

RENATA ADRIANA LABANCA

**CARBAMATO DE ETILA E SEUS PRECURSORES
EM AGUARDENTE DE CANA: MÉTODOS DE
ANÁLISE E SUAS CORRELAÇÕES**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**

RENATA ADRIANA LABANCA

**CARBAMATO DE ETILA E SEUS PRECURSORES
EM AGUARDENTE DE CANA: MÉTODOS DE
ANÁLISE E SUAS CORRELAÇÕES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Beatriz Abreu Glória

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA – DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RENATA ADRIANA LABANCA

**CARBAMATO DE ETILA E SEUS PRECURSORES EM AGUARDENTE DE
CANA: MÉTODO DE ANÁLISE E SUAS CORRELAÇÕES**

TESE APROVADA EM 25 DE SETEMBRO DE 2009

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. DAVID LEE NELSON

Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES

Dr. JOÃO BOSCO FARIA

Dra. MARIEM RODRIGUES RIBEIRO

Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA
Orientadora

L112c Labanca, Renata Adriana
Carbamato de etila e seus precursores em aguardente de cana :
métodos de análise e suas correlações / Renata Adriana Labanca,
2009. -
203 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos.

1. Aguardente de cana – Teses. 2. Bebidas destiladas – Teses.
3. Carbamato de etila – Teses. 4. Carcinógenos – Teses. 5.
Cianetos – Teses. 6. Uréia – Teses. I. Glória, Maria Beatriz Abreu. II.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III.
Título.

CDD 663.59

A minha orientadora, professora Maria Beatriz Abreu Glória, pelos anos de convivência e aprendizado. Aos meus amados pais e queridos irmãos, pela felicidade de ter uma família tão especial. Ao meu noivo, Augusto Cesar de Almeida Santos, pelo amor e carinho. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dr^a. Maria Beatriz Abreu Glória, pela amizade, conhecimento, paciência, confiança e orientação.

Aos Professores do departamento de pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelos ensinamentos ao longo de todos estes anos.

Aos funcionários da pós-graduação em Ciência de Alimentos pela atenção e amizade ao longos destes anos.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiarem o projeto.

Aos funcionários da FUNED, em nome da Rita Lopes Portocarrero Naveira, em especial, ao Serviço de Química, coordenado pela Tânia Mara Amâncio Guerra Peixoto. As amizades feitas ao longo destes dois anos, principalmente a turma do Laboratório de Contaminantes Metálicos: Anderson Caldeira de Oliveira, Claudia F. Soares da Silva, Fabíola C. Aquino Silva, João Gustavo Camões, João Paulo Trigueiro, Nilton de Oliveira Couto e Thiago Geraldo Soares.

Devo também agradecer aos proprietários dos alambiques pelas suas contribuições para a realização da pesquisa *in loco*. Estes foram Sr. Luiz Malatesta, professor Sérgio Bambirra, e o Sr. Elton.

A FUNCESI, em especial aos amigos “VIAGUITANOS”, Silvia Teodoro de Oliveira, Guilherme Carneiro e Helen Azevedo Jannotti Siqueira. Aos coordenadores dos cursos de Farmácia e Nutrição, Daniela Eugênia e Poliana, e aos alunos, que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

A Sheilla Vitorino pelos ensinamentos na parte estatística. A professora Isabel Rodrigues, pelos ensinamentos em planejamento fatorial e pela lição de vida.

A madrinha Sami Dênia de Oliveira pela grande amizade em todos os momentos.

A comadre Raquel Linhares Carreira pelo presente maravilhoso que me deu no início do doutorado, a Isabella é muito importante em minha vida, obrigada!

A Isabella, minha afilhada linda, obrigada pelas alegrias vivenciada, muita outras virão.

A amiga Renata Barbosa Oliveira, sua determinação e carinho me motivam sempre.

A Viviane Dias Medeiros, por ser tão disponível e atenciosa, você é muito especial.

A amiga Lúcia de Almeida Peret, seus conselhos me ajudam sempre.

Aos amigos do COLTEC, sempre presentes em meu coração: Valéria Guimarães Santos, Flávio Henrique Nazareno, Douglas Marques e Adriana, João Fernando Melo Fonseca e Ana, Leandro Rocha e Emerson Amaral e Lidiane.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Adriana Mendonça, Ana Amélia Paolucci, Bruno Dela Paula, Bruno Botelho, Cecília Muller, Cristina Naghetini, Cyntia Karine Barreto Batista, Flávia Beatriz Custódio, Flávia Vitorino, Giuliana Elisa de Oliveira, Juliana Rigueira, Lívia M. Schmidt, Silvia Mendonça Vieira, Warley Pinheiro Evangelista, Tânia Maria Leite, Tarliane Silva e Tássia Souza, sentirei muitas saudades.

A minha família e a família do meu noivo, por entender meus momentos de ausência. Em especial aos meus pais, José Hott Labanca e Maria Aparecida Cosendey Labanca; meus irmãos, Rogério Cosendey Labanca e Rosângela Cosendey labanca.

Ao meu noivo, Augusto Cesar de Almeida Santos, pela paciência em ir comigo aos “passeios” em alguns alambiques, ajuda em momentos de sufoco, agradeço a você, que junto comigo vibra a cada vitória conquistada.

Aos meus sogros, Sr. Nuno Manoel de Almeida Santos e Dona Vera Luiza Cesar de Almeida Santos, sempre muito presentes na minha vida, me incentivando sempre. Aos meus cunhados e concunhados, Patrícia Joviano, Leonardo Lamonier, Flávio Cesar, Fernanda Couto, Rodrigo Cesar, Gabriela Cesar, Arthur, Luísa Cesar e Rodrigo. E as mais novas sobrinhas do pedaço: Camila e Laís.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus, por me dar uma nova oportunidade todos os dias.

SABER DISCERNIR OS MOMENTOS

Debaixo do céu há momento para tudo e tempo certo para cada coisa:

Tempo para nascer e tempo para morrer.

Tempo para plantar e tempo para arrancar as plantas.

Tempo para matar e tempo para curar.

Tempo para chorar e tempo para rir.

Tempo para gemer e tempo para bailar.

Tempo para abraçar e tempo para se separar.

Tempo para procurar e tempo para perder.

Tempo para calar e tempo para falar.

Tempo para amar e tempo para odiar.

Tempo para a guerra e tempo para a paz.

(Ecl 3, 1-8)

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	20
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
REVISÃO DA LITERATURA	27
1. AGUARDENTE DE CANA	27
1.1. COMPOSIÇÃO DA AGUARDENTE DE CANA	28
1.2. PROCESSAMENTO DA AGUARDENTE DE CANA	30
1.3. MATÉRIA PRIMA	31
1.4. FERMENTAÇÃO	32
1.4.1. Preparo do mosto	34
1.4.2. Preparo do pé de cuba	35
1.4.3. Fermentação propriamente dita	36
1.5. DESTILAÇÃO	37
1.6. ENVELHECIMENTO	39
1.7. ENVASE E ROTULAGEM	40
1.8. ASPECTOS DE IDENTIDADE E QUALIDADE	41
2. CARBAMATO DE ETILA	43
2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	43
2.2. OCORRÊNCIA	44
2.3. LEGISLAÇÃO	45
2.4. FORMAÇÃO	47
2.4.1. Formação em vinhos	47
2.4.2. Formação em bebidas destiladas	48
2.4.3. Formação em cerveja, pães e molhos	52
2.5. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	53
2.6. REDUÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA EM BEBIDAS ALCOÓLICAS	56
2.7. MÉTODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA	58
2.7.1. Extração e purificação	58
2.7.2. Separação e quantificação	59
2.7.3. Uso do padrão interno deuteroado para determinação do carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM	62
2.7.4. Cromatografia líquida de alta eficiência	64

3.	PRINCIPAIS PRECURSORES DO CARBAMATO DE ETILA	65
3.1.	UREIA	65
3.1.1.	Características físico químicas	65
3.1.2.	Ocorrência em bebidas alcoólicas	65
3.1.3.	Aspectos toxicológicos	67
3.1.4.	Metodologia analítica	67
3.2.	CIANETO	67
3.2.1.	Características físico químicas	67
3.2.2.	Ocorrência em bebidas alcoólicas	67
3.2.3.	Aspectos toxicológicos	69
3.2.4.	Metodologia analítica para a detecção de cianeto em bebidas alcoólicas	70
3.3.	COBRE	71
3.3.1.	Características físico químicas	71
3.3.2.	Ocorrência e legislação em aguardentes de cana	72
3.3.3.	Aspectos toxicológicos	76
3.3.4.	Metodologia analítica	77
4.	OTIMIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS	79
4.1.	PLANEJAMENTO FATORIAL	79
4.2.	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS	80
4.2.1.	Linearidade	80
4.2.2.	Efeito da Matriz	81
4.2.3.	Seletividade	82
4.2.4.	Exatidão e precisão	82
4.2.5.	Limites de detecção e quantificação	86
	PARTE EXPERIMENTAL	88
	CAPÍTULO I.	
	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE UREIA EM AGUARDENTE DE CANA	89
1.	OBJETIVOS	90
2.	MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1.	MATERIAL	90
2.1.1.	Amostras	90
2.1.2.	Reagentes, padrões e soluções	91
2.2.	MÉTODOS	91
2.2.1.	Otimização de método para determinação de ureia em aguardente de cana	91
2.2.2.	Validação da metodologia para determinação de ureia em aguardente de cana	92
2.2.2.1.	Linearidade	92
2.2.2.2.	Limite de detecção do equipamento	93
2.2.2.3.	Limite de detecção do método	93
2.2.2.4.	Limite de quantificação do método	93
2.2.2.5.	Especificidade e seletividade	93
2.2.2.6.	Exatidão e precisão	93

2.3.	CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE UREIA E OS TEORES DE CARBAMATO DE ETILA NAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DE AGUARDENTE DE CANA	94
2.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	94
2.5.	CUIDADOS	94
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
3.1.	OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE UREIA EM AGUARDENTE DE CANA	95
3.2.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE UREIA EM AGUARDENTE DE CANA	95
3.2.1.	Linearidade	95
3.2.2.	Limite de detecção do equipamento	95
3.2.3.	Limite de detecção do método	96
3.2.4.	Limite de quantificação do método	96
3.2.5.	Especificidade e seletividade	96
3.2.6.	Exatidão e precisão	97
3.3.	CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE UREIA E OS TEORES DE CARBAMATO DE ETILA NAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DE AGUARDENTE DE CANA	99
4.	CONCLUSÕES	100

CAPÍTULO II.

