanto, o estudo da fração volátil do chá dessa planta foi negligenciado, embora o uso deste chá seja difundido mundialmente. A composição volátil do óleo essencial extraído do tisano de hortelã pimenta foi avaliada por dois estudos (DUBAND et al., 1992; ORAV; KANN, 2001); no entanto, nenhum trabalho até o momento analisou a fração volátil do chá sem a extração do óleo. O mentol e seus derivados (ex. isomentol e mentona) dominam a fração volátil do óleo essencial da hortelã pimenta. O mentol é o composto majoritário representando de 30 % a 50 % dos sólidos totais, sendo considerado o princípio ativo dessa matriz. Também é considerado um composto de odor ativo para o aroma do óleo essencial dessa planta (GÜNTERT et al., 2001). Todavia a composição da fração volátil do óleo é complexa, sendo resultado de um balanço delicado entre os compostos majoritários e os minoritários, que podem estar, inclusive, presentes em quantidade traço. Portanto, outros compostos têm sido apontados como contribuintes importantes para o aroma dessa matriz. Benn (1998), com base nas análises de CG/EM e CG-O, identificou o alfa-terpineno, o eucaliptol, o gama-terpineno, o hidrato de trans-sabineno, o mentofurano e o terpineno-4-ol como componentes da fração volátil do óleo da hortelã pimenta. O mesmo autor usou a ADEA, sendo capaz de identificar o mentofurano como um odorante potente dessa matriz.

Em outro estudo, a 3,6-dimetil-4,5,6,7-tetrahydro-benzo(b)-furan-2(3)-ona (mentofurolactona) também foi apontada como um composto de odor ativo para o aroma do óleo dessa planta (FRÉROT; BAGNOUD; VUILLEUMIER, 2002). Esses autores apresentaram indícios de que a mentofurolactona existe naturalmente na hortelã pimenta. Em contrapartida, em estudos anteriores, a mentofurolactona foi descrita como um artefato produzido através da oxidação do mentofurano (FOOTE; WUESTHOFF; BURSTAIN, 1967; FOOT et al., 1967). A fração volátil do óleo essencial é geralmente extraída através da hidrodestilação (GÜNTERT et al., 2001). Por outro lado, a cromatografia de adsorção tem sido utilizada para o isolamento de compostos do chá verde e do chá preto, porém essa técnica nunca foi empregada para extração da fração volátil do chá de hortelã pimenta (SHIGEMATSU; SHIMODA; OSAJIMA, 1994; SHIMODA et al., 1995). Em geral, pouco se sabe sobre a fração volátil do extrato aquoso da erva, apesar dos compostos do óleo essencial serem bem conhecidos. A maioria dos estudos que analisam o extrato aquoso avaliam o conteúdo de compostos fenólicos na matriz (FECKA; TUREK, 2007). É possível que a fração mentólica também predomine no extrato aquoso, porém outros compostos, não achados no óleo essencial, poderiam aparecer na bebida e influenciar o aroma do chá.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir para a identificação dos constituintes do aroma do chá de hortelã pimenta, utilizando o método de cromatografia de adsorção para o isolamento dos compostos voláteis e, posterior análise por meio de técnicas de cromatografia gasosa.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar dos compotos voláteis
- Identificar compostos voláteis de impacto para bebida

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

O estudo foi realizado com folhas de hortelã pimenta (*Mentha piperita* L) secas e cortadas, provenientes de sachês de seis marcas de chás diferentes, adquiridas em mercados locais. Os reagentes utilizados foram: acetona, comprada na Merck (Darmstadt, Alemanha) e o adsorvente Porapak Q (*mesh* 50-80) da Supelco (Filadélfia, EUA). Todos padrões utilizados foram adquiridos da Aldrich (Wisconsin, USA).

4.2. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL

Foi baseada em um método modificado (MOREIRA et al., 2002). O extrato foi obtido através da infusão do sachê (2 g) em água destilada, em ebulição (50 mL), com a ajuda de um banho agitador (agitação por 10 min). Posteriormente, o extrato foi imediatamente resfriado em água corrente (10 min). Em seguida, a solução aquosa foi filtrada por gravidade e passada por uma coluna de vidro (0.5 cm d. i. x 18 cm) empacotada com adsorvente do tipo “Porapak Q” (Supelco, USA), previamente condicionado à 225°C por 3 h com nitrogênio gasoso a um fluxo de 0.9-1.0 L min⁻¹. Posteriormente, a coluna foi lavada com 100 mL de água para remoção de glicídios. A dessorção dos compostos voláteis foi realizada com cerca de 100 mL de acetona e o eluato foi concentrado em um rotaevaporador à 20°C a 200 mL.

4.3. ANÁLISE CROMATROGRÁFICA

4.3.1. CG/DIC

Uma coluna polar de sílica fundida (50 m x 0.25 mm, Supelcowax®) foi usada em um cromatógrafo modelo Carlo Erba 4300 (Milão, Itália) nas seguintes condições: programação do forno de 50-230°C a 3°C min⁻¹ e então mantida a 230°C por 20 min. O DIC e o injetor foram mantidos a 240°C e 230°C, respectivamente. A injeção ocorreu com um divisor a uma razão de 1:20. As concentrações aproximadas de cada composto volátil foram determinadas através da utilização de padronização externa.

4.3.2. CG/EM

Foi usado um Shimadzu GC-17A/QP-5050 (Shimadzu, Japão) com sistema de dados próprio, um “scan” cíclico de 1 s e um limite de massa de m/z 20-300. A temperatura da fonte de íons foi de 240°C. A coluna e as condições cromatográficas foram as mesmas descritas no tópico CG/DIC. Os compostos voláteis foram identificados com base na comparação de seus espectros de massas com àqueles do sistema de dados (biblioteca NIST) e também por comparação com padrões e com Índices de Kövatz descritos na literatura. Todas as amostras de hortelã foram analisadas em triplicata. Apenas os compostos identificados a partir dos espectros de massas, em conjunto com os padrões externos, foram considerados definitivamente identificados.

4.3.3. CG-O e ADEA

Foram empregadas as condições cromatográficas descritas na seção CG/DIC, exceto que na saída da coluna foi colocado um divisor na razão de 1:10, de modo que uma parte do efluente da coluna fosse desviada para um sistema artesanal, o que permite ao analista sentir os odores dos compostos voláteis separados durante a cromatografia gasosa. O extrato da amostra foi diluído sucessivamente pela técnica de ADEA até que não fosse percebido mais nenhum odor. Os compostos voláteis ainda detectados por CG-O, mesmo após uma diluição acentuada, foram considerados de impacto para o aroma dos extratos da folha. Isto significa que o limite de detecção, ou seja, a concentração mínima para que se perceba algum odor, é tão baixa que o composto ainda apresenta algum odor, mesmo com um fator de diluição extremamente alto. Os extratos foram diluídos na faixa de 2^1 - 2^4 . Três panelistas participaram do trabalho de CG-O e ADEA. Esse método foi baseado em citação anterior (ACREE; TERANISHI, 1993).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

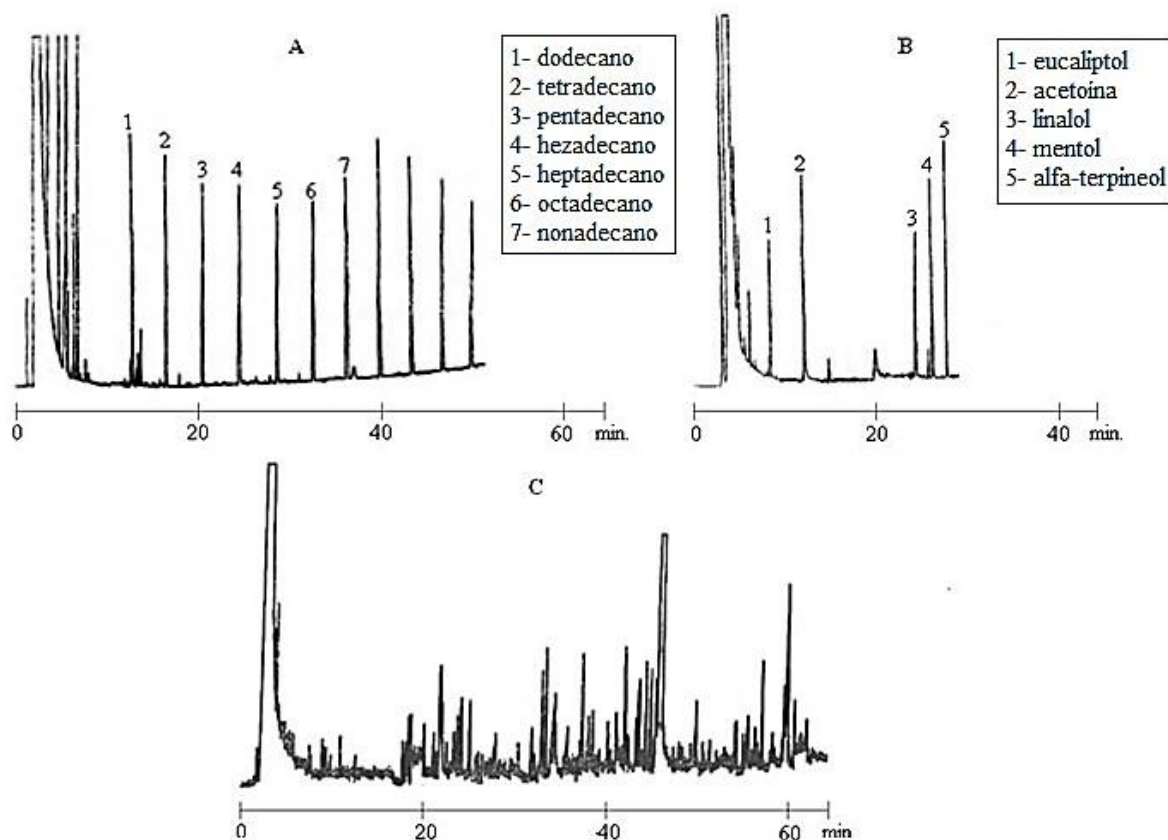
Houve a preocupação em utilizar-se condições de preparo similares às do chá caseiro, realizando uma extração não exaustiva com água fervente. O uso da cromatografia de adsorção com o polímero Porapak Q permitiu a identificação de compostos voláteis no extrato aquoso sem a necessidade de aquecimento adicional. O enriquecimento da fração volátil na coluna de vidro, seguido de sua dessorção com acetona gerou extratos com odor similar ao da erva original. Além disso, o uso dessa técnica, particularmente as condições de pré-concentração, permitiu a identificação de novos compostos voláteis na hortelã pimenta. A Tabela 4 apresenta os 31 compostos voláteis que foram identificados no extrato aquoso da erva através do uso da CG/DIC e CG/EM. Na Figura 3, é mostrado um perfil cromatográfico de alguns compostos voláteis identificados no chá de hortelã pimenta. Entre os compostos, alguns hidrocarbonetos, terpenos, ácidos, álcoois e cetonas foram detectados pela primeira vez no extrato de hortelã pimenta. A maioria dos compostos voláteis foram representados por terpenos (45% do total), seguidos por hidrocarbonetos acíclicos (26%) e ácidos carboxílicos (13%). A fração volátil também apresentou baixa concentração de cetonas (6%), álcoois alifáticos (7%) e cumarina (3%).

Tabela 4. Compostos voláteis do chá de hortelã pimenta. Valores expressos em $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Compostos	IR	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Média \pm SD*
Eucaliptol ^a	1188	264.4	326.5	266.5	312.2	206.7	273.7	275.0 \pm 42.1
Dodecano ^{a,b}	1235	3.8	3.6	3.7	4.2	3.7	3.9	3.8 \pm 0.2
Acetoina ^{a,b}	1276	76.5	48.3	64.8	51.2	50.2	51.2	57.0 \pm 11.2
Acetol ^{a,b}	1293	51.9	44.1	58.1	46.2	48.5	51.5	50.0 \pm 5.0
Tridecano ^{a,b}	1306	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Tetradecano ^{a,b}	1384	3.5	4.6	4.1	5.3	3.0	4.3	4.1 \pm 0.8
Ácido acético ^a	1401	87.1	40.9	54.5	42.2	72.5	63.5	60.1 \pm 18.0
2-Etil-1-hexanol ^{a,b}	1474	4.7	4.7	5.1	3.0	4.3	4.7	4.4 \pm 0.7
Pentadecano ^{a,b}	1493	3.7	7.8	3.1	5.9	5.5	4.7	5.1 \pm 1.7
Linalol ^a	1581	278.8	211.5	244.8	354.9	478.3	298.4	311.1 \pm 95.3
Hexadecano ^{a,b}	1586	4.3	6.0	3.7	3.4	3.2	4.0	4.1 \pm 1.0
Mentol ^a	1618	314.4	296.5	315.4	290.9	313.0	281.7	302.0 \pm 14.3
Citral ^{a,b}	1631	484.0	225.7	285.2	399.6	355.3	327.4	346.2 \pm 90.0
o-cimeno ^c	1650	288.4	426.4	236.2	391.7	258.2	319.6	320.1 \pm 75.2
α -terpineol ^a	1676	373.8	361.4	358.7	241.4	546.3	355.6	373.0 \pm 98.0
Heptadecano ^{a,b}	1687	5.9	7.4	8.7	3.8	5.5	7.0	6.4 \pm 1.7
Acetato de dihidrocarveol ^{b,c}	1697	395.1	384.3	333.7	371.5	370.3	383.9	373.1 \pm 21.4
Octadecano ^{a,b}	1784	5.1	4.8	4.7	4.3	4.9	4.8	4.8 \pm 0.3
Carvona ^a	1825	396.3	356.7	370.9	386.2	394.9	386.8	382.0 \pm 15.3
Geraniol ^{a,b}	1827	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
P-cimeno-8-ol ^c	1828	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Ascaridol ^b	1848	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Álcool benzílico ^a	1856	6.9	2.9	5.8	5.6	6.6	4.6	5.4 \pm 1.5
Nonadecano ^{a,b}	1880	7	3.8	6.9	5.5	4.5	4.7	5.4 \pm 1.3
Ácido octanóico ^{a,b}	2003	74.2	71.8	42.8	55.8	43.5	54.6	57.1 \pm 13.5
Espatuleno ^c	2093	342.5	308.2	342.8	320.6	332.7	327.5	329.0 \pm 13.3
Óxido de α -bisabolol ^{b,c}	2102	309.6	321.5	316.6	341.1	366.2	320.0	329.2 \pm 21.0
Ácido nonanóico ^{a,b}	2144	57.2	68.7	42.9	70.2	58.7	50.8	58.1 \pm 10.4
Dihidroactinidiolida ^c	2316	442.9	325.2	280.7	231.8	247.8	228.7	293.0 \pm 82.0
Coumarina ^a	2429	36.8	37.1	41.1	39.2	37.7	36.7	38.1 \pm 1.7
Ácido dodecanóico ^{a, b}	2461	54.5	81.5	46.3	49.5	80.7	72.8	64.2 \pm 16

^aCompostos definitivamente identificados: via CG/EM + padrão; ^bCompostos identificados pela primeira vez na hortelã pimenta; ^cCompostos com valores estimados, obtidos através do uso do mentol como padrão; IR = Índice de retenção; tr = traços; A = amostra; SD = Desvio padrão *Média das seis diferentes amostras de chá de hortelã pimenta

Figura 3. Perfil cromatográfico de uma amostra de chá e de alguns padrões utilizados



A – Padrões de hidrocarbonetos identificados nas amostras, utilizados na análise do índice de retenção (IR);
 B – Alguns padrões usados para a identificação definitiva dos compostos voláteis nas amostras de chá;
 C – Perfil cromatográfico do extrato aquoso da A1.

