

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

Daniel Ronaldo Chreem

**DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM CACHAÇAS
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro
2014

Daniel Ronaldo Chreem

DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM CACHAÇAS
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bastos De
Maria.

Co-orientador: Prof. Dr Ricardo Felipe Moreira
Alves

Rio de janeiro
2014

Daniel Ronaldo Chreem

**DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM CACHAÇAS
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de
Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, da
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Claudia Cardoso Netto
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Prof. Dra. Glorimar Rosa
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Chreem, Daniel.

Determinação de carbamato de etila em cachaças comercializadas no município do Rio de Janeiro

80 f; 30 cm

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

1. Carbamato de etila. 2. cachaça. 3. Rio de Janeiro 4. Carcinógenos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Olga e Ronaldo, os quais jamais mediram esforços e paciência para me incentivar a buscar com personalidade meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Baruch Hashem.

À minha família. Meus pais e meus irmãos, Ishac e Maurício. Nada me energiza e conforta mais do que tê-los ao meu lado e sentar a mesa de jantar, todos os dias para ouvi-los. Sempre estaremos juntos.

Meus avós, Samuel e Elizabeth, com ensinamentos constantes de que educação e respeito são as bases para a formação de uma pessoa melhor. Aos meus avós, Ishac e Sara, que lá de cima, sempre encontram alguma maneira de sinalizar o meu caminho. A todos meus Tios e Primos.

Ao meu orientador, prof. Carlos Alberto Bastos De Maria, por toda sua sabedoria e cumplicidade para elaboração deste trabalho. Um amigo pra vida toda.

À minha noiva, Ândria Santos, minha eterna Paqueta. Parceira de todas as horas para incentivo, ideias, conforto e perseverança. Uma verdadeira guerreira.

Aos queridos mestres que fizeram parte da minha vida acadêmica. Àqueles que me impulsionam para sempre fazer ciência. Em especial ao Professor Ricardo Felipe Alves Moreira (UNIRIO).

As minhas queridas amigas Renata, Marcela, Larissa Cohen e Juliana Leite. Que revigoram e estimulam apenas com suas presenças.

Aos meus amigos Bruno Salama, Yuri, Topo, Márcio e Bruno Paiva. Todos com uma maneira diferente de orientar, animar e equilibrar meus pensamentos na medida certa.

Aos meus também mentores nesta jornada Ariel Apelbaum e Rogério Lachtermacher. Com contribuição direta pela busca incessante na minha formação.

A toda Powerade Team. Aos amigos José Luiz, Thiago Rocha, Baiana e aos queridos atletas.

A minha estagiária Paula Bragança. Pela força, cérebro e braços emprestados sempre quando requisitada.

Aos colegas de mestrado, que batalharam comigo nesta jornada. Em especial a Liza Riacchi. Amiga, companheira de Laboratório e guia pela busca de erudição neste trabalho.

À UNIRIO pela iniciativa do programa de pós-graduação, agora mais uma possibilidade para aqueles que almejam a carreira acadêmica na área de Alimentos em Nutrição.

Ao Mike, meu gato alvinegro.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O carbamato de etila é um composto secundário com reconhecido potencial carcinogênico encontrado em bebidas alcoólicas destilado-fermentadas como as aguardentes de cana, dentre elas a cachaça, produto exclusivamente brasileiro. Valores acima de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de carbamato de etila recebem embargo do mercado internacional, inviabilizando sua exportação para países com demanda importante desses produtos. Além disso, com a iminente chegada de grandes eventos a cidade do Rio de Janeiro como a Copa do Mundo de 2014 e os Jogos Olímpicos em 2016, o monitoramento da qualidade de cachaças se faz necessário visando a saúde coletiva e a economia brasileira. Logo, o objetivo deste estudo consiste na determinação de carbamato de etila em cachaças e outras aguardentes de cana comercializadas no município carioca. Um total de 120 amostras de cachaças foram adquiridas nas 4 regiões da Cidade do Rio de Janeiro (Zona Norte, Zona Sul, Centro e Zona Oeste). No total, 47% das amostras exibiram teores de CE acima do preconizado pela legislação. Os valores médios encontrados na Zona Oeste foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que nas demais regiões. Nenhuma diferença estatística ($p < 0,05$) foi observada entre cachaças envelhecidas e não envelhecidas. As cachaças foram classificadas da seguinte forma: (A) muito alta concentração ($301-800 \text{ mg L}^{-1}$); (B) alta concentração ($151-300 \text{ mg L}^{-1}$); e (C) concentração padrão ($0-150 \text{ mg L}^{-1}$). A região da Zona Oeste apresentou 3% das amostras classificadas no grupo A. Por outro lado, a região Centro apresentou o maior percentual de cachaças no grupo A (27%). Todas as regiões demonstraram distribuição similar no grupo B. No grupo C, as amostras da Zona Oeste apresentaram maior percentual (67%) de amostras. Diferentemente, no Centro foi observada menor representatividade de amostras neste grupo (43%). Um pequeno número (4%) de amostras multidestilladas foram analisadas, exibindo baixíssimos teores de CE ($< 5 \text{ mg L}^{-1}$). Concluindo, os consumidores de cachaça da cidade do Rio de Janeiro continuam bastante expostos à contaminação de CE.

Palavras-chaves: carcinógeno, carbamato de etila, cachaça, Rio de Janeiro.

ABSTRACT

The city of Rio de Janeiro has six millions of habitants and thus is an important consumer market. Additionally, this metropolis will be one of the 12 host cities for the 2014 FIFA World Cup Brazil and will host the 2016 Games of the XXXI Olympiad. These competitions are expected to attract hundreds of thousands of people among participants, visitors and tourists. The monitoring of EC in cachaça will help decision-makers make better decisions toward decreasing the level of contamination in order to protect public health. The aim of this study was to determine the content of EC in cachaças sold in the top five supermarket chains located in the city of Rio de Janeiro. A total of 120 cachaças from of 29 different brands were acquired at the 4 different regions from the Rio de Janeiro city (north, south, west and downtown). In total, 47 % of samples exhibited EC contents above 150 mg l⁻¹. The mean value found in the west region was significantly ($p < 0.05$) lower than those from other three regions. No statistically significant ($p < 0.05$) difference was found between aged and non aged samples. Cachaças were classified, as follows: (A) very high concentration (301-800 mg L⁻¹); (B) high concentration (151-300 mg L⁻¹); standardized concentration (0-150 mg L⁻¹) (C). The west region presented 3 % of samples classified in the concentration limit (A). Downtown region on the other hand presented the greatest percentage (27 %). All regions showed distribution percentage similar (ca 30 %) in the limit (B). In the limit (C), west region showed the highest percentage (67 %) of samples. Conversely, downtown region presented the lowest representativeness (43 %). A small number (4 %) of commercial multi-distilled cachaça has been analyzed exhibiting very low levels of EC (<5 µg L⁻¹). In conclusion, cachaça consumers from Rio de Janeiro city continue very exposed to the EC contamination.

Keywords: carcinogen, ethyl carbamate, cachaça, Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Série histórica de produção dos principais países produtores de cana-de-açúcar, em milhões de toneladas.	18
Figura 2.	Fluxograma geral do processo de produção de aguardentes.	20
Figura 3.	Síntese da via de fermentação alcoólica.	22
Figura 4.	Alambique simples fabricado em cobre	29
Figura 5.	Esquema simplificado de uma coluna de destilação de aguardentes de cana.	30
Figura 6.	Ciclo da uréia, com formação de uréia a partir de arginina.	45

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Processo de fermentação alcoólica a partir da metabolização da glicose à etanol e gás carbônico.	22
Esquema 2.	Metabolismo de Carbamato de Etila em camundongos	39
Esquema 3.	Formação de CE à partir da uréia.	44
Esquema 4.	Reação do ácido isociânico com o etanol, formando CE.	44
Esquema 5.	Formação de CE à partir de ácido carbâmico.	47
Esquema 6.	Formação de CE à partir da complexação de íons cianeto e cobre.	48
Esquema 7.	Formação de EC à partir da oxidação de compostos insaturados.	50
Esquema 8.	Oxidação de HCN. Reação de HOCN com etanol e formação de CE.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Limites máximos permitidos pelo MAPA dos compostos e contaminantes de aguardentes de cana e cachaça.	17
Tabela 2.	Principais variáveis no processo de destilação que podem influenciar na qualidade da aguardente produzida.	26
Tabela 3.	Resumo da excreção de 24 horas de carbamato de etila marcado após administração de doses de 10 e 100 mg/Kg.	40
Tabela 4.	Valores das constantes de velocidades obtidas pelo gráfico de $\ln ([\text{OCN-}]_{\infty} - [\text{OCN-}]_t)$ versus tempo em diferentes concentrações de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.	47
Tabela 5.	Concentração de CE (μgL^{-1}) em cachaça após 90 dias de estocagem em função da graduação alcoólica, com diferentes materiais de coloração.	49
Tabela 6.	Concentração de CE (μgL^{-1}) em cachaça após 90 dias de estocagem em função do teor de cobre (mgL^{-1}), com diferentes materiais de coloração.	49
Tabela 7a.	Valores de média e desvio padrão (DP) das cachaças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro (Centro e Zona Norte).	58
Tabela 7b.	Valores de média e desvio padrão (DP) das cachaças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro (Zona Sul e Zona Oeste).	59
Tabela 7c.	Valores de média e desvio padrão (DP) das cachaças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro.	60
Tabela 8.	Classificação das amostras de acordo com a concentração de CE.	61
Tabela 9.	Número e percentual das amostras de acordo com as marcas por região analisada.	62

LISTA DE SIGLAS

IBRAC	Instituto Brasileiro da cachaça
D.P.	Desvio padrão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia gasosa
DIC	Detector por ionização em chama
ND	Não detectado
SPME	<i>Solid phase microextraction</i>
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
ANOVA	Análise de variância
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
AA	Álcool anidro
MC	Massa Corporal
HCN	Cianeto de hidrogênio
HNCO	Ácido isociânico
HOCN	Ácido ciânico
NH ₃	Amônia
CO ₂	Gás carbônico
TTB	<i>Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
US EPA	<i>United States Environmental Agency Protection</i>
NTP	<i>National Toxicology Program.</i>
SCOEL	<i>Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits.</i>
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AGUARDENTES DE CANA	18
2.1.1. Fermentação	21
2.1.2. Produção de Compostos Secundários	23
2.1.3 Destilação	24
2.1.3.1 Destilação em Alambique	27
2.1.3.2 Destilação em Coluna	30
2.1.3.3 Bidestilação	31
2.1.4 Envelhecimento	34
2.2 CARBAMATO DE ETILA COMO CONTAMINANTE EM CACHAÇAS	37
2.2.1 Metabolismo de CE	37
2.2.2 Potencial carcinogênico do CE	41
2.2.3 Processo de formação de Carbamato de Etila em Aguardentes.....	43
2.2.4 Determinação de Carbamato de Etila em Aguardentes e outras bebidas destiladas	52
3 JUSTIFICATIVA	54
4 OBJETIVOS	55
4.1. OBJETIVO GERAL.....	55
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
5 MATERIAIS E MÉTODOS	56
5.1. LEVANTAMENTO DA QUALIDADE DE AGUARDENTES	56
5.2. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	56
5.3. CG/EM.....	56
5.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	57
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

As aguardentes de cana são bebidas alcoólicas produzidas a partir de processo de destilação simples ou do mosto fermentado da cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, apresentando teor alcoólico entre 38 e 54 % v/v em temperatura de 20 °C, podendo ser adicionada de açúcares em até 6 L⁻¹, expressos em sacarose. A cachaça, por definição, é uma aguardente de cana, porém esta bebida se caracteriza notavelmente por ser um produto de patente brasileira, além de apresentar teor alcoólico específico de 38 a 48 % v/v a 20° C (BRASIL, 2005).

Dados históricos sobre a cachaça sugerem que os primeiros engenhos de açúcar surgiram no início do século XVI no Brasil, principalmente no litoral pernambucano, baiano e paulista. Antes tida como uma bebida de consumo de escravos e índios, a cachaça tomou o gosto popular por ser uma iguaria abundante e de baixo custo. Mesmo com sua proibição, em meados de 1649, a cachaça continuou sendo bastante procurada para consumo forçando sua liberação, contudo, acompanhada de taxações, que contribuía diretamente para desenvolvimento de Lisboa àquela época. Em 1819, a cachaça já era tida como a aguardente do Brasil. Ainda que no início da década de 90 tivesse ocorrido a marginalização do produto com associação a um destilado bruto e de baixa qualidade, houve uma renovação do conceito relacionado a cachaça e sua representatividade comercial e cultural no país (IBRAC, 2013; QNESC, 2003).

O reconhecimento internacional da cachaça como produto exclusivo e genuinamente brasileiro ocorreu em maio de 2013 através de registro realizado no *Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau* (TTB), órgão do governo dos Estados Unidos com especialização no comércio de álcool e tabaco. A atribuição da cachaça pelo governo norte-americano aos brasileiros resultou no acordo de reconhecimento de *bourbon whisky* e *tennesse whisky* como bebidas exclusivas dos Estados Unidos (BRASIL, 2013). Além disso, recentemente a cachaça se tornou Patrimônio Histórico Cultural do Estado do Rio de Janeiro segundo projeto de lei nº 417/2011 aprovado em 2012, reforçando ainda mais identificação desta bebida como produto característico nacional (BRASIL, 2012a).

Neste contexto, a Associação Brasileira de Bebidas divulgou que a produção de aguardentes no Brasil ultrapassa a marca de 1,5 bilhão de litros por ano, sendo a terceira bebida destilada mais consumida mundialmente (ABRABE, 2011). Se somados os anos de 2003 e 2004, 17 milhões de litros de aguardentes de cana foram exportados, com receita de cerca de US\$ 20 milhões. O Brasil exporta estes produtos para cerca de 45 países, porém as vendas não chegam a atingir 1 % da produção nacional, que varia em torno de 1,3 bilhão a 2 bilhões de

litros. Mesmo com números imponentes, o país exporta pouco e de forma equivocada, pois se estima que um terço do produto é vendido a granel, o que torna difícil o controle da origem e a agregação de valor de mercado (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2007). Quase R\$ 16 milhões de reais foram obtidos através da venda de aguardentes em 2010 para os principais países exportadores, como Alemanha (17 %), Estados Unidos (11 %), Portugal (9 %), França (9 %), Paraguai (8 %), Bolívia (7 %), Espanha (6 %), Itália (4 %), Holanda (3%) e Argentina (2 %) (IBRAC, 2011; ALICEWEB, 2013).

De acordo com as diferentes etapas no processo produtivo das aguardentes de cana, alguns contaminantes químicos orgânicos e inorgânicos indesejados podem ser formados na fermentação e/ou destilação da matéria-prima. Os efeitos deletérios destes compostos estão relacionados a alterações no *flavor* e a síntese de substâncias químicas com potencial carcinogênico, como o Carbamato de Etila (CE) (CARUSO; FARAH-NAGATO; ALABURDA, 2010). O CE pode ser formado em vários alimentos e bebidas que passam processos de fermentação, porém com valores extremamente inferiores aos encontrados em bebidas alcoólicas (BOSCOLO, 2001). No Brasil, a Instrução Normativa nº 13 de junho de 2005 preconiza quantidade de CE inferior a $150 \mu\text{g L}^{-1}$ em cachaças (BRASIL, 2005). Esta determinação estabelecia o limite de adequação dos valores de CE até junho de 2010, mas este prazo foi prorrogado até 30 de junho de 2012 (BRASIL, 2010). O controle sistemático sobre contaminantes como acroleína, álcool sec-butílico, álcool n-butílico, metanol, chumbo, arsênio, cobre e CE é obrigatório. A Tabela 1 ilustra os valores máximos permitidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) destes compostos e contaminantes presentes em aguardentes de cana.

Tabela 1 - Limites máximos permitidos pelo MAPA dos compostos e contaminantes de aguardentes de cana e cachaça.

Composto	Limite máximo
Grau alcoólico real (% v/v)	38,0-54,0
Acidez volátil (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	150,0
Ésteres em acetato de etila (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	200,0
Aldeídos em aldeído acético (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	30,0
Furfural e hidroximetilfurfural (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	5,0
Soma dos alcoóis superiores: isoamílico, isobutílico e 1-propanol (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	360,0
Coef. de congêneres (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	200,0-650,0
Cobre (mg L ⁻¹)	5,0
Álcool metílico (metanol) (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	25,0
Carbamato de etila (µg L ⁻¹)	150,0
Álcool sec-butílico (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	10,0
Álcool n-butílico (mg 100 ml ⁻¹ de AA)	3,0

AA = álcool anidro

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2005.

Sendo um carcinógeno com atividade em diversos tecidos de animais, o CE é reconhecido como componente com potencial genotóxico e carcinogênico em humanos, que pode atuar de forma isolada ou sinergicamente com o acetaldeído para formação de neoplasias (LACHENMEIER et al., 2010; IARC, grupo 2^a). Sua síntese pode ocorrer através da reação do etanol com compostos nitrogenados, como cianetos, uréia e grupos carbamil (CARUSO; FARAHA-NAGATO; ALABURDA, 2010). Dessa forma, é de fundamental importância monitorar a concentração de CE em bebidas fermento-destiladas, incluindo a cachaça.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AGUARDENTES DE CANA

No Brasil a produção de cana-de-açúcar passou por um aumento de aproximadamente 50% desde o início da década de 90, consolidando ainda mais a liderança mundial, com distribuição de produtividade média passando de 44 para 67 toneladas de cana por hectare. A Figura 1 apresenta a liderança mundial do Brasil, com relação a produção de cana-de-açúcar em toneladas (BRASIL, 2012b).