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A ANÁLISE DE CIANETO EM AGUARDENTES DE CANA

		101
1.	OBJETIVOS	102
2.	MATERIAL E MÉTODOS	102
2.1.	MATERIAL	102
2.1.1.	Amostras	102
2.1.2.	Reagentes, padrões e soluções	102
2.2.	MÉTODOS	104
2.2.1.	Comparação de métodos para a quantificação de cianeto em aguardente de cana	104
2.2.1.1.	Otimização dos métodos para determinação dos teores de cianeto em aguardente de cana	104
2.2.1.2.	Estudo da interferência da sacarose com ácido pícrico para determinação de cianeto em aguardentes de cana por espectrofotometria	105
2.2.2.	Validação da metodologia para determinação de cianeto em aguardente de cana	106
2.2.2.1.	Linearidade	106
2.2.2.2.	Efeito da Matriz	106
2.2.2.3.	Exatidão e precisão	106
2.2.2.4.	Limite de detecção do equipamento	108
2.2.2.5.	Limite de quantificação do método	108
2.2.3.	Determinação dos teores de cianeto em amostras de aguardente de cana	108
2.2.4.	Correlação entre os teores de cianeto e carbamato de etila em amostras de aguardente de cana	108
2.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	108
2.4.	CUIDADOS	109

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.1.	OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CIANETO EM AGUARDENTE DE CANA	109
3.1.1.	Estudo da interferência da sacarose com ácido pícrico para determinação de cianeto em aguardentes de cana por espectrofotometria	109
3.2.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CIANETO EM AGUARDENTE DE CANA	110
3.2.1.	Linearidade	110
3.2.2.	Efeito da Matriz	111
3.2.3.	Exatidão e precisão	112
3.2.4.	Limite de detecção do equipamento, limite de detecção e de quantificação do método	114
3.3.	TEORES DE CIANETO EM AGUARDENTE DE CANA	114
3.4.	CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE CIANETO E CARBAMATO DE ETILA EM AMOSTRAS DE AGUARDENTE DE CANA	115
4.	CONCLUSÕES	117

CAPÍTULO III.

	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COBRE EM AGUARDENTE DE CANA POR ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA E TEORES DE COBRE EM DIFERENTES FRAÇÕES ALCOÓLICAS NO PROCESSO DE DESTILAÇÃO	118
1.	OBJETIVOS	119
2.	MATERIAL E MÉTODOS	119
2.1.	MATERIAL	119
2.1.1.	Amostras	119
2.1.2.	Reagentes, padrões e soluções	120
2.2.	MÉTODOS	120
2.2.1.	Validação da metodologia para análise de cobre em aguardente de cana	120
2.2.1.1.	Linearidade	120
2.2.1.2.	Efeito da Matriz	121
2.2.1.3.	Exatidão e precisão	121
2.2.1.4.	Limite de detecção do equipamento	122
2.2.1.5.	Limite de quantificação do método	122
2.2.2.	Determinação dos teores de cobre em diferentes frações no alambiques	122
2.2.2.1.	Coleta das amostras de aguardente de cana nos alambiques	122
2.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	123
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.1.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE EM AGUARDENTE DE CANA	124
3.1.1.	Linearidade	124
3.1.2.	Efeito da Matriz	125
3.1.3.	Exatidão e precisão	126
3.1.4.	Limite de detecção do equipamento de quantificação do método	127

3.2.	INFLUENCIA DA FRAÇÃO ALCOÓLICA NOS TEORES DE COBRE EM AGUARDENTE DE CANA ARTESANAL	128
4.	CONCLUSÕES	129

CAPÍTULO IV.

	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA POR ESPECTROFLUORIMETRIA	131
1.	OBJETIVOS	132
2.	MATERIAL E MÉTODOS	132
2.1.	MATERIAL	132
2.1.1.	Amostras	132
2.1.2.	Reagentes, padrões e soluções	132
2.2.	MÉTODOS	133
2.2.1.	Determinação dos espectros de absorção do carbamato de etila por espectrometria na região do UV-visível e por espectrofluorimetria	133
2.2.2.	Determinação dos espectros de absorção do carbamato de etila derivado com 9-xantidrol por espectrofotometria – região do UV-visível	133
2.2.2.1.	Reação de derivação	133
2.2.2.2.	Estudo da influência do Ph na reação do CE com 9-xantidrol	133
2.2.3.	Determinação dos espectros de absorção do carbamato de etila por espectrofotometria – região do UV-visível e por espectrofluorimetria	134
2.2.3.1.	Reação de derivação	134
2.2.3.2.	Estudo da influência do pH	134
2.2.3.3.	Estudo da influência do tempo de contato e estabilidade do composto fluorescente	134
2.2.4.	Validação da metodologia para determinação de carbamato de etila derivado com 9-xantidrol por espectrofluorimetria em aguardente de cana	134
2.2.5.	Análise estatística	135
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	135
3.1.	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL E POR ESPECTROFLUORIMETRIA	135
3.2.	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DERIVADO COM 9-XANTIDROL POR ESPECTROFOTOMETRIA N REGIÃO DO UV-VISÍVEL	136
3.2.1.	Reação de derivação	136
3.2.2.	Estudo da influência do pH	137
3.3.	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DERIVADO COM 9-XANTIDROL POR ESPECTROFLUORIMETRIA	137
3.3.1.	Reação de derivação	137
3.3.2.	Estudo da influência do pH	137
3.3.3.	Estudo da influência do tempo de contato e estabilidade do composto fluorescente	138

3.4.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA POR ESPECTROFLUORÍMETRO EM AGUARDENTE DE CANA	141
3.4.1.	Linearidade	141
3.4.2.	Limite de detecção do equipamento	141
3.4.3..	Limite de detecção e quantificação do método	142
3.4.4.	Exatidão e precisão	142
4.	CONCLUSÕES	143

CAPÍTULO V.

	DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM AGUARDENTES DE CANA POR CG-EM UTILIZANDO PADRÃO INTERNO DEUTERADO	144
1.	OBJETIVOS	145
2.	MATERIAL E MÉTODOS	145
2.1.	MATERIAL	145
2.1.1.	Amostras	145
2.1.2.	Reagentes, padrões e soluções	145
2.2.	MÉTODOS	146
2.2.1.	Determinação de carbamato de etila em aguardente	146
2.2.2.	Comparação de duas possibilidades para análise do carbamato de etila em aguardente de cana, com e sem o uso do padrão interno deuterado	146
2.3.	CUIDADOS	147
2.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	147
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	148
3.1.	COMPARAÇÃO DE DUAS POSSIBILIDADES PARA ANÁLISE DO CARBAMATO DE ETILA EM AGUARDENTE DE CANA, COM E SEM O USO DO PADRÃO INTERNO DEUTERADO	148
4.	CONCLUSÕES	153

CAPÍTULO VI.

	TEORES DE CARBAMATO DE ETILA, COBRE, CIANETO, UREIA, ACIDEZ E GRADUAÇÃO ALCOÓLICA EM AGUARDENTES DE CANA AO LONGO DO PROCESSO DE DESTILAÇÃO	154
1.	OBJETIVOS	155
2.	MATERIAL E MÉTODOS	155
2.1.	MATERIAL	155
2.1.1.	Amostras	155
2.1.2.	Reagentes e padrões	155
2.2.	MÉTODOS	155
2.2.1.	Coleta das amostras de aguardente de cana	155
2.2.2.	Caracterização do vinho	156
2.2.3.	Métodos de análise	156
2.2.3.1.	Determinação do grau alcoólico	156
2.2.3.2.	Determinação do carbamato de etila	156
2.2.3.3.	Determinação do cobre	157
2.2.3.4.	Determinação da ureia	157
2.2.3.5.	Determinação de cianeto	157

2.2.3.6.	Determinação da acidez	157
2.2.4.	Formação de CE, cobre, cianeto e ureia versus tempo de destilação	157
2.2.5.	Correlação dos analitos pesquisados	157
2.3.	CUIDADOS	158
2.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	158
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	158
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DO VINHO	158
3.2.	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE DESTILAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE CE, COBRE, CIANETO, ACIDEZ E UREIA	159
3.2.1.	Grau alcoólico	159
3.2.2.	Carbamato de etila	159
3.2.3.	Cobre	160
3.2.4.	Ureia	161
3.2.5.	Cianeto	162
3.2.6.	Acidez	162
3.3.	CORRELAÇÃO DOS ANALITOS PESQUISADOS COM O CARBAMATO DE ETILA	163
4.	CONCLUSÕES	166

CAPÍTULO VII.