Os terpenos se apresentaram em menor diversidade (14 compostos) quando comparados com os do óleo essencial (cerca de 70 compostos) (BENN, 1998; NÄF; VELLUZ, 1998; GÜNTERT et al., 2001; ORAV; KANN, 2001). Nenhum derivado do mentol foi identificado. Já é bem conhecido que o uso de folhas velhas é característico da presença de mentol e menor proporção de seus derivados (ROHLOFF et al., 2005). Dessa forma, a menor concentração dos seus derivados aliada a baixa eficiência de extração de terpenos em meio aquoso, e também o fato de ter sido usada uma condição de extração não exaustiva, pode ter contribuído para não detecção de derivados do mentol. A concentração estimada de cada composto identificado no extrato aquoso de hortelã pimenta está apresentada na Tabela 4. Os valores médios dos ácidos carboxílicos de cadeia curta e média (C2 – C12) e cetonas variaram de $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ a $64 \mu\text{g Kg}^{-1}$, enquanto os álcoois alifáticos e os hidrocarbonetos acíclicos apresentaram valores médios abaixo de $6 \mu\text{g Kg}^{-1}$. A cumarina foi previamente detectada no óleo essencial de hortelã pimenta (NÄF; VELLUZ, 1998). O

presente estudo também detectou esse composto no extrato aquoso ($38 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Os terpenos ficaram na faixa de $275 - 382 \mu\text{g Kg}^{-1}$, correspondendo a 89% do total. Esses resultados estão, em parte, de acordo com os encontrados no óleo essencial, o qual contém mais de 98% do volume representado por terpenos (GÜNTERT et al., 2001). Considerando o presente trabalho, pode-se dizer que os perfis qualitativo e quantitativo dos compostos voláteis do extrato aquoso são representados por terpenos oxigenados. A identificação por tentativa do composto tetrahydro-4, 4, 7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona, também chamado de dihidroactinidiolida, está de acordo com outro estudo que identificou esse mesmo composto na matriz (KA et al., 2005). A análise olfatométrica dos extratos permitiu a identificação de 9 compostos durante a análise por CG/O, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Compostos voláteis do chá de hortelã pimenta detectados através da CG/O.

Compostos	Impressão odorífera	Tempo
Eucaliptol	doce, chá, erva	8:04 – 8:13
Linalol	doce, flor, chá	24:20 – 24:37
Mentol	pasta dental, menta, picante	26:30 – 26:43
Acetato de dihidrocarveol	erva, hortelã, menta	30:26 – 30:56
Álcool benzílico	doce, mel	35:37 – 35:50
Carvona	hortelã, erva	34:00 – 34:33
Espatulenol	erva, chá	43:42 – 43:55
Óxido de bisabolol B	mato, erva, hortelã	44:31 – 44:53
Cumarina	erva, chá	55:26 – 56:18

Após a diluição sucessiva dos extratos, pela técnica de ADEA, apenas o mentol foi identificado em todas as diluições, inclusive sendo percebido no extrato diluído em até 16 vezes. Outros compostos, descritos na Tabela 5, também foram percebidos durante a aplicação do AEDA, porém os resultados foram conflitantes e, por isso, optou-se por não considerá-los. Em suma, as diferenças qualitativas e quantitativas entre os dados apresentados no trabalho e os da literatura podem ser atribuídas, não somente pelas variações edafoclimáticas sobre o metabolismo da hortelã pimenta, mas também pelas diferentes técnicas empregadas, particularmente o uso de técnicas diferentes de extração/pré-concentração. Isso poderia justificar a grande quantidade de terpenos oxigenados encontrados e a presença de hidrocarbonetos acíclicos, ácidos carboxílicos, cetonas e álcoois alifáticos. Além disso, alguns compostos como dodecano, acetoína, acetol, citral, geraniol e o ácido octanóico foram identificados pela primeira vez na hortelã pimenta. A acetoína, o acetol, o citral e o geraniol já foram descritos como compostos voláteis de impacto odorífero para

diversas plantas (KAWAKAMI et al., 1995; WU et al., 2011). A fração de terpenos foi a majoritária no extrato aquoso, embora seu perfil qualitativo e quantitativo tenha sido menor quando comparado com o óleo essencial. Por conta disso, pode ser que as propriedades químicas do óleo essencial de hortelã pimenta não sejam totalmente reproduzidas com o uso do chá caseiro.

6. CONCLUSÃO

O emprego da extração não exaustiva seguido da técnica de cromatografia de adsorção permitiu a identificação de 31 compostos na matriz, sendo que 16 compostos voláteis foram identificados pela primeira vez no extrato aquoso da erva. A partir da análise olfatométrica foi possível detectar 9 compostos de odor no extrato aquoso de hortelã pimenta. No entanto, apenas o mentol foi detectado no extrato após diluição de 16 vezes, sendo considerado o composto de impacto odorífero para o chá. Apesar da fração de terpenos ter sido a majoritária no extrato, seu perfil quantitativo e qualitativo foi menor quando comparado com o do óleo essencial. Por isso, é possível que as propriedades químicas do óleo essencial não sejam idênticas às do chá caseiro.

PARTE II. ANÁLISE REVISADA DO RISCO DE CONTAMINAÇÃO DA CACHAÇA POR CARBAMATO DE ETILA E HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

7. INTRODUÇÃO

A aguardente de cana é uma bebida fermento-destilada originária da cana de açúcar com graduação alcoólica entre 38 e 54% (v/v); já o termo cachaça somente deve ser utilizado se essa bebida for produzida no Brasil e possuir graduação alcoólica entre 38 e 48% (v/v) (BRASIL, 2005a). O Estado de São Paulo é o maior produtor de cachaça industrial, enquanto o Estado de Minas Gerais um importante produtor de cachaça artesanal. A cachaça é a segunda bebida mais consumida no país, pois possui um aroma peculiar e bem apreciado. Em 2011, cerca de 9,8 milhões de litros de cachaça foram exportados para os continentes Europeu e Americano (BRASIL, 2012). Devido à grande comercialização interna da bebida e ao grande cenário de exportação atual, faz-se necessário o estabelecimento de parâmetros para a padronização da cadeia tecnológica da cachaça, visando à qualidade da bebida. Nesse contexto, a detecção e o controle de contaminantes potencialmente mutagênicos e carcinogênicos, como a uretana (carbamato de etila, CE) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) é considerado um índice importante de qualidade, uma vez que esses compostos representam um risco à saúde pública (IARC, 2010a, b). A legislação brasileira atual determina um valor máximo de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CE para a cachaça (BRASIL, 2005a). Esse valor é igual ao recomendado para as bebidas destiladas em países como Canadá, Estados Unidos, República Tcheca e França (EFSA, 2007). No entanto, ainda não foram determinados valores máximos de HPAs para as bebidas fermento-destiladas no Brasil, nem no exterior. O comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação indicaram 13 HPAs como genotóxicos e carcinogênicos (benzo(a)antraceno, BaA; benzo(b)fluoranteno, BbF; benzo(j)fluoranteno, BjF; benzo(k)fluoranteno, BkF; benzo(a)pireno, BaP; criseno, CR; dibenzo(a,h)antraceno, DBahA; dibenzo(a,e)pireno, DBaeP; dibenzo(a,h)pireno, DBahP; dibenzo(a,i)pireno, DBaiP; dibenzo(a,l)pireno, DBalP; indeno(1,2,3-c,d)pireno, IP; e 5-metilcriseno, MCR). Em 2002, o Comitê Científico para Alimentação Humana (CCAH)

sugeriu que o BaP fosse o marcador da presença e dos efeitos cancerígenos dos HPAs nos alimentos e apontou a necessidade de novas análises para reavaliar essa proposição (EUROPA, 2008). O comitê estimou um consumo diário máximo desses compostos que variou entre 6 a 8 ng Kg⁻¹, considerando indivíduos de 70 Kg. A Comissão Europeia, por outro lado, estabeleceu limites máximos de BaP em alimentos como óleos, gorduras, carnes curadas, alimentos à base de cereais e crustáceos que variou de 1 a 10 µg g⁻¹ (EUROPA, 2006). Em 2008, Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) concluiu que o BaP isoladamente não seria um marcador adequado, e indicou a inclusão de mais 3 compostos (BaA, BbF e CR) para indicar a contaminação dos alimentos por HPAs, totalizando 4 contaminantes (EFSA, 2008). Com base nas conclusões da AESA, a Comissão Europeia substituiu o Regulamento número 1881/2006 pelo Regulamento número 853/2011 que reduziu os teores de BaP nos alimentos (1 a 6 µg kg⁻¹) e incluiu os teores máximos relativos à soma dos 4 contaminantes que variaram de 1 µg kg⁻¹ (produtos alimentícios destinados a lactentes e crianças) a 35 µg kg⁻¹ (grãos de cacau e seus produtos derivados e moluscos bivalves defumados) (EUROPA, 2011). No Brasil, a legislação determina teores máximos de BaP de 0,7 µg L⁻¹ para água envasada, e 0,03 µg Kg⁻¹ para alimentos aromatizados com sabor de fumaça (BRASIL, 2005b; BRASIL, 2007a). No entanto, ainda não há um consenso internacional com relação aos limites de HPAs para os alimentos e bebidas (EFSA, 2008). Dessa forma, diferentes estudos foram conduzidos para avaliar o perfil quantitativo e qualitativo dos HPAs e do CE na cachaça e na aguardente de cana, já que existe uma preocupação em atender as exigências nacionais e internacionais no que diz respeito à qualidade do produto.

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GERAL

Revisar a presença de CE e HPAs nessas bebidas, as vias para a formação desses contaminantes e as técnicas para o seu controle.

8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a formação, os métodos de análise para carbamato de etila;
- Estudar a formação, os métodos de análise para HPA.

9. MÉTODOS DE ANÁLISE

A principal e mais rápida técnica utilizada para detectar CE em bebidas alcoólicas é a CG-EM com monitoramento seletivo de íons (SIM) (LAU; WEBER; PAGE, 1987; ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991). Além do detector de massas, outros tipos já foram utilizados, como o detector seletivo para nitrogênio/fósforo, o eletrolítico de condutividade de *Hall*TM, o de infravermelho com transformada de *Fourier* (GC-FTIR), e por luminescência. A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF) foi proposta como método alternativo para análise do CE, apresentando resultados similares aos obtidos por CG/EM (HERBERT et al., 2002; MACHADO et al., 2013). Nesse método, porém, é necessário que se realize a derivatização do CE da amostra com o 9-xantadiol, em meio ácido, para formação do seu éster fluorescente detectável (carbamato de etil xantila), aumentando o tempo e o custo da análise (HERBERT et al., 2002; MADRERA; VALLES, 2009). Lachemeier, Frank e Kuballa (2005) propuseram a aplicação da CG com detector de

massas em tandem (CG-EM-EM) com monitoramento de reação múltipla (MRM), após a extração da amostra com uma coluna *Extrelut*[®] (terra diatomácea) para o isolamento do CE e eliminação de interferentes da matriz. Esse método permitiu a obtenção de picos cromatográficos com menor interferência, quando comparados com os obtidos pela técnica de CG-EM/SIM. A extração por *Extrelut*[®] se mostrou mais eficiente do que outros métodos de extração em fase sólida (EFS) (LACHEMEIER et al., 2009). De acordo com os autores, a técnica de microextração em fase sólida (SPME) apresentou menor rendimento de extração, em bebidas alcoólicas com mais de 40% de álcool etílico, causado pela ligação competitiva entre o etanol e o analito, no revestimento das fibras do SPME. Além disso, também foi observado que houve uma diminuição da extração do CE, em soluções aquosas contendo mais de 20% de etanol (LACHENMEIER; NERLICH; KUBALLA, 2006). Acredita-se que isso é devido a formação de micelas ricas em etanol que envolvem o analito, prejudicando sua adsorção à fase (LACHENMEIER et al., 2006).