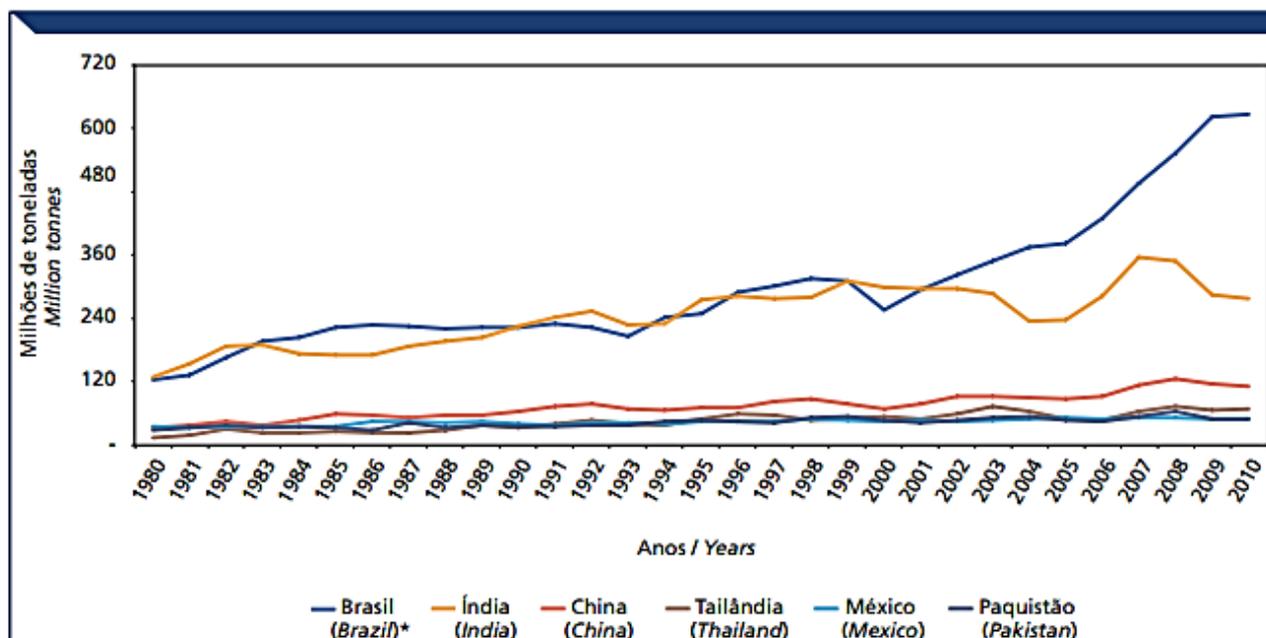


Figura1 – Série histórica de produção dos principais países produtores de cana-de-açúcar, em milhões de toneladas.

Fonte: BRASIL, 2012b.

Em São Paulo, maior produtor de cana do país, esta produtividade média é ainda maior com 78 toneladas de cana por hectare e com identificação de pólos de produção com mais de 90 toneladas de cana por hectare (MAPA, 2009; NIPPO-BRASIL, 2011). A cada tonelada de cana-de-açúcar é possível produzir-se em torno de 56 quilos de açúcar, 17 litros de álcool anidro e 49 litros de álcool ou 120 litros de aguardente. O processo de esmagamento da cana fornece em torno de 70 % de suco doce potável que pode ser na forma de garapa ou do próprio caldo de cana (BRASIL, 2009).

Com relação à produção de aguardentes de cana, no território nacional, o estado de São Paulo detém 45% da produção; esta hegemonia é seguida por Pernambuco (12%), Ceará (11%),

Rio de Janeiro (8%), Minas Gerais (8%), Goiás (8%), Paraná (4%), Bahia (2%) e Paraíba (2%) (LÓPEZ, 2005; EMBRAPA, 2011). A produção de aguardentes de cana é dividida nas seguintes etapas: colheita da cana, obtenção e preparo do mosto, fermentação e destilação do vinho e, em alguns casos, envelhecimento. O fluxograma geral do processo de produção é apresentado na Figura 2 (ESPINOZA, 2009).

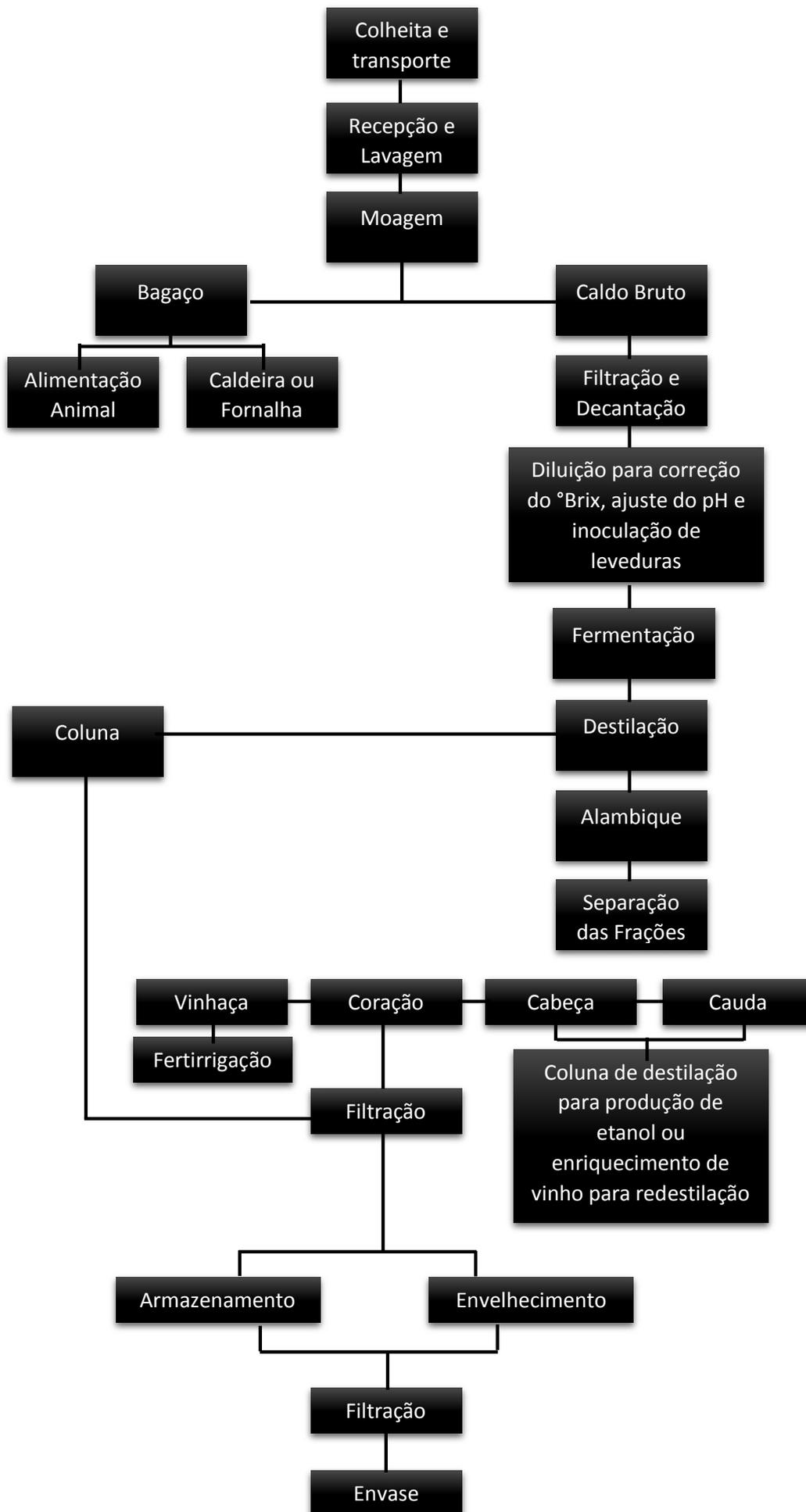


Figura 2- Fluxograma geral do processo de produção de aguardentes.

Fonte: Adaptado de Espinoza, 2009.

2.1.1. Fermentação

No processo de produção de aguardentes, o caldo preparado nas condições ideais para fermentação é conhecido como mosto. Entretanto, até este ponto são necessários procedimentos que envolvem a diluição do caldo de cana para o ajuste do grau °Brix, correção do pH para 4,5 (facultativo), adição de nutrientes para leveduras (facultativo), e em determinados casos aplicação de medidas microbiológicas como antissépticos (AQUINO, 2009).

O mosto produzido é encaminhado para processo de fermentação alcoólica, uma das principais etapas do processo de produção de aguardentes. A fermentação pode ocorrer em dornas abertas ou fechadas. Na indústria nacional existe uma predominância para dornas abertas por serem de custo menor, de fácil sanitização e por permitirem um controle visual maior da fermentação, porém existem aspectos deletérios como o favorecimento a contaminações e perdas de álcool por arraste (NOGUEIRA; FILHO, 2005; VOLPE, 2013).

Existem, em suma, dois tipos de processos de fermentação alcoólica utilizados pelas indústrias de aguardentes: descontínuo (cortes, *Melle-Boinot* e *Melle-Boinot-Almeida*) e semicontínuo (decantação). Todavia, de maneira geral leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes tipos de cepas são capazes de coexistir em diferentes áreas, mesmo as mais remotas, e metabolizar a glicose, obtida através da atividade catalítica da invertase sobre a sacarose presente na cana. As leveduras descarboxilam o ácido pirúvico a CO₂ e acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase. Sequencialmente, ocorre reação de redução do acetaldeído à etanol catalisada pela álcool-desidrogenase. Enquanto o NADH é oxidado a NAD⁺ formando principalmente etanol e gás carbônico, como pode ser visto no Esquema 1 e na Figura 3 (PULZATTO, 2000; BRUNO, 2006, BRUNO; VAITSMAN; KINIGAMI, 2007; RECHE; FRANCO, 2009; NOGUEIRA, 2013; MENDES et al., 2013; BADOTTI et al., 2013).



Esquema 1: Processo de fermentação alcoólica a partir da metabolização da glicose à etanol e gás carbônico.

Fonte: Adaptado de Aquino, 2009.

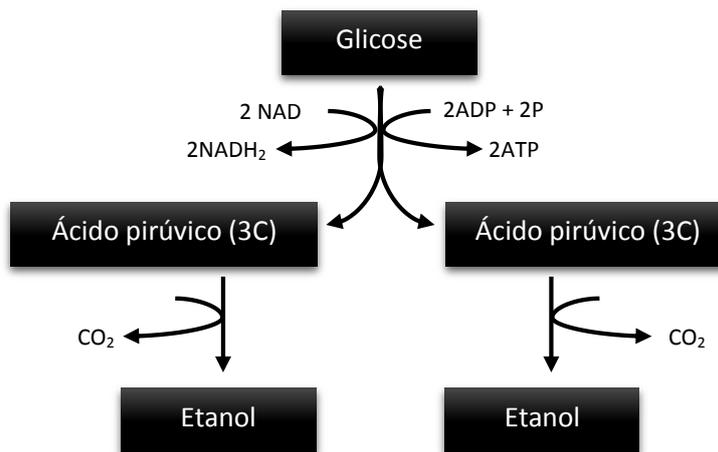


Figura 3: Síntese da via de fermentação alcoólica.

Fonte: Adaptado de Nogueira, 2013.

As leveduras além de liberar etanol em maior quantidade (SILVA et al., 2009; DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2012) também convertem parte dos açúcares do mosto em compostos secundários, que são responsáveis pelas características sensoriais da bebida. Dentre estes é possível identificar mais de 200 analitos distribuídos em: ácidos orgânicos, alcoóis superiores, aldeídos, ésteres, entre outros (JANZATTI, 2004; DUARTE et al., 2011). A fermentação alcoólica deve ser conduzida em condições adequadas de concentração de açúcares e temperatura aproximada de 26°C a 32°C. Além disso, deve se controlar o pH bem como a higiene do processo, circunstâncias essenciais para garantir os melhores rendimentos fermentativos e evitar proliferação bacteriana, com formação de ácidos butírico e acético e dextranas (AQUINO; FRANCO, 2008; AQUINO; FRANCO, 2009; GALINARO, 2011). Observa-se a finalização do processo de fermentação quando a glicose, substrato das leveduras, apresenta esgotamento identificado através de análise do °Brix do vinho, denominação do fermentado alcoólico do mosto. Nesta situação, a superfície do mosto não apresenta espuma pela diminuição do desprendimento de CO₂, além de redução da temperatura e aumento de acidez (VENTURINO FILHO, 2010).

2.1.2. Produção de Compostos Secundários

Durante o processo de fermentação, vários compostos secundários podem ser formados, entre esses, especialmente os ésteres e aldeídos, são os responsáveis pelo aroma e sabor dos destilados em geral, porém, quando se encontram acima dos limites estabelecidos pelo MAPA são considerados nocivos à saúde humana. As quantidades verificadas desses compostos variam muito entre aguardentes, ressaltando a necessidade do produtor de estar sempre atento ao processo de fabricação da bebida, por meio da realização periódica de análises físico-químicas, principalmente no início da safra de cana e do processo de destilação. Os compostos secundários totais, excluindo-se o etanol em aguardentes, devem apresentar quantidades totais dentro dos limites apresentados na Tabela 1 (PEREIRA et al., 2003; MIRANDA et al., 2007; MORETTI, 2011).

Os álcoois com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo fermentativo são conhecidos como óleo fusel ou óleo de cana. A origem destes é proveniente, em grande parte, de reações de degradação de aminoácidos que ocorrem durante o processo de fermentação. Aplicando-se esse tipo de reação a certos aminoácidos, pode-se explicar a formação dos principais álcoois superiores, como o álcool d-amílico a partir da d-leucina, o álcool isoamílico a partir da l-leucina e o álcool isobutílico a partir da valina, os quais

apresentam odores característicos, frequentemente, encontrados em bebidas (PEREIRA et al., 2003; YOKOYA, 1995).

O acetaldeído, principal aldeído presente na aguardente de cana, é resultado da ação de leveduras durante as etapas preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer nas fases finais, desde que o mosto sofra aeração. Os demais aldeídos são obtidos, provavelmente, a partir da oxidação de álcoois superiores provenientes da degradação de aminoácidos gerados pela hidrólise de proteínas. O furfural, um aldeído de presença rara em algumas cachaças, é resultante da decomposição química de carboidratos. É formado, principalmente, pela pirogenação da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. Nas cachaças envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros (hemiceluloses). Esse composto pode estar presente no caldo de cana, quando a colheita da cana-de-açúcar for precedida da queima do palhiço (PEREIRA et al., 2003; YOKOYA, 1995).

O éster de maior destaque encontrado em aguardentes é o acetato de etila, que é obtido pela reação de pequena quantidade de etanol com ácido acético, provenientes do processo de fermentação (PIGOTT; SHARP; DUCAN, 1989). Esse éster é responsável, quando presente em pequenas quantidades, pela incorporação de um aroma agradável de frutas na cachaça. Por outro lado, em grandes quantidades, confere à cachaça um sabor enjoativo e indesejado (PEREIRA et al., 2003). Mesmo na ausência de oxigênio, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de produzir pequenas quantidades de ácido acético. Quantidades elevadas desse ácido carboxílico são, frequentemente, associadas a práticas de estocagem da cana e contaminação do mosto com bactérias acéticas, decorrente de um tempo excessivo de descanso entre o processo de fermentação e a destilação (FARIA, 1989; PEREIRA et al., 2003).

2.1.3 Destilação

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

alambique (cobre, aço inox ou misto) de forma descontínua ou em colunas de aço inox ou com aço inox e partes de cobre (alto ou baixo grau) de forma contínua (GALINARO, 2011).

Em média é possível produzir um destilado de aguardente de cana (38% a 54 % v/v) a partir de um vinho com 7% a 8 % (v/v). Isto ocorre devido ao aquecimento do vinho nos destiladores, formando vapores ricos em etanol e compostos secundários, com posterior condensação por resfriamento retornando a fase líquida do combinado mais concentrado. Este produto manufaturado compreende a aguardente de cana, ou seja, uma bebida com abundância de compostos voláteis. Enquanto a parte quantitativa em água e em substâncias fixas do vinho é conhecida como vinhaça, vinhoto, restilo ou garapão, que permanece na panela do alambique (SORATTO; VARVAKISII; HORII, 2007; BRUNO, 2012). O processo de destilação além de concentrar os constituintes voláteis da fermentação do mosto, também é capaz de formar novos compostos principalmente por desidratação, esterificação e acetilação. Os congêneres derivados da reação de *Maillard*, tais como alguns heterocíclicos: pirazinas, e compostos furânicos produzidos da degradação de açúcares residuais, estão também relacionados com aromas, como o cacau e caramelo, respectivamente. Os teores de tais substâncias são muito mais elevados em aguardentes de alambiques que são expostos ao calor intenso por períodos mais prolongados (LÉAUTÉ, 1990; CANUTO, 2013).

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

Tabela 2 – Principais variáveis no processo de destilação que podem influenciar na qualidade da aguardente produzida.

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

Fonte: Adaptado de Aquino, 2009.

O material de revestimento dos aparelhos utilizados na destilação de vinhos de cana é constituído muitas vezes de cobre, um metal bom condutor de calor, maleável, com boa resistência ao desgaste físico e que pode apresentar influência determinante nas características sensoriais da bebida. Porém, as reações entre os congêneres e as superfícies de cobre do destilador são especialmente de maior relevância do ponto de vista da formação do produto final, em virtude da possibilidade da remoção ou modificação de muitos congêneres desagradáveis presentes, pois se acredita que o metal atue como catalisador de reações de oxirredução, nas quais compostos sulfurados voláteis transformam-se em compostos insolúveis, enquanto a superfície metálica da chapa, exposta aos vapores do destilado catalisa a esterificação dos ácidos orgânicos pelo álcool, bem como promove a redução e a consequente remoção de compostos sulfurados como o sulfeto de dimetila (FARIA et al., 2003).