TEORES DE CARBAMATO DE ETILA EM DIFERENTES FRAÇÕES ALCOÓLICAS DE AGUARDENTES DE CANA DURANTE O ARMAZENAMENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS		167
1.	OBJETIVOS	168
2.	MATERIAL E MÉTODOS	168
2.1.	MATERIAL	168
2.1.1.	Amostras	168
2.1.2.	Reagentes e soluções	168
2.2.	MÉTODOS	169
2.2.1.	Coleta das amostras de aguardente de cana nos alambiques	169
2.2.2.	Caracterização dos alambiques de aguardente artesanais	169
2.2.3.	Métodos de análise	170
2.2.3.1.	Determinação dos teores de carbamato de etila	170
2.3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	171
2.4.	CUIDADOS	172
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	173
3.1.	INFLUÊNCIA DA FRAÇÃO ALCOÓLICA E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NOS TEORES DE CE	173
3.1.1.	Alambique A	173
3.1.2.	Alambique B	174
3.1.3.	Alambique C	176
4.	CONCLUSÕES	179
CONCLUSÕES INTEGRADAS		184
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		185
ANEXOS		208

LISTA DE TABELAS

	Pág.
REVISÃO DA LITERATURA	
1. Padrão de identidade da aguardente de cana	42
2. Teores de carbamato de etila encontrados em alimentos fermentados	45
3. Teores de carbamato de etila encontrados em 71 amostras de aguardentes de cana mineiras	45
4. Teores de carbamato de etila encontrados em bebidas alcoólicas	46
5. Limites estipulados pelo Canadá para o teor de carbamato de etila em bebidas alcoólicas	49
6. Classificação dos grupos de compostos carcinogênicos pela IARC	53
7. Condições cromatográficas para separação e quantificação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas em colunas de vidro	59
8. Métodos utilizados para a extração de carbamato de etila em bebidas alcoólicas	60
9. Condições cromatográficas para separação e quantificação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas em colunas capilares	61
10. Condições cromatográficas para separação e quantificação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas por CG e diferentes detectores	62
11. Concentração de cianeto em alimentos	69
12. Teores de cianeto em matrizes e métodos diversos encontrados na literatura	71
13. Teores médios e valores mínimos e máximos de cobre encontrados em bebidas por diversas metodologias	78
14. Valores de concentrações e respectivos valores de recuperação média e desvio padrão relativos aceitáveis para resultados quantitativos em análise de analitos traços	84
CAPÍTULO I.	
I.1. Número de amostras de aguardente de cana coletadas por regiões de Minas Gerais	90
I.2. Valores de concentrações e respectivos valores de recuperação média e coeficiente de variação aceitáveis para resultados quantitativos	94
I.3. Resultados encontrados para análise de ureia com modificações na metodologia	95
I.4. Equações das retas das curvas-padrão e respectivos coeficientes de determinação obtidas para ureia em três dias consecutivos	96
I.5. Limite de quantificação do método para análise de ureia, através dos valores de recuperação e coeficiente de variação	97
I.6. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação para amostras adicionadas de ureia	97
I.7. Análise estatística descritiva do teor de ureia em aguardentes de cana coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004	98
I.8. Teores de ureia em aguardentes de cana de Minas Gerais	99
I.9. Teores de ureia em aguardentes produzidas em diferentes regiões de Minas Gerais	99

CAPÍTULO II.

II.1.	Número de amostras de aguardente de cana coletadas por regiões de Minas Gerais	103
II.2.	Resultados qualitativos do estudo da interferência da sacarose com ácido pícrico na análise de cianeto em aguardente de cana	110
II.3.	Resultados de exatidão para análises de cianeto em aguardente de cana	113
II.4.	Resultados de precisão para análises de cianeto em aguardente de cana	113
II.5.	Limites em mg/L obtidos para o cianeto em dois métodos utilizados	114
II.6.	Análise estatística descritiva do teor de cianeto em aguardentes de cana coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004	114
II.7.	Percentual de amostras em faixas de concentração de cianeto em aguardente de cana coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004	115
II.8.	Teores de cianeto em aguardentes produzidas em diferentes regiões de Minas Gerais	116

CAPÍTULO III.

III.1.	Planejamento de coleta das amostras nos alambiques artesanais produtores de aguardente de cana	119
III.2.	Características gerais da produção da aguardente de cana artesanal nos alambiques selecionados	123
III.3.	Resultados de exatidão comparados aos valores de referência para análises de cobre em aguardente de cana	127
III.4.	Resultados de precisão comparados aos valores de referência para análises de cobre em aguardente de cana	127
III.5.	Teores de cobre em aguardentes de cana artesanal produzidas nos diferentes alambiques em função do grau alcoólico	128

CAPÍTULO IV.

IV.1.	Soluções e volumes utilizados para obtenção de solução com diferentes valores de pH	133
IV.2.	Determinação do tempo de reação ideal para o carbamato de etila com o 9-xantidrol em espectrofluorímetro a 298 nm de excitação e 600 nm de emissão	140
IV.3.	Determinação da estabilidade da reação do carbamato de etila com o 9-xantidrol em espectrofluorímetro a 298 nm de excitação e 600 nm de emissão	140
IV.4.	Equações das retas das curvas-padrão e respectivos coeficientes de correlação obtidas para carbamato de etila em três dias consecutivos	141
IV.5.	Limite de quantificação do método através dos valores de recuperação e coeficiente de variação	142
IV.6.	Percentuais de recuperação e coeficientes de variação para amostras adicionadas de carbamato de etila	143

CAPÍTULO V.

CAPÍTULO VI.

VI.1.	Caracterização do alambique utilizado para produção de aguardente de cana	156
VI.2.	Caracterização do vinho utilizado para produção de aguardente de cana	158

VI.3.	Coeficientes de correlação calculados pelo teste de Pearson para analitos de amostras de aguardente de cana durante o processo de destilação	164
CAPÍTULO VII.		
VII.1.	Planejamento de coleta das amostras nos alambiques artesanais produtores de aguardente de cana	169
VII.2.	Características gerais da produção da aguardente de cana artesanal nos alambiques selecionados	170
VII.3.	Condições de análise do carbamato de etila por CG-EM em aguardente de cana	171
VII.4.	Planejamento fatorial usado para investigar da formação do carbamato de etila em aguardentes de cana de cada um dos alambiques	172
VII.5.	Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana artesanal produzidas nos diferentes alambiques em função do grau alcoólico na coleta e armazenadas sob diferentes temperaturas por 260 dias	173
VII.6.	Coeficientes de regressão para o carbamato de etila versus temperatura de armazenamento e grau alcoólico da aguardente de cana produzida no alambique A	174
VII.7.	ANOVA para o carbamato de etila em aguardente de cana produzida no alambique A	174
VII.8.	Coeficientes de regressão para o carbamato de etila versus temperatura de armazenamento e grau alcoólico da aguardente de cana produzida no alambique B	175
VII.9.	ANOVA para o carbamato de etila em aguardente de cana produzida no alambique B	176
VII.10.	Coeficientes de regressão para o carbamato de etila versus temperatura de armazenamento e grau alcoólico da aguardente de cana produzida no alambique C	178
VI.11.	ANOVA para o carbamato de etila em aguardente de cana produzida no alambique C	178

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
REVISÃO DA LITERATURA	
1. Representação genérica do processo de produção da aguardente de cana	30
2. Estrutura química do carbamato de etila	43
3. Exemplos de glicosídeos cianogênicos: (A) epiheterodendrina e (B) amidalina	51
4. Esquema para cianogênese em plantas	68
5. Aparatos para determinação quantitativa de cianeto em bebidas destiladas	72
6. Reação do ácido pícrico com o cianeto formando 2,6-dinitro-4-hidroxiamino-1,3-dicianobenzeno	72
CAPÍTULO I.	
I.1. Etapas para preparo de amostra de aguardente de cana para análise espectrofotométrica da ureia após modificações	92
I.2. Curva analítica equação da reta e R^2 para análise da ureia em espectrofotômetro UV-vis a 540 nm em concentrações de 0,1 a 15 mg/L	96
I.3. Concentração de ureia (mg/L) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais no período de maio de 2003 a março de 2004	98
I.4. Correlação entre a concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) e ureia (mg/L) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais no período de maio de 2003 a março de 2004 com equação da reta e R^2	100
CAPÍTULO II.	
II.1. Etapas para preparo de amostras de aguardente de cana para análise espectrofotométrica de cianeto utilizando-se (A) método com ácido pícrico (CÓRREA et al., 2004) e o (B) método com cloramina-T (EEC, 1999)	105
II.2. Curvas padrão, equação da reta e R^2 para análise de cianeto nas concentrações de 10 a 200 $\mu\text{g/L}$, pelo método com cloramina-T (A) e nas concentrações de 10 a 160 mg/L pelo método com ácido pícrico (B)	111
II.3. Curva padrão equação da reta e R^2 para análise do cianeto em concentrações de 10 a 200 $\mu\text{g/L}$, método com cloramina-T em solvente (A) e na matriz (B)	112
II.4. Concentração de cianeto ($\mu\text{g/L}$) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais que apresentaram teores acima do limite de quantificação	115
II.5. Correlação entre a concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) e cianeto ($\mu\text{g/L}$) (A), cianeto ($\mu\text{g/L}$) e cobre (mg/L) (B) e cianeto ($\mu\text{g/L}$) e ureia (mg/L) (C) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais no período de maio de 2003 a março de 2004	116
CAPÍTULO III.	
III.1. Curva analítica, equação da reta e R^2 para análise de cobre em solução de etanol 40% depois de retirar os <i>outliers</i>	125
III.2. Curva padrão, equação da reta e R^2 para análise de cobre em concentrações de 0,05 a 5,00 mg/L em (A) aguardente de cana (matriz), e em (B) solvente	126

CAPÍTULO IV.