As técnicas mais utilizadas para a determinação dos HPAs em alimentos e bebidas são a CLAE-DF ou ultravioleta visível CLAE-UV e a CG-EM (FALCÓN; GRANDE; GÁNDARA, 2005; PURCARO; MORET; CONTE, 2013). A CLAE-DF é conhecida por apresentar maior seletividade, menor limite de detecção e por não necessitar do uso de padronização interna, e nem de clarificação da amostra, quando comparada com as outras técnicas (cromatografia em camada delgada, CG-EM e CG-FTIR) (FALCÓN et al., 2005; GALINARO; CARDOSO; FRANCO, 2007; TITATO; LANÇAS, 2005). Geralmente, a extração dos HPAs é feita através da EFS e da extração líquido-líquido (ELL), utilizando diferentes tipos de solvente (metanol, ciclohexano, 2-propanol, dimetilformamida e acetonitrila) para a solubilização de compostos de alta massa molecular (MM). Após a ELL, a amostra é clarificada utilizando adsorventes à base de sílica, com objetivo de eliminar os interferentes da matriz. Apesar da EFS e da ELL apresentarem valores similares de recuperação, na aguardente de cana, foi sugerido que a EFS, por ter menos etapas que a ELL durante o procedimento de extração, apresentaria resultados com melhor precisão (FALCÓ et al., 2005). Em outro estudo, Caruso e Alaburda (2009) obtiveram resultados similares quando compararam a EFS com a ELL por partição com ciclohexano e dimetilformamida/água. Todos os métodos avaliados foram eficientes, porém, novamente, a EFS apresentou melhores resultados (recuperação do composto variou de 82,9% a 97% e o coeficiente de variação foi de 0,5% a 4,9%), melhor manipulação, foi mais rápida e mais econômica (menor uso de solvente que a ELL). Em contrapartida, na EFS, pode ocorrer a adsorção dos HPAs nos

cartuchos utilizados, reproduzindo valores subestimados. Esse problema pode ser evitado através da adição de acetonitrila, a qual aumentará a solubilidade dos contaminantes na amostra (FALCÓN et al., 2005). Além disso, a acetonitrila aumenta a dessorção dos HPAs através da aplicação de pequenas alíquotas do solvente (GALINARO et al., 2007).

10. CARBAMATO DE ETILA

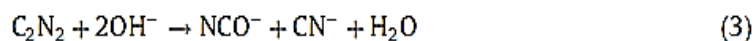
10.1. OCORRÊNCIA E EXPOSIÇÃO

O CE é um éster do ácido carbâmico de fórmula molecular $C_3H_7NO_2$. Nos últimos anos, considerável atenção foi dada ao CE, devido à suspeita desse composto ser um carcinógeno que pode ser encontrado em alimentos fermentados e bebidas destiladas. Esse contaminante foi considerado genotóxico e foi incluído no grupo 2A da IARC como provável carcinógeno humano (IARC, 2010a). O CE é geralmente encontrado em quantidades traço em alimentos e bebidas fermentadas e em concentrações acima de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ em bebidas destiladas provenientes de plantas cianogênicas, como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e a cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (LACHENMEIER et al., 2010), e frutas com caroço (LACHENMEIER et al., 2005b). Um estudo pioneiro de meta-análise avaliou o risco no qual os consumidores de cachaça brasileiros são sujeitos, baseados no modelo da margem de exposição (MOE), estabelecido pelo JECFA e pela EFSA (LACHENMEIER et al., 2010). Em geral, a MOE maior ou igual a 10000 tem sido considerada de baixa prioridade para as ações de gerenciamento de risco (EFSA, 2005). A MOE para a população brasileira se apresentou inferior a 10000 e variou entre 4294 e 5058. As pessoas que consomem muita cachaça, em média quatro quartinhos (um quartinho equivale a 170 mL) por dia, conseguiram chegar a uma MOE de 59. Até mesmo os consumidores moderados que bebem uma única dose ao dia atingiram uma MOE de 800. Ao comparar a população brasileira com a europeia, com relação ao consumo da bebida e o risco associado, os autores observaram que os consumidores brasileiros estão mais em risco do que os europeus, os quais apresentaram MOE de 5450 a 9090 (LACHENMEIER et al., 2010).

10.2. FORMAÇÃO

As vias prováveis de formação do CE em bebidas alcoólicas estão relacionadas com a reação entre o etanol e precursores nitrogenados, como a uréia, o fosfato de carbamila (bebidas fermentadas) e o cianeto (bebidas destiladas) (OUGH; CROWELL; GUTLOVE, 1988a; STEVENS; OUGH, 1993; FARAH-NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003). Em um estudo prévio, foi proposto que a formação de CE em vinhos ocorreu pela reação da amônia, presente na bebida, com um aditivo utilizado no controle microbiológico, o carbonato de dietila (LOFROTH; GEJVALL, 1971). Além dessas, outras vias de formação do contaminante também foram sugeridas. Vale ressaltar que a predominância de um tipo de reação ou outro depende do precursor presente na matéria prima. Estudos posteriores correlacionaram a formação do CE com a alta concentração de uréia no vinho, devido à presença de arginina (principal aminoácido) no suco de uva, a qual é metabolizada a uréia durante a fermentação (OUGH, CROWELL; MOONEY, 1988). Foi sugerido que a formação do CE durante o armazenamento da cachaça ocorre gradualmente, através da reação entre etanol e uréia (COOK et al., 1990). Andrade-Sobrinho et al. (2009) verificaram que a ureia estava na ordem de magnitude de $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras de cachaça, a qual permaneceu na mesma concentração durante longos períodos de armazenamento. Dessa forma, se houvesse de fato reação entre uréia e etanol, ela seria muito lenta. A biossíntese de fosfato de carbamila pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* também está associada com a presença de CE na bebida, o qual é formado pela reação entre fosfato de carbamila e etanol (INGLEDEW; MAGNUS; PATTERSON, 1987). Bactérias ácido-láticas também metabolizam arginina e formam citrulina. Esse último aminoácido não-proteico pode reagir com o etanol e contribuir para a formação do CE (FDA, 2011). Além disso, a maioria dos fertilizantes que são utilizados na agricultura contém nitrogênio, podendo, portanto, aumentar a concentração de uréia nas bebidas (FDA, 2011). A produção de CE durante a fermentação do suco de cana de açúcar pode ocorrer da mesma forma que no vinho. No entanto, o CE que foi formado nesse processo, fica concentrado no vinhoto. Isso ocorre porque o ponto de ebulição do CE é maior (182 – 185°C) do que as temperaturas geralmente utilizadas no processo de destilação (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). Outras vias de formação do CE nas bebidas destiladas foram propostas, como: reação de proteínas com etanol, catalisada por íon cobre, e liberação de ácido ciânico proveniente da decomposição térmica da uréia presente no mosto

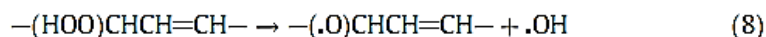
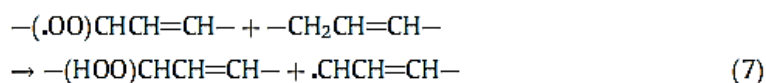
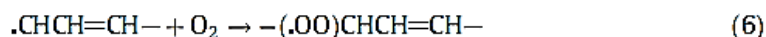
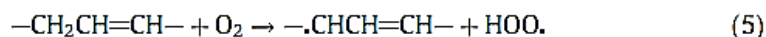
(RIFFIKIN; WILSON; BRINGHURST, 1989; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). Nenhum experimento até momento tem validado essas hipóteses. Em contrapartida, o cianato (NCO^-) e sua forma tautomérica, o isocianato (OCN^-), parecem ser os principais precursores responsáveis pela formação do CE na cachaça (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). Esses precursores são formados a partir de reações enzimáticas e da clivagem térmica dos glicosídeos cianogênicos, como a epiheterodendrina na cevada (*Hordeum vulgare*) e a amigdalina em frutas com caroço (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; COOK et al., 1990). A cana de açúcar é classificada como planta cianogênica, porém a identidade química da fonte de cianeto ainda é desconhecida (GALINARO; FRANCO, 2011). Foram propostas duas vias de formação do CE a partir do cianeto: a primeira através da complexação do cianeto com o íon cobre (Cu^{+2}), seguido pela sua oxidação, formando um cianogênio (CN_2), e a segunda pela autooxidação de compostos insaturados, submetidos a luz UV, contribuindo para a formação de radicais livres, os quais catalisam a oxidação do cianeto a cianato (BEATTIE; POLYBLANK, 1995; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). A primeira via proposta para a formação do CE é baseada na complexação do cianeto com o Cu^{+2} , seguido da oxidação do complexo, formando cianogênio com subsequente desproporcionamento, produzindo cianato, conforme as reações descritas abaixo (BEATTIE; POLYBLANK, 1995):



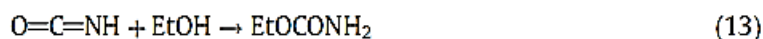
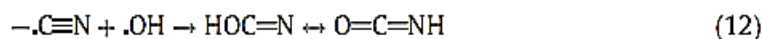
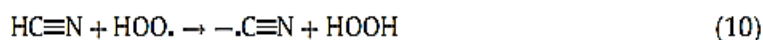
Os íons CNO^- podem reagir com o etanol produzindo o CE, conforme a reação abaixo:



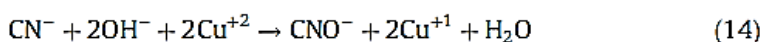
A segunda via proposta para a formação do CE está relacionada com a autooxidação dos compostos insaturados presentes na bebida, sobre influência da luz UV. Nesse processo, os radicais livres (ex. peroxil ou hidroxil) seriam formados, e estes catalisariam a oxidação do cianeto a cianato, de acordo com o esquema abaixo (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001): etapas de iniciação, propagação e autooxidação, como seguem:



Hipótese de formação do CE:

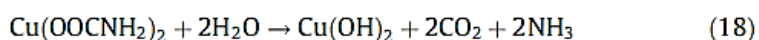
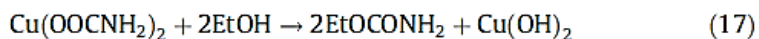
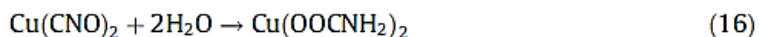


No mesmo estudo, utilizaram uma solução etanol:água (30:70, v/v) adicionada de cianeto e íons cobre na presença de atmosfera de oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono. Eles observaram que a oxidação do cianeto a cianato parece ser independente do oxigênio dissolvido. O oxigênio estaria envolvido somente na oxidação do Cu^{+1} a Cu^{+2} , e posteriormente esse íon favoreceria a oxidação do cianeto a cianato (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). A partir dessa análise, os autores indicaram que a formação do cianato seria mais favorecida pela reação 14 do que pela reação 15, conforme mostrado abaixo:



Além disso, eles também avaliaram o potencial catalítico do Cu^{+2} na conversão do cianato a CE na presença de etanol. A formação do CE foi claramente dependente da presença do metal de transição. Isso foi confirmado, quando o KCN, em solução de etanol:água, foi convertido a KOCN e, posteriormente, a CE na presença de Cu^{+2} . Essa reação não ocorreu na ausência do metal de transição. O complexo de coordenação entre o cianato e o íon cúprico ocorre através da ligação do átomo de nitrogênio, formando uma estrutura binuclear. Nesse caso, o átomo de carbono tende a ser mais eletropositivo, favorecendo o ataque nucleofílico

do oxigênio pelo etanol (etanólise). Esse mesmo efeito foi observado com o Fe^{+3} , indicando que a ligação do cianato com um metal de transição desempenha um papel importante na sua ativação e suscetibilidade ao ataque nucleofílico. A partir desses dados, a via mais provável para a formação do CE foi indicada como segue (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO,2001):



O aquecimento prolongado da solução etanol:água favorece a formação de uma mistura de carbonato e hidróxido de cobre que são catalisadores ineficientes na formação do CE. Isso explicaria porque o potencial catalítico do íon cobre, *in vitro*, diminui com o tempo. A formação do carbonato e hidróxido de cobre foi observada através da análise elementar e da espectroscopia de infravermelho (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). Entretanto, a concentração de íon cobre se apresentou na ordem de miligramas, enquanto que a de íon cianeto esteve, quando detectado, no teor máximo de $15 \mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, mesmo que uma grande parcela do íon cobre fosse desativada, via formação de carbonato e hidróxido de cobre, isso não seria um fator limitante na formação do CE. Aresta, Boscolo e Franco (2001), por outro lado, também avaliaram os teores de uréia e de CE nas cachaças comercializadas, porém não encontraram relação entre a presença do composto e a formação do contaminante. Embora houvesse reação entre a uréia e o etanol, ela pouco contribuiria para o aumento de CE na cachaça, pois a concentração de uréia na bebida é geralmente muito baixa. A presença de uréia na bebida pode ser devido à contaminação ou práticas inadequadas durante o processo de destilação, muito provavelmente pelo arraste da uréia (não volátil) remanescente no caldo durante a destilação (POLASTRO et al., 2001). Todos os estudos acima sugerem que a catálise do cianeto é a principal fonte de CE. Certamente os íons cobre desempenham um papel crucial na formação do contaminante.

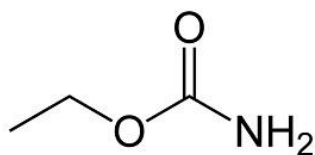


Figura 4. Estrutura do carbamato de etila

10.3. RESULTADOS

A Tabela 6 apresenta a quantidade média de CE presente em cachaças e aguardentes da cana de açúcar sob diferentes condições de destilação. Na prática, as distintas condições resultam em grande variabilidade da quantidade de CE, um reflexo da falta de padronização na cadeia produtiva. Valores mais baixos foram observados quando a destilação descontínua (alambique/ produção artesanal) foi utilizada ao invés do método contínuo (destilação em coluna/industrial). O destilado do alambique é geralmente separado em três frações de mesmo volume (cabeça/primeira, coração/segunda e cauda/terceira), enquanto o destilador industrial produz um único destilado. As frações cabeça e cauda contém maior quantidade de CE que o coração. Em estudo anterior, Andrade-Sobrinho et al. (2009) sugeriram que a menor quantidade de CE em destilados de alambique é decorrente do uso do coração para a bebida. Isso foi confirmado por Baffa-Júnior et al. (2011), que avaliaram a concentração de CE em diferentes estágios da produção da cachaça. As frações da cabeça, rica em compostos de baixo ponto de ebulição, como o acetato de etila e o metanol, apresentaram a maior concentração do contaminante ($59700 \mu\text{g L}^{-1}$) e foram consideradas impróprias para consumo. Essa fração do destilado possui a maior quantidade de álcool (60 – 65%, v/v) e o CE é cerca de 10 vezes mais solúvel em etanol que em água, o que explicaria os maiores níveis de contaminante nessa fração. Adicionalmente, foi encontrada na cabeça a maior abundância de cianetos (CHRISTOPH; SCHMITT; HILDENBRAND, 1987; GUERAIN; LEBLOND, 1992). Posteriormente, foi sugerido que a explicação mais plausível para a alta concentração do CE na fração cabeça seria pela reação dos cianetos com o etanol, ao invés da hipótese da solubilidade (NÓBREGA et al., 2009). A fração coração contém cerca de 40% (v/v) de etanol e tem apresentado concentrações de CE abaixo de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Já a fração cauda do destilado com aproximadamente 35% de etanol (v/v), apresentou valores médios de $53100 \mu\text{g L}^{-1}$, provavelmente devido a altas temperaturas de destilação, no final do processo, que poderia causar o acúmulo de CE na fase de vapor (BAFFA-JUNIOR et al., 2011). O mesmo estudo também determinou o conteúdo de cobre tanto no suco de cana de açúcar, quanto nas frações do destilado. Foram encontrados valores médios de cobre de $0,055 \text{ mg L}^{-1}$ no suco de cana de açúcar, de $8,76 \text{ mg L}^{-1}$ na fração cabeça, $3,14 \text{ mg L}^{-1}$ na fração coração e $5,18 \text{ mg L}^{-1}$ na fração cauda, indicando que o cobre poderia estar atuando como catalisador para a formação do CE. Cerca de 30% dos destilados produzidos em alambique apresentaram valores de CE

acima do permitido pela legislação ($150 \mu\text{g L}^{-1}$) (Tabela 6). Nesse caso, é possível que o processo de destilação tenha sido executado sobre condições controladas incorretamente. A presença de aromas desagradáveis também ajuda a tornar a bebida imprópria para consumo. A fração coração contém compostos secundários, como ésteres, álcoois e ácidos que contribuem para o aroma característico da cachaça (NETTO; MOREIRA; DE MARIA, 2003). Assim sendo, é importante obter um destilado da fração coração que possua tanto uma baixa quantidade de CE quanto importantes componentes do aroma.