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

2.1.3.1 Destilação em Alambique

No aquecimento do fermentado em alambiques, é possível separar o destilado em duas frações: flegma e vinhoto. Na fração flegma existe uma divisão durante o processo de destilação do seu conteúdo hidroalcoólico em três subfrações sequenciais: cabeça (78% v/v), coração (57% v/v) e cauda (27% v/v). Do ponto de vista comercial, a fração coração é a de maior (ou único) interesse mercadológico por apresentar menor quantidade de compostos indesejáveis bem como aspecto mais límpido e incolor (BIZELLI; RIBEIRO; NOVAES, 2000; SOUZA, 2009). A determinação do melhor ponto de corte entre as três frações de destilado, é realizada através do acerto do perfil qualitativo e quantitativo dos alcoóis, ésteres, ácidos graxos e aldeídos, com especial atenção para o conteúdo de CE, metanol, acroleína, 1-e 2-butanol compostos considerados como contaminantes orgânicos e alguns sendo responsáveis por geração de *off-flavor* na bebida (BIZELLI; RIBEIRO; NOVAES, 2000). Os analitos mais voláteis e com menor ponto de ebulição ao álcool etílico podem ser recolhidos na primeira fração do destilado (cabeça) enquanto os menos voláteis e com ponto de ebulição superior ao álcool etílico são coletados na fração final (cauda). As porções medianas voláteis compõem a fração coração. Adicionalmente, o comportamento de compostos secundários é dependente de suas propriedades termodinâmicas, podendo ser distribuídos em categorias de compostos mais

voláteis que o álcool (representados por ésteres e muitos aldeídos), compostos menos voláteis que o álcool (compostos fenólicos e ácidos orgânicos) e compostos que são mais voláteis que o álcool nas soluções alcoólicas de baixa concentração e menos voláteis que o álcool nas soluções alcoólicas mais concentradas (YOKOKA, 1995; BIZELLI; RIBEIRO; NOVAES, 2000). Porém, esta metodologia de corte em processo artesanal de produção de aguardentes pode ser perigosa já que ainda é realizada de forma totalmente empírica, baseada na experiência do mestre alambiqueiro, e sobre as concentrações de alcoóis, avaliada por medidas de densidade (SILVA; MACEDO; MALCATA, 2000; CANUTO, 2013).

A vinhaça obtida apresenta conteúdo muito pobre em teor alcóolico e riqueza em água, podendo ser reutilizada como repositores de minerais e água na lavoura (NOGUEIRA; FILHO, 2005; RECHE; FRANCO, 2009). Porém, o uso (ou descarte) indiscriminado e inadequado de vinhaça em solos e água pode apresentar problemas ambientais relacionados a esta prática. Algumas alternativas vêm sendo propostas para reciclagem da vinhaça como, por exemplo, fertirrigação e produção energética, (CHIRSTOFOLETTI et al., 2013). A Figura 4 apresenta em síntese a anatomia de um alambique para destilação de vinhos de cana.

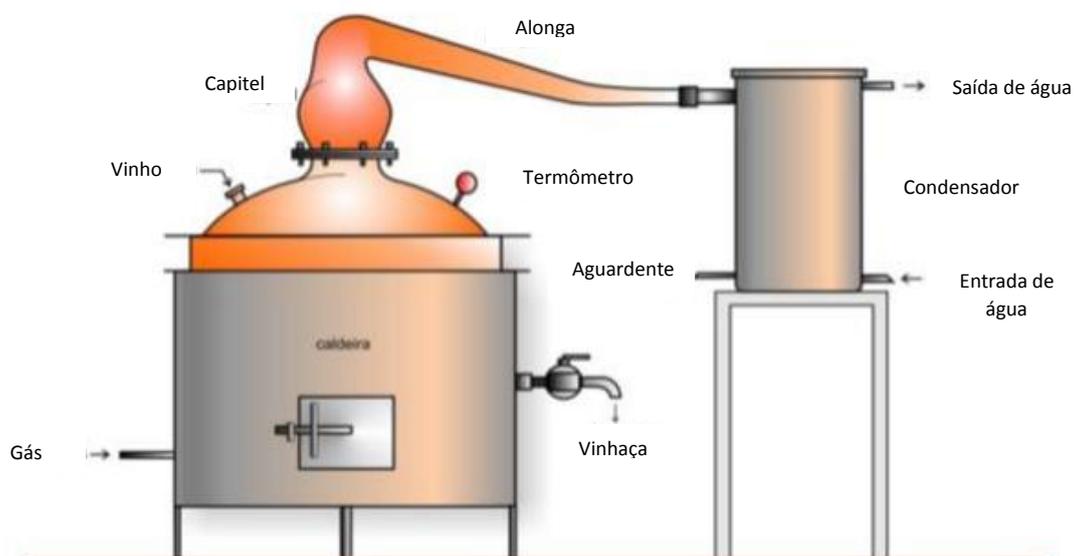


Figura 4 - Alambique simples fabricado em cobre.

Fonte: Adaptado de Souza, 2009.

Devido a facilidade de produção e manipulação, a aplicação de destilação de aguardentes em alambiques revestidas de cobre é a metodologia preferencial para pequenos produtores. Mesmo com a possibilidade de contaminação da bebida pelo cobre do alambique, sua utilização ainda é bem vista em detrimento ao papel de catalisador durante o processo de destilação realizado por este metal (FARIA, 1982). Ainda sobre as vantagens de alambiques de cobre, a ausência deste metal no destilador pode produzir um defeito sensorial com aroma sulfurado no produto final, que também é possível de ser observado em colunas de destilação (FARIA, 1982; ROTA, 2008; ROTA; FARIA, 2009). Entretanto, a legislação brasileira proíbe o uso de cobre em equipamentos destinados a produção de alimentos (BRASIL, 2007; RIACCHI et al., 2013).

A comparação das análises da composição química das frações de destilados em alambiques com destilados em colunas de aço inox oriundos do mesmo vinho de cana, usando-se tratamento quimiométrico dos resultados analíticos para trinta e nove compostos orgânicos, confirmou que as frações oriunda da destilação descontínua, cabeça, coração e cauda, são quimicamente distintas entre si e também do correspondente destilado do mesmo vinho obtido da coluna de aço inox (destilação contínua). A análise de componentes principais de 39 compostos orgânicos, dentre eles contaminantes como o carbamato de etila, demonstrou discriminação dos quatro destilados (três da destilação descontínua e um da destilação contínua), com variação total de 71,2% (SERAFIM et al., 2012).

2.1.3.2 Destilação em Coluna

No caso da destilação em coluna de aço, não há estratificação do destilado em frações, devido ao sistema ser contínuo, ou seja, a alimentação da coluna com vinho e a saída do destilado acontecerem simultaneamente e durante todo o processo. Outro fator importante na destilação em coluna é a quantidade de pratos teóricos que esta possui. Um alambique simples possui apenas um prato, enquanto que em colunas de baixo grau, utilizadas na produção de aguardente, o número varia de 15 a 20 pratos (RECHE; FRANCO, 2009).

A Figura 5 esquematiza uma coluna de destilação empregada em processos industriais de produção de aguardentes de cana. A coluna de destilação é constituída por um cilindro de aço inox, com variações de diâmetro e altura em função da sua produtividade horária, provida internamente com bandejas que contém chaminés, calotas e sifões. O vinho é introduzido continuamente na parte superior da coluna, de onde vai descendo de bandeja em bandeja e, simultaneamente, a vaporização do álcool e dos demais compostos voláteis ocorre em virtude

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

2.1.3.3 Bidestilação

A prática de bidestilação foi proposta inicialmente para produção de outras bebidas destiladas, como o uísque, o conhaque e o rum, visando a obtenção de um destilado mais leve para ser posteriormente envelhecido (NOVAES, 1999). Embora as destilarias brasileiras em geral não utilizem este tipo de metodologia, já existem algumas marcas de aguardentes bidestiladas no mercado, contudo as mesmas não são difundidas tão amplamente quanto as bebidas por destilação tradicional. Tecnicamente, a bidestilação consiste na realização sucessiva de destilações em alambiques distintos ou mesmo no mesmo alambique. Em síntese, o vinho fermentado é destilado até que todo o álcool presente seja recuperado, sendo o destilado assim obtido (30% volume de álcool a 20 °C) submetido a uma nova destilação, onde são separadas a “cabeça” (10%), o “coração” (80%) e a “cauda” (10%), conforme a destilação tradicional da cachaça. O destilado alcoólico simples assim obtido é então envelhecido também podendo ser diluído para a produção da cachaça (CAVALCANTI, 2009).

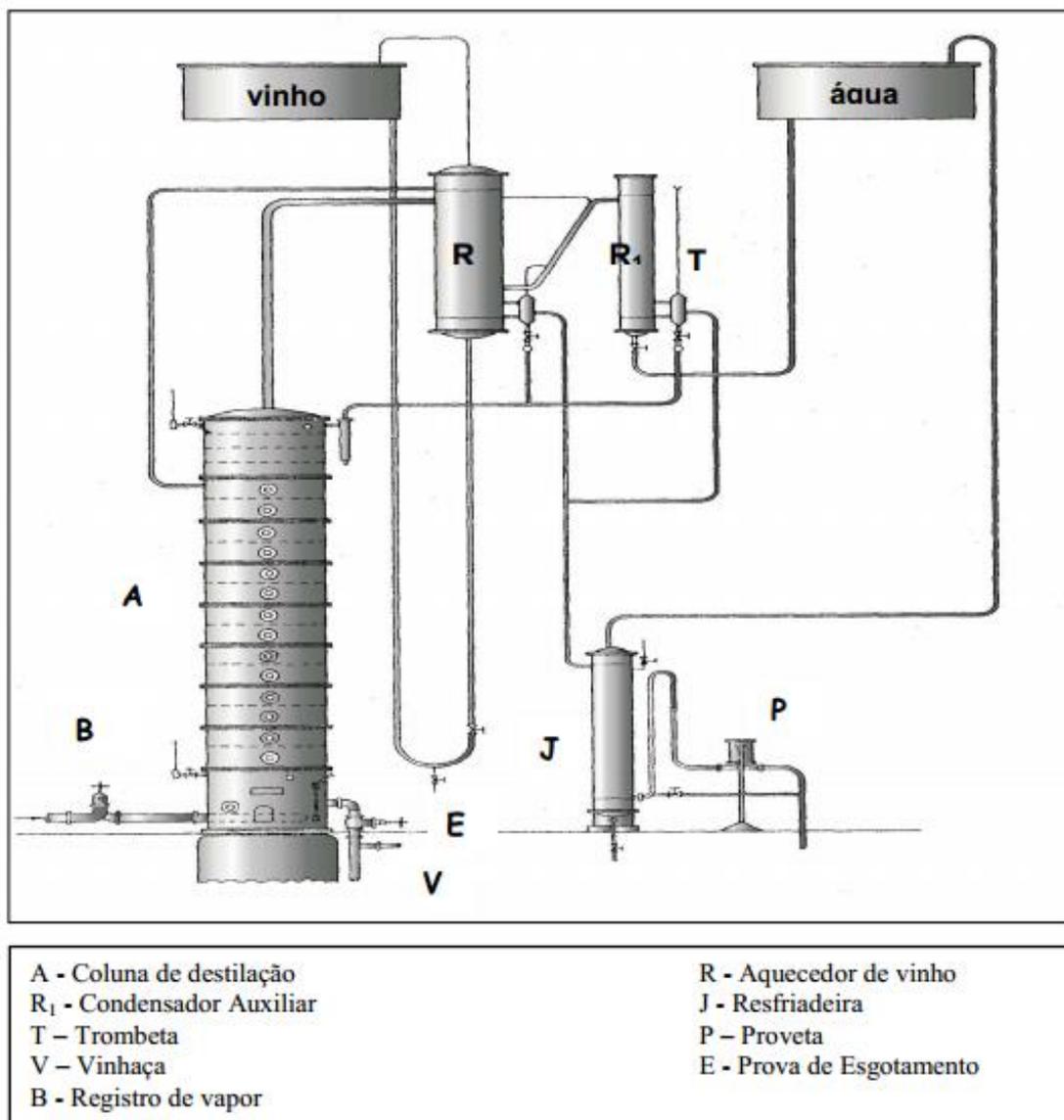


Figura 5 – Esquema simplificado de uma coluna de destilação de aguardentes de cana.

Fonte: NOVAES, 2000.

Na sequência, a destilação secundária elimina novas frações cabeça e cauda, promovendo redução substancial do volume para armazenamento. Todavia, é necessária adição de água destilada previamente ao engarrafamento em decorrência da elevação do grau alcoólico deste novo destilado, muitas vezes acima dos valores recomendados para comercialização (MUTTON; MUTTON, 2005).

A técnica de bidestilação, portanto, produz uma aguardente mais padronizada, com qualidade físico-química superior às provenientes de monodestiladas, com menor acidez acética e características sensoriais mais agradáveis. Esta melhoria da qualidade da aguardente bidestilada é buscada pela separação de frações ricas em compostos indesejáveis, como é o caso dos aldeídos, metanol, ácido acético e carbamato de etila, e de outros compostos voláteis prejudiciais à qualidade sensorial da bebida e à saúde do consumidor (NOGUEIRA; FILHO, 2005; DE SOUZA et al., 2009). Rota e Faria (2009) observaram efeitos positivos sob o ponto de vista sensorial no processo de bidestilação de cachaças, com tendência de maior aceitação da amostra bidestilada em alambiques de cobre, em relação aos atributos sabor, impressão global e sabor residual, quando comparada a amostra de cachaça destilada em alambique tradicional. No caso das amostras de cachaças produzidas em colunas de aço inox, foi constatado melhor aceitação do aroma e sabor residual.

A respeito da redução quantitativa de contaminantes, nos processos de bidestilação ocorre remoção de cobre proveniente de alambiques mal conservados (CAVALCANTI, 2009). Amaral e colaboradores apresentaram médias de teores de cobres de cachaças bidestiladas menores do que nas cachaças monodestiladas com valores de $2,40 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,36$ e $4,97 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,06$, respectivamente. Os valores de aldeídos e ésteres também apresentaram médias inferiores nas cachaças bidestiladas comparadas as cachaças destiladas tradicionalmente, sugerindo que as seguidas destilações podem representar uma alternativa para um melhor controle da produção, da padronização e qualidade da cachaça. Ressalta-se que a contaminação de cobre em aguardentes acontece durante a destilação, quando se forma o azinhavre ($\text{CuCO}_3\text{Cu(OH)}_2$) nas paredes internas dos destiladores de cobre. Esse composto é dissolvido pelos vapores alcoólicos ácidos, contaminando o destilado (LIMA et al., 2007). Quando o produto contaminado é consumido, o excesso de cobre solúvel no organismo pode ser tóxico devido à afinidade que o cobre possui com grupos S-H de muitas proteínas e enzimas, podendo ser a causa de várias doenças, estado este conhecido como hipercupremia (MORETTI, 2012).

2.1.4 Envelhecimento

De acordo com a última atualização para regulamentação da conformidade da cachaça pelo INMETRO, o armazenamento ou estocagem da cachaça deve ser realizado em recipientes produzidos com diferentes tipos de madeiras, aço inoxidável ou aço carbono isolado internamente, de forma que não ocorra contaminação da bebida. As áreas de estocagem devem obedecer à legislação vigente, principalmente em referência aos padrões de temperatura e umidade (BRASIL, 2009b). Neste processo, são recomendados barris de madeira cuja capacidade varie entre 200 e 700 litros (LEA; PIGGOT, 2003). No Brasil, o MAPA estabelece capacidade máxima de 700 litros para o envelhecimento de aguardentes de cana (BORRAGINI, 2009). Dentre os tipos de madeira mais utilizados, destacam-se: Carvalho (*Quercus* sp), ararua ou araribá (*Centrolobium tomentosum*), jequitibá rosa (*Cariniana strellensis Raddi Kuntze*), jequitibá branco (*Cariniana legalis*), bálsamo ou cabreúva (*Myroxylum peruiferum*), amendoim (*Pterogyne nitens*), ipês amarelo e roxo (*Tabebuia* sp), freijó (*Cordia goeldiana*) e amburana ou imburana (*Amburana cearensis*) (BORRAGINI, 2009).

O tempo de envelhecimento de aguardentes leva em média de 3 a 6 meses, porém existem aguardentes que ficam armazenadas por períodos maiores. As cachaças podem ser denominadas de acordo com seu teor de envelhecimento. A cachaça *premium* deve conter 100 % de cachaça envelhecida por um período não inferior a um ano. No caso da *extra premium* o produto também deve conter 100 % de cachaça, porém com envelhecimento mínimo de três anos. Já a “envelhecida”, necessita da presença de pelo menos 50 % de cachaça reservada por um período não inferior a um ano. O envelhecimento de aguardentes influencia na suavização do aroma e sabor da bebida, principalmente pela oxidação de aldeídos, com características pungentes, oriundos do processo de fermentação alcoólica (MAIA; CAMPELO, 2005, BOSQUEIRO, 2010).

Durante o processo de envelhecimento, ocorrem interações químicas dos componentes da destilação entre si, com o etanol, o oxigênio da atmosfera e componentes da madeira. A oxidação de aldeídos e ácidos fenólicos e a decomposição da lignina, hemicelulose e celulose em monômeros solúveis como ácidos fenólicos, também pode acontecer durante a estocagem da bebida. Por conseguinte, interações entre os ácidos fenólicos produzidos e os álcoois do fermentado destilado geram ésteres fenólicos que fornecem aromas agradáveis à bebida. Alterações na coloração das aguardentes também podem ser vistas variando de amarelo claro a vermelho dourado, bem como aumento da viscosidade e oleosidade do produto. Sendo assim, o envelhecimento da aguardente em tonéis de madeira promove diminuição significativa do

sabor alcoólico e da agressividade da bebida, com simultâneo aumento da doçura e do sabor de madeira, proporcionando uma efetiva melhora sensorial do produto (CARDELLO; FARIA, 1999; PARAZZI et al., 2008; BOSQUEIRO, 2010).