- IV.1. Espectro de absorção do carbamato de etila (200 mg/L) em 40% v/v de etanol, (a) fixando-se a excitação a 233 nm e (b) fixando-se a emissão em 600 nm **135**
- IV.2. Formação do xantiuretano apartir do 9-xantidrol com o carbamato de etila em meio ácido **136**
- IV.3. Espectro de absorção do carbamato de etila (200 mg/L) em 40% v/v de etanol com xantidrol (0,02 mol/L) (5:1), variando o pH (a) 12,3 (b) 7,0 e (c) 0,6, por espectrofotômetro UV-visível **137**
- IV.4. Tempo de reação do carbamato de etila com 9-xantidrol, a 233 nm de excitação e 600 nm de emissão **138**
- IV.5. Espectro de absorção do carbamato de etila (300 mg/L) em 40% v/v de etanol com xantidrol (0,02 mol/L) (5:1), pH 0,6 (A); pH 12,3 (B) e pH 7,0 (C) **139**
- IV.6. Curva padrão, equação da reta e R^2 para análise do carbamato de etila com leitura de absorbância a 233 nm de emissão e 600 nm de excitação em concentrações de 50 a 300 mg/L **141**

CAPÍTULO V.

- V.1. Curva analítica, equação da reta e R^2 para análise do carbamato de etila em etanol 40% antes (A) e depois (B) de retirar os *outliers*, sem adição de padrão interno **148**
- V.2. Curva analítica, equação da reta e R^2 para análise do carbamato de etila em solução de etanol 40% antes (A) e depois (B) de retirar os *outliers*, com adição de padrão interno **149**
- V.3. Perfil cromatografico de carbamato de etila em amostra de aguardente, as três primeiras áreas são do padrão interno de CE deuterado (1) e as três outras são de 5; 150 e 600 $\mu\text{g/L}$ de CE (2); preto, rosa e azul, consecutivamente (A - expandido; B - normal) **151**
- V.4. Cromatograma de carbamato de etila e carbamato de etila deuterado em amostra de aguardente de cana **152**

CAPÍTULO VI.

- VI.1. Correlação entre grau alcoólico e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre **159**
- VI.2. Correlação do teor de carbamato de etila (CE) e tempo, ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre. **160**
- VI.3. Correlação dos teores de cobre e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre. **160**
- VI.4. Correlação dos teores de ureia e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre. **161**
- VI.5. Correlação do cianeto com tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre. **162**
- VI.6. Correlação da acidez e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre. **163**

- VI.7. Correlação negativa entre o CE e grau alcoólico quantificados na aguardente de cana, equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação (R^2). **164**
- VI.8. Correlação positiva entre CE e os parâmetros quantificados na aguardente de cana, equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação (R^2). **170**

CAPÍTULO VII.

- VII.1. Diagrama representando o planejamento fatorial o fatorial 3^2 , mais o ponto central, totalizando 9 experimentos **172**
- VII.2. Superfície de resposta e curva de contorno do modelo ajustado para o carbamato de etila, relacionando ao grau alcoólico e a temperatura de armazenamento, no alambique A **175**
- VII.3. Superfície de resposta e curva de contorno do modelo ajustado para o carbamato de etila, relacionando ao grau alcoólico e a temperatura de armazenamento, no alambique B **176**
- VII.4. Superfície de resposta e curva de contorno do modelo ajustado para o carbamato de etila, relacionando ao grau alcoólico e a temperatura de armazenamento, no alambique C **178**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - análise de variância
AOAC - Association Of Official Agricultural Chemists
ATP - trifosfato de adenosina
BATF - Bureau of Alcohol, Tobacco and Fire Arms
CE - carbamato de etila
CICAD - Inter-American Drug Abuse Control Commission
CG-EM - Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas
CG-FID - Cromatografia a Gás com Detecção por Ionização de Chama
CG-TEA - Cromatografia a Gás com detector por luminescência
CG-NPT - Cromatografia a Gás com detector de nitrogênio e fósforo termiônico
CNPJ - Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica
CV - coeficiente de variação
DMS - dimetil sulfeto
EEC - Comunidade Econômica Européia (União Européia)
FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA - Food and Drug Administration
FNB - Food and Nutrition Bureau
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IAL - Instituto Adolfo Lutz
IARC - International Agency for Research on Cancer
ICP OES - Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO - International Organization for Standardization
JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LDE - limite de detecção do equipamento
LDM - limite de detecção do método
LD₅₀ - dose letal
LQM - limite de quantificação do método
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NBR – Normas Brasileiras
OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho.
PBDAC - Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça

PI - padrão interno

RDA – ingestão diária recomendada

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SIM - Monitoramento Seletivo de Íons

UNICA - união da indústria de cana-de-açúcar

VC - vinil carbamato

VCE - vinil carbamato epóxido

WHO- World Health Organization

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar a influência da destilação e da temperatura de armazenamento nos teores de carbamato de etila (CE) e de alguns de seus precursores em aguardente de cana produzidas em alambiques artesanais. O método para a determinação de CE por CLAE após derivação com 9-xantidrol não foi sensível o suficiente para a análise de aguardente de cana. O uso de CE deuterado como padrão interno foi investigado e conferiu maior exatidão ao método por CG-EM. Métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos e validados para a determinação de possíveis precursores de CE, ureia e cianeto. Um método foi validado para a determinação de cobre utilizando espectrometria de absorção atômica com chama. Amostras de aguardente de cana produzidas no estado de Minas Gerais apresentaram teores de cianeto que variaram de 0,020 a 0,115 mg/L e de ureia que variaram de 0,50 a 5,10 mg/L. Não houve correlação significativa entre os teores destes compostos e os teores de CE nas amostras. O processo de destilação foi acompanhado em um estabelecimento artesanal de Minas Gerais. Os teores de cobre foram significativamente maiores nas frações cabeça e cauda. O carbamato de etila apresentou correlação positiva significativa com cianeto, uréia e acidez, e correlação negativa com o grau alcoólico. A influência da temperatura de armazenamento e do grau alcoólico nos teores de CE em aguardentes de cana de três alambiques artesanais foi investigada. Menores teores de CE foram encontrados durante o armazenamento a 10 °C, comparado a 23 e 36 °C, sugerindo que a aguardente de cana deve ser armazenada em baixas temperaturas.

Palavras-chave: aguardente de cana, carbamato de etila, ureia, cianeto, grau alcoólico.

ABSTRACT

ETHYL CARBAMATE IN SUGAR CANE DISTILLED SPIRIT: METHODS FOR THE ANALYSIS OF PRECURSORS AND FORMATION IN ARTISANAL STILL. **The objective of this work was to investigate the influence of distillation and storage temperature on the levels of ethyl carbamate (EC) and some of its precursors in sugar cane spirit produced in artisanal stills. A method for the determination of EC by HPLC after derivatization with 9-xanthidrol was not sensitive enough for analysis of sugar cane spirits. The use of deuterated EC as an internal standard was investigated and found to provide greater accuracy using GC-MS. Spectrophotometric methods were developed and validated for the determination of the possible EC precursors - urea and cyanide. A method was validated for copper using atomic absorption flame spectrometry and used to investigate the influence of distillation on copper levels. Samples of sugar cane spirit produced in the state of Minas Gerais showed levels of cyanide ranging from 0.020 to 0.115 mg/L and of urea from 0.50 to 5.10 mg/L. There was no significant correlation between the levels of these compounds and the EC levels found in these samples. The distillation process was followed in an artisanal still in Minas Gerais. The levels of copper were higher in the head and tail fractions. The levels of ethyl carbamate showed a significant positive correlation with cyanide, urea and acidity, and a negative correlation with alcohol. The influence of storage temperature and the alcoholic content on EC levels in sugar cane spirits of three artisanal stills was investigated. Lower levels of EC were found during storage at 10 °C, compared to 23 and 36°C, suggesting that the sugar cane spirit should must be stored at low temperatures.**

Keywords: sugar cane distilled spirit, ethyl carbamate, urea, cyanide, alcoholic degree.

INTRODUÇÃO

O grande desafio dos produtores de aguardente de cana tem sido agregar valor ao produto, obter reconhecimento internacional como produto típico brasileiro e aumentar as exportações. Para os especialistas, o incremento de valor, por meio da melhoria da qualidade a partir dos investimentos em tecnologia, e da adoção de estratégias de marketing, permitirá que o setor eleve sua participação na pauta das exportações brasileiras, conforme os dados do Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça (PBDAC).

Minas Gerais se destaca na produção artesanal de aguardente de cana, com um total anual de 540 milhões de litros e exportação de 18 milhões de litros, gerando cerca de 120 mil empregos diretos e três vezes mais empregos indiretos nos setores que gravitam em torno dela durante a entressafra agrícola. Embora a atividade de produção de aguardente de cana seja economicamente importante, estima-se que aproximadamente 90% da produção artesanal no estado de Minas Gerais sejam produzidas em alambiques clandestinos.

A cachaça constitui a segunda bebida destilada mais consumida no planeta de acordo com o ranking mundial do consumo de destilados publicado pelo Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça. A cadeia produtiva da cachaça encontra-se em plena expansão, pois vem se firmando como um importante produto do agronegócio brasileiro. De um montante de 1,3 bilhão de litros produzidos por ano, o mercado externo absorve em torno de 1%.

Atualmente, vem adquirindo espaço crescente no mercado de exportação. São vários os países que adquirem o produto brasileiro. Para exportação, existem algumas barreiras, sendo estas divididas em três categorias principais: as tarifárias, as não tarifárias e as técnicas. A última é relativa às condições sanitárias dos produtos, através de normas e regulamentos técnicos, sanitários. Esta barreira técnica contempla para a exportação em alguns países a análise de carbamato de etila e cobre na aguardente de cana.

Em 1985, o governo canadense estipulou um limite máximo (150 µg/L em destilados) para o carbamato de etila por ser este um agente cancerígeno. Este limite foi adotado por vários países compradores da aguardente de cana, o que tem limitado a

exportação. No Brasil, em 2005 o Ministério da Agricultura por meio da Instrução Normativa nº. 13 de 20 de junho de 2005, estipulou este mesmo valor máximo de 150 µg/L para a aguardente de cana, contudo, estabelecendo um limite de cinco anos para adequação do produto pelos produtores.