Tabela 6. Concentração de CE em cachaça e outras aguardentes de cana brasileiras.

Cachaça e outras aguardentes de cana destiladas no sistema artesanal						
Nº	Tipo de destilação	Sistema de aquecimento	Sistema de resfriamento	Tipo de material	Valor médio de CE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
17*	simples	vapor/fogo direto	-	alambique de cobre	145	1
8*	simples	vapor/fogo direto	deflegmador tubular	alambique de cobre	71	1
5*	simples	vapor/fogo direto	capelo	alambique de cobre	237	1
1*	simples	-	-	alambique de aço inoxidável	11	1
1*	dupla	-	-	-	17	1
3	dupla	-	-	-	298	2
1	simples	-	-	alambique de cobre	187	3
1	dupla	-	sem resfriamento	alambique de cobre	14	3
1	dupla	-	capelo	alambique de cobre	8	3
1	dupla	-	deflegmador tubular	alambique de cobre	7	3
1	dupla	-	-	alambique de cobre + retificador	4	3
6*	-	vapor/fogo direto	sem resfriamento	alambique de cobre	335	2
2*	-	vapor/fogo direto	capelo	alambique de cobre	95	2
3*	-	vapor	deflegmador tubular	alambique de cobre	63	2
16*	-	-	-	-	30	4
20*	-	-	-	-	55	4
16*	-	-	-	-	645	4
13*	-	-	-	-	64	5
2*	simples	vapor/fogo direto	sem resfriamento/capelo	caldeira de cobre, coluna e tubo condensador de aço inoxidável	<10	5
1*	simples	fogo direto	deflegmador tubular	caldeira de cobre, coluna e tubo condensador de aço inoxidável	<10	5
1*	simples	fogo direto	deflegmador tubular + PB	alambique de cobre	<40	5
1*	-	-	-	alambique de cobre	204	6
34	-	-	-	-	630	7
3	-	-	-	alambique de cobre	142	8
33*	-	-	-	-	60	9
275*	-	-	-	-	380	9

Tabela 6. Continuação

Cachaça e outras aguardentes de cana destiladas no sistema contínuo (industrial)						
Amostras	Tipo de destilação	Sistema de aquecimento	Sistema de resfriamento	Tipo de material	Valor médio de CE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
69*	-	-	-	-	930	7
3	-	-	-	coluna de aço inoxidável	527	8
33*	-	-	-	-	300	9
101*	-	-	-	-	490	9
10*	-	vapor	-	-	320	1
20	-	-	-	-	257	5
1*	-	-	-	-	423	6
Sistema de destilação não identificado						
22*	-	-	-	-	1206	10
71	-	-	-	-	893	11
12	-	-	-	-	<150	12

Referências (Ref.): 1) Bruno et al. (2007); 2) Nóbrega et al. (2009); 3) Alcarde et al. (2012b); 4) Barcelos et al. (2007); 5) Nóbrega et al. (2011); 6) Galinaro & Franco (2011); 7) Andrade-Sobrinho et al. (2002); 8) Andrade-Sobrinho et al. (2009); 9) Lachenmeier et al. (2010); 10) Baffa-Júnior et al. (2007); 11) Labanca et al. (2008); 12) Zacaroni et al. (2011). №: número de amostras; PB: Pratos borbulhadores. *Amostras de cachaça.

Além da separação das frações do destilado, outros parâmetros tecnológicos, como o tipo de destilação (contínua ou descontínua), o material utilizado (cobre, aço inoxidável) e os tipos de dispositivos acoplados (deflegmador, pratos borbulhadores), também são muito importantes para manter a concentração de CE baixa. Bebidas bidestiladas tendem a ter menor quantidade do contaminante, devido a sua baixa volatilidade, mas apresentam, também, menor conteúdo de etanol e de outros compostos secundários associados ao aroma (RIFFKIN et al., 1989). Foi observada a mesma tendência para as cachaças redestiladas (FARAH-NAGATO et al., 2000; BRUNO; VAITSMAN; KUNIGAMI, 2007; GALINARO; FRANCO, 2011). Em estudo recente, Alcarde, Souza e Bortoletto, (2012a, b) obtiveram uma redução do CE superior a 90% nesse tipo de bebida. No entanto, Nóbrega et al. (2009) verificaram que cerca de 70% das amostras redestiladas apresentaram valores do contaminante superiores a $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Eles não observaram diferenças entre os produtos que foram submetidos a destilação simples ou dupla. Os componentes do alambique podem ser feitos de aço inoxidável, cobre ou dos dois materiais, tanto na parte ascendente, quanto na descendente. A parte ascendente é composta por uma caldeira e por uma coluna, enquanto que a descendente contém um tubo condensador e um tanque, como mostrado nas Figuras 1 e 2. Os destiladores do sistema de destilação contínuo, geralmente utilizados na indústria, são feitos de aço inoxidável, pois sofrem menos corrosão. Em alguns casos, a parte descendente desse destilador pode ser feita de cobre para remover moléculas produtoras de aroma desagradável, como o sulfeto de dimetila. Nesse caso, o cobre atua catalisando a conversão do sulfeto de dimetila ao sulfato que não possui cheiro (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009). Baixas concentrações de CE são geralmente encontradas em cachaças produzidas em alambiques de cobre (Tabela 6). Isso ocorre devido a formação de complexos não voláteis, como CuCN , $\text{Cu}(\text{CN})_2$, $\text{Cu}_2(\text{CN})^{-3}$, $\text{Cu}_3(\text{CN})^{-4}$ formados através da interação do cianeto com o cobre (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002). Em contrapartida, as bebidas destiladas em alambiques com condensadores de cobre são mais suscetíveis à contaminação. Nesse caso, os vapores ácidos da destilação podem promover a corrosão do cobre, fazendo com que ocorra a migração do metal para a bebida, favorecendo a formação do CE (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). Em 2007, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária proibiu o uso de cobre em materiais que entram em contato direto com alimentos (BRASIL, 2007b). Tanto as condições de processamento, quanto a utilização de alguns dispositivos acoplados aos destiladores podem influenciar no processo de destilação. Uma taxa de refluxo alta está associada com

baixas temperaturas de destilação (< 80°C) e um processo lento de destilação. Isso promove uma separação mais eficiente dos compostos, reduzindo a presença de CE nas aguardentes de cana (BRUNO et al., 2007). Em geral, esse mesmo processo pode ser obtido através do acoplamento de dispositivos de resfriamento. Concentrações mais altas de CE foram obtidas em cachaças produzidas em destiladores sem nenhum dispositivo de resfriamento (200 – 700 $\mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que as produzidas em alambiques com sistema de resfriamento apresentaram valores mais baixos do contaminante (55 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) (NÓBREGA et al., 2009). A Figura 2 mostra diferentes tipos de dispositivos de refrigeração. O deflegmador tubular é o mais eficiente, pois permite controlar melhor a taxa de refluxo através do ajuste do fluxo de água. Isso foi observado por Bruno et al. (2007) que obtiveram baixas temperaturas de destilação (78°C) ao utilizarem esse sistema. Baixas concentrações do contaminante também foram obtidas utilizando alambiques acoplados com sistema de resfriamento do tipo capelo (NÓBREGA et al., 2009). Entretanto, foram observados valores mais altos de CE em bebidas destiladas em alambique com coluna do tipo *hot head*, na qual a temperatura de destilação não pode ser controlada adequadamente (BRUNO et al., 2007; NÓBREGA et al., 2011). Nesse caso, vapores mais quentes (>90°C) podem ser formados, favorecendo o arraste de compostos nitrogenados menos voláteis no condensador. Isso também foi observado em alambiques acoplados a sistema de pré-aquecimento (BRUNO et al., 2007). Alcarde et al. (2012b) verificaram que as amostras submetidas a redestilação mesmo que em alambiques com coluna acoplada a deflegmador tubular, ou coluna tipo capelo ou até mesmo sem sistema de resfriamento, obtiveram baixos teores de CE. Em estudo recente, foi verificado que as bebidas submetidas a um processo mais rápido de destilação apresentaram maior quantidade de CE (39,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) do que aquelas destiladas lentamente (21,03 $\mu\text{g L}^{-1}$) (LIMA et al., 2012). De qualquer forma, em todas as velocidades de destilação, as amostras apresentaram valores do contaminante abaixo de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os autores atribuíram esse fato à qualidade da fermentação do suco de cana, e ao fato da amostra não ter sofrido contaminação por compostos, como ácido láctico ou acético.

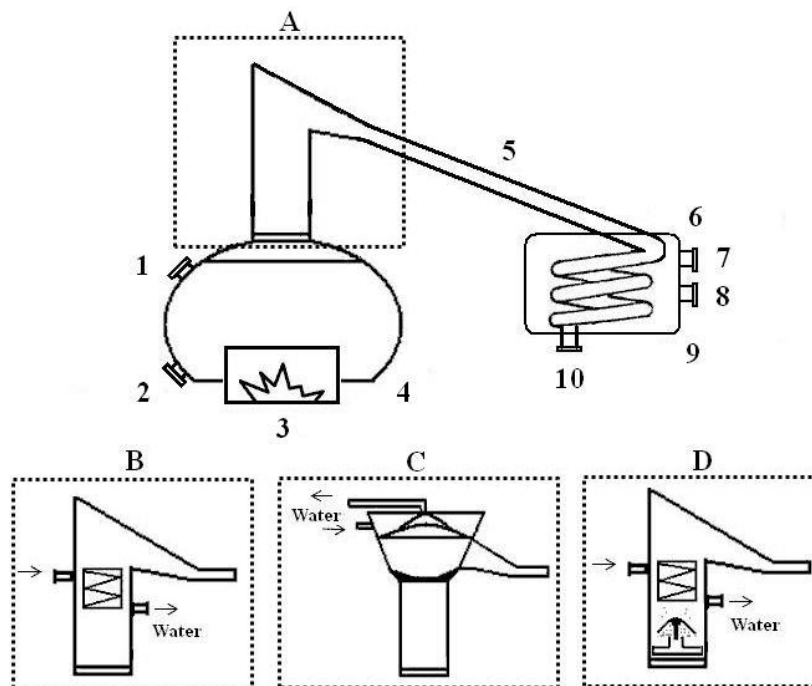


Figura 5. Alambique e sistemas de resfriamento.

1) entrada do fermentado; 2) saída do vinho; 3) sistema de aquecimento; 4) caldeira; 5) tubo condensador; 6) tanque de condensação; 7) entrada de água de resfriamento; 8) saída de água quente; 9) serpentina de condensação; 10) saída do destilado. A) coluna sem sistema de resfriamento; B) coluna com deflegmador tubular; C) coluna com resfriamento do tipo capelo; D) coluna com deflegmador tubular e prato borbulhador. (Modificado de: Nóbrega et al., 2011 e Alcarde et al., 2012b).

A eficiência da destilação pode ser aumentada através da adição de um sistema de refluxo na coluna. Alguns autores obtiveram concentrações muito baixas de CE ($<10 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$) em cachaças destiladas em alambique com deflegmador tubular integrado a pratos borbulhadores (BRUNO et al., 2007; NÓBREGA et al., 2011). Os alambiques equipados com um sistema de retificação também fornecem altas taxas de refluxo. O retificador é comumente utilizado para purificar o álcool por destilação repetida ou fracionada, com objetivo de remover água e outros compostos indesejáveis. A amostra redestilada que apresentou menor concentração de CE ($4,42 \mu\text{g L}^{-1}$) foi produzida através desse sistema (ALCARDE et al., 2012b). Em geral, as aguardentes de cana produzidas em alambique obtiveram menores quantidades de CE do que aquelas produzidas pelo sistema contínuo de destilação, ou seja, em destiladores industriais, como apresentado na Tabela 6. O aspecto mais importante no sistema contínuo a ser levado em conta é o ajuste da temperatura. O controle inadequado da temperatura está associado com a formação excessiva de vapores e do seu arraste na coluna. Nesse caso, ocorreria o encharcamento dos pratos e o arraste ao mesmo tempo. Foi encontrada grande variação na concentração de CE utilizando o destilador industrial (40 – 714

$\mu\text{g L}^{-1}$), no entanto, quando houve maior controle da temperatura de destilação, pouca variação foi observada (BRUNO et al., 2007). A Figura 3 mostra um exemplo de um destilador com pratos borbulhadores utilizado no sistema contínuo de destilação. Previamente, foi mencionado que na destilação artesanal ocorre a separação do destilado em três frações (cabeça, coração e cauda), porém o mesmo não acontece na destilação industrial. O fracionamento do destilado no processo artesanal é fundamental para a obtenção de cachaça de qualidade superior. Esse fato pode explicar o porquê das cachaças destiladas de forma artesanal terem menor quantidade de CE do que as produzidas industrialmente. Essa hipótese foi confirmada por um estudo de metanálise, o qual mostrou que as cachaças destiladas no sistema contínuo apresentaram valores significativamente mais altos ($490 \mu\text{g L}^{-1}$, 101 amostras; teste-t, $p = 0,048$) que as destiladas no sistema artesanal ($380 \mu\text{g L}^{-1}$, 275 amostras) (LACHENMEIER et al., 2010).