A avaliação da composição química durante os processos de armazenamento demonstra, de fato, alteração no perfil físico-químico de aguardentes. Por exemplo, na estocagem de aguardentes em tonéis de carvalho em um período de 390 dias foi possível observar tendência de aumento do teor alcoólico, sugerindo que a evaporação de água do destilado foi maior que a de etanol durante esse período. Com relação a acidez volátil da aguardente, houve aumento progressivo no decorrer do período de envelhecimento, sendo que ao seu final a aguardente apresentou 83,14 mg de ácido acético por 100 mL⁻¹ etanol puro, contra um valor inicial de 8,17 mg de ácido acético 100 mL⁻¹ etanol puro. Esse aumento se deve à reação de oxidação do etanol, a qual contribui para a formação de acetaldeído que conduz à formação de ácido acético. Além disso, determinados componentes secundários provenientes da madeira, tais como taninos e compostos fenólicos favorecem este aumento de acidez. Os ésteres, produtos da fermentação alcoólica por leveduras, também são produzidos por esterificação de ácidos graxos com o etanol durante o envelhecimento, levando a maior concentração nas bebidas produzidas desta forma. O teor de aldeídos da aguardente aumentou cerca de 125%. Uma das reações químicas mais importantes durante a maturação e que altera os componentes do destilado é a oxidação e formação de acetal. Também houve aumento de furfural, provavelmente em consequência da degradação de pentoses do tonel de carvalho. Os congêneres apresentaram aumento de 43% ao fim do processo de envelhecimento da aguardente. É importante pontuar que, neste achado os teores de cobre tiveram ligeiro declínio, com a possibilidade de absorção ou adsorção do metal, ou mesmo interação direta com taninos, intensificando a coloração da bebida (MIRANDA et al., 2008).

Partindo do princípio da dificuldade de aquisição de madeiras de lei, no mercado nacional, e ao alto custo de importação de carvalho é importante que os produtores busquem formas alternativas e inteligentes para o armazenamento das aguardentes com ganho sensorial na bebida. Viegas e colaboradores (2013) observaram a potencialidade do armazenamento de cachaças em tonéis de eucalipto (*Eucalyptus saligna*). Considerou-se relevante utilizar uma espécie arbórea capaz de suprir o mercado com madeira adequada para o armazenamento de destilados. Neste estudo, foi constatado que a estocagem de cachaças no período de um mês proporcionou menor redução do teor alcoólico, com valores entre 45 e 45,8 % v/v. Além disso,

em uma das espécies de eucalipto analisadas foi identificada maior redução no teor de acidez da cachaça, de 16,96 para 9,63 mg de ácido acético 100 mL⁻¹.

A espectrometria de massas (EM) vem sendo aplicada para investigação da legitimidade do envelhecimento de aguardentes. Em um estudo, amostras de cachaças recém destiladas foram adulteradas propositalmente pela adição de serragem, corantes ou essências, com intuito de simular envelhecimento natural em barris de madeira ao longo de 1 a 2 anos. A simples inspeção visual no cromatograma total de íons revelou diferenças notáveis entre a espectrometria de massas via ionização por infusão direta de *eletrospray* (ESI(-)-EM) das amostras autênticas (envelhecidas em barris de carvalho ou amburana) e as amostras falsificadas. Um conjunto de íons diagnósticos foram detectados no ESI(-)-EM das amostras autênticas envelhecidos em carvalho (m/z 197, 241, 301 e 307) e amburana (m/z 271 e 377/379). Esta metodologia rápida e direta parece ser útil como procedimento de rotina para monitorar a prática de falsificação altamente rentável e comum no mercado de aguardentes (DE SOUZA et al., 2013).

2.2 CARBAMATO DE ETILA COMO CONTAMINANTE EM CACHAÇAS

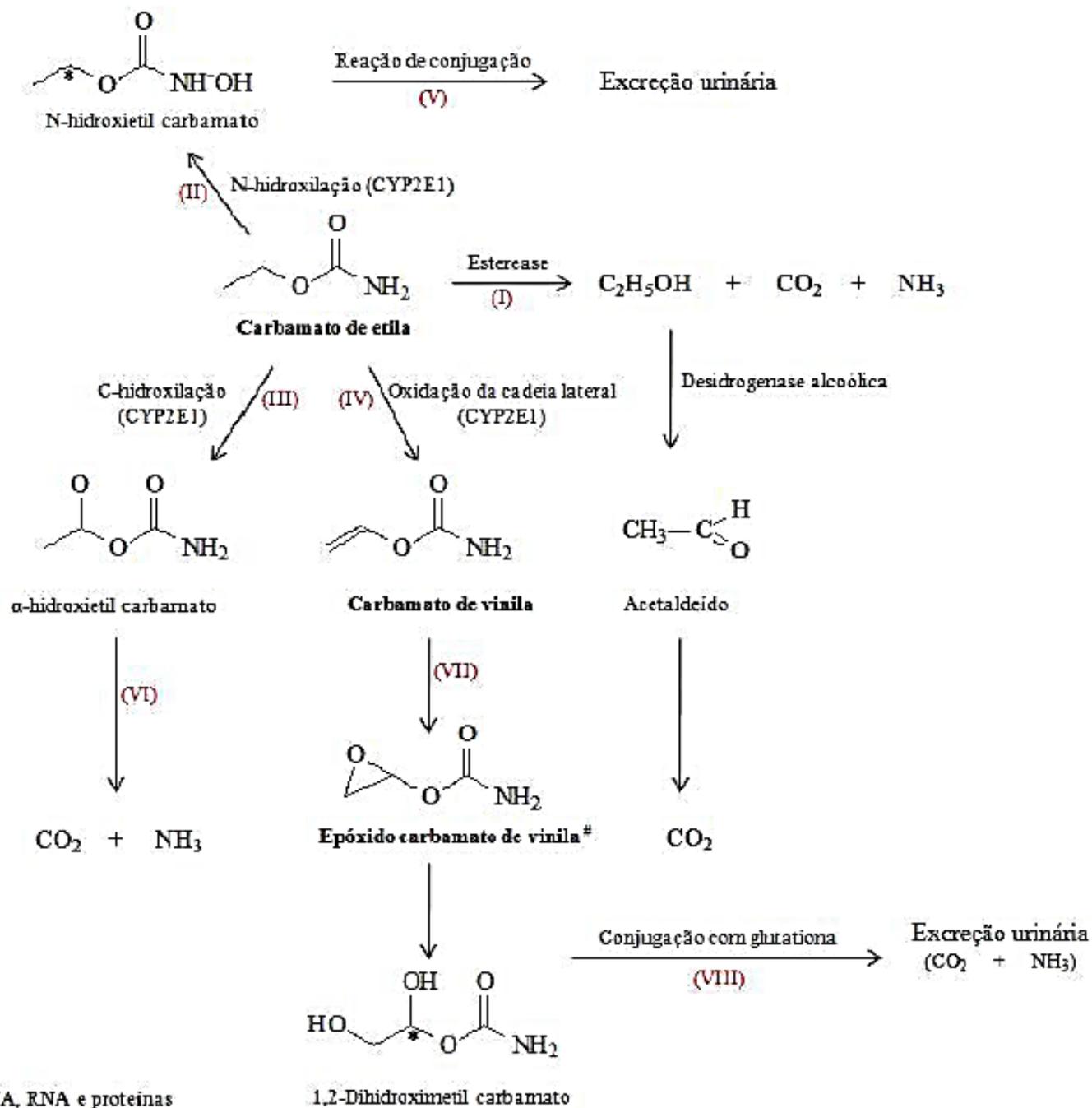
A quase uma década o CE é objeto de estudo em bebidas alcoólicas no Brasil. Na época, foram apresentados dados alarmantes das quantidades presentes em cachaças comum a concentração média de $770 \mu\text{g L}^{-1}$ registrada em uma ampla pesquisa em bebidas comerciais no Brasil. Tendo isto em evidência, vários autores observaram a ocorrência de CE em cachaças produzidas em Minas Gerais, identificando teores médios de CE bem acima dos valores máximos de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; LELIS, 2006; BAFFA JÚNIOR et al., 2007; BARCELOS et al., 2007; LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008).

Em recente pesquisa, Lachenmeier e colaboradores (2010) avaliou o risco de câncer da população brasileira frente à exposição do CE presente na dieta, principalmente com relação à cachaça e tiquira (aguardente de mandioca). A avaliação de risco revelou, como resultado de um amplo levantamento bibliográfico, uma concentração média de CE em cachaças destiladas em alambique e em coluna de $380 \mu\text{g L}^{-1}$ e $490 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. A faixa de exposição diária ao CE pela população foi estimada em 0,1-0,2 μg por kg de massa corporal (mc), sendo a cachaça o principal fator contribuinte (0,06-0,07 $\mu\text{g kg}^{-1}$ mc). Em relação à MOE (margem de exposição), a média calculada foi de 1.300, fato considerado preocupante, visto que o valor de baixo risco foi estimado em MOEs maiores ou iguais a 10.000, indicando um risco significativo de câncer da população brasileira consumidora de aguardentes, em especial de tiquira e cachaça. Em conclusão, os autores ressaltaram que se o teor médio de CE nas cachaças estivesse em $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (nível máximo tolerado pelo MAPA), haveria aumentos da MOE para patamares mais seguros.

2.2.1 Metabolismo de CE

O CE é um composto com características mutagênicas que pode produzir adutos de DNA *in vivo*, com característica prócarcinogênese em ensaios com roedores (SCHLATTER; DINOVI; SETZER, 2010). Neste modelo animal é possível observar que o metabolismo de CE é regulado ao menos por três caminhos distintos. Mais de 90% da ingestão de CE é hidrolisada a etanol, amônia e dióxido de carbono. Cerca de 0,1% é reversivelmente convertida a N-hidroxiuretana e menos que 0,5% do CE é metabolizado a carbamato de vinila, sequencialmente induzindo a formação de epóxi carbamato de vinila, o composto responsável pelo caráter carcinogênico do CE por sua capacidade de formar adutos de DNA, RNA e proteínas (SCHLATTER; DINOVI; SETZER, 2010; SAKANO et al., 2002). O Esquema 2, apresenta o metabolismo do CE observado em camundongos, neste é possível identificar a reação de

hidrólise do CE a etanol, CO₂ e amônia pela ação de uma esterase (reação I). A N-hidroxilação de CE forma carbamato de N-hidroxietila (Esquema 2, reação II), enquanto sua C-hidroxilação produz carbamato de α -hidroetila (Esquema 2, reação III) e a oxidação de cadeia lateral de CE é responsável pela síntese de carbamato de vinila (Esquema 2, reação IV), todas catalisadas pela ação da citocromo P450 2E1 (CYP2E1). No decorrer do metabolismo, temos: carbamato de N-hidroxietila sofrendo reação de conjugação e é excreção via urina (Esquema 2, reação V); metabolização de carbamato de α -hidroetila a CO₂ e amônia (Esquema 2, reação VI); oxidação do carbamato de vinila a epóxido carbamato de vinila (Esquema 2, reação VII); e reação de conjugação do epóxido carbamato de vinila com a glutatona, com formação de CO₂ e amônia, com excreção urinária (Esquema 2, reação VIII) (EFSA, 2007; GALINARO, 2011).



Esquema 2 – Metabolismo de Carbamato de Etila em camundongos

Fonte: Adaptado de EFSA, 2007.

Esterases microssomais hepáticas participam na produção de metabólitos, porém a CYP2E1 tem sido destacada como a principal enzima relacionada ao metabolismo de CE nas reações de formação de N-hidroxiuretana e carbamato de vinila. Isto pode ser observado através da comparação de ratos selvagens e ratos com *knockout* CYP2E1 que receberam doses de CE. Independente da dose, 91 a 93% do CE foi rapidamente absorvido e metabolizado a ¹⁴CO₂ nos animais *gavados*, posteriormente houve eliminação via expiração aérea em torno de 6 horas após a ingestão. O modelo animal com CYP2E1-*null* exalou seis vezes menos ¹⁴CO₂ indicando a participação majoritária desta enzima no metabolismo de CE (HOFFLER; EL-MASRI; GHANAYEM, 2003).

Em outro estudo, foi administrada dose única de 10 ou 100 mg Kg⁻¹ de peso de CE marcado (¹⁴C-etil-uretana marcada) em ratos sem (-/-) e com (+/+) expressão de CYP2E1. Dentro de um período de 24 horas os ratos +/+ eliminaram aproximadamente 80 % da dose total administrada contrastando com 40 % da dose total eliminada por ratos -/- na forma de ¹⁴CO₂, corroborando achados anteriores que sustentam a hipótese de participação predominante de CYP2E1. A respeito de outras formas de excreção do CE ingerido, menos do que 1 e 5 % foram eliminados através de voláteis orgânicos radioativos para ratos +/+ e -/-, respectivamente, e valores inferiores a 1 % para ambos tipos de animais. A Tabela3 apresenta as formas de eliminação de CE investigadas nos ratos (HOFFLER; GHAYANEM, 2005).

Tabela 3 – Resumo da excreção de 24 horas de carbamato de etila marcado após administração de doses de 10 e 100 mg Kg⁻¹.

	¹⁴ C-etil-uretana			
	100 mg Kg ⁻¹		10 m /Kg ⁻¹	
	CYP2E1 +/+	CYP2E1 -/-	CYP2E1 +/+	CYP2E1 -/-
CO2	87,5 ± 2,9	38,0 ± 2,2 ^a	78,5 ± 3,6	30,0 ± 4,2 ^a
Voláteis Orgânicos	0,7 ± 0,1	3,0 ± 0,5 ^a	0,6 ± 0,5	4,2 ± 0,4 ^a
Urina	3,1 ± 0,5	4,7 ± 0,8	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,6
Fezes	Neg	Neg	Neg	Neg
Total percentual da dose	91,3	45,7	82,8	37,4

Neg = Valores inferiores a 1 %. ^avalores de CYP2E1-/- estatisticamente diferentes dos valores correspondentes de CYP2E1 +/+ (P ≤ 0,05).

Fonte: Adaptado de HOFFLER; GHAYANEM, 2005.

O potencial carcinogênico de CE pode ser influenciado pela ingestão de etanol, que também é metabolizado por CYP2E1. Esta relação pode levar a remoção primária de CE pela reação de hidrólise (OMS/WHO, 2012) ou superexpressar produção enzimática de CYP2E1 levando a metabolização ainda mais veloz de CE após ingestão e participar sinergicamente com o etanol para formação de epóxi carbamato de vinila (IARC, 2010). Por exemplo, Kristiansen et al.(1990) observaram redução na incidência de tumores de pulmão em roedores que ingeriram água contendo CE e etanol em concentrações de 10% e 20%, cerca de 1/2 e 2/3 respectivamente.

Assim, atualmente os trabalhos realizados principalmente em ratos tentam estabelecer se a relação entre CE e etanol é de fato antagônica ou sinérgica ou mesmo se ambos dependem de doses diárias ingeridas para que esta relação direta se estabeleça de forma favorável ou contrária a formação de epóxi carbamato de vinila (RIACCHI et al., 2013).

2.2.2 Potencial carcinogênico do CE

Inicialmente, o CE foi empregado em pesquisas como composto biologicamente ativo para fármacos hipnóticos e anestésicos, tendo sua utilização descontinuada apenas com a disponibilidade de barbitúricos para estes tipos de tratamentos (SCOEL, 2012). Adicionalmente, era comum a utilização de CE como intermediário para preparo de aminoácidos, além de servir como solubilizante e co-solvente no desenvolvimento de pesticidas e cosméticos, bem como bactericidas tópicos e anestésico para animais. Curiosamente, até o final da década de 60 a administração de CE era estudada com intuito antitumoral para diferentes casos de câncer como múltiplos mielomas e neoplasias de língua, mama, próstata, entre outros (LAPIDES, 1949; BLACK; SPEER, 1956). A administração oral de 1 a 6g de CE por dia em um período de aproximadamente quatro meses em pacientes com leucemia e outros tipos de câncer somáticos demonstrou efeitos colaterais recorrentes como diarreia, náuseas e vômitos. A leucopenia também era comumente observada em indivíduos com neoplasias somáticas, porém esta queda importante de contagem de células brancas era vista de forma positiva em pacientes com leucemia. Na administração de CE por via intramuscular, houve observação de tonturas, enjoos e sonolência. Após a cessão do tratamento com CE era possível observar reversão de alguns efeitos deletérios que eram identificados durante o período de tratamento (BLACK; SPEER, 1954; SERMAN, 1955; TEITEL et al., 1965). Sequencialmente, achados científicos identificaram outros efeitos colaterais como necrose hepática, sedação, náusea persistente, anemia, fibrose de linfonodos e pneumonia fatal frente a exposição de CE

em humanos levando sua utilização para critérios mais rígidos de utilização (HIRSCHBAECK et al., 1948; FIELD; LANG, 1988).

Em virtude de ensaios realizados em ratos e camundongos, verificou-se incidência de adenomas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos, hepatomas, carcinomas mamários, tumores de ovários, hemangiomas hepáticos e tumores melanóticos de pele, entre outros (LUEBKE et al., 1987; FIELD; LANG, 1988). Ainda nestes animais, houve exposição transplacentária de CE, desenvolvendo teratogênese e diversos tipos de adenomas em fetos (KLEIN, 1954). O risco de exposição também foi detectado durante período de lactação (VESSELINOVITCH et al., 1971; FIELD; LANG, 1988). Estas pesquisas levaram a classificação do CE como possível e provável carcinógeno humano pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e *United States Environmental Agency Protection* (US EPA), respectivamente (BELAND et al., 2005; BAAN et al., 2007; BRASIL, 2009). Todavia, em 2007 a IARC reclassificou o CE como composto pertencente ao grupo “provável cancerígeno para seres humanos”, 2A, que contém substâncias como arsênio, acrilamida, chumbo e mercúrio, situação ratificada pela mesma IARC em 2010 (EFSA, 2007; IARC, 2010; SCOEL, 2012). De acordo com o Programa Toxicológico Nacional dos Estados Unidos (NTP), é possível exposição a risco em humanos através de inalação, ingestão e contato com a pele (NTP, 2011).