O carbamato de etila é o ester etílico do ácido carbâmico e tem sido encontrado em alimentos como pão, vinho, iogurte, queijo, cerveja e, principalmente, em bebidas alcoólicas. O mecanismo de formação desta substância ainda é mal compreendido e muito complexo. Em vinhos, pesquisadores indicaram os possíveis precursores desta substância e quais os fatores que influenciam a sua formação, sendo citados o tempo de armazenamento, a luz, a temperatura e o pH. Em testes de toxicidade em animais, foi comprovado que o carbamato de etila é o agente causador de adenomas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos, hepatomas, carcinomas mamários, tumores de ovários, hemangiomas hepáticos e tumores melanóticos de pele e de íris, entre tantos outros. Desta forma, o teor de carbamato de etila em alimentos deve ser o menor possível.

Estudos recentes apresentaram resultados preocupantes demonstrando altos teores de carbamato de etila em aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais (<30 a 2609 µg/L). São poucos os estudos sobre a formação do carbamato de etila em aguardentes de cana, havendo necessidade de maiores informações sobre a forma de prevenir e reduzir esta formação.

Este trabalho teve como objetivo geral estudar os métodos de análise para o carbamato de etila e seus principais precursores em aguardente de cana e correlacioná-los durante a produção artesanal de aguardente de cana.

Os objetivos específicos foram:

- (i) validar método para a quantificação de ureia por espectrofotometria em aguardente de cana;
- (ii) comparar dois métodos de análise para quantificação de cianeto por espectrofotometria em aguardente de cana, validar o mais adequado e quantificar cianeto em amostras de aguardente de cana;
- (iii) validar método para a quantificação de cobre por absorção atômica em aguardente de cana e investigar a presença de cobre em aguardente de cana no processo de destilação, variando o grau alcoólico;
- (iv) desenvolver um método de análise para a quantificação de carbamato de etila por espectrofluorimetria em aguardente de cana;
- (v) verificar a influência do uso do padrão interno deuterado na análise de carbamato de

etila em aguardente de cana por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM);

(vi) analisar carbamato de etila, cobre, cianeto, ureia, acidez e graduação alcoólica em aguardentes de cana ao longo do processo de destilação; e

(vii) investigar a formação de carbamato de etila em amostras aguardente de cana de alambiques durante o armazenamento a diferentes temperaturas.

1. AGUARDENTE DE CANA

As aguardentes, denominadas “spirits” em inglês, “spiritueux” ou “eaux-de-vie” em francês, “acquaviti” em italiano e “schnaps” em alemão, são bebidas alcoólicas obtidas por destilação de um líquido que contém álcool etílico em sua composição. De maneira geral, o conteúdo em álcool deriva da fermentação de açúcares contidos na matéria-prima. As aguardentes são bebidas fortes, de fácil conservação, de época e região de origem duvidosa, mas de uso geral e universal. Normalmente apresentam teor alcoólico de 38 a 54 °GL. Os sabores e aromas são diversos, dependendo das matérias primas das quais são obtidas (LIMA, 2001).

Segundo a Instrução Normativa nº. 13 de 20 de junho de 2005 (BRASIL, 2005a), “cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume a 20 °C e com características sensoriais peculiares”. Aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% em volume a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares em até 6 g/L, expressos em sacarose.

A cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, perdendo apenas para a cerveja. São Paulo é o maior produtor de aguardente de cana industrial. Minas Gerais, o quinto produtor nacional, é o mais especializado na produção de aguardente de cana artesanal. Apesar do quadro favorável, há muito a fazer para consolidar o produto no mercado, especialmente no exterior. O setor produtor de aguardente de cana comemora o seu melhor desempenho em exportações. Em 2002, foram exportados 14,8 milhões de litros, aproximadamente 1% da produção nacional.

Aparentemente, os números são bastante tímidos, mas representam crescimento de 33% em relação a 2001, quando as exportações ficaram em 11,1 milhões de litros ou US\$ 9 milhões (SEBRAE, 2008). O Brasil possui quantidade significativa de pequenos produtores, levando a necessidade de estudar a qualidade das aguardentes de cana produzidas e confrontar os resultados obtidos com a legislação vigente (BOGUSZ JUNIOR et al., 2006).

No mercado de exportação do produto, que fatura US\$ 600 milhões/ano, não há distinção entre a aguardente de cana industrial e a artesanal. A bebida é largamente consumida em países como a Alemanha, Itália, Portugal, Espanha, Holanda, Suíça,

Bélgica, França, Reino Unido e Áustria, além daqueles situados na América do Norte e o restante da América do Sul (OLIVEIRA et al., 2003).

O mercado apresenta um grande potencial para a aguardente de cana artesanal de qualidade. Os preços no mercado internacional têm se tornado mais atrativos para a aguardente de cana de qualidade. A aguardente de cana, bebida pura ou na forma de caipirinhas, é, atualmente, a bebida da moda nos mercados da Europa e dos Estados Unidos (MIRANDA et al., 2007).

O aumento do consumo de aguardente de cana e a possibilidade de exportação exigem que o processo de fabricação dessa bebida seja baseado em práticas criteriosamente determinadas para obtenção de um produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais (AZEVEDO et al., 2003).

O estado de Minas Gerais destaca-se na produção artesanal de aguardente de cana, com um total anual de 120 milhões de litros e um consumo interno de 170 milhões de litros, gerando cerca de 120 mil empregos diretos e três vezes mais empregos indiretos nos setores que gravitam em torno da bebida. Embora a atividade do setor de aguardente de cana seja economicamente importante, estima-se que aproximadamente 90% da produção artesanal no estado de Minas Gerais ainda sejam produzidos em alambiques clandestinos (CARDOSO, 2006; SEBRAE, 2008).

1.1. COMPOSIÇÃO DA AGUARDENTE DE CANA

A aguardente de cana é composta principalmente de água e álcool em proporções variáveis, segundo a sua graduação. Compõe ainda de componentes secundários e/ou componentes aromáticos e flavorizantes, e de outros compostos em quantidades bem menores, embora importantes (LIMA, 1964).

Os componentes secundários são responsáveis pelo flavor característico de cada tipo de bebida. Cerca de 1300 compostos já foram detectados nas bebidas em geral. Estes compostos pertencem à diversas classes, dentre elas, aldeídos, ésteres, álcoois superiores, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas (VALSECHI, 1960; LIMA, 1964).

Os componentes secundários são formados durante o processo de fermentação do mosto, mudando de caráter e proporção durante a destilação e posterior maturação do produto. O processo de fabricação, a composição dos mostos e as condições de fermentação e de destilação são capazes de mudar o perfil e os teores dos componentes

secundários de uma aguardente de cana (LIMA, 1964; LÉAUTÉ, 1990; BOSCOLO et al., 2000).

PEREIRA et al. (2003) analisaram 45 amostras de aguardentes de cana de Minas Gerais e verificaram que existem diferenças significativas entre as amostras para acidez volátil, ésteres, aldeídos e álcoois superiores. Vinte e quatro por cento destas amostras encontravam-se fora dos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação vigente.

NÓBREGA (2003) extraiu os compostos voláteis da aguardente de cana por meio da concentração dinâmica do *headspace* em cartuchos contendo substâncias adsorventes e analisou por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM). Cerca de 100 compostos voláteis, com número de carbonos que variavam de 5 a 18, foram detectados. Os compostos presentes em maiores quantidades foram o 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 1,1-dietoxi-etano (acetaldeído dietil acetal) e os ésteres acetato de 3-metilbutila, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila e dodecanoato de etila. Dentre os compostos identificados em menor quantidade, destacou-se, devido a sua natureza química, o composto sulfurado 4,5-dehidro-2-metil-3(2H)-tiofenona. Esta foi a primeira vez que este e outros compostos voláteis foram reportados em aguardente de cana.

RODRIGUES FILHO et al. (2007) quantificaram dextranas em aguardentes de cana. Embora inócuas à saúde humana e com aplicações variadas, a presença desta substância em açúcares está associada a problemas que conduzem a perdas na produção. Sua presença em açúcares utilizados em bebidas alcoólicas é responsável pela formação de precipitados denominados flocos alcoólicos, os quais são considerados defeitos sensoriais e são indesejáveis sob o ponto de vista comercial podendo, inclusive, conduzir ao descarte do produto. Foram encontrados teores de 1,6 a 11,2 mg/L, com valores médios de 5,9 mg/L.

1.2. PROCESSAMENTO DA AGUARDENTE DE CANA

O processamento da aguardente de cana pode ser representado de várias formas. Um processo produtivo genérico está apresentado em seis fases abaixo e serve apenas como exemplo para mostrar suas principais etapas (Figura 1).