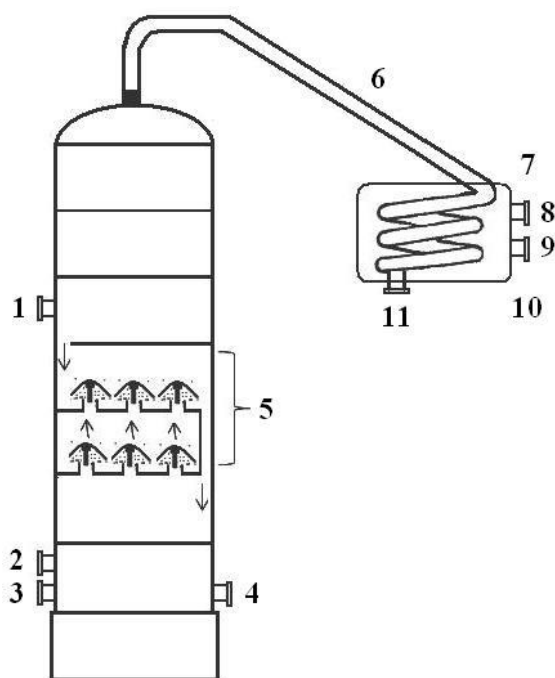


Figura 6. Destilador industrial – Sistema contínuo de destilação.

1) entrada do fermentado; 2) entrada de vapor; 3) saída de vapor; 4) saída do vinhoto; 5) sistema de refluxo com pratos borbulhadores; 6) tubo condensador 7) tanque de condensação; 8) entrada de água fria; 9) saída de água quente; 10) serpentina de condensação; 11) saída do destilado.

Outros parâmetros que poderiam interferir na qualidade da cachaça foram avaliados. Andrade-Sobrinho et al. (2002) investigaram a influência da coloração da garrafa (âmbar ou transparentes) e do tempo de envelhecimento da bebida sobre concentração de CE na cachaça, porém não encontraram diferenças significativas entre os resultados. Outros estudos também não observaram diferenças quando avaliaram a transparência da garrafa e compararam com a quantidade do contaminante (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009; NÓBREGA et al., 2009). Em um estudo mais detalhado, Galinaro e Franco (2011) também não observaram diferenças na concentração de CE em amostras recém-destiladas expostas ou não à luz solar, bem como naquelas submetidas à irradiação em diferentes comprimentos de onda (250 – 500 nm), durante 3 horas. Portanto, a probabilidade de haver um precursor fotoquímico na aguardente de cana é muito baixa. No mesmo estudo, foi verificado que a formação do CE foi acelerada quando se aumentou a temperatura de destilação. A formação do contaminante foi cerca de 80% mais rápida a 34°C (14 horas) do que a 15°C (78 horas). Os autores obtiveram a concentração máxima do contaminante depois de 7 dias após a destilação realizada tanto em alambique de cobre, quanto em alambique de aço inoxidável do mesmo fabricante. Esse resultado foi diferente do encontrado por Riffkin et al. (1989) e Aylott et al. (1990) que verificaram que todo CE é formado nas primeiras 48 horas após a destilação. Essa discrepância pode refletir flutuações aleatórias relativas a diferenças metodológicas. O fato é que mais de 60% do contaminante foi formado imediatamente após a destilação e 80% durante as primeiras 72 horas. A influência do íon cobre sobre a concentração do CE na cachaça foi indicada por diversos estudos (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; BRUNO et al., 2007; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009). No entanto, alguns trabalhos não conseguiram associar essa relação com a presença do contaminante (LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009). Andrade-Sobrinho et al. (2009) sugeriram que isso pode ser devido ao fato das amostras já estarem estabilizadas. De fato, o CE é formado completamente entre 24 e 48 horas após a destilação (RIFFKIN et al., 1989; AYLOTT et al., 1990). Dois estudos detalhados confirmaram essa correlação. Bruno et al. (2007) submeteram amostras de cachaça recém-destiladas ao tratamento com diferentes quantidades de resina catiônica para promover a remoção do cobre por filtração. O tratamento conseguiu reduzir a concentração do CE em 80% (de 272 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$). Esse resultado foi similar ao encontrado por Riffkin et al. (1989), quando analisaram o *whisky*. Cerca de 20% a 80% do CE foi produzido na primeira e na segunda hora depois da destilação do *whisky*, respectivamente. Eles observaram que a formação do contaminante foi interrompida após a

remoção do íon cobre, confirmando a influência catalítica do metal. Em estudo anterior, Aresta, Boscolo e Franco (2001) apontaram propostas para o controle do CE que já foram sugeridas para outras bebidas alcoólicas (OUGH; TRIOLI, 1988; RIFFIKIN et al., 1989; TEGMO-LARSSON; SPITTLER, 1990; TAKY et al., 1992). Essas propostas incluem: (1) o uso de enzimas específicas para a remoção da uréia e do cianeto (urease e rodanase, respectivamente), (2) a adição de sais de prata para promover a precipitação do cianeto no mosto, (3) o uso de resinas catiônicas para a eliminação do Cu^{2+} e (4) o armazenamento das garrafas em temperatura e iluminação controladas. A adição de agentes quelantes naturais em amostras de cachaça recém destiladas, pode ser uma opção para diminuir a ação catalítica do metal de transição. Nesse sentido, o ácido fítico é um excelente candidato, pois é considerado um quelante eficiente, e além disso, é um composto que é ingerido comumente na dieta humana.

11. HPAs

11.1. OCORRÊNCIA E EXPOSIÇÃO

Os HPAs são pertencentes a um grupo ubíquo de diversos compostos relacionados quimicamente que são persistentes no meio ambiente e possuem diferentes estruturas e toxicidade variada. São compostos formados apenas por carbono e hidrogênio, contendo dois ou mais anéis aromáticos. As fontes de HPAs podem ser natural ou antropogênica, e são derivadas da combustão incompleta ou da pirólise de compostos orgânicos. Durante a pirólise, moléculas menores (e.g. naftaleno, NA) são formadas e podem sofrer reações pirossintéticas, resultando em estruturas mais complexas com anéis condensados (e.g. BghiP) (WISE; BONNETT; GUENTHER; MAY, 1981; CERNIGLIA, 1992). A exposição a esses compostos pode ocorrer através da ingestão de alimentos que foram contaminados pela água, ar ou solo, alimentos fritos, defumados ou curados ou alimentos processados industrialmente (EFSA, 2008). A ingestão em longo prazo de HPAs representa um risco à saúde, pois são compostos considerados genotóxicos e pró-carcinogênicos. Alguns desses contaminantes, como o BaP e o BaA foram incluídos no grupo 2A da IARC, sendo classificados como prováveis

carcinógenos humanos (IARC, 2010a). Como mencionado previamente, a SCF estabeleceu, preventivamente, que o BaP fosse usado como marcador para a detecção da contaminação dos alimentos por HPAs. Essa orientação possui limitações, como será visto adiante. O próprio SCF apontou a necessidade de mais análises para elucidar a ação individual e conjunta de cada HPA. Além disso, a AESA indicou a inclusão de mais três compostos (BaA, BbF e CHR), totalizando quatro contaminantes (EFSA, 2008).

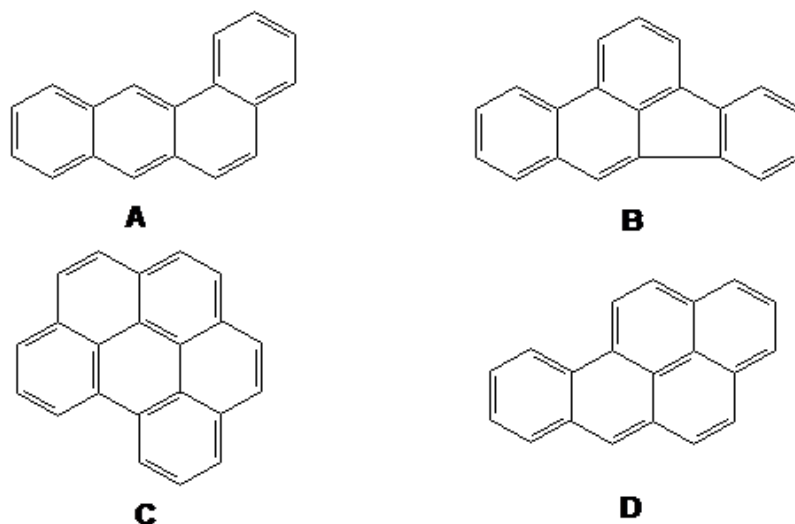


Figura 7. Estrutura de alguns HPAs.

A) benzo(a)antraceno; B) benzo(b)fluoranteno; C) benzo(ghi)perileno; D) benzo(a)pireno.

11.2. FORMAÇÃO

A queima da palha da cana de açúcar é uma prática comum no Brasil, a qual é realizada para ajudar na colheita da planta (ALCARDE, 2012c). Essa prática é frequentemente associada a poluição atmosférica, através da emissão de diversos contaminantes, incluindo os HPAs e a contaminação de produtos derivados da cana de açúcar, como a cachaça (SERRA; PUPIN; TOLEDO, 1995; MAZZOLI-ROCHA et al., 2008). Esse processo resulta em um impacto substancial ao meio ambiente e à saúde da população local. Alguns esforços já foram feitos para reduzir a prática da queima no Brasil, porém o progresso é muito lento. Como exemplo disso, o governo do estado de São Paulo, determinou um prazo

máximo de até 2021 para a eliminação total da queimada em áreas mecanizáveis (uso de colheitadeiras) e até 2031, no caso de áreas onde o uso de máquinas não é possível (BRASIL, 2002). Além da contaminação da cana de açúcar pelo fogo, outras fontes antropogênicas, como uso de lubrificantes e graxas nas máquinas, resinas asfálticas de tanques de armazenamento e barris de madeira tratados termicamente, bem como outras fontes naturais (vulcões, plantas, fungos e bactérias) poderiam contribuir para o aumento da contaminação da cana de açúcar (BETTIN; FRANCO, 2005; CARUSO; FARAH-NAGATO; ALABURDA, 2010; GILBERT, 2012).

11.3. RESULTADOS

A Tabela 7 apresenta a concentração média de HPAs em cachaças que foram produzidas a partir da cana de açúcar queimada e da cana de açúcar crua, bem como daquelas, cuja prática de colheita da matéria prima é desconhecida. Dois estudos avaliaram algumas amostras de cachaça e de aguardente de cana produzidas a partir da cana crua e queimada. Ambos utilizaram a EFS com cartuchos de octadecil silano, porém Bettin e Franco (2005) utilizaram uma mistura de isopropanol e acetato de etila como solvente, enquanto Galinaro et al. (2007) usaram uma fase binária, constituída por diclorometano e hexano. Os Valores médios de NA, AC, BbF, BkF e BghiP reportados pelo primeiro estudo foram maiores do que os do segundo trabalho, independente da matéria prima usada. Pequenas diferenças no índice de recuperação e na reprodutibilidade são insuficientes para explicar esses resultados conflitantes. Enquanto a influência do processamento industrial não possa ser descartada, é pouco provável que esse parâmetro sozinho cause uma variação grande para alguns poucos HPAs. Por outro lado, os HPAs não são quimicamente sintetizados para a indústria, porém existem poucos usos comerciais para muito dos compostos. O fluoranteno (F), os derivados do pireno e o AC são utilizados como intermediários na manufatura de compostos agroquímicos (GILBERT, 2012). A pirólise de resíduos de pesticida, durante a queima da cana, poderia ter aumentado à produção de HPAs, inflando os resultados encontrados por Bettin e Franco (2005). É possível que a contaminação por outras fontes antropológicas (derivados do petróleo) e alguns processos naturais (contaminação biológica) também tenham contribuído para os resultados conflitantes. Em geral, os dois estudos apresentaram uma

quantidade média de NA um pouco menor para as amostras produzidas com cana crua, quando comparada com as amostras provenientes da cana queimada. A concentração de BaP nas bebidas produzidas através da cana queimada foi duas vezes maior do que naquelas feitas com a planta crua, enquanto que os outros HPAs obtiveram concentrações de 5 a 10 vezes maior (e.g. BaA, BbF e CHR). Esses resultados indicam que o BaP sozinho não seria um marcador adequado para detectar a contaminação da cachaça por HPAs, pois o BaP representa menos de 1% do total dos HPAs. Portanto, é importante estabelecer teores máximos do conteúdo total de HPAs. Considerando as amostras cujo método de colheita não foi indicado, verificou-se uma grande variação nos resultados. Dessa forma, não foi possível classificar através de métodos estatísticos, as amostras de acordo com o tipo de matéria prima utilizada. Essa limitação tem sido contornada através da aplicação da análise estatística multivariada. A ocorrência de 15 HPAs, em 131 amostras de cachaça (26 produzidas através de cana queimada e 105 através da cana crua) foi investigada por Galinaro et al. (2007). Os dados foram submetidos a análise de componentes principais (PCA) e a análise canônica discriminante, e foram validados através de parâmetros como, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, e recuperação média. A associação do PCA com a análise canônica discriminante permitiu a diferenciação entre os dois produtos com uma taxa de sucesso de 98,1%. Em outro estudo, Galinaro e Franco (2009) utilizaram a análise linear discriminante para identificar os destilados produzidos pela cana crua e pela cana queimada. A aplicação do modelo quimiométrico indicou que das 14 amostras estudadas, 21% foram provenientes da cana de açúcar queimada. Os seguintes HPAs foram descritores químicos: AN, AC, F, FE, IN, FL, PI, BaA, BbF e benzo(ghi)perileno (BghiP). Serra et al. (1995) investigaram a presença de BaP, BaA, FE e NA em plantas de cana de açúcar cruas e queimadas, bem como avaliaram a presença de BaP e BaA em amostras de aguardente de cana. Nenhum dos contaminantes foi detectado na cana de açúcar crua, enquanto que os compostos BaP ($0,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$), FE ($0,13 \mu\text{g Kg}^{-1}$) e NA ($1,32 \mu\text{g Kg}^{-1}$) foram identificados na planta queimada. Com relação as amostras de aguardente, a concentração média dos compostos ficou entre $0,3 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente. A distribuição dos HPAs, baseada no perfil do peso molecular mostrou ser assimétrica. A soma das médias dos HPAs de baixo peso molecular (e.g. NA e AC) foi maior do que a soma dos compostos de baixo peso molecular (e.g. BaP e BkF) nas duas cachaças, mesmo as produzidas através da cana crua ou queimada (GALINARO et al., 2007; GALINARO; FRANCO, 2009). Esse resultado pode ser atribuído a formação acelerada de

compostos de baixo peso molecular durante a decomposição térmica de macromoléculas (pirólise), seguida da recombinação das moléculas orgânicas (pirossíntese), produzindo compostos de alto peso molecular.