Segundo recente relatório produzido pela Comissão Científica Europeia sobre Limites de Exposição Ocupacional (SCOEL), é razoável assumir que o CE é um carcinógeno humano estabelecido, com base em contundentes evidências de sua carcinogenicidade em modelos animais, com indução de tumores malignos em ratos e camundongos em múltiplos locais de proliferação e com diferentes formas de administração, como oral, intravenosa e intramuscular. Também se sugere que o CE é um composto genotóxico, mutagênico e clastogênico, especialmente com sua ativação metabólica (SCOEL, 2012). No que tange a relação de CE com a clínica veterinária, sua aplicação via intravenosa garante anestesia duradoura e estável em animais, conferindo baixa depressão cardiorrespiratória, porém a recomendação de aplicação é limitada em função dos riscos oferecidos as cobaias e aos pesquisadores. Tanto que em 2005, o Comitê Institucional de Biossegurança NorteAmericano (IBC) classificou o CE como “químico perigoso relatável” que, quando utilizado, deve ser relatado para todos comitês de cuidado e ética em animais, quando utilizado *in vivo* (IBC, 2005).

Ressalta-se, que o perigo de exposição ao CE se evidencia ainda mais em virtude de sua formação natural durante processo fermentação de alguns alimentos além das bebidas alcoólicas, como vinagres, molhos de soja, queijos, iogurtes e azeitonas. (OUGH, 1976;

BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991; BOSCOLO, 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002). Ainda há casos de presença de CE, em alimentos como chucrute, extrato de levedura ($41 \mu\text{g L}^{-1}$) e “pudim de natal” apresentando baixos valores quantificados, com $29 \mu\text{g L}^{-1}$, $41 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (HASNIP et al., 2007). No caso de aguardentes, o consumo médio estimado é de no máximo 80 ng Kg^{-1} de massa corporal/dia (EFSA, 2007; WEBER; SHARIPOV, 2009; GALINARO, 2011).

Recentemente no Brasil foi investigada a exposição ao CE por meio de relação entre o consumo de bebidas alcoólicas, em especial aguardente, e a concentração do carcinógeno nas mesmas, demonstrando o maior risco de exposição ao câncer pelo consumidor brasileiro. Os valores médios de CE encontrados em aguardentes foram de aproximadamente três vezes acima do mínimo permitido pela legislação. A faixa de exposição diária ao CE pela população foi estimada em $0,1-0,2 \mu\text{g}$ por kg de massa corporal (MC), sendo a cachaça o principal fator contribuinte ($0,06-0,07 \mu\text{g kg}^{-1}$ MC). A Margem de Exposição (MOE) média calculada para CE foi de 1.300, ressaltando-se que são considerados valores seguros de MOEs aqueles iguais ou maiores a 10.000. Caso, o teor médio de CE nas aguardentes estivesse em $150 \mu\text{g L}^{-1}$, haveria um aumento da MOE para valores próximos ao parâmetro de segurança (LACHEMNEIER et al, 2010).

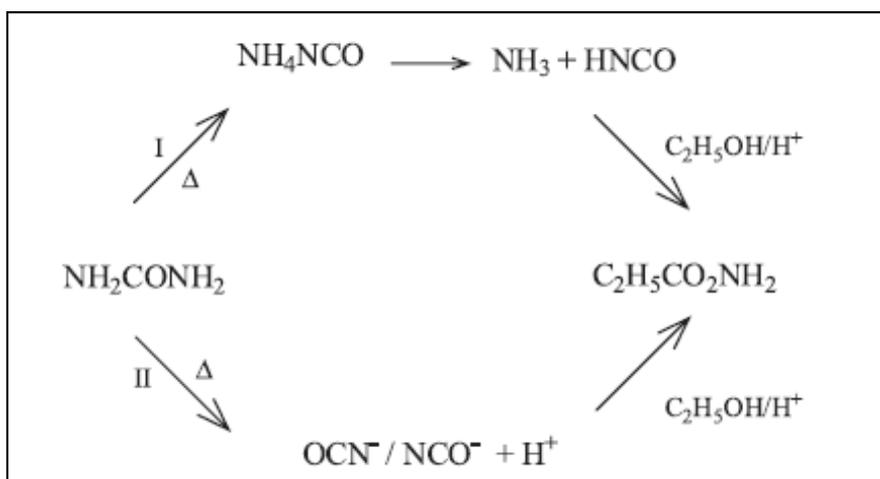
2.2.3 Processo de formação de Carbamato de Etila em Aguardentes

Existem algumas hipóteses propostas para formação de CE em bebidas fermentadas, porém seu principal precursor é o cianeto de hidrogênio (HCN), que pode ser originado, principalmente, a partir da uréia e seus derivados, cianoglicosídeos, piracarbonato de dietila e carbonato de dietila, os dois últimos achados em vinhos (COOK et al., 1990; LABANCA, 2004; LELIS, 2006; EFSA, 2007; GALINARO, 2011; PEREIRA, 2012)

A uréia pode estar presente naturalmente na bebida ou ser formada pelo metabolismo de arginina. Assim estima-se que todas as bebidas fermentadas tenham a possibilidade de apresentar CE, uma vez que a sua produção está relacionada com a reação entre a uréia e etanol (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003). Uma parte da uréia é metabolizada pelas leveduras como fonte direta de nitrogênio, enquanto arginase degrada arginina em uréia e ornitina (Figura 6). Porém, no excesso de arginina disponível, a uréia é liberada para o meio de fermentação aumentando ainda mais a probabilidade de síntese de CE (BAFFA JÚNIOR, 2011). Outra rota de formação de CE envolve a amônia e a produção de fosfato de carbamila, que em conjunto com o etanol pode

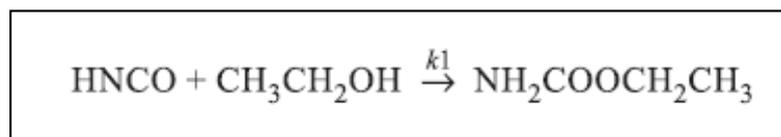
formar CE. Este processo é comum em vinhos, e também provável de ocorrer em aguardentes. Entretanto, grande parte do CE formado durante a etapa de fermentação pode ser removido, uma vez que o ponto de ebulição do CE é de cerca de 185°C e as bebidas serão posteriormente destinadas ao processo de destilação (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; LELIS, 2006).

A decomposição da uréia, na presença de etanol, em meio ácido entre 60 °C e 100 °C pode formar os intermediários: amônia e ácido isociânico (HNCO) (Esquema 3, reação I). Já na presença de água, a uréia decompõe-se termicamente em amônia, CO₂, ácidos cianico (HO-CN) e HNCO. O ácido cianico converte-se em isociânico. A reação do ácido isociânico com o etanol pode levar a formação do CE (Esquema 3, Reação II). Os íons cianato (OCN⁻/NCO⁻) são os intermediários desta reação (DONGPENG; YANG; ZHAI, 2007).



Esquema 3 – Formação de CE à partir da uréia.

Fonte: Adaptado de DASILVA; OHE; FRANCO, 2013.



Esquema 4 – Reação do ácido isociânico com o etanol, formando CE.

Adaptado de DONGPENG; YANG; ZHAI, 2007.

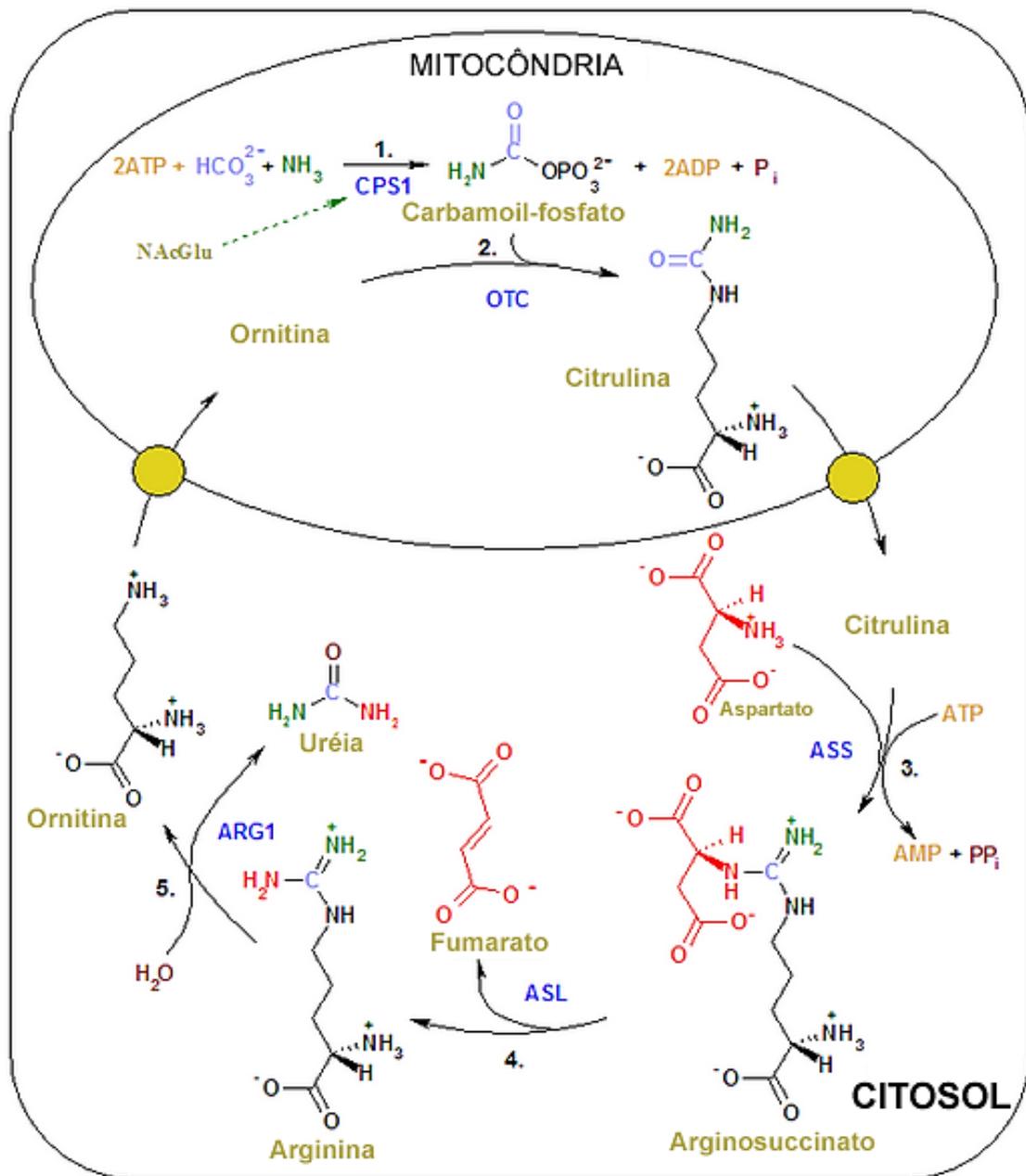


Figura 6 – Ciclo da uréia, com formação de uréia a partir de arginina.

Adaptado de BAFFA JUNIOR, 2011.

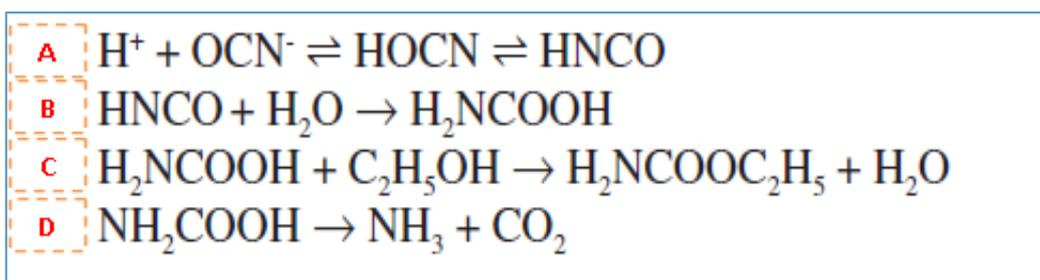
Na Tabela 4 é possível verificar que em meio aquoso e na ausência de etanol, a concentração de íons cianato decai com $k_1 = 2,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, e nestas condições não ocorre formação de CE. O valor de k_1 para a formação de CE é da mesma ordem de grandeza para o decaimento da concentração de íons cianato em soluções onde as concentrações de etanol são iguais ou inferiores a $8,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Em soluções que a concentração de etanol é superior a $8,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, a constante de velocidade para o decaimento de íons cianato diminui à medida que o teor alcoólico aumenta. Além disso, o rendimento químico de CE também varia de em função da concentração de etanol. Maiores concentrações de etanol rendem maior percentual de CE (DA SILVA; OHE; FRANCO, 2013).

O Esquema 5 apresenta a formação de CE à partir do ácido carbâmico. Os íons cianato produzem HOCN (reação A), que possui uma constante de dissociação $2,0 \times 10^{-4}$ a 28°C e apresenta duas formas tautoméricas (quando dois isômeros apresentam equilíbrio químico dinâmico, através da mudança de H na molécula): HOCN e HNCO. Comumente há a predominância na formação de HNCO (97%). Na sequência, ocorre a hidratação de HNCO com formação de ácido carbâmico (reação B). O ácido carbâmico pode reagir com etanol originando CE (reação C) ou decompor-se em NH_3 e CO_2 (reação D), sendo duas reações competitivas, no qual o rendimento dos produtos depende das concentrações relativas de etanol e água. Ou seja, com aumento da concentração (atividade) de etanol, a produção de CE é favorecida aumentando seu rendimento. Caso a concentração (atividade) de água seja maior, a produção de amônia e dióxido de carbono é aumentada (DASILVA; OHE; FRANCO, 2013).

Tabela 4—Valores das constantes de velocidades obtidas pelo gráfico de $\ln ([\text{OCN}^-]_\infty - [\text{OCN}^-]_t)$ versus tempo em diferentes concentrações de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

Concentração de Etanol (mol L^{-1})	k_1, s^{-1}	$t_{1/2}, \text{s}^{-1}$	T, °C
0	$2,9 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-3}$	25
$1,0 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-3}$	25
$2,0 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-3}$	25
$2,0 \times 10^{-2}$	$4,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-3}$	35
$2,0 \times 10^{-2}$	$9,2 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-2}$	45
$4,0 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-3}$	25
$8,0 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-3}$	25
$8,0 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-3}$	25
2,0	$1,7 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-3}$	25
4,0	$1,5 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-3}$	25
6,8	$6,7 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	25
6,8	$2,0 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-3}$	35
6,8	$5,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	45
8,0	$6,8 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-4}$	25
13,7	$5,2 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-4}$	25

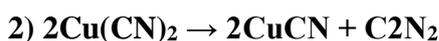
Fonte: Adaptado de DA SILVA; OHE; FRANCO, 2013.



Esquema 5 – Formação de CE à partir de ácido carbâmico.

Fonte: Adaptado de DA SILVA; OHE; FRANCO, 2013.

Mesmo após o processo de fermentação, muitas bebidas alcoólicas apresentam valores de CE que podem aumentar durante as etapas de destilação e fermentação. A cana-de-açúcar é classificada como uma planta cianogênica, e embora a identidade química determinante da origem do glicosídeo cianogênico ainda não seja clara (GALINARO; FRANCO, 2011), os íons cianeto (CN⁻) formados através da provável ação enzimática e clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos, podem seguir por duas rotas químicas prováveis para formação de CE: complexação com cobre ou autooxidação sob luz UV (BOSCOLO, 2001; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). Os íons cúpricos, 2Cu⁺⁺, provavelmente originados da corrosão do condensador do sistema de destilação, oxidam o cianeto a cianogênio. Subsequentemente, ocorre desproporcionamento do cianogênio associado a redução de Cu⁺⁺ a Cu⁺, o que promove a síntese de íons cianato. O Esquema 6 resume este processo com a interação entre o cianato produzido e o etanol do meio, levando a formação de CE (BEATTIE; POLYBLANCK, 1995; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009).



Esquema 6 – Formação de CE à partir da complexação de íons cianeto e cobre.

Fonte: Adaptado de ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001

Na destilação, é possível detectar em alguns casos espécies distintas de complexos aniônicos cobre-cianeto (CuCN, Cu(CN)₂⁻, Cu₂(CN)₃⁻ e Cu₃(CN)₄⁻), sustentando a hipótese de que o CE pode ser formado durante esta etapa de produção de aguardentes de cana (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; LELIS, 2006). Ainda, alguns trabalhos buscam relacionar a variação de teor alcoólico e teor de cobre no incremento das concentrações de CE (Tabelas 5 e 6). Contudo, esta correlação não é estabelecida de forma consensual, em virtude da falta de estabilização das amostras (LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009). Vale ressaltar que o tratamento com resina catiônica em cachaças recentemente destiladas, promoveu remoção de cobre por filtração, levando a uma redução

substancial de 80% dos teores de CE ($272 \mu\text{g L}^{-1}$ to $50 \mu\text{g L}^{-1}$), confirmando a ação catalítica de cobre (BRUNO; VAITSMAN; KUNIGAMI, 2007).

Tabela 5 – Concentração de CE ($\mu\text{g L}^{-1}$) em cachaça após 90 dias de estocagem em função da graduação alcoólica, com diferentes materiais de coloração.