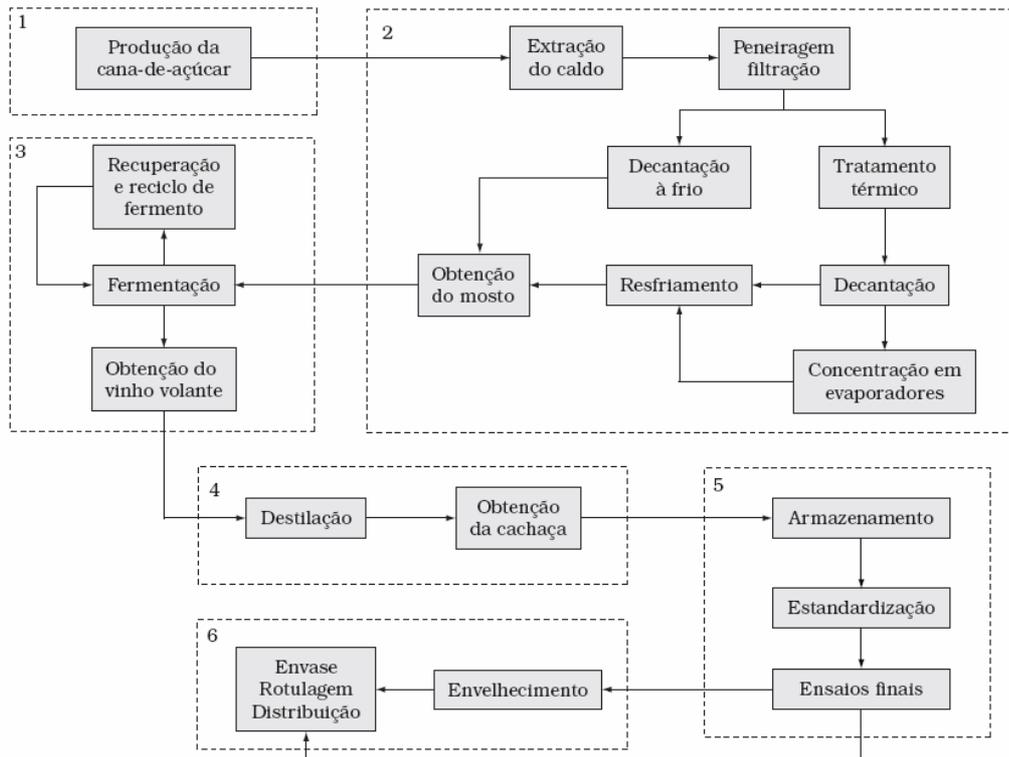


Figura 1. Representação genérica do processo de produção da aguardente de cana. Fonte: SORATTO et al. (2007).

A fase um representa a produção da cana, a fase dois o processo de decantação e obtenção do mosto, a fase três a fermentação, a quarta a destilação, a quinta o armazenamento e a sexta o envelhecimento (SORATTO et al., 2007).

Basicamente, a aguardente de cana é processada de duas formas distintas: industrial e artesanalmente. No segmento industrial, o processo produtivo é desenvolvido em empresas de médio e grande porte; a bebida é padronizada; e a operação de destilação é realizada em coluna de aço inox, garantindo a escala de produção. No segmento artesanal, as aguardentes de cana são processadas em empresas pequenas de administração familiar e baixa escala de produção; os procedimentos produtivos mobilizam conhecimentos empíricos; e a operação de destilação predominantemente é desenvolvida em alambiques de cobre (COUTINHO, 2001).

A coexistência de dois modelos de produção (industrial e artesanal) resulta em concepções distintas de qualidade no setor de aguardente de cana. Na medida em que cada modelo de produção constrói seu conceito de qualidade atrelado à sua estrutura produtiva e organizacional, quando os distintos modelos concorrem num mesmo mercado, emergem as contradições das lógicas industrial e artesanal (SEBRAE, 2005).

1.3. MATÉRIA PRIMA

Os maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar são Brasil, Índia e Cuba. O Brasil, que tem uma área plantada de aproximadamente 5,0 milhões de hectares, é o maior produtor mundial (cerca de 330 milhões de t/ano, representando um terço da produção mundial). São Paulo é o principal produtor (200 milhões de t/ano, aproximadamente 60% da produção brasileira) e Minas Gerais é o quarto estado produtor do país, com 18 milhões t/ano (UNICA, 2008).

Dados da UNICA (2008) apontam que na safra de 2008/2009 foram produzidos 550 milhões de toneladas de cana de açúcar. A previsão da produção na safra de 2013/2014 é de 547 milhões de toneladas, permanecendo concentrada na região Centro-Sul. SCOLARI (2006) estima um potencial de produção de 900 milhões de toneladas de cana de açúcar, considerando a utilização de área não produtiva.

A matéria prima para produção de aguardente de cana é a cana de açúcar, *Saccharum officinarum L.*, em estágio ideal de maturação, sadia, recém-cortada e livre de matéria estranha. Esta apresenta em média as seguintes características: 8-14% de fibra e 86-92% de caldo, sendo que 11-18% do caldo é constituído de sacarose (VALSECHI, 1960; NOVAES et al., 1974). É aconselhável plantar diferentes variedades de cana de açúcar, pois estas apresentam tempos de maturação diferentes suprimindo, portanto, o alambique durante o ano todo (VALSECHI, 1960).

O rendimento em aguardente vai depender também da limpeza da cana. A presença de impurezas (matéria estranha de origem vegetal, ponteiros de cana ou restos de folhas e matéria estranha mineral – terra, pedra, etc), pode comprometer o processo fermentativo (NOVAES, 1994).

O estado sanitário do colmo também é importante. A incidência alta de podridão vermelha pode promover uma redução dos teores de açúcar da cana, interferir na fermentação e, como consequência, reduzir o rendimento em aguardente de cana. Os colmos a serem moídos devem ser recém-cortados e frescos. Recomenda-se que o intervalo entre o corte de cana e a moagem não ultrapasse 48 h. A extração do caldo de cana é o fator mais importante do ponto de vista do rendimento de aguardente por tonelada de cana processada, e está diretamente relacionado com o número e tipo de unidades esmagadoras (NOVAES, 1994; ABIPTI, 1999; FARIA, 2000; LIMA, 2001; NOGUEIRA e VENTURINI FILHO, 2005).

Segundo FARIA (2000), as pequenas fábricas de aguardente de cana que utilizam alambiques possuem geralmente somente um moinho, que é alimentado manualmente,

sem envolver preparo prévio do mosto. Já as grandes indústrias, com produção superior a 1000 L/h de aguardente de cana, são equipadas com várias unidades esmagadoras, facas preparadoras e usam a embebição do bagaço de cana para obter uma melhor extração.

Ao passar através dos primeiros ternos de moenda, o teor de caldo residual decresce rapidamente, enquanto que o de fibra aumenta. Quando a umidade do bagaço atinge 50%, o caldo fica fortemente retido por capilaridade, tornando-se inútil continuar comprimindo o bagaço a seco. A embebição é um artifício para extrair mais caldo residual, quando se atinge o limite de extração a seco. Esta operação consiste em adicionar água, ou caldo diluído, sobre o bagaço que sai das moendas com a finalidade de diluir a sacarose restante e aumentar assim sua extração, ao passar pela moenda seguinte. A água do processo de embebição deve ser de boa qualidade, de preferência com características de potabilidade. Esse controle é muito importante, já que a água pode ser um importante veículo de contaminação das fermentações (NOGUEIRA e VENTURINI FILHO, 2005).

1.4. FERMENTAÇÃO

O processo de fermentação consiste na transformação dos açúcares fermentáveis do mosto, constituído de caldo de cana e nutrientes, em álcool etílico, gás carbônico e outros compostos secundários. Em geral, o processo de fermentação consiste em colocar o inóculo e todo o meio a ser fermentado em uma dorna (PATARO et al., 2002). A população responsável pela fermentação do caldo é constituída normalmente por leveduras e bactérias (SOUSA, 2005).

Na fermentação rudimentar, para a obtenção do fermento biológico, usava-se geralmente cascas de frutas ou cereais, tais como: cascas de uvas, maçãs, pêras e milho. Atualmente, é usado fermento biológico, que por sua pureza é mais fácil de controlar uma possível contaminação por outros fungos, além do processo ser mais rápido. O preparo do mosto envolve operações que permitem melhorar as condições de fermentação do caldo de cana. Inicia-se pela sua filtração e decantação, com ajustes no teor de açúcar, acidez, nutrientes e temperatura. O caldo de cana proveniente da moenda é filtrado em tela fina, passando em seguida por decantador, de modo a eliminar a terra e o bagacilho. Na filtração, são eliminados os pedaços maiores de bagaço arrastados com o caldo. O

bagacilho, partículas de terra e outras impurezas menores, são extraídos durante a decantação (CHERUBIN, 2003).

As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas geralmente são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, apesar do grande número de outras espécies envolvidas. O rendimento em etanol e a formação de compostos voláteis entre as diferentes linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e não *Saccharomyces*, isoladas de fermentações para produção de aguardente de cana, mostrou através de análise estatística multivariada, que as linhagens se separaram em diferentes grupos. Dentre os parâmetros fermentativos estudados, o rendimento de etanol foi o parâmetro de maior impacto na diferenciação entre as linhagens e entre os compostos voláteis o ácido acético foi o componente de maior impacto (OLIVEIRA, 2001). A viabilidade celular é extremamente importante para o desenvolvimento do processo fermentativo e a tolerância da levedura ao produto da fermentação (etanol) é determinante na produtividade (PATARO et al., 2002).

A fermentação ideal ocorre com o caldo de cana numa concentração de açúcares em torno de 15º Brix. Normalmente, o caldo apresenta uma concentração de açúcares de 14 a 22 ºBrix. Acima de 15 ºBrix é necessário diluir o caldo de cana, para garantir a estabilidade do fermento ao longo de todo o período de fabricação. Teores de açúcar acima de 15 ºBrix acarretam fermentações mais lentas e freqüentemente incompletas, além de dificultarem a multiplicação do fermento. Quando se destila um mosto com fermentação incompleta, ocorrem incrustações no alambique e formação de furfural, que provocam aroma e gosto indesejáveis na aguardente de cana (RIBEIRO, 2002). Teores de açúcar abaixo de 15 ºBrix permitem fermentações mais rápidas, sendo importantes na etapa de multiplicação do fermento. Entretanto, acarretam uma diminuição no rendimento industrial (CHERUBIN, 2003).

O pH desejável do caldo a ser fermentado situa-se entre 4,0 e 5,0. O caldo da cana-de-açúcar sadia e madura apresenta um pH que varia de 5,0 a 6,0, o que demonstra a necessidade de aumento de acidez para se obter uma boa fermentação. Essa diminuição do pH na fabricação artesanal é feita naturalmente, como parte integrante do processo (YOKOYA, 1995).