Tabela 7. Concentração de HPAs em amostras de cachaça e outras aguardentes de cana. Valores expressos em µg L-1.

Amostras provenientes de cana de açúcar não queimada																			
Ref.	Nº	BaP	BaA	FE	NA	AN	PI	CR	BeP	AC	F	FL	BbF	BkF	DBahA	BghiP	IP	∑ ^d HPAs	
1 ^e	105*	0,02 ^d	0,04 ^d	0,61 ^d	0,23 ^d	0,13 ^d	0,19 ^d	0,08 ^d	-	0,21 ^d	0,10 ^d	0,23 ^d	0,01 ^d	0,01 ^d	0,04 ^d	0,02 ^d	0,04 ^b	1,96	
2	28 ^f	nd	Nd	0,28 ^d	6,00 ^d	nd	nd	nd	nd	2,00 ^d	0,50 ^d	0,70 ^d	0,25 ^d	0,40 ^d	0,05 ^d	0,86 ^d	-	11	
∑ ^d		0,02	0,04	0,44	3,11	0,13	0,19	0,08		1,10	0,30	0,46	0,13	0,20	0,04	0,44			
Amostras provenientes de cana de açúcar queimada																			
Ref.	Nº	BaP	BaA	FE	NA	AN	PI	CR	BeP	AC	FL	F	BbF	BkF	DBahA	BghiP	IP	∑ ^d HPAs	
1 ^g	26*	0,04 ^d	4,95 ^d	7,01 ^d	0,27 ^d	1,41 ^d	2,32 ^d	0,73 ^d	-	1,05 ^d	1,13 ^d	2,07 ^d	0,05 ^d	0,02 ^d	0,02 ^d	0,003 ^b	0,04 ^b	21	
2	28 ^f	1,55 ^d	1,07 ^d	2,75 ^d	9,70 ^d	3,40 ^d	3,47 ^d	1,10 ^d	1,86 ^d	9,30 ^d	3,45 ^d	2,91 ^d	2,50 ^d	3,70 ^d	1,45 ^d	4,50 ^d	0,24 ^c	0,14 ^c	52
∑ ^d		0,79	3,01	4,88	4,98	2,40	2,89	0,91	1,86	5,17	2,29	2,49	1,27	1,86	0,73	4,50			
Amostras cujo o tipo de cana de açúcar não foi informado																			
Ref.	Nº	BaP	BaA	FE	NA	AN	PI	CR	BeP	AC	FL	F	BbF	BkF	DBahA	BghiP	IP		
3	2	0,33 ^d	0,49 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	25*	0,15 ^d	0,17 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27 ^d	0,05 ^d	0,32 ^d	-	-		
5 ^a	20*	0,03 ^b 0,49 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	14*	0,04 ^d	0,10 ^d	1,26 ^d	4,32 ^d	0,45 ^d	0,53 ^d	0,73 ^d	-	0,42 ^d	0,39 ^d	0,67 ^d	0,21 ^d	0,02 ^d	0,09 ^d	0,20 ^d	-		
7	61*	0,03 ^b 0,86 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Referências (Ref.): 1) Galinaro et al. (2007); 2) Bettin & Franco (2005); 3) Serra et al. (1995); 4) Tfouni et al. (2007); 5) Caruso & Alaburda (2009); 6) Galinaro & Franco (2009); 7) Caruso et al. (2010). Nº: número de amostras; nd: não detectado; - não analisado; ^aNão foi possível calcular a média, pois o valor de HPAs em cada amostra não foi informado; ^bmenor valor; ^cmaior valor; ^dmédia; ^eMaior valor de IP e média não informada; ^fAmostras obtidas através da cana de açúcar queimada e não queimada, porém sem distinção do número de amostras em cada grupo; ^gMédias de IP e BghiP não informadas. BaP: benzo(a)pireno; BaA: benzo(a)antraceno; FE: fenantreno; NA: naftaleno; AN: antraceno; PI: pireno; CR: criseneno; BeP: benzo(e)pireno; AC: acenafteno; FL: fluoreno; F: fluoranteno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; DBahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(ghi)perileno; IP: indeno(1,2,3-c,d)pireno. *Amostras de cachaça.

12. CONCLUSÃO

Muito tem sido feito para identificar os fatores responsáveis pela formação do CE na aguardente de cana e na cachaça. A presença de um glicosídeo cianogênico na cana de açúcar tem sido apontada como o principal precursor. A contaminação pode ocorrer durante a fermentação e durante a destilação, através da ação catalítica do Cu^{+2} sobre o cianeto. A proibição do uso de materiais de cobre em equipamentos que entram em contato direto com alimentos e bebidas é um fator de extrema relevância para a redução do CE na cachaça. O controle da temperatura e da taxa de refluxo, através de sistemas de refrigeração (e.g. deflegmador) e de refluxo (pratos borbulhadores), tanto no sistema contínuo quanto no descontínuo são muito importantes para manter baixas concentrações do contaminante na bebida. Entretanto, o sistema descontínuo possui uma vantagem adicional de utilizar somente a fração coração do destilado que contém baixas concentrações de CE. Isso pode explicar o porquê das cachaças produzidas pelo método artesanal tendem a ter menor quantidade de CE do que as produzidas industrialmente.

É necessário destacar que o processo de destilação, a configuração dos destiladores e seus parâmetros físicos, como temperatura e razão de refluxo, são de extrema importância para reduzir a contaminação. Adicionalmente, alguns procedimentos foram propostos com o objetivo de reduzir a quantidade de CE na cachaça recém-destilada. Esses métodos são baseados (1) no uso de resinas catiônicas, (2) na aplicação de enzimas específica para a remoção da ureia e do cianeto, (3) na adição de sais de prata e (4) no armazenamento de garrafas em condições controladas de temperatura e iluminação. O uso de quelantes, por outro lado, pode reduzir a disponibilidade de cobre que reagiria com o cianeto. O ácido fítico pode ser um quelante promissor, uma vez que pode quelar tanto o ferro quanto o cobre. Em suma, a união de todos esses procedimentos poderia contribuir para a manutenção da concentração do CE dentro dos níveis permitidos por lei ($150 \mu\text{g L}^{-1}$) e auxiliar na promoção da saúde do consumidor. Apesar do conhecimento e da tecnologia disponível, a compilação dos dados já relatados indicam que em torno de 45% das cachaças e aguardentes de cana exibiram concentrações de CE acima de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Esse cenário pode ser ainda pior, uma vez que existe um grande consumo de cachaças produzidas ilegalmente, cuja concentração do contaminante é desconhecida. O uso do limite de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ pode não ser efetivo para

aumentar a MOE dos consumidores brasileiros para um valor acima de 10000. No entanto, poderia ao menos aumentar a MOE para um fator entre 3 – 6, o qual reduziria o risco para a saúde pública (LACHENMEIER et al., 2010). O fato é que os consumidores de cachaça e aguardente de cana são mais expostos a contaminação por CE do que os que consomem outras bebidas destiladas. Portanto, as autoridades brasileiras e os países importadores devem requerer o uso de práticas produtivas padronizadas para a redução do contaminante na bebida.

De um ponto de vista epidemiológico, é necessário estudar a incidência de câncer de fígado associado com a ingestão de CE, para estabelecer um limite superior mais seguro para consumidores de cachaça e aguardente. Conforme demonstrado na Tabela 7, o nível de BaP na cachaça e na aguardente proveniente da cana queimada e não queimada é mais baixo que o estabelecido na União Européia para produtos alimentícios ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) (EUROPA, 2006). Os valores foram até mais baixos que o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para águas envasadas ($0,7 \mu\text{g L}^{-1}$) (BRASIL, 2005b). No entanto, deve-se levar em conta que o consumo de aguardente é muito mais baixo do que o consumo de água. Em estudo recente, foi sugerido que um fator de 10 poderia ser utilizado para interpolar o limite utilizado para água para determinar o das bebidas alcoólicas (LACHENMEIER et al., 2011). Portanto, esse limite estabelecido de $7 \mu\text{g L}^{-1}$ poderia ser utilizado como referência para cachaça. No entanto, é importante estabelecer limites máximos para o total de HPAs, uma vez que já foram detectados 16 compostos na cachaça, e o BaP representa menos de 1% do conteúdo total. Apesar das propriedades genotóxicas dos HPAs terem sido previamente demonstradas (EFSA, 2002; IARC, 2010a), há grande dificuldade em determinar valores de toxicidade para humanos baseando-se em estudos realizados com animais. Assim, é difícil estabelecer o limite superior para a quantidade total de HPAs. O princípio da precaução na saúde pública, contudo, deve ser buscado, tomando as medidas necessárias para reduzir fatores de risco. Enquanto não houver estudos conclusivos sobre os níveis seguros de HPAs na cachaça, é possível utilizar os parâmetros estabelecidos pela *German Society for Fat Science*, que sugere valores abaixo de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (GALINARO et al. 2007). Nesse caso, apenas as amostras analisadas por Bettin e Franco (2005) excederam o limite sugerido. Uma proposta alternativa é a aplicação da recomendação da EFSA, que estabelece níveis máximos ($35 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para cacau e derivados e moluscos bivalves) para a soma de quatro contaminantes BaA, BbA, BbF and CR (EUROPA, 2011). Considerando a última recomendação, as amostras brasileiras se apresentaram um pouco abaixo do limite de $35 \mu\text{g Kg}^{-1}$. A grande variação encontrada em cachaças de diferentes estados pode ser associada aos tipos de processamento e à cana

utilizada (queimada ou não). Já se sabe que a contaminação dos destilados de cana de açúcar pode ocorrer em diferentes estágios da cadeia produtiva; consequentemente, deve ser feito um controle rigoroso da produção para minimizar o problema. A análise da quantidade de HPAs descritas em diversos artigos científicos demonstrou que a concentração total de contaminantes detectada nas cachaças e nas outras aguardentes brasileiras produzidas a partir da cana queimada foi 2-3 vezes maior do que no caso da cana não queimada. Assim, a implementação de ações como a redução do fornecimento de crédito para estimular a diminuição do uso da cana queimada seria um importante passo para o controle da contaminação.

13. REFERÊNCIAS

- ACREE, T.; ARN, H. Flavornet and human odor space, 2004. Disponível em: <<http://www.flavornet.org>>. Acesso em: 20 nov. 2013.
- ACREE, T. E.; TERANISHI, R. Flavor science, sensible principles and techniques. 1. ed. Washington, DC: American Chemical Society, 1993.
- ADEDEJI, J.; HARTMAN, T. G.; ROSEN, R. T.; HO, C. T. Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombins* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 39, p. 1494 – 1497, 1991.
- ALCARDE, A. R.; SOUZA, L. M.; BORTOLETTO, A. M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugarcane spirit. **Journal of the Institute of Brewing**, Reino Unido, v. 118, n. 1, p. 27 – 31, 2012a.
- ALCARDE, A. R.; SOUZA, L. M.; BORTOLETTO, A. M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugarcane spirit. Part 2: Influence of type of pot still. **Journal of the Institute of Brewing**, Reino Unido, v. 118, n. 4, p. 352 – 355, 2012b.
- ALCARDE, A.R. Processamento da cana-de-açúcar. Brasília, EMBRAPA, 2012 c. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-cucar/arvore/COMTAG01_102_22122006154841.html> Acesso em 10 out. 2013.
- AMOORE, J. E.; VENSTROM, D. Sensory analysis of odor qualities in terms of the stereochemical theory. **Journal of Food Science**, EUA, v. 31, p. 118 – 128, 1966.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 61, p. 10835 – 10847, 2013.
- ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1074 – 1077, 2002.
- ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; CAPPELINI, L. T. D.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; BUCHVISER, S. F.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. 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.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; ZACARONI, L. M.; SANTIAGO, W. D.; DÓREA, H. S.; MACHADO, A. M. R. Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Querus SP*) e recipiente de vidro. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 874 – 878, 2011.
- AREIAS, F. M.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B.; FERRERES, F.; SEABRA, R. M. Phenolic fingerprint of peppermint leaves. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 73, p. 307 – 311, 2001.

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

AYLOTT, R. I.; COCHRANE, G. C.; LEONARD, M. J.; MACDONALD, L. S.; MACKENZIE, W. M.; MCNEISH, A. S.; WALKER, D. A. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part I: Post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, Reino Unido, v. 96, n. 4, p. 213 – 221, 1990.

BAFFA-JÚNIOR, J. C.; MENDONÇA, R. C. S.; PEREIRA, J. M. A. T. K.; PEREIRA, J. A. M.; SOARES, N. F. F. Ethyl-carbamate determination by gas chromatography–mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 129, n. 4, p. 1383 – 1387, 2011.

BAFFA-JÚNIOR, J. C.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. M. A. T. K.; MELO, N. R. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças comerciais da região da zona da matamineira – MG. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 371 – 373, 2007.

BAGDATLIOGLU, N.; NERGIZ, C.; ERGONUL, P. G. Heavy metals levels in leafy vegetables and some selected fruits. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, Alemanha, v. 5, p. 421 – 428, 2010.

BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; ANJOS, J. P. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de minas gerais: Zona da mata, sul de minas e vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 1009 – 1011, 2007.