Cu (mgL^{-1})	GL	Âmbar	Azul	Verde	Transparente
0,21	40	$60,07 \pm 1,37^a$	$68,36 \pm 1,32^a$	$66,47 \pm 0,34^a$	$67,70 \pm 0,20^a$
	45	$64,47 \pm 1,71^b$	$76,81 \pm 0,49^b$	$76,16 \pm 1,51^b$	$75,92 \pm 1,48^b$
	50	$66,87 \pm 0,55^b$	$83,53 \pm 2,13^c$	$86,02 \pm 1,28^c$	$86,05 \pm 1,01^c$
5,00	40	$84,42 \pm 0,64^a$	$127,11 \pm 0,99^a$	$127,42 \pm 0,86^a$	$126,86 \pm 1,11^a$
	45	$91,25 \pm 0,96^b$	$137,95 \pm 0,60^b$	$137,24 \pm 2,25^b$	$138,58 \pm 0,90^b$
	50	$109,25 \pm 2,51^c$	$155,70 \pm 0,91^c$	$156,60 \pm 2,21^c$	$155,72 \pm 1,05^c$
10,0	40	$108,91 \pm 1,46^a$	$175,62 \pm 1,21^a$	$156,54 \pm 0,67^a$	$177,94 \pm 1,01^a$
	45	$120,58 \pm 2,42^b$	$193,80 \pm 1,34^b$	$193,15 \pm 2,23^b$	$194,78 \pm 0,52^b$
	50	$135,95 \pm 0,91^c$	$249,37 \pm 1,40^c$	$248,87 \pm 2,30^c$	$248,78 \pm 3,90^c$

*Médias seguidas por pelo menos a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade fixando cobre e grau alcoólico

Fonte: Adaptado de BAFFA JUNIOR, 2011.

Tabela 6 – Concentração de CE ($\mu\text{g L}^{-1}$) em cachaça após 90 dias de estocagem em função do teor de cobre (mg L^{-1}), com diferentes materiais de coloração.

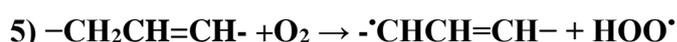
°GL	Cu (mgL^{-1})	Âmbar	Azul	Verde	Transparente
40	0,21	$60,07 \pm 1,37^a$	$68,36 \pm 1,32^a$	$66,47 \pm 0,34^a$	$67,70 \pm 0,20^a$
	5,00	$84,42 \pm 0,64^b$	$127,11 \pm 0,99^b$	$127,42 \pm 0,86^b$	$126,86 \pm 1,11^b$
	10,0	$108,91 \pm 1,46^c$	$175,62 \pm 1,21^c$	$156,54 \pm 0,67^c$	$177,94 \pm 1,01^c$
45	0,21	$64,47 \pm 1,71^a$	$76,81 \pm 0,49^a$	$76,16 \pm 1,51^a$	$75,92 \pm 1,48^a$
	5,00	$91,25 \pm 0,96^b$	$137,95 \pm 0,60^b$	$137,24 \pm 2,25^b$	$138,58 \pm 0,90^b$
	10,0	$120,58 \pm 2,42^c$	$193,80 \pm 1,34^c$	$193,15 \pm 2,23^c$	$194,78 \pm 0,52^c$
50	0,21	$66,87 \pm 0,55^a$	$83,53 \pm 2,13^a$	$86,02 \pm 1,28^a$	$86,05 \pm 1,01^a$
	5,00	$109,25 \pm 2,51^b$	$155,70 \pm 0,91^b$	$156,60 \pm 2,21^b$	$155,72 \pm 1,05^b$
	10,0	$135,95 \pm 0,91^c$	$249,37 \pm 1,40^c$	$248,87 \pm 2,30^c$	$248,78 \pm 3,90^c$

*Médias seguidas por pelo menos a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade fixando cobre e grau alcoólico

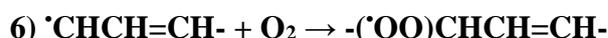
Fonte: Adaptado de BAFFA JUNIOR, 2011.

Outra hipótese para formação de EC está relacionada a auto oxidação de compostos insaturados, naturalmente presentes na aguardente, sob a influência de radiação de luz ultravioleta. Nesta situação, ocorre uma reação em cadeia dividida em três etapas: iniciação, propagação e auto oxidação nos quais radicais livres, como hidroxila e peroxila, catalisam a reação de cianeto em cianato (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). O Esquema 7 apresenta as fases de produção de CE a partir da radiação UV.

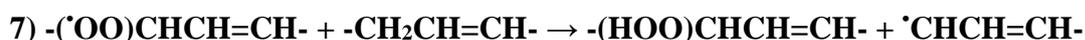
Iniciação



Propagação



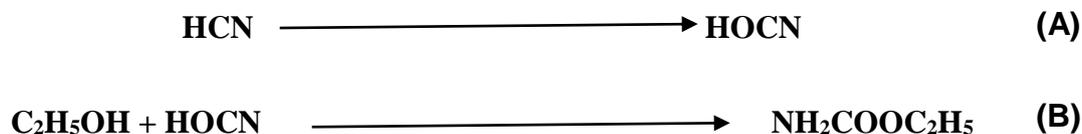
Auto oxidação



Esquema 7 – Formação de EC à partir da oxidação de compostos insaturados, levando a ação catalítica de radicais livres na produção de cianato a partir de cianeto.

Fonte: Adaptado de ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001.

O Esquema 8 apresenta a formação de HCN a HOCN, com posterior combinação com o etanol para formação de CE (Esquema 8, reação B) (BATTAGLIA; CONACHER; PAGE, 1990; NAGATO; NOVAES; PENTEADO, 2003; LELIS, 2006).



Esquema 8 – Oxidação de HCN (A). Reação de HOCN com etanol e formação de CE (B).

Fonte: Adaptado de LELIS, 2006.

Tendo em vista os cuidados com relação à radiação de UV, alguns trabalhos preocuparam-se em investigar se a coloração dos recipientes poderia influenciar a produção de CE. Existe grande controvérsia de resultados com relação ao tipo de material de revestimento das bebidas e a influência de produção de CE disponível em aguardentes e cachaças. A hipótese mais justificada para aumento de CE em bebidas com exposição a luz é de que processos fotoquímicos com auto oxidação de compostos cianogênicos podem estar envolvidos na formação de CE, levando a oxidação de cianeto para cianato neste cenário. Lima (2012) observou que 70% das amostras de aguardentes analisadas sofreram influência da luminosidade, com teores reduzidos de CE para amostras expostas a menor luminosidade. Baffa-Júnior e colaboradores (2011) demonstraram quantidades distintas de CE em diferentes tipos de coloração em embalagens de vidro (âmbar, azul, verde e transparente), com teores reduzidos de CE para garrafas de coloração âmbar. Contudo, outros trabalhos não observaram diferenças significativas entre a concentração de CE em bebidas armazenadas em recipientes transparentes ou em âmbar (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002). Resultados semelhantes foram encontrados por Andrade-Sobrinho et al., 2009 e Nóbrega et al., 2009. Galinaro e Franco (2011) também não encontraram diferenças entre os teores de CE em amostras recentemente destiladas que foram expostas (ou preservadas) da luz solar ou submetidas a 3 horas de irradiação por comprimentos de onda (250 nm a 500 nm).

Além da radiação, do conteúdo de etanol e das concentrações de íons Cu^{++} , existem outros fatores capazes de influenciar a formação de EC a partir de cianeto em bebidas alcoólicas destiladas, como pH, temperatura e proximidade de grupos carbonila em moléculas orgânicas (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).

2.2.4 Determinação de Carbamato de Etila em Aguardentes e outras bebidas destiladas

Atualmente, a detecção de CE em cachaças e outras aguardentes têm sido feita através de cromatografia gasosa (CG) acoplada à EM. Esta técnica apresenta vantagens como a injeção direta da amostra analisada, rapidez, aplicação e adequação aos limites de quantificação ($30 \mu\text{g L}^{-1}$). De acordo com a investigação, pequenas adaptações são realizadas, principalmente no que compete ao preparo da amostra, como a utilização de padrão interno (carbamato de metila, carbamato de propila, carbamato de isopropila, carbamato de butila e carbamato de etila deuterado ^{13}C ou ^{15}N) e extração de fase sólida com terra diatomácea (NAGATO et al., 2000; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; UTHURRY et al., 2004; LELIS, 2006; BRUNO; VAITSMAN; KUNIGAMI, 2007; HASNIP et al., 2007; BAFFA JUNIOR et al., 2007; LABANCA; GLÓRIA; AFONSO, 2008; LACHENMEIER et al., 2009; SAE-ROM et al., 2009; GALINARO, 2011; PEREIRA, 2012). Na detecção de CE por CG/EM, o monitoramento seletivo de íons é realizado em modo SIM, em sua maioria com as seguintes relações massa/carga (m/z): 89, 74, 62 e 44.

Existem trabalhos em bebidas alcoólicas que determinam teores de CE por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando detector por espectrometria de massas (MS) ou detectores de fluorescência (DF) (MADRERA; VALLES, 2008; SAE-ROM et al., 2009; PEREIRA, 2012). O método de CLAE/DF vem surgindo como alternativa ao método de GC/MS em virtude de apresentar percentual de detecção semelhante, bem como proporcionar rapidez no preparo de amostras, uma vez que não necessita de etapas prévias de extração e concentração do analito (ANJOS et al., 2011). Adicionalmente, também é possível verificar metodologias de utilização de GC acoplada a detector por condutividade térmica (DCT) ou detector de ionização em chama (DIC) (ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991; ANDRADE-SOBRINHO et al. 2002; ANDRADE-SOBRINHO, 2009; WEBER; SHARIPOV, 2009).

Outras técnicas também são estudadas para combinação com CG/EM, tais como além extração líquido-líquido (FAUHL; WITTKOWSKI, 1992) e microextração em fase sólida (SPME) (LACHENMEIER; NERLICH; KUBALLA, 2006). A SPME apresenta fatores atraentes para sua utilização por conta de ser uma metodologia isenta de solventes, ágil, de simples manuseio, sensível e que não necessita de concentração prévia do analito, evitando a produção de subprodutos (LIMA, 2012). Alguns autores têm empregado métodos mais sofisticados para quantificação de CE, como a utilização de GC bidimensional acoplada a EM com tempo de voo (TOF), junto a pré tratamento com SPME combinada ao *headspace*, com

limites de detecção entre 2,75 a 4,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de quantificação de 9,16-14,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ e percentagens de recuperação variando de 89 a 99% (PERESTRELO et al., 2010).

3 JUSTIFICATIVA

A cidade do Rio de Janeiro será sede da disputa da próxima Copa do Mundo em 2014 e dos Jogos Olímpicos de 2016, com previsão de chegada de mais de 980 mil turistas de acordo com o Ministério do Turismo (BRASIL, 2011). Tendo em vista a identidade, reconhecimento e popularidade das aguardentes, sobretudo a cachaça, com o país, é de grande importância monitorar a qualidade da bebida, que é atualmente comercializada na cidade, no que tange a saúde pública e a economia nacional. Neste sentido, o presente estudo apresenta o propósito de determinar a presença e quantidade de CE em cachaças e demais aguardentes localizadas em diferentes bairros e regiões da cidade do Rio de Janeiro. O monitoramento do teor de CE poderá fornecer subsídios para os tomadores de decisão intervirem com medidas adequadas ao controle do contaminante na bebida, se esse for o caso, e, assim, aumentar a proteção do cidadão carioca e dos turistas brasileiros e estrangeiros consumidores de cachaça.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e quantificar a presença de CE em cachaças da cidade do Rio de Janeiro.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar aguardentes e cachaças em quatro regiões da cidade do Rio de Janeiro (Centro, Zona Norte, Zona Oeste e Zona Sul);
- Realizar tratamento estatístico de significância entre as quatro regiões da cidade

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. LEVANTAMENTO DA QUALIDADE DE AGUARDENTES

Amostras de 120 cachaças foram coletadas em 5 supermercados localizados no Centro (ZC), Zona Oeste (ZO), Zona Norte (ZN) e Zona Sul (ZS) da cidade do Rio de Janeiro com distribuição igualitária de amostras entre si, ou seja, 30 amostras de cada região.

De cada região, no mínimo sete amostras correspondiam a aguardentes de cana envelhecidas. Ressalta-se que, amostras da mesma marca foram adquiridas a partir de lotes distintos.

As aguardentes coletadas foram inteiramente aleatórias quanto ao método de destilação ou teores alcoólicos e de açúcares. As amostras foram analisadas em triplicata.

5.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

As soluções padrão de CE foram preparadas em solução 40% de etanol nas concentrações de 20, 30, 50, 100, 300, 100, 600 e 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para cada solução de padrão externo e cada amostra, foi adicionado carbamato de metila (500 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Através de análise linear de regressão, foram determinadas equação da curva ($y = 10.832x + 185.43$) e correlação ($R^2 = 0.9989$).

As amostras foram aplicadas sem tratamento prévio, seguindo metodologia descrita por Hesford e Schneider (2001). Teores iguais ou inferiores a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram considerados como zero para fins de cálculo, como descrito anteriormente (CARUSO; FARAH-NAGATO; ALABURDA, 2010).

5.3. CG/EM

As análises de CG/EM foram baseadas na descrição de Labanca et al. (2008) e Nóbrega et al. (2009). Foi utilizado CG acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo Shimadzu GCMS-QP2010 (Kyoto, Japão) equipado com coluna capilar polar de sílica fundida (30 m x 0.25 mm i.d. Supelcowax TM 10. Supelco, Milford, USA) com espessura de filme de 0.2 μm . Foram realizadas aplicações de alíquotas de 2 μl , em modo *splitless*.

O equipamento foi operado com energia de ionização de 70 eV e com fluxo de gás hélio de 1,5 ml min⁻¹ como gás carreador e escaneamento de 20 a 300 m/z em um ciclo de 1 segundo. O forno do CG foi iniciado em temperatura de 90°C por 2 minutos, seguido com aumento de 10°C por minuto até alcançar 150°C, e posteriormente com elevação gradativa de 40°C por minuto até 230°C. A temperatura do injetor foi de 250°C e o detector CG/MS mantido em 230°C. O monitoramento no modo SIM foi de 62 m/z e 75m/z, baseado em procedimento de padronização interna.

5.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise estatística dos dados foi realizada através de *software* de análise de variância, *One Way ANOVA* (OriginPro, versão 8.1.10.86), com valor de significância menor que 0,05.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho da amostragem foi considerado adequado para obtenção de estimativa razoável para os teores de CE em cachaças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. A Tabela 7 (a, b e c) apresenta as médias e desvios padrão de CE para cada amostra e região analisada.

Tabela 7a – Valores de média e desvio padrão (DP) das cachaças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro (Centro e Zona Norte).

Centro		Zona Norte	
Amostra	CE ($\mu\text{g L}^{-1}$) Média e DP	Amostra	CE ($\mu\text{g L}^{-1}$) Média e DP
Não envelhecidas		Não Envelhecidas	
A	431,34 \pm 13,97	A	281,69 \pm 18,75
A2	303,20 \pm 21,23	A2	292,49 \pm 10,55
A3	395,39 \pm 27,18	A3	334,37 \pm 11,11
A4	497,01 \pm 31,65	A4	354,80 \pm 37,18
A5	413,37 \pm 17,63	B	470,26 \pm 15,02
B	494,42 \pm 22,28	D	257,96 \pm 16,74
D	268,12 \pm 15,17	E	42,95 \pm 1,26
D2	268,89 \pm 12,39	E2	68,86 \pm 2,14
E	65,75 \pm 2,51	F	171,24 \pm 5,81
E2	81,94 \pm 7,36	G	< 5,00
E3	64,43 \pm 8,03	L2	290,27 \pm 32,75
F	131,11 \pm 9,13	N	41,50 \pm 15,22
F2	140,96 \pm 5,94	N2	44,33 \pm 6,99
G	< 5,00	N3	52,12 \pm 6,24
H	260,45 \pm 13,55	P	< 5,00
K	270,02 \pm 14,08	P2	< 5,00
K2	304,82 \pm 21,42	Q	72,68 \pm 4,37
K3	225,71 \pm 12,55	S	137,73 \pm 33,92
L4	183,86 \pm 5,59	T	226,20 \pm 12,51
Média	252,67 \pm 148,79	U	176,01 \pm 7,74
Envelhecidas		V	63,23 \pm 2,48
C	< 5,00	X	237,71 \pm 24,84
E4	104,34 \pm 2,11	Média	172,21 \pm 136,97
E5	95,39 \pm 5,13	Envelhecidas	
I	64,12 \pm 4,04	C	33,32 \pm 58,45
I2	57,84 \pm 17,99	G2	93,08 \pm 16,60
J	12,24 \pm 3,99	J	53,78 \pm 5,41
J2	11,41 \pm 2,93	J2	24,15 \pm 3,45
K4	608,80 \pm 27,11	J3	51,57 \pm 3,14
L	202,14 \pm 9,44	L	191,18 \pm 5,54
L2	189,12 \pm 13,38	N4	218,08 \pm 46,29
L3	196,14 \pm 7,36	R	525,66 \pm 8,33
Média	140,14 \pm 172,46	Média	148,85 \pm 168,64
Média Total	211,41 \pm 164,44	Média Total	160,24 \pm 142,61

< 5,00 = Amostras com valores abaixo de 5 µg L⁻¹ foram consideradas como zero para fins de cálculo,
CE = carbamato de etila, DP = desvio padrão

Tabela 7b – Valores de média e desvio padrão (DP) das cachaças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro (Zona Sul e Zona Oeste).