A temperatura ideal para fermentação situa-se entre 28 e 30 ºC. Temperaturas mais baixas diminuem a atividade do fermento, enquanto as mais elevadas favorecem o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, provocando o enfraquecimento das leveduras (YOKOYA, 1995).

O acompanhamento da fermentação é feito por meio de medições do teor de sólidos solúveis (°Brix), da temperatura, do tempo de fermentação, da acidez e do pH. Pode-se ainda realizar análises microscópicas do fermento para determinar o rendimento e a produtividade da fermentação e de compostos secundários (YOKOYA, 1995).

Preparo do mosto

Mosto é todo o líquido açucarado com poder de fermentação; e vinho é o mosto fermentado, pronto para destilar. O mosto nas fábricas de aguardente de cana é constituído pelo caldo de cana, extraído por pressão, esmagamento ou moagem de cana de açúcar em aparelhos denominados jogos de moendas (VALSECHI, 1960; NOGUEIRA e VENTURINI FILHO, 2005).

O preparo do mosto de cana tem por objetivo garantir uma quantidade ideal de açúcares fermentáveis, menor contaminação inicial possível, pH, nutrientes e boas condições para o metabolismo da levedura (VALSECHI, 1960; NOVAES, 1974; LIMA, 2001). Assim, no preparo do mosto, alguns cuidados devem ser tomados em relação à concentração de sólidos solúveis, açúcares totais, acidez total e pH, de forma a garantir uma fermentação pura, regular e com rendimentos satisfatórios (NOGUEIRA e VENTURINI FILHO, 2005).

A acidez do mosto tem influência no desenvolvimento da levedura e na fermentação. Embora a levedura prefira um pH próximo de 4,5, observa-se que a acidez do caldo é praticamente suficiente para uma boa fermentação. A acidez titulável do caldo proveniente de uma cana-de-açúcar normal e madura está em torno de 2,5 g de ácido sulfúrico por litro de mosto, e o pH deve estar próximo de 5,5. Entretanto, quando o caldo já vem bastante contaminado do campo, é necessária a correção do pH, sendo geralmente empregado ácido sulfúrico, com dosagem em torno de 25 mL de ácido sulfúrico comercial (densidade = 1,84 g/mL) para cada 100 L de mosto (NOGUEIRA e VENTURINI FILHO, 2005).

FARIA (2000) descreve outras medidas preventivas, que podem ser adotadas com o objetivo de transformar o mosto natural, que o caldo de cana já representa, em um meio de cultura mais adequado à máxima atividade fermentativa. Uma medida é a decantação do caldo, prática simples que promove a separação das impurezas grosseiras em suspensão. Outra prática é a diluição do mosto, para adequar a quantidade de açúcar presente com a capacidade fermentativa das leveduras e, assim, evitar que sua ação fermentativa seja inibida por concentrações alcoólicas muito elevadas. Dessa forma

evitam-se as fermentações incompletas e as decorrentes perdas de açúcar, que também favorecem contaminações indesejáveis ao final e após a fermentação.

A correção da temperatura também é sugerida à valores próximos de 30 °C para favorecer preferencialmente a ação das leveduras. NOGUEIRA e VENTURINI FILHO (2005) descreveram a temperatura como um dos fatores de grande importância ao bom desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo.

1.4.2. Preparo do pé de cuba

O pé de cuba, o pé de fermentação ou o levedo se refere ao volume inicial ou massa de fermento adicionada ao mosto para realizar a fermentação. São vários os tipos de fermento utilizados para preparar um pé de cuba, tais como o caipira, o de panificação, o misto e o selecionado (VALSECHI, 1960).

Os produtores mineiros de aguardente de cana artesanal utilizam fubá e farelo de arroz como nutrientes para o fermento. O fubá, obrigatoriamente isento de inseticida, é usado em proporções variadas em relação ao pé de cuba ou fermento. O farelo de arroz é fonte de vitaminas do complexo B, o que aumenta a atividade e o vigor das leveduras, melhorando o desenvolvimento da fermentação (RIBEIRO, 2002).

Uma boa aguardente de cana é definida no processo de fermentação, pois é nele que são formados todos os compostos. De nada adianta o cuidado nas outras etapas da produção, se houver descuido durante a fermentação. Os produtores artesanais costumam adicionar fubá de milho, farelo de soja, de arroz, entre outros, ao caldo de cana na preparação de receitas próprias do fermento iniciador (pé-de-cuba), a maioria dos produtores acredita que o segredo está na mistura, que fermenta de cinco a 20 dias. Mas, na realidade, pouco importa o que vai ser adicionado ao caldo de cana, pelo menos em relação ao desenvolvimento dos microrganismos presentes no ambiente (GOMES et al., 2002).

De acordo com FARIA (2000), o pé-de-cuba deve conter células de levedura, suspensas em um volume correspondente a 10-20% do volume total do mosto a ser fermentado, de forma a prover cerca de 10 a 20 g de massa úmida de leveduras por litro do meio a ser fermentado. O tipo de fermento adotado pela indústria de aguardente de cana é fator determinante no processo de preparo do mesmo, podendo ser utilizados diversos tipos de fermento, cada qual condicionado às possibilidades técnicas da destilaria.

1.4.3. Fermentação propriamente dita

O processo fermentativo consiste basicamente no desdobramento do açúcar (sacarose) em etanol. A fermentação é iniciada pela adição do pé-de-cuba ao caldo de cana presente na dorna de fermentação, e completado com o caldo de cana diluído para 16 °Brix (CANTÃO, 2006).

Na fermentação inicial, o mosto deve conter a quantidade de oxigênio necessária para a multiplicação das leveduras, característica dessa fase, na qual se observa, principalmente, o crescimento da colônia de levedura. A fermentação principal é iniciada quando o oxigênio do mosto termina, interrompendo, portanto, o processo aeróbico de crescimento das leveduras, que passam a produzir as enzimas que irão transformar os açúcares em etanol e gás carbônico. Esta etapa é perceptível pela formação de bolhas no mosto. Observa-se ainda o aparecimento de aroma característico e aumento acentuado da temperatura, acompanhados de uma queda constante do °Brix e também do aumento do grau alcoólico do mosto (CANTÃO, 2006).

Já na fase final da fermentação, a produção de bolhas começa a diminuir e a temperatura a baixar, observando-se ainda um pequeno desprendimento de gás carbônico. A fase final termina quando ocorre a interrupção do desprendimento de bolhas e a volta para a temperatura ambiente (LIMA, 2001).

Geralmente o processo fermentativo tem uma duração média de 24 h, com reciclagem do inóculo, ou seja, após esse tempo, as leveduras se depositam no fundo da dorna de fermentação, retira-se o vinho e adiciona-se um novo mosto, com temperatura em torno de 30 °C (CANTÃO, 2006).

Por ser um processo rústico, capaz de ocorrer mesmo em condições tecnicamente adversas, a esterilização prévia do caldo de cana não é realizada. Dessa forma, para evitar contaminações capazes de prejudicar o rendimento e a qualidade do produto, há necessidade uma supervisão atenta e constante do processo (FARIA, 2000).

Os grãos não são fontes de nutrientes para o levedo, possivelmente, apenas servem de suporte para a sua proliferação e ajudam na decantação. Se o processo foi conduzido com higiene e o tempo de fermentação foi respeitado, o sucesso nessa etapa é certo. Ao final do período de preparação do pé-de-cuba, ocorre o predomínio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Por ser um fungo altamente adaptado ao álcool, o *S. cerevisiae* quase sempre domina a fermentação de bebidas alcoólicas. Entretanto, muitas linhagens diferentes dessa mesma levedura podem conduzir o processo. Isso significa que a aguardente de cana apresenta variações de qualidade ao longo da safra. Sem ter como avaliar, os produtores costumam misturar toda a aguardente de cana produzida ao longo de cada safra, correndo o risco de misturar uma excelente aguardente de cana com

uma de pior qualidade. O resultado final é uma aguardente de cana mediana (GOMES et al., 2002).

1.4. DESTILAÇÃO

Os alambiques usados nas destilarias artesanais, normalmente são simples, compostos de uma panela, onde é colocado o vinho de cana a destilar; de um capitel ou cabeça, onde os vapores da aguardente de cana se enriquecem de álcool; de um tubo de condensação, onde os vapores do destilado são parcialmente condensados e conduzidos para o resfriador, através de uma serpentina, que mergulha em um recipiente cheio de água, para completar a condensação dos vapores e promover seu resfriamento (LIMA, 2001).

No processo industrial é empregada a destilação contínua, conduzida em colunas de destilação, que são alimentadas continuamente com vinho pela parte superior e vapor pela base, de modo a se obter, também continuamente, o destilado na parte superior da coluna e o resíduo na sua base (FARIA, 2000). A coluna de destilação é um cilindro de aço inoxidável, com diâmetro e altura variáveis em função da sua produtividade, provida internamente com bandejas que contém chaminés, calotas e sifões. Introduce-se o vinho da cana de modo contínuo na parte superior da coluna, de onde vai descendo de bandeja em bandeja e nas quais vai ocorrendo a vaporização do álcool e dos demais voláteis pelo aquecimento do sistema pelo vapor de água. Na base da coluna sai finalmente o vinhoto, resíduo praticamente isento de álcool. No topo saem 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 obtido pode ser diluído em água, adoçado e filtrado, antes de ser engarrafado (NOVAES, 1994).

A destilação produz três frações: cabeça, coração e cauda (VALSECHI, 1960). No início da destilação, o líquido obtido tem aproximadamente 65% de álcool em volume, porém à medida que prossegue, a concentração diminui gradativamente podendo chegar a até 0% de álcool, se não for interrompida a destilação. A interrupção é feita geralmente quando a concentração do destilado (aguardente de cana) encontra-se entre 42 e 48% de álcool em volume, determinado pelo uso de um alcoômetro. A aguardente de cana

produzida é recolhida, mas na panela ficam ainda resíduos de álcool, que são recuperados à parte, pela continuação da destilação, para se obter a água-fraca, cauda, que, às vezes, é destilado de novo com o vinho de outra destilação, para aumentar o rendimento (LIMA, 2001).