BATTAGLIA, R.; CONACHER, B. S.; PAGE, B. D. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: A review. **Food Additives and Contaminants**, EUA, v. 7, n. 4, p. 477 – 496, 1990.

BEATTIE, J. K.; POLYBLANK, G. A. Copper-catalysed oxidation of cyanide by peroxide in alkaline aqueous solution. **Australian Journal of Chemistry**, Australia, v. 48, n. 4, p. 861 – 868, 1995.

BENN, S. Potent odorants in peppermint and cornmint oils characterized by GC-O and AEDA. **Perfumer & Flavorist**, EUA, n. 23, p. 5 – 16, 1998.

BETTIN, S. M.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 234 – 238, 2005.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588 – 594, 2009.

BLANK, I. Gas chromatography-olfactometry in food aroma analysis. In RAY M. (Ed.). **Techniques for analyzing food aroma**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1996. p. 293 – 329.

BLUMENTHAL, M. et al. The complete German commission E monographs therapeutic guide to herbal medicines. 1. ed. Austin: American Botanical Council, 1998.

BOELENS, M. H.; VAN GEMERT, L. J. Organoleptic properties of aliphatic aldehydes. **Perfumer & Flavorist**, Reino Unido, v. 12, n. 5, p. 31 – 43, 1987.

BRASIL. Governo do Estado de São Paulo. Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas. Disponível em: <http://www.sigam.ambiente.sp.gov.br/sigam2/Repositorio/24/Documentos/Lei%20Estadual_11241_2002.pdf> Acesso em: 12, out. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005a. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gec/Legislacao/mapa/IN13.pdf>> Acesso em: 14 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Notícia, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/07/venda-de-cachacpara-os-eua-cresce-12porcento-em-2012>> Acesso em: 12 dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução de diretoria colegiada - RDC nº. 274, de 22 de setembro de 2005b. Aprova o regulamento técnico para águas envasadas e gelo. Disponível em: <<http://iqalaboratorios.com.br/wp-content/uploads/2011/05/ANVISA-RDC-274-%C3%81gua-Mineral-F%C3%ADsico-Qu%C3%ADmica.pdf>> Acesso em: 17 dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007a. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Disponível em <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/resolu%C3%A7%C3%A3o-2_2007.pdf> Acesso em: 6 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº 20, de 22 de março de 2007b. Aprova o regulamento técnico sobre disposições para embalagens, utensílios, tampas e equipamentos metálicos em contato com os alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/edbef8804745959d9d90dd3fbc4c6735/RDC_20_2007.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 19 mar. 2013.

BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER JR, F. J.; KRAUSE K. H. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, Suíça, v. 142, p. w 13659, 2012.

BRUNO, S. N. F.; VAITSMAN, D. S.; KUNIGAMI, C. N. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugarcane spirits. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 104, n. 4, p. 1345 – 1352, 2007.

BURBOTT, A. J.; LOOMIS, W. D. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. **Plant Physiology**, EUA, v. 42, n. 1, p. 20 – 28, 1967.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 93, p. 223 – 226, 2005.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Optimisation of the benzo(a)pyrene determination procedure in cachaça. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 3, 502 – 508, 2009.

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

CASTRO-VÁZQUEZ, L., DÍAZ-MAROTO, M.C., & PÉREZ-COELLO, M.S. (2006). Volatile composition and contribution to the aroma of spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 54, n. 13, p. 4809 – 4813, 2006.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, EUA, v. 3, p. 351 – 368, 1992.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; CHONG, K. L.; TAN, J. B. L.; WONG, S. K. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**, EUA, v. 23, p. 185 – 189, 2010.

CHEN, M. Z.; TRINNAMAN, L.; BARDSLEY, K.; ST HILAIRE, C. J.; DA COSTA, N. C. Volatile compounds and sensory analysis of both harvests of double-cut Yakima peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Food Science**, EUA, v. 76, n. 7, p. 1032- 1038, 2011.

CHRISTOPH, N.; SCHMITT, A.; HILDENBRAND, K. Ethylcarbamate in obstbranntweinen (Teil 1). **Alkohol-Industrie**, Alemanha, v. 16, p. 369 – 373, 1987.

CLARK, R. J.; MENARY, R. C. Variations in composition of peppermint oil in relation to production areas. **Economic Botany**, EUA, v. 35, p. 59 – 69, 1981.

COOK, R.; MACCAIG, N.; MACMILLIAN, J. M. B.; LUMSDEN, W. B. Ethyl carbamate formation in grain-based spirits. Part III. The primary source. **Journal of the Institute of Brewing**, Reino Unido, v. 96, n. 4, p. 233 – 244, 1990.

COURT, W. A.; ROY, R. C.; POCS, R. Effects of harvest date on the yield and quality of the essential oil of peppermint. **Canadian Journal of Plant Science**, Canadá, 73, 815 – 824, 1993.

DAMBRAUSKIENE, E.; VISKELAS, P.; KARLELIENE, R. Productivity and biochemical composition of *Mentha piperita* L. of different origin. **Biologija**, Eslováquia, v. 54, n. 2, p. 105 – 107, 2008.

DAMS, I.; BIAŁOŃSKA, A.; CIUNIK, Z.; WAWRZEŃCZYK, C. Lactones 38: Synthesis and odoriferous properties of p-menthane lactones. **Flavour Fragrance Journal**, Reino Unido, v. 27, n. 3, p. 237 – 243, 2012.

DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; RIOS, M. D.; SASAKI, R. Determination of provitamin A of green leafy vegetables by high performance liquid chromatography and open column chromatography. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, Itália, n. 137, p. 290 – 294, 1998.

DMITRIKOV, V. P.; NABIVACH, V. M. Physico-chemical regularities of quinoline bases retention in gas chromatography. **Coke and Chemistry**, EUA, v. 8, p. 27 – 34, 1995.

DUBAND, F.; CARNAT, A. P.; CARNAT, A.; PETITJEAN-FREVTET, C.; CLAIR, C.; LAMAISON, J. L. Composition aromatique et polyphénoliques de l'infusé de Menthe, *Mentha x piperita* L. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, França, v. 50, n. 3, p. 146 – 155, 1992.

EFSA. European Food Safety Authority, 2002. Opinion of the scientific committee on food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf> Acesso em 17 fev. 2013.

EFSA. European Food Safety Authority, 2005. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/282.pdf>> Acesso em: 18 dez. 2012

EFSA. European Food Safety Authority, 2007. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/Contam_ej551_ethyl_carbamate_en_rev.1,3.pdf> Acesso em: 10 dez. 2012.

EFSA. European Food Safety Authority, 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/724.pdf>> Acesso em: 7 jan. 2013.

ENBERGER, R.; HOPP R., Synthesis and sensory characteristics on menthol enantiomers and their derivatives for the use of nature-identical peppermint oils. In. BERGER, R.G.; NITZ, S.; SCHRIER, P. **Topics in Flavor Research**. Alemanha: H. Eichorn, Marzling, p. 201 – 218, 1988.

EUROPA. European Commission (EC) nº 1881, 2006. Official Journal of the European Union. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>> Acesso em 12 dez. 2012.

EUROPA, European Commission (EU) nº 835, 2011. Official Journal of the European Union. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:EN:PDF>> Acesso em 20 jan. 2013.

FALCÓN, M. S. G.; GRANDE, B. C.; GÁNDARA, J. S. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 90, n. 4, p. 643 – 646, 2005.

FARAH-NAGATO, L. A.; NOVAES, F. V.; PENTEADO, M. V. C. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. **Boletim da sociedade brasileira de ciência e tecnologia de alimentos**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 40 – 47, 2003.

FARAH-NAGATO, L. A.; SILVA, O. A.; YONAMINE, M.; PENTEADO, M. V. C. Quantitation of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. **Alimentaria**, Hungria, v. 37, n. 311, p. 31 – 36, 2000.

FDA. Ethyl carbamate preventative action manual, 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodcontaminantsadulteration/chemicalcontaminants/ethylcarbamateurethane/ucm078546.htm>. Acesso em 13 out. 2013.

FECKA, I.; RAJ, D.; KRAUZE-BARANOWSKA, M. Quantitative determination of four water-soluble compounds in herbal drugs from Lamiaceae using different chromatographic techniques. **Chromatographia**, EUA, v. 66, p. 87 – 93, 2007.

FECKA, I.; TUREK, S. Determination of water soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 55, p. 10908 – 10917, 2007.

FOOTE, C. S.; WUESTHOFF, M. T.; BURSTAIN, I. G. Structure and stereochemistry of the ketoacids derived from menthofuran photoperoxide. **Tetrahedron**, Reino Unido, v. 23, p. 2601 – 2608, 1967.

FOOTE, C. S.; WUESTHOFF, M. T.; WEXLER, S.; BURSTAIN, I. G.; DENNY, R. Photosensitized oxygenation of alkyl-substituted furans. **Tetrahedron**, Reino Unido, v. 23, n. 6, p. 2583 – 2599, 1967.

FRÉROT, E.; BAGNOUD, A.; VUILLEUMIER, C. Menthofurolactone: a new p-menthane lactone in *Mentha piperita* L.: analysis, synthesis and olfactory properties. **Flavour Fragrance Journal**, Reino Unido, v. 17, p. 218 – 226, 2002.

GALINARO, C. A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in brazilian sugarcane spirits: Discrimination between cachaças produced from nonburned and burned sugarcane crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 55, n. 8, p. 3141 – 3147, 2007.

GALLAHER, R. N., GALLAHER, K.; MARSHALL, A. J. MARSHALL, A. C. Mineral analysis of ten types of commercially available tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, EUA, v. 19, p. S53 – S57, 2006.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1447 – 1451, 2009.

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.

GAO, B.; LU, Y.; QIN, F.; CHEN, P.; SHI, H.; CHARLES, D.; YU, L. Differentiating Organic from Conventional Peppermints Using Chromatographic and Flow Injection Mass Spectrometric (FIMS) Fingerprints. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 60, p. 11987 – 11994, 2012.

GAUDIN, J. M. Synthesis and organoleptic properties of p-menthane lactones. **Tetrahedron**, EUA, v. 56, p. 4769 – 4776, 2000.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant physiology**, EUA, v. 122, p. 205 – 213, 2000.

GHARIB, F. A. E-L.; SILVA, J. A. T. Composition, total phenolic content and antioxidant activity of the essential oil of four Lamiaceae herbs. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, EUA, v. 7, n. 1, p. 19 – 27, 2012.

GILBERT, S. G. A small dose of toxicology: The health effects of common chemicals. 2 ed. United States: Healthy World Press, 2012. Disponível em: <http://www.toxipedia.org/download/attachments/9175184/A+Small+Dose+of+Toxicology,+2nd+Edition.pdf>. Acesso em 10 jun. 2013.

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**, EUA, v. 19, p. 5319 – 5341, 2012.

GORJANOVIC, S.; KOMES, D.; PASTOR, F. T.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; PEZO, L.; HEČIMOVIĆ, I.; SUŽNJEVIĆ, D. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 60, p. 9573 – 9580, 2012.

GUEDON, D. J., PASQUIER, B. P. Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha piperita* clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 42, p. 679 – 684, 1994.

GUERAIN, J.; LEBLOND, N. Formation du carbamate d'éthyle et élimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits à noyaux. In CANTAGREL, R., *Ler Symposium Scientifique International de Cognac*. Paris: Lavosier-Tec & Doc, 1992. p. 330 – 338.

GÜNTERT, M. et al. Flavor chemistry of peppermint oil (*Mentha piperita* L.). In: TAKEOKA, G. R.; GÜNTERT, M.; ENGEL, K. H., *Aroma Active Compounds in Foods: chemistry and Sensory Properties*. Washington, DC: Ed. American Chemical Society, 2001. p. 119 – 137.

HADJMOHAMMADI, M.; KARIMIYAN, H.; SHARIFI, V. Hollow fibre-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of flavonoids in *Echinophora platyloba* DC. and *Mentha piperita*. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 141, p. 731 – 735, 2013.

HERBERT, P.; SANTOS, L.; BASTOS, M.; BARROS, P.; ALVES, A. New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. **Journal of Food Science**, EUA, v. 67, n. 5, p. 1616 – 1620, 2002.

INGLEDEW, W. M.; MAGNUS, C. A.; PATTERSON, J. R. Yeast foods and ethyl carbamate formation in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, EUA, v. 38, n. 4, p. 332 – 335, 1987.

IARC. International Agency for Research on Cancer, 2010a. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>.> Acesso em: 16 jan. 2013.

IARC. International Agency for Research on Cancer, 2010b. Alcohol consumption and ethyl carbamate. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/mono96.pdf>> Acesso em 18 jan. 2013.

KA, M. H.; CHOI, E. H.; CHUN, H. S.; LEE, K. G. Antioxidative activity of volatile extracts isolated from *Angelica tenuissimae* roots, peppermint leaves, pine needles, and sweet flag leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 53, p. 4124 – 4129, 2005.

KAPP, K.; HAKALA, A. E.; ANNE ORAV, A.; POHJALA, L.; VUORELA, P.; PÜSSA, T.; VUORELA, H.; RAAL, A. Commercial peppermint (*Mentha × piperita* L.) teas: antichlamydial effect and polyphenolic composition. **Food Research International**, Canadá, v. 53, n. 2, p. 758 – 766, 2013.

KARA, D. Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 114, p. 347 – 354, 2009.

KAWAKAMI, M.; GANGULY, S. N.; BANERJEE, J.; KOBAYASHI, A. Aroma composition of oolong tea and black tea by brewed extraction method and characterizing compound of darjeeling tea aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 43, p. 200 – 207, 1995.

KIZIL, S.; HAŞIMI, N.; TOLAN, V.; KILINÇ, E.; YÜKSEL, U. Mineral content, essential oil components and biological activity of two *Mentha* species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). **Turkish Journal of Field Crops**, Turquia, v. 15, p. 148 – 153, 2010.

KRZYŻANOWSKA, J.; JANDA, B.; PECIO, L.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; CZUBACKA, A.; PRZYBYS, M.; DOROSZEWSKA, T. Determination of polyphenols in *Mentha longifolia* and *M. piperita* field-grown and in vitro plant samples using UPLC-TQ-MS. **Journal of AOAC International**, EUA, v. 94, p. 43 – 50, 2011.