Zona Sul		Zona Oeste	
Amostra	CE (µg L ⁻¹) Média e DP	Amostra	CE (µg L ⁻¹) Média e DP
Não envelhecidas		Não envelhecidas	
A	701,55 ± 58,64	A	189,95 ± 6,29
A2	93,63 ± 2,30	A2	72,62 ± 3,36
A3	340,25 ± 10,94	A3	176,29 ± 38,37
A4	332,96 ± 4,99	A4	192,38 ± 3,53
A5	408,69 ± 8,40	B	153,24 ± 9,24
A6	212,94 ± 12,07	B2	219,03 ± 4,29
A7	683,43 ± 20,55	D	229,59 ± 15,86
A8	216,39 ± 16,31	D2	225,83 ± 19,29
E	112,71 ± 13,46	E	201,19 ± 2,52
E2	121,76 ± 4,66	E2	20,12 ± 1,28
E3	113,94 ± 4,74	E3	25,38 ± 4,20
E4	71,42 ± 2,93	F	52,52 ± 13,04
E5	87,89 ± 7,74	G	< 5,00
E6	117,33 ± 3,78	H	101,14 ± 17,91
E7	86,96 ± 6,58	L	30,98 ± 1,82
F	223,5 ± 6,22	L2	52,24 ± 3,61
G	< 5,00	N2	12,79 ± 3,86
G2	12,82 ± 20,54	P	< 5,00
L2	299,84 ± 15,44	X	123,05 ± 5,15
L3	248,88 ± 24,90	W	31,13 ± 5,97
L4	235,25 ± 7,87	Z	5,81 ± 1,46
L5	300,27 ± 5,68	Média	101,20 ± 85,20
N	270,95 ± 3,52	Envelhecidas	
Média	240,61 ± 179,39	J	< 5,00
Envelhecidas		K	170,38 ± 4,99
I	81,48 ± 4,00	N	110,62 ± 1,62
I2	81,29 ± 3,89	AA	< 5,00
J	29,63 ± 3,16	AA2	< 5,00
J2	101,17 ± 1,47	BB	< 5,00
L	317,14 ± 8,19	R	301,17 ± 60,60
M	102,00 ± 18,37	Y	26,46 ± 2,02
O	424,38 ± 26,91	CC	112,77 ± 4,04
Média	172,52 ± 159,04	Média	80,16 ± 104,62
Média Total	214,35 ± 174,84	Média Total	94,89 ± 90,12

< 5,00 = Amostras com valores abaixo de 5 µg L⁻¹ foram consideradas como zero para fins de cálculo,
CE = carbamato de etila, DP = desvio padrão

Tabela 7c – Valores de média e desvio padrão (DP) das cachaças comercializadas na cidade do Rio de Janeiro.

CE em todas as regiões	
Tipo de cachaça	CE ($\mu\text{g L}^{-1}$) Média e DP
Média não envelhecidas	190,70 \pm 151,56
Média envelhecidas	131,17 \pm 148,37
Média Total	170,22 \pm 152,80

< 5,00 = Amostras com valores abaixo de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ foram consideradas como zero para fins de cálculo, CE = carbamato de etila, DP = desvio padrão

As médias de teores de CE em aguardentes encontradas na Zona Oeste foram significativamente ($p < 0,05$) menores do que nas demais regiões (Centro, Zona Sul e Zona Norte), sendo a única região da cidade com média total ($94,89 \mu\text{g L}^{-1} \pm 90,12$) abaixo do limite estabelecido pela legislação ($150 \mu\text{g L}^{-1}$). Nesta região foram adquiridas cachaças de maior variedade e valor agregado, o que poderia explicar esta diferença. Em contraste, as cachaças do Centro da cidade apresentaram padrão oposto, com menor variação e valor agregado as bebidas adquiridas. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores médios de concentração de CE entre as regiões Norte, Sul e Centro. Embora as cachaças envelhecidas ($131,17 \mu\text{g L}^{-1} \pm 148,37$) tenham apresentado teores menores que as não envelhecidas ($190,70 \mu\text{g L}^{-1} \pm 151,56$), não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras envelhecidas e não envelhecidas. Este resultado corrobora os achados prévios de Andrade-Sobrinho e colaboradores (2002). Baixos teores de concentração de CE ($<5 \mu\text{g L}^{-1}$) foram encontrados na pequena amostragem (4%) de cachaças multidestilladas. Uma vez que o ponto de ebulição de CE apresenta valores de $182\text{-}185^\circ\text{C}$, o teor deste composto em cachaças pode ser monitorado com êxito durante processos de destilação bem conduzidos (ALCARDE; SOUZA; BORTOLETTO, 2012; ALCARDE; SOUZA; BORTOLETTO, 2012b). Vários trabalhos demonstram que etapas de bidestilação podem reduzir o conteúdo de CE em bebidas destiladas. Em *whisky*, por exemplo, apenas 1% do CE formado durante a primeira destilação foi destilado durante a segunda destilação (RIFFIKIN; WILSON; BRINGHURST, 1989). Também é possível observar que, a fração cauda acumula cerca de 15% do CE formado e a vinhaça retém 84% do CE presente na segunda destilação. Na análise de 13 amostras de cachaças comerciais, valores médios de $317 \mu\text{g L}^{-1}$ de CE foram encontrados, porém nas bebidas bidestiladas foram constatados menores teores com médias de $38\text{-}48 \mu\text{g L}^{-1}$ (NAGATO et al., 2000). Em outro trabalho, a redestilação reduziu os teores de CE em aproximadamente 92,5% em 15 amostras

comerciais de cachaça (GALINARO, 2011), Desta maneira, quanto maior o número de destilações, menores serão os teores de CE nas bebidas destiladas, obviamente, em condições bem controladas.

Em estudos anteriores (CARUSO; FARAH-NAGATO; ALABURDA, 2010), as amostras foram distribuídas em grupos de acordo com suas concentrações de CE. Este tipo de classificação foi adotada na Tabela 8, seguindo o padrão: concentração padrão (0-150 $\mu\text{g L}^{-1}$); alta concentração (151-300 $\mu\text{g L}^{-1}$); muito alta concentração (301-800 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 8 – Classificação das amostras de acordo com a concentração de CE.

Grupo	Centro	Zona Norte	Zona Sul	Zona Oeste	Total	%
Amostras com concentração Padrão de CE (0-150 $\mu\text{g L}^{-1}$)	13	16	15	20	64	53,33 %
Amostras com alta concentração de CE (151-300 $\mu\text{g L}^{-1}$)	9	10	8	9	36	30,00 %
Amostras com muito alta concentração de CE (301-800 $\mu\text{g L}^{-1}$)	8	4	7	1	20	16,67 %
Total de amostras	30	30	30	30	120	100,00 %

Aproximadamente 47% das amostras analisadas apresentaram teores de CE acima do limite internacional. Dentre estas, aproximadamente 36% estavam com valores muito altos de CE (de 301-800 $\mu\text{g L}^{-1}$). Das amostras de cachaças dentro dos parâmetros de normalidade de CE (64 ou 53%), cerca de 20 ou 31% foram provenientes da ZO. Inclusive, esta região apresentou apenas uma cachaça com teores muito altos de CE, correspondendo apenas a 5% do total das amostras deste grupo. Por outro lado, no ZC foram adquiridas maior quantidade de amostras

com concentração muito alta de CE, compreendendo 8 ou 40% do total de cachaças analisadas dentro desta classificação.

A Tabela 9 apresenta o total de variedade de marcas das cachaças por região analisada. Do total de 58 marcas distintas de cachaças a ZO apresentou maior variedade, com 35%. As amostras provenientes da ZC e ZS apresentaram menor percentual de variação entre marcas de cachaças, com cada uma destas regiões representando 17% do total.

Tabela 9 – Número e percentual das amostras de acordo com as marcas por região analisada.

	ZC	ZN	ZS	ZO	Total
Número de marcas analisadas	10	18	10	20	58
%	17%	31%	17%	35%	100%

Cachaças de marcas semelhantes foram adquiridas em lotes diferentes

A quantificação de CE em 22 amostras de cachaças comerciais da zona da Mata Mineira encontrou valores médios de $1.206 \mu\text{g L}^{-1}$ de CE com variação de 0,005 a $12.376 \mu\text{g L}^{-1}$. Resultados bem acima da média total de $170,22 \mu\text{g L}^{-1} \pm 152,80$ das 120 amostras analisadas na cidade do Rio de Janeiro, com variação de < 5 a $701,55 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo estes similares aos investigados em cachaças produzidas nas regiões Norte e Sul do Estado de Minas Gerais, com variação de “não detectado” a $643 \mu\text{g L}^{-1}$ (BARCELOS et al., 2007). Outro trabalho buscou investigar também os teores de CE nas regiões Norte e Sul de Minas Gerais. Dentre as 71 amostras analisadas, 63,63% das amostras da região Norte apresentaram concentração acima do preconizado pela legislação, sendo aconselhadas como impróprias para consumo. Em contraste, todas as amostras analisadas da região Sul enquadraram-se dentro dos parâmetros estabelecidos no MAPA (MASSON, 2009). Nóbrega e colaboradores (2009) analisaram as concentrações de CE em aguardentes produzidas em 19 destilarias do Estado da Paraíba. Dentre as 25 marcas de cachaças analisadas, 70% encontravam-se acima dos valores mínimos aceitáveis de CE. A variação dos teores foi de 55 a $700 \mu\text{g L}^{-1}$,

Ainda no ensaio de Baffa Junior (2007), apenas 5 das 22 amostras (23%) analisadas apresentaram teores abaixo de $150 \mu\text{g L}^{-1}$, valor internacionalmente considerado aceitável (BAFFA-JÚNIOR, 2007). Em outro ensaio, foram pesquisados os teores de CE de 188 amostras

de bebidas alcoólicas, como segue: 126 amostras de cachaça (63 da região sudeste, 39 da região nordeste, 22 da região sul e 2 da região centro-oeste), 37 amostras de tiquira, 6 amostras de grapa (1 brasileira e 5 italianas) e 19 amostras de uísque importado (6 americanos e 13 escoceses), Somente 21% das amostras analisadas apresentaram teores abaixo do permitido pela legislação pioneira canadense (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002). Caruso e colaboradores observaram que em 61 amostras comercializadas na Cidade de São Paulo, provenientes de diferentes locais, um total de 32 amostras apresentaram índices de CE acima do preconizado, no qual 17 amostras (28 %) apresentaram valores de 150 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15 amostras (25 %) com resultados acima de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo 6 destas (10 %) acima de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Bruno e colaboradores estudaram a influência dos métodos de destilação na produção de CE em aguardentes de cana no estado do Rio de Janeiro. Aproximadamente 45 % dos produtos apresentam valores de CE acima dos índices preconizados pela legislação. Além disso, estes achados demonstraram que sistemas destilação contínua em coluna promoveram maior formação de CE, no qual apenas uma de sete colunas observadas apresentou resultados de CE menores que 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto 10 entre 16 alambiques de cobre produziram resultados adequados de CE. Adicionalmente, a média de CE produzido por destilação em coluna foi consideravelmente superior as médias encontradas em destilação descontínua em alambiques, Neste caso, não houve correlação positiva entre a presença de íons Cu^{++} e a síntese de CE, confirmando resultados anteriores (LABANCA, 2004; BARCELOS et al., 2007; MASSON, 2009; ZACARONI et al, 2011).

7 CONCLUSÃO

Apesar da disponibilidade de tecnologia, os resultados encontrados no presente estudo indicaram que aproximadamente 47% das amostras de cachaças apresentaram concentrações de CE acima de $150 \mu\text{g L}^{-1}$, no qual foi ligeiramente superior aos 45% relatados em 2007 por Bruno e colaboradores (2007). Altos teores do contaminante podem ser justificados por superaquecimento e baixa taxa de refluxo, pela ausência de utilização de aparato de resfriamento adequado (como, por exemplo, deflegmador) e sistemas de refluxo (por exemplo, pratos borbulhadores) durante processo de destilação (BRUNO; VAITSMAN; KUNIGAMI, 2007; NÓBREGA et al., 2009; RIACHI et al., 2013). A destilação sem separação das frações cabeça, coração e cauda também é capaz de promover valores aumentados de CE. Vem sendo estabelecido que bebidas destiladas produzidas a partir da fração coração apresentam menores teores de CE (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009; RIACHI et al., 2013). De forma alarmante, a redução das concentrações de CE em cachaças tem sido lenta e tímida nos últimos anos e, portanto, os consumidores de cachaça continuam amplamente expostos a este contaminante. As autoridades brasileiras devem exigir o uso de práticas de produção padronizadas que resultem em cachaças de qualidade superior. Dados preliminares também sugerem que o consumo de cachaças multidestilladas pode ser mais indicado para segurança da saúde dos consumidores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRABE, 2011, **Associação Brasileira de Bebidas**. A cachaça, Disponível em: <http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>, Acessado em 22 de agosto de 2013. Brasil.

ALCARDE, A.R.; SOUZA, L.M.; BORTOLETTO, A.M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. **Journal of the Institute of Brewing**, United Kingdom, v. 118, n. 1, p. 27-31. 2012.

ALCARDE, A.R.; SOUZA, L.M.; BORTOLETTO, A.M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. Part 2: influence of type of pot still. **Journal of the Institute of Brewing**, United Kingdom, v. 118, n.4, p. 352-355. 2012b.

ALICEWEB. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Web**. Disponível em <http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=5&menu=1104>. Acessado em 03 de outubro de 2013.

AMARAL, F. A. C.; SILVA, F. L.; SANTOS, G. A. A.; CALIARI, M.; SILVA, F. A. Influência da quantidade de destilação no teor de cobre, aldeído e éster na cachaça orgânica. 63ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC). Disponível em <http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/7028.htm>, Acessado em 06 de janeiro de 2014.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; BOSCOLO, M.; LIMA-BETO, B. S.; FRANCO, D. W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**. São Paulo, v.25, n.6b, Nov/Dez. 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; CAPELLINI, 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.116-1119, 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 (*quercus sp*) e recipiente de vidro. **Química Nova**. São Paulo, v. 34, n..5, 2011

AQUINO, F. W. B.; FRANCO, D. W. F. Dextranas em açúcares do Estado de São Paulo. **Química Nova**. São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1034-1037, 2008.

AQUINO, F.W. B. Dextranas em açúcares e em aguardentes de cana. Tese de Doutorado em Ciências em Química Analítica. **Instituto de Química de São Carlos**, Universidade de São Paulo. São Carlos/SP, 2009.

AQUINO, F.W.B.; FRANCO, D. W. Molecular mass distribution of dextran in Brazilian sugar and insoluble deposits of cachaça. **Food Chemistry**. United Kingdom, v. 114, p. 1391-1395, 2009.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper (II) Catalysis in Cyanide Conversion into Ethyl Carbamate in Spirits and Relevant Reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. United States, v.49, n.6, p. 2819-2824, 2001.

BAAN, R.; SRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V.; ALTERI, A.; COGLIANO, V.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of alcoholic beverages. **The Lancet Oncology**. United Kingdom, v. 8, n. 4, p. 292-3. Abr, 2007.

BADOTTI, F.; VILAÇA, S. T.; ARIAS, A.; ROSA, C. A.; BARRIO, E. Two interbreeding populations of *Saccharomyces cerevisiae* strains coexist in cachaça fermentations from Brazil. **FEMS Yeast Research**. United States, v. 10 n.1111, p. 1567-1364, 2013.

BAFFA JÚNIOR, J. C.; 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 Mata Mineira – MG. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.18, n.4, p. 371-373, out./dez. 2007.

BAFFA JÚNIOR, J. C. Mecanismos de formação de carbamato de etila durante a produção e estocagem de aguardentes de cana-de-açúcar. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. 2011.

BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; DOS 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, H. B.; PAGE, B. D.; Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Additives and Contaminants**. United States, v. 7, n. 4, p. 477-96. Jul/ago, 1990.

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

BELAND, F. A.; BENSON, R. W.; MELLICK, P. W.; KOVATCH, R. M.; ROBERTS, D. W.; FANG, J. L.; DOERGE, D. R. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. **Food and Chemical Toxicology**. United Kingdom, v. 43, n. 1, p. 1-19. Jan, 2005.

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

BLACK, M. M.; SPEER, F. D. Urethane plus triethylene melamine therapy in human cancer cases. **New York State Journal of Medicine**. United States, v. 54, n.10, p. 1477-80. Mai, 1954.

BLACK, M. M.; SPEER, F. D. In vitro and clinical effects of urethane plus triethylene melamine on human breast cancer. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**. United States, v. 102, n.4, p. 420-6. Abr, 1956.

BORRAGINI, M. C. C. Envelhecimento da cachaça com circulação forçada e aeração. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara/SP, 2009.

BOSCOLO, M. Caramelo e carbamato de etila em aguardentes de cana: ocorrência e quantificação. Tese de Doutorado em Ciências em Química Analítica. **Instituto de Química de São Carlos**, Universidade de São Paulo. São Carlos/SP, 2001.

BOSQUEIRO, A. C. Composição química da aguardente de cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambiques simples. Dissertação de Mestrado em Ciências – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2010.

BRASIL, 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa no 13, de 29 de junho de 2005, Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jun, 2005, p. 3.

BRASIL, 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC n° 20. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/edbef8804745959d9d90dd3fbc4c6735/RDC_20_2007.pdf?MOD=AJPERES. Acessado em 15 de dezembro de 2013.

BRASIL, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico da agroenergia**. Brasília. MAPA, 2009. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/anuario_cana.pdf. Acessado em 02 de dezembro de 2013.

BRASIL, 2009b. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Portaria n° 276, de 24 de setembro de 2009, Aprova o Regulamento de avaliação de conformidade da cachaça. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/rtac/pdf/RTAC001497.pdf>. Acesso em 22 de setembro de 2013.

BRASIL, 2010. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 20, de 19 de julho de 2010. Alteração do item 13.3 do anexo da IN n° 13, de 29/06/2005. **Diário Oficial da União**, 20/07/2010, seção 1, n, 137 p, 8.