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

LACHENMEIER, D. W.; FRANK, W.; KUBALLA, T. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the routine analysis of ethyl carbamate in stone-fruit spirits. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, EUA, v. 19, n. 2, p. 108 – 112, 2005.

LACHENMEIER, D. W.; KUBALLA, T.; LIMA, M. C. P.; NÓBREGA, I. C. C.; KERR-CORRÊA, F.; KANTERES, F.; REHM, J. Ethyl carbamate analysis in german fruit spirits and brazilian sugarcane spirits (cachaça): Improved sample cleanup with automated parallel evaporation. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Alemanha**, v. 105, n. 8, p. 507 – 512, 2009.

LACHENMEIER, D. W.; LIMA, M. C. P.; NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; KERR-CORRÊA, F.; KANTERES, F., ET AL. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **BMC Cancer**, Reino Unido, v. 10, p. 266, 2010.

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**, EUA, v. 1108, n. 1, p. 116 – 120, 2006.

LACHENMEIER, D. W.; SCHEHL, B.; KUBALLA, T.; FRANK, W.; SENN, T. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stonefruit spirits. **Food Additives and Contaminants**, EUA, v. 22, n. 5, p. 397 – 405, 2005.

LACHENMEIER, D. W.; SCHOEBERL, K.; KANTERES, F.; KUBALLA, T.; SOHNIUS, E. M.; REHM, J. Is contaminated unrecorded alcohol a health problem in the European Union? A review of existing and methodological outline for future studies. **Addiction**, Reino Unido, v. 106, p. 20 – 30, 2011.

LANGE, B. M.; MAHMOUD, S. S.; WILDUNG, M. R.; TURNER, G. W.; DAVISA, E. M.; LANGE, I.; BAKER, R. C.; BOYDSTOND, R. A.; CROTEAU, R. B. Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v. 108, n. 41, p. 16944 – 16949, 2011.

LAU, B. P. Y.; WEBER, D.; PAGE, B. D. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, EUA, v. 402, p. 233 – 241, 1987.

LAWRENCE, B. M. *Mint: The genus Mentha*. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.

LEE, J. Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and Echinacea purpurea products. **Journal of Functional Foods**, EUA, v.2, p. 158 – 162, 2010.

LEFFINGWELL, J. C.; LEFFINGWELL, D. GRAS Flavor chemicals - Detection thresholds. **Perfumer & Flavorist**, EUA, v. 16, n. 1, p. 1 – 19, 1991.

LEFFINGWELL, J. C.; SHACKELFORD, R. E. Laevo-Menthol - Syntheses and organoleptic properties. **Cosmetics and Perfumery**, EUA, v. 89, n. 6, p. 69 – 89, 1974.

LIMA, U. A.; TEIXEIRA, C. G.; BERTOZZI, J. C.; SERAFIM, F. A. T.; ALCARDE, A. R. 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**, Reino Unido, v. 118, n. 3, p. 305 – 308, 2012.

LOFROTH, G.; GEJVALL, T. Diethyl pyrocarbonate: Formation of urethan in treated beverages. **Science**, EUA, v. 174, n. 4015, p. 1248 – 1250, 1971.

LORANTY, A.; REMBIAŁKOWSKA, E.; ROSA, E. A. S.; BENNETT, R. N. Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**, EUA, v. 23, p. 432 – 411, 2010.

LOZAK, A.; SOLTYK, K.; OSTAPCZUK, P.; FIJALEK, Z. Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. **Science of the Total Environment**, EUA, v. 289, p. 33 – 40, 2002.

LV, J.; HUANG, H.; YUA, L.; WHENT, M.; NIU, Y.; SHI, H.; WANG, T. T. Y.; LUTHRIA, D.; CHARLES, D.; YU, L. L. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 132, p. 1442 – 1450, 2012.

MACHADO, A. M. R.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; ANJOS, J. P.; ZACARONI, L. M.; DÓREA, H. S.; NELSON, D. L. Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 138, p. 1233 – 1238, 2013.

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

MAFFEI, M.; CANOVA, D.; BERTEA, C. M.; SCANNERINI, S. UV-A effects on photomorphogenesis and essential oil composition in *Mentha piperita*. **Journal of photochemistry and Photobiology, B: Biology**, Holanda, v. 5, p. 105 – 110, 1999.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v. 100, n. 24, p. 14481 – 14486, 2003.

MAZZOLI-ROCHA, F.; MAGALHÃES, B. C.; MALM, O.; SALDIVA, P. H. N.; ZIN, W. A.; FAFFE, D. S. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugarcane burning. **Environmental Research**, EUA, v. 108, n. 1, p. 35 – 41, 2008.

MCKAY, L. D.; BLUMBERG, B. J. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, EUA, v. 20, p. 619 – 633, 2006.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; PIETROLUONGO, M.; DE MARIA, C. A. B. Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton* species) honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 50, p. 7616 – 7621, 2002.

NÄF, R.; VELLUZ, A. Phenols and lactones in italo-mitcham peppermint oil *Mentha x piperita* L. **Flavour Fragrance Journal**, Reino Unido, v. 13, p. 203 – 208, 1998.

NETTO, C. C.; MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B. Volatile profile from caninha aged in oak (*Quercus* sp.) and balsam (*Myroxylon* sp.) barrels. **Food Science and Technology International**, EUA, v. 9, n. 5, p. 359 – 364, 2003.

NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; PAIVA, J. E.; LACHENMEIER, D. W. Ethyl carbamate in pot still cachaças (brazilian sugarcane spirits): Influence of distillation and storage conditions. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 117, n. 4, p. 693 – 697, 2009.

NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; PAIVA, J. E.; LACHENMEIER, D. W. Ethyl carbamate in cachaça (brazilian sugarcane spirit): Extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 127, n. 3, p. 1243 – 1247, 2011.

OH, J.; JO, H.; CHO, A. R.; KIM, S. J.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, Europa, v. 31, p. 403 – 409, 2013.

OHLOFF, G. Importance of minor components in flavors and fragrances. **Perfumer & Flavorist**, Reino Unido, v. 3, p. 11 – 22, 1978.

ONG, P. K. C.; ACREE, T. E. Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 47, p. 665 – 670, 1999.

ORAV, A.; KANN, J. Determination of peppermint and orange aroma compounds in food and beverages. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry**, Estónia, v. 50, p. 217 – 225, 2001.

OUGH, C. S.; CROWELL, E. A.; GUTLOVE, B. R. Carbamyl compound reactions with ethanol. **American Journal of Enology and Viticulture**, EUA, v. 39, n. 3, 239 – 242, 1988a.

OUGH, C. S.; CROWELL, E. A.; MOONEY, L. A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (*Chardonnay*) fermentation. Addition of amino acids, urea and ammonium: Effects of fortification of intracellular and extracellular precursors. **American Journal of Enology and Viticulture**, EUA, v. 39, n. 3, p. 243 – 249, 1988b.

OUGH, C. S.; TRIOLI, G. Urea removal from wine by an acid urease. **American Journal of Enology and Viticulture**, EUA, v. 39, n. 4, p. 303 – 307, 1988.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; NEVEU, V.; VOS, F.; SCALBERT, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. **European Journal of Clinical Nutrition**, Europa, v. 64, p. S112 – S120, 2010.

POLASTRO, L. R.; BOSO, L. M.; ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; LIMA-NETO, D. W. F.; FRANCO, D. W. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: Cachaça e tiquira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 78 – 81, 2001.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. (2013). Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. **Talanta**, EUA, v. 105, p. 292 – 305, 2013.

PYTLAKOWSKA, K.; KITA, A.; JANOSKA, P.; POLOWNIAK, M.; KOZIK, V. Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 135, p. 494 – 501, 2012.

QIAN, M. C.; WANG, Y. Seasonal variation of volatile composition and odor activity value of ‘Marion’ (*Rubus* spp. *hyb*) and ‘Thornless Evergreen’ (*R. laciniatus* L.) blackberries. **Journal of Food Science**, EUA, v. 70, n. 1, p. 13 – 20, 2005.

RIACHI, L.G.; ABI-ZAID I. E.; MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B. Volatile composition of peppermint (*Mentha piperita* L.) commercial teas through solid phase extraction. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Venezuela, v. 62, n. 4, p. 389 – 392, 2012.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic Compounds. **Trends in Plant Science**, EUA, v. 2, n. 4, p. 152 – 159, 1997.

RIFFKIN, H. L.; WILSON, R.; BRINGHURST, T. A. The possible involvement of Cu²⁺ peptide/protein complexes in the formation of ethyl carbamate. **Journal of the Institute of Brewing**, Reino Unido, v. 95, n. 2, p. 121 – 122, 1989.

ROHLOFF, J.; DRAGLAND, S.; MORDAL, R.; IVERSEN, T-H. Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield, and quality of peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 53, p. 4143 – 4148, 2005.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 69, p. 167 – 174, 2000.

SCHMIDT, E.; BAIL, S.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; ATANASOVA, T.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; JIROVETZ, L. Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of essential oil from *Mentha x piperita*. **Natural Product Communications**, EUA, v. 4, n. 8, p. 1107 – 1112, 2009.

SERRA, G. E.; PUPIN, A. M.; TOLEDO, M. C. F. Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 134 -137, 1995.

SHIGEMATSU, H.; SHIMODA, M.; OSAJIMA, Y. Comparison of the odor concentrates of black tea. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Japão, v. 41, n. 11, p. 768 – 777, 1994.

SHIMODA, M., SHIGEMATSU, H., SHIRATSUCHI, H., OSAJIMA, Y. Comparison of the odor concentrates by SDE and adsorptive column method from green tea infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 43, p. 1616 – 1620, 1995.

SONG, H.; CADWALLADER, K. R. Aroma components of American country ham. **Journal of Food Science**, EUA, v. 73, n. 1, p. 29 – 35, 2008.

STEVENS, D. F.; OUGH, C. S. Ethyl carbamate formation: Reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, EUA, v. 44, n. 3, p. 309 – 312, 1993.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; ZYRNICKI, W. Multi-element analysis, bioavailability and fractionation of herbal tea products. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 777 – 787, 2013.

TAKY, N.; IMAMURA, L.; TAKEBE, S.; KOBASHI, K. Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health**, Japão, v. 38, n. 6, p. 498 – 505, 1992.

TEGMO-LARSSON, I. M.; SPITTLER, T. D. Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. **Journal of Food Science**, EUA, v. 55, n. 4, p. 1166 – 1167, 1990.

TELCI, I.; KACAR, O.; BAYRAM, E.; ARABACI, O.; DEMIRTAS, I.; YILMAZ, G.; ÖZCAN, I.; SÖNMEZ, C.; GÖKSU, E. The effect of ecological conditions on yield and quality traits of selected peppermint (*Mentha piperita* L.) clones. **Industrial Crops and Products**, EUA, v. 34, n. 1, p. 1193 – 1197, 2011.

TFOUNI, S. A. V.; MACHADO, R. M. D.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 101, n. 1, p. 334 – 338, 2007.

TITATO, G. M.; LANÇAS, F. M. Comparison between different extraction (LLE and SPE) and determination (HPLC and capillary-LC) techniques in the analysis of selected PAHs in water samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, EUA, v. 28, n. 19, p. 3045 – 3056, 2005.

TOMI, F.; BRADESI, P. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats, 2010. Disponível em: <http://hal-univ-corse.archives-ouvertes.fr/docs/00/60/33/40/PDF/These_SUTOUR_Sylvain.pdf>. Acesso em: 10 out. 2013.

VERMA, R. S.; PANDEY, V.; PADALIA R. C.; SAIKIA, D.; KRISHNA, B. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Aqueous Distillate Volatiles of Indian Peppermint (*Mentha piperita*) and Spearmint (*Mentha spicata*). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Reino Unido, v. 17, n. 3, p. 258 – 267, 2011.

VOIRIN, B.; BRUN, N.; BAYET, C. Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. **Phytochemistry**, EUA, v. 29, n. 3, p. 749 – 755, 1990.

WANG, D.; FAN, G.; WANG, Y.; LIU, H.; WANG, B.; DONG, J.; ZHANG, P.; ZHANG, B.; KARAS, R. H.; GAO, X.; ZHU, Y. Vascular reactivity screen of Chinese medicine danhong injection identifies danshensu as a no-independent but PGI₂-mediated relaxation factor. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, EUA, v. 62, n. 5, p. 457 – 465, 2013.

WILSON III, C. W.; SHAW, P. E. Importance of thymol, methyl N-methylantranilate, and monoterpene hydrocarbons to the aroma and flavor of mandarin cold-pressed oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 29, p. 494 – 496, 1981.

WISE, S.; BONNETT, W. J.; GUENTHER, F. R.; MAY, W. E. A relationship between reversed-phase C₁₈ liquid chromatographic retention and the shape of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatographic Science**, EUA, v. 19, n. 9, p. 457 – 465, 1981.

WU, Y.; ZHU, B.; TU, C.; DUAN, C.; PAN, Q. Generation of volatile compounds in litchi wine during winemaking and short term bottle storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 59, p. 4923 – 4931, 2011.

YEUNG, J. H. K. New results on the pharmacology and clinical use of the tcm-drug *salvia miltiorrhiza*. **Evidence and Rational Based Research on Chinese Drugs**, China, DOI 10.1007/978-3-7091-0442-2-6, p. 237 – 282, 2013.

YILMAZ, E. The chemistry of fresh tomato flavor. **Turkish Journal of Agriculture & Forestry**, v. 25, p. 149 – 155, 2001.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J. P.; DUARTE, J. M. F. C.; NELSON, D. L. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 320 – 324, 2011.

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: Analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, EUA, v. 259, p. 325 – 350, 1991.

ZHELJAZKOV, V. D.; ASTATKIE, T. Distillation waste water can modify peppermint (*Mentha ×piperita* L.) oil composition. **Industrial Crops and Products**, EUA, v. 36, p. 420 – 426, 2012.

ZHELJAZKOV, V. D.; CANTRELL, C. L.; ASTATKIE, T.; EBELHAR, M. W. Peppermint productivity and oil composition as a function of nitrogen, growth stage, and harvest time. **Agronomy Journal**, EUA, v. 102, n. 1, p. 124 – 128, 2010.