BRASIL, 2011. Ministério do Turismo, Instituto Brasileiro do Turismo, Embratur 2011, Disponível em http://www.dadosefatos.turismo.gov.br/dadosefatos/geral_interna/noticias/detalhe/20110926-4.html. Acessado em 08 de novembro de 2013.

BRASIL, 2012a. Governo do Estado do Rio de Janeiro, Lei n° 6921, de 06 de julho de 2012, Aprova o Projeto de Lei n° 417/2011. **Cachaça como Patrimônio Histórico Cultural do Estado do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://www.alerj.rj.gov.br/processo2.htm>. Acessado em 28 de agosto de 2013.

BRASIL, 2012b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico da agroenergia**. Brasília. MAPA, 2012. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/anuario_agroenergia_web_2012.pdf. Acessado em 02 de dezembro de 2013.

BRASIL, 2013. Governo Federal, Decreto nº 7.968, de 26 de março de 2013. Altera o anexo ao Decreto nº 6,871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, mar, 2013.

BRUNO, S. N. F. Adequação dos processos de destilação e de troca iônica na redução dos teores de carbamato e etila em cachaças produzidas no estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Instituto de Química**. Rio de Janeiro/RJ, 2006.

BRUNO, S. N. F.; VAITSMAN, D. S.; KUNIGAMI, C. N.; M. G. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**. United Kingdom, vol. 104, p. 1345-1352, 2007.

BRUNO, S. N. F. Distillation of Brazilian Sugar Cane Spirits. Revista Internacional do Conhecimento. Ano 3, Número 5, 2012. Disponível em <http://revistainternacionaldoconhecimento.wordpress.com/2012/05/02/destilao-distillation-of-brazilian-sugar-cane-spirits-cachaas-by-sergio-nicolau-freire-bruno/>. Acessado em 05 de janeiro de 2014.

CANUTO, M. H. Influência de alguns parâmetros na produção de cachaça: linhagem de levedura, temperatura de fermentação e corte do destilado. Tese de Doutorado em Ciências em Química. Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG, 2013.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise tempo-intensidade de características sensoriais de cachaça de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus sp.*), **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v, 33, n, 1, p, 27-34, 1999.

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

CAVALCANTI, A. F. Bidestilação em alambiques de cobre contendo dispositivos de prata e cobre e sua influência na qualidade da cachaça. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara/SP, 2009.

CHIRSTOFOLETTI, C. A. 1.;ESCHER, J. P.;CORREIA, J. E.;MARINHO, J. F.; FONTANETTI, C. S.Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**. United States, vol. 33, n. 12, p. 2752-61, 2013.

COOK, R.; MCAIG, J. M. B.; MCMILLAN.; LUMSDEN, W. B. Ethyl carbamate formation in grain-based spirits: Part III. The primary source. **Journal of the Institute of Brewing**. United Kingdom, v. 96, p. 233-244, 1990.

DA SILVA, A. A.; OHE, T. H. K.; FRANCO, D. W. Decaimento de íons cianato e a formação de carbamato de etila. **Química Nova**. São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1101-1103, 2013.

DE SOUZA, P. P.; CARDEALZ. L.;AUGUSTI, R.;MORRISON, P.;MARRIOT, P.J. Determination of volatile compounds in Brazilian distilled cachaça by using comprehensive two-dimensional gas chromatography and effects of production pathways. **Journal of Chromatography A**. United States, vol.1216, n. 14, p. 2881-90, 2009.

DE SOUZA, P. P.; RESENDE,A. M.; AUGUSTI, D.V.; BADOTTI, F.; GOMES, F. C.; CATHARIANO, R. R; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Artificially-aged cachaça samples characterised by direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry. **Food Chemistry**. United Kingdom, v. 15, n. 143, p. 77-81, jul 2013.

DONGPENG, W.; YANG, B.; ZHAI, L. Z.Synthesis of Diethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea. **Fuel Processing Technology**. United States, v. 88, n. 8, p. 807 -812, 2007.

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

DUARTE, F.W.; SOUSA, F.V.M.; DIAS, R.D.; SCHWUAN, R.F. Effect of Co-Inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the Quality of the Distilled Sugar Cane average Cachaça. **Journal of Food Science**. United States, v. 76, p.1307- 1318,

2011.

EFSA, 2007. European Food Safety Authority. 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.

Acessado em 22 de novembro de 2013.

EMBRAPA, 2011. **Cachaça**. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>>. Acessado em 08 de dezembro de 2013.

ESPINOZA, L. J. S. Tecnologia de produção da cachaça. Princípios do Processo de Produção de Cachaça de Qualidade. Conselho Regional de Química IV Região (SP/MS). Disponível em http://www.crq4.org.br/downloads/tec_cachaca.pdf. Acessado em 08 de dezembro de 2013.

FARIA, J. B. A redução dos teores de cobre contaminante das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum* L.) brasileiras. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP, 1982, 52p.

FARIA, J. B. A influência do cobre na qualidade das aguardentes da cana (*Sacharum officinarum* L.). Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

FARIA, J. B.; FERREIRA, V.; LOPEZ, R.; CACHO, J. The sensory characteristic defect of “cachaça” distilled in absence of copper. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2003.

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

FIELD, K. J.; LANG, C.M. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. **Laboratory Animals**. United States, v.22, n. 3, p. 255-62. Jul, 1988.

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

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

HASNIP, S.; CREWS, C.; POTTER, N.; CHRISTY, J.; CHAN, D.; BONDU, T.; MATTHEWS, W.; WALTERS, B.; PATEL, K. Survey of Ethyl Carbamate in Fermented Foods Sold in the United Kingdom in 2004. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. United States, v, 55, n,7, p, 2755-2759, 2007.

HESFORD, F.; SCHNEIDER, K. Validation of a simple method for the determination of ethyl carbamate in stone fruit brandies by GC-MS. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**. Deutschland, v. 92, p. 250-259. 2001.

HIRSCHBOECK, J. S.; LINDERT, M. C.; CHASE, J.; CALVY, T. L. Effects of urethane in the treatment of leukemia and metastatic malignant tumors. **Journal of the American Medical Association**. United States, v. 136, n.2, p. 90-5. Jan, 1948.

HOFFLER, U.; EL-MASRI, H. A.; GHANAYAM, B. I. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) Is the Principal Enzyme Responsible for Urethane Metabolism: Comparative Studies Using CYP2E1-Null and Wild-Type Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. United States, v. 305, n. 2, p. 557-564, 2003.

HOFFLER, U.; GHANAYAM, B. I. Increased bioaccumulation of urethane in CYP2E1 -/- versus CYP2E1+/+ mice. **Drug Metabolism and Disposition**. United States, v. 33, n. 8, p. 1144-1150, 2005.

IARC, 2010. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **IARC Monographs**. vol 96. Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate (Urethane). 2010. Disponível em [:http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/mono96.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/mono96.pdf). Acessado em 30 de dezembro de 2013.

IBC, 2005. Institutional Biosafety Committee. Working with Urethane. Disponível em <http://www.vcu.edu/oehs/chemical/biosafe/urethane.pdf>. Acessado em 10 de janeiro de 2014.

IBRAC, 2011. O panorama do setor da Cachaça e as oportunidades para o micro e pequeno produtor. Instituto Brasileiro da Cachaça. **Reunião Nacional dos Gestores de Projetos de “Derivados de Cana”**. Porto Alegre, 01 de setembro de 2011, Disponível em:

<http://www.sebrae.com.br/setor/derivados-de-cana/cachaca/mercado/no-brasil/O%20panorama%20do%20setor%20da%20Cachaca%20-%20IBRAC.pdf>.

Acessado em 01 de novembro de 2013.

IBRAC, 2013. Instituto Brasileiro da Cachaça, O caminho e os desafios da cachaça,

Disponível em: <http://www.ibraccachacas.org/index.php/noticias/cachaca-na-midia/271-o-caminho-e-os-desafios-da-cachaca>, Acessado em 11 de novembro de 2013.

JANZANTTI, N.S. Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça. 2004. Tese de Doutorado em Ciências dos Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 2004.

KLEIN, M. Induction of lung adenomas following exposure of pregnant, newborn, and immature male mice to urethan. **Cancer Research**. United States. v. 14, n. 6, p. 438-40. Jul, 1954.

KRISTIANSEN, E.; CLEMMENSEN, S.; MEYER, O. Chronic ethanol intake and reduction of lung tumours from urethane in strain A mice. **Food and Chemical Toxicology**. United Kingdom, v. 28, n. 1, p. 35-8. Jan, 1990.

LABANCA, R. A. Teores de carbamato de etila, cobre e grau alcoólico em aguardentes produzidas em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG. 2004.

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

LACHENMEIER, D. W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. United States, v. 1108, n.1, p.116-20. Mar, 2006.

LACHENMEIER, D. W.; KANTERES, F.; KUBALLA, T.; LÓPEZ, M. G.; REHM, D. J. Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages from Mexico (Tequila, Mezcal, Bacanora, Sotol)

and Guatemala (Cuxa): Market Survey and Risk Assessment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. United States, v.6, p. 349-360, 2009.

LACHENMEIER, D.W.; LIMA, M. C. P.; NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; KERR-CORREA, F.; KANTERES, F.; REHM, J. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **Biomed Central**. United Kingdom, v.10, p. 266 -281, 2010.

LAPIDES, J. Clinical value of urethane therapy in prostatic cancer. **Cancer**. United States, v.2, n.3, p. 469-74. Mai, 1949.

LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. Fermented Beverage Production. 2, ed, New York, Boston. Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003, 423p.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**. United States, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.

LELIS, V. G. Ocorrência de carbamato de etila e sua formação na cachaça. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos. Programa de Pós Graduação de em Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2006.

LIMA, A. J. B.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; LIMA, J. L.; NELSON, D. L. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**. São Paulo, v.32, n.4, p. 845-848, 2009.

LIMA, L. M. Z. Influência da luz na composição fenólica, na atividade antioxidante e na concentração de carbamato de etila de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras. Tese de Doutorado em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG. 2012.

LOPEZ, R. Cachaça brasileira planeja conquistar mercado externo. **Engarrafador Moderno**, n. 134, p. 6-13, 2005.

LUEBKE, R. W.; ROGERS, R. R.; RIDDLE, M. M.; ROWE, D. G.; SMIALOWICZ, R. J. Alteration of immune function in mice following carcinogen exposure, **Immunopharmacology**. United States, v. 13, n. 1, p. 1-9. 1987.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. Tecnologia das cachaças de alambique, Belo Horizonte, SEBRAE/MG, SINDBEBIDAS, 2005, 129 p.

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

MASSON, J. Determinação dos Teores de carbamato de etila e de acroleína em aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2009.

MENDES, T. A. O.; PINTO, L. M.; MENDES, D. S. O.; MALTA, H. L.; OLIVEIRA, E. S. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**. Brasil. Vol. 16, n. 2, p. 81-89, abr/jun, 2013.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p.897-901, out-dez, 2007.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho, **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas, v. 28, p. 84-89, dez, 2008.

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

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente. In: VENTURINI FILHO, W. G. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 20, p. 485-524.

NAGATO, L. A. F.; 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**. Spanish, v. 31, p. 31-36. 2000.

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

NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; PAIVA, J. E.; LACHENMEIER, D. W. Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions. **Food Chemistry**. United Kingdom. v. 117, p. 693-697, 2009.

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

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

NOVAES, F, V, Processo de dupla destilação, In: SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, Programa de fortalecimento do setor de aguardente de cana-de-açúcar e seus derivados do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999, 118p,

NTP, 2011. National Toxicology Program. Department of Health and Human Services. Urethane. Report on Carcinogens, 11th ed: 1-2. Disponível em <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Urethane.pdf>. Acessado em 14 de janeiro de 2014.

OMS/WHO. 2012. Organização Mundial de Saúde / World Health Organization. Food safety: chemical risks in foods. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_report_64_final.pdf. Acessado em 29 de dezembro de 2013.

OUGH, C. S.; Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. United States, v. 24, n. 2, p. 323-8. Mar/Abr, 1976.

PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.v, 28, n,1, p, 193-199, jan/mar, 2008.

PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. G.; AZEVEDO, S. M.; MORAIS, A. R.; FERNADES, W.; AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v..27, n. 5, p.1068-1075, set./out., 2003.

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

PERESTRELO, R.; PETRONILHO, S.; CÂMARA, J. S.; ROCHA, S. M.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction as a powerful tool for quantification of ethyl carbamate in fortified wines. The case study of Madeira wine. **Journal of Chromatography A**. United States, v. 1217, n. 20, p. 3441-5. Mai, 2010.

PIGGOTT, J. R.; SHARP, R.; DUCAN, R. E. B. The science and technology of whiskies. New York: Longman, 1989. 410 p.

PORTAL NIPPO-BRASIL, 2011. Cana-de-açúcar colocar o Brasil na vanguarda tecnológica mundial. Disponível em <<http://www.nippobrasil.com.br/campo/especiais/especial563.php>>. Acessado em 24 de outubro de 2013.

PULZATTO, M. E. Fatores que Influem na Obtenção de Biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces Cerevisiae*) da Fermentação Alcoólica. 2000. 112 f. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 2000.

Qnesc, 2013. Química Nova na Escola. Origem, produção e composição química da cachaça, N° 18, novembro de 2013, Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc18/18-A01.pdf>. Acessado em 19 de novembro.

RECHE, R. V.; LEITE NETO, A. F.; DA SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; DE OSTI, R. Z.; FRANCO, D. W. Influence of Type of Distillation Apparatus on Chemical Profiles of Brazilian Cachaças. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. United States, v. 55, n. 16, p. 6603-6608, 2007.

RECHE, R. V.; FRANCO, D. W. Distinção entre cachaças destiladas em alambiques e em colunas usando quimiometria. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 2, p. 332-336, 2009.

RIACCHI, L. G.; SANTOS, A.; MOREIRA, R. F.; DE MARIA C. A. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. **Food Chemistry**. United Kingdom, vol. 15, n. 14, p-159-69, 2013.

RIFFIKIN, H.L.; WILSON, R.; BRINGHURST, T.A. The possible involvement of Cu⁺² peptide/protein complexes in the formation of ethyl carbamate. **Journal of the Institute of Brewing**. United Kingdom, v. 95, n. 2, p. 121-122, 1989.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, E. A. A. Q. Expansão da exportação de cachaça brasileira: uma nova oportunidade de negócios internacionais, In: **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**. Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos-SP. 2007.

ROTA, M. B.; Efeito da bidestilação na qualidade sensorial da cachaça. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP, 2008.

ROTA, M. B.; FARIA, J. B. Efeito do processo de bidestilação na qualidade sensorial da cachaça. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 20, n.1, p. 121-127. jan/mar, 2009

SAE-ROM, P.; SANG-DO, H.; JI-HO, Y.; SUNG-YONG, L.; KWON-PYO, H.; EUN-HYE, L.; HYE-JUNG, Y.; NAM-GYOON, Y.; DONG-HO, B. Exposure to ethyl carbamate in alcohol-drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration, **Food Control**. United States, v. 20, p. 946-952, 2009.

SAKANO, K.; OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**. United Kingdom. v. 33, n. 5, p. 703-714, set. 2002.

SCHLATTER, J.; DINOVI, M.; SETZER, R. W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic Example: Ethyl carbamate (CAS 51-79-6). **Food and Chemical Toxicology**. United States, v. 48, p. 63–68, 2010.

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

<http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=7723&langId=en>. Acessado em 04 de janeiro de 2014.

SERAFIM, F.A.T.; SILVA, A.A.; GALINARO, C.A.; FRANCO, D.W. Comparação do perfil químico entre cachaças de um mesmo vinho destiladas em alambiques e em colunas. **Química Nova**, São Carlos, v. 35, n. 7, p. 1412-1416, 2012.

SERMAN, M.[Recurring cancer of the tongue treated with intracarotid urethane]. **El Día Médico**. España, v. 27, n.30, p.832. Mai, 1955.

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

SILVA, P. H. A.; SANTOS, J. O.; ARAÚJO, L. D.; FARIA, F. C.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, V. A.; VICENTE, M. A.; BRANDÃO, R. L. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Brasil, v. 29, p. 100-106, 2009.

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

SOUZA, A. P. Produção de aguardentes de cana-de-açúcar por dupla destilação em alambique retificador. 2009. 99p. Dissertação de Mestrado em Ciências – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2009.

TEITEL, A.; CHIRITZA, C.; DEMETRESCO, C.; GORK, E.; MaVRODIN, A. [On the cytostatic action "in vivo" of some new synthetic carbamic esters. Action of a new O-tertiary-alkylated urethane in the treatment of experimental cancer]. **Thérapie**. France, v.20, n.6, p. 1431-42. Nov/Dez, 1965.

UTHURRY, C. A.; VARELA, F.; COLOMO, B.; LEPE, J.A. S.; LOMBARDEIRO, J.; GARCIA DEL HIERRO, J. R. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. **Food Chemistry**. United Kingdom, v.88, p. 329–336, 2004.

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

VESSELINOVITCH, S. D.; MIHAILOVICH, N.; RAO, K. V.; ITZE, L. Perinatal carcinogenesis by urethan. **Cancer Research**. United States, v. 31, n. 12, p. 2143-7. Dez, 1971.

VIÉGAS, E. K. D.; CRUZ, S. H.; LIMA, U. A.; ALCARDE, A. R. Potencialidade da madeira de eucalipto para o armazenamento da cachaça, II Congresso Brasileiro de Eucalipto, 2013. Disponível em <http://www.congressoeucalipto2013.com.br/trabalhos/trab10.pdf>. Acessado em 08 de janeiro de 2014.

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

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

YOKOYA, F. Fabricação da aguardente de cana: série Fementações Industriais, N° 2ª; Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. 92p, 1995.

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**. United States, v. 259, n.3-4, p. 325-50. Mar/Abr, 1991.