Em processos artesanais, o vinho é colocado no alambique de cobre onde é aquecido, evaporado e resfriado. Do líquido deve se retirar a cabeça, ou seja, aproximadamente 10% do volume inicial da destilação, que conta com os componentes mais voláteis e alguns tóxicos. O volume seguinte, que representa em torno de 80% da destilação, é conhecido como coração. É considerada a melhor parte do processo, a aguardente de cana propriamente dita. Os últimos 10%, chamados de cauda ou água fraca, são também descartados. Outra característica do alambique é a destilação feita em batelada: todo vinho é destilado de uma vez só na panela. Em resumo, a destilação artesanal consiste na geração de vapores de álcool na panela, sua passagem à serpentina de refrigeração através do capitel e do tubo de condensação e daí para fora do alambique, na forma de uma mistura líquida com teor de álcool muito superior à do vinho de cana de onde se originou (LIMA, 2001).

Normalmente dois processos são utilizados na destilação: simples ou batelada e contínua (VALSECHI, 1960; LÉAUTÉ, 1990). A destilação simples é realizada em aparelhos denominados alambiques simples, os quais podem ser de um ou dois corpos. Geralmente são de cobre ou de aço inox, tendo como fonte de aquecimento o fogo direto ou o vapor circulante em serpentina. A destilação contínua é realizada em colunas de destilação. Estas podem ser de alto ou de baixo grau. As colunas de baixo grau fornecem destilados com graduação alcoólica entre 40 e 60 °GL, enquanto que as de alto grau produzem álcool com grau alcoólico em torno de 95 °GL (VALSECHI, 1960; NOVAES et al., 1974).

O uso de aço inox na fabricação de alambiques está cada vez mais difundido no Brasil, devido aos problemas advindos da contaminação da aguardente de cana pelo cobre. Recomenda-se o emprego de pelo menos partes do alambique em cobre, já que este é fundamental na produção de boas aguardentes de cana (VARGAS e GLÓRIA, 1995).

Para aumentar a capacidade das destilarias, diminuir as perdas de álcool e reduzir o consumo de combustível foram desenvolvidos alambiques múltiplos, de dois ou três corpos, nos quais a destilação da água fraca se faz dentro de outro corpo do alambique, e não para fora, mantendo o aquecimento. Essa foi a primeira evolução importante na fabricação da aguardente de cana no Brasil. A seguinte foi a utilização de colunas

contínuas, introduzidas na década de 1950, nas quais a destilação da aguardente de cana é feita de maneira continuada e automática durante todo o dia, como nas fábricas de álcool industrial (LIMA, 2001).

Nas colunas, o vinho de cana é introduzido pela parte de cima, desce para a base e, nesse trajeto, o álcool e os demais compostos voláteis são conduzidos para cima, ao mesmo tempo em que vão se concentrando. O destilado sai pela parte superior da coluna, passa por um condensador para condensar a aguardente de cana e por um resfriador para resfriá-la. Na base da coluna sai a vinhaça (LIMA, 2001; RIBEIRO, 2002).

Quando se construíram as primeiras colunas de destilação de aguardente de cana, por volta de 1950, estas se pareciam muito com as colunas de destilação do álcool industrial e as aguardentes de cana produzidas eram puras demais porque muito dos componentes secundários eram separados e retirados. Inicialmente, isso causou a recusa das aguardentes de cana produzidas em colunas, que foram então redesenhadas e hoje, nas grandes destilarias, utilizam-se colunas de destilação contínua, sendo, portanto, possível obter nas colunas de destilação, uma aguardente de cana de qualidade, comparáveis às obtidas nos alambiques (LIMA, 2001).

1.5. ENVELHECIMENTO

Uma aguardente de cana recém destilada não apresenta sabor agradável, fino e suave. Este só poderá ser adquirido com o envelhecimento natural ou forçado. No envelhecimento natural, a aguardente de cana permanece por certo tempo armazenada em recipiente de madeira apropriado. No envelhecimento forçado, a aguardente de cana pode ser tratada com corrente de ar, ozônio, descarga elétrica ou sais de prata para acelerar as reações de oxidação dos seus componentes da aguardente de cana (Valsechi, 1960; Mosedale e Puech, 1998).

O produto denominado “aguardente de cana envelhecida” ou “caninha envelhecida” deve conter no mínimo 50% de aguardente de cana envelhecida, por um período não inferior a um ano, podendo ter adição de caramelo para correção da cor. A adição de açúcar superior a 6 g/L e inferior a 30 g/L requer a denominação adocicada (BRASIL, 2005a).

Inúmeras reações químicas estão associadas ao processo de envelhecimento de bebidas destiladas, dentre estas, as reações entre os compostos secundários provenientes da destilação (álcoois, hidrocarbonetos carbonilados superiores etc); a

extração direta de componentes da madeira (extrativos); a decomposição de macromoléculas da madeira (celulose, hemiceluloses e lignina) (JANZANTTI, 2004). Por meio do envelhecimento em barris de madeiras, pode-se corrigir eventuais defeitos da fermentação e da destilação, melhorando assim o paladar das bebidas destiladas (CARDELLO e FARIA, 2000; MORI et al., 2003; JANZANTTI, 2004).

1.7. ENVASE E ROTULAGEM

O envase consiste no acondicionamento do produto em embalagens adequadas, normalmente garrafas de vidro, em volumes de 600, 700 ou 1000 mL, por intermédio de envasadoras manuais, semi-automáticas ou automáticas, conforme o volume de produção. As garrafas são fechadas com tampas metálicas, rolhas ou conta-gotas. Sendo proibido o uso de embalagens plásticas.

Seguindo novas tendências do mercado, os produtores têm utilizado garrafas de cerâmica ou porcelana, de diferentes formatos e tamanhos. Para rosquear tampas metálicas nas garrafas de vidro, são utilizadas rosqueadeiras para recravação manual ou semi automática (BRASIL, 2005b; PEREIRA et al., 2006).

A Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, do MAPA (BRASIL, 2005a), estabeleceu que a rotulagem da aguardente de cana deve estar de acordo com as normas do Regulamento da Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997). Assim, os rótulos devem apresentar como dizeres obrigatórios a denominação do produto; marca comercial; produzido/standardizado e engarrafado por:...(razão social); endereço do local de produção/engarrafamento; CNPJ; número do registro do produto no MAPA; grau Alcoólico:% em vol.; conteúdo, observando o disposto na Portaria INMETRO nº 88/96 (BRASIL, 1996); composição (destilado do mosto fermentado de cana-de-açúcar); Lote nº.....; validade (produto não perecível); a expressão "Indústria Brasileira", por extenso ou abreviada. As seguintes frases de advertência devem estar em destaque: "Evite o consumo excessivo de álcool" e "Proibida a venda a menores de 18 anos"

Os locais de envase da aguardente de cana, as embalagens e os rótulos devem atender à legislação vigente específica. Convém que a produção seja identificada por número de lote, de forma a contribuir para a rastreabilidade de cada produto. Está na rastreabilidade um dos segredos para que o produtor obtenha qualidade. O grau de rastreabilidade deverá ser suficiente de forma a permitir identificar, partindo da

embalagem final do produto até a fazenda de onde foi retirada a cana-de-açúcar, bem como todos os ingredientes envolvidos na produção do mesmo. Daí a importância da manutenção dos registros ao longo do processo (PEREIRA et al., 2006).

1.8. ASPECTOS DE IDENTIDADE E QUALIDADE

A aguardente de cana, hoje, é um produto cada vez mais consumido por todas as classes sociais, o que tem gerado uma crescente demanda por produtos de melhor qualidade. Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de aprimorar tanto a qualidade da matéria-prima, testando novas variedades de cana-de-açúcar, quanto em relação aos cuidados observados durante os processos de fermentação e destilação, assim como no controle de eventuais contaminantes (MAIA et al., 1991; VARGAS e GLÓRIA, 1995; BRUNO, 2006).

A avaliação da aguardente de cana é feita com base na legislação brasileira (BRASIL, 2005a), que especifica que esta deve atender aos requisitos mostrados na Tabela 1. Anterior a esta legislação, a que regia era a Portaria nº 371 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária de 1974, e o carbamato de etila não era preconizado (BRASIL, 1974).

Apesar do grande volume produzido e comercializado, a qualidade de grande parte das aguardentes de cana deixa muito a desejar. Muitos leigos, ou mesmo curiosos, estão à frente das unidades produtoras, executando o processo muitas vezes de maneira empírica e rudimentar, baseados no senso comum e informações errôneas que muitas vezes passam de pai para filho (BIZELLI et al., 2000).

Tabela 1. Padrão de identidade da aguardente de cana

Parâmetros	BRASIL (1974)		BRASIL (2005a)	
	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo
Grau alcoólico em % vol.			54,0	38,0
Álcool metílico em mg/100 mL de álcool anidro	200	-	20	-
Cobre (Cu) em mg/L	5,0	-	5,0	-
Chumbo (Pb) em µg/L	-	-	200	-
Arsênio (Ar) em µg/L	-	-	100	-
Carbamato de etila em µg/L	-	-	150	-
Acroleína em g/100 mL de álcool anidro	-	-	5,0	-
Açúcares totais em g/L			6,0	-
Acidez volátil em ácido acético em g/100 mL de álcool anidro	0,150	-	0,150	-
Ésteres totais expresso em acetato de etila em g/100 mL de álcool anidro	0,200	-	0,200	-
Aldeídos totais em acetaldeído em mg/100 mL de álcool anidro	30	-	30	-
Soma de furfural e hidroximetilfurfural em mg/100 mL de álcool anidro	5,0	-	5,0	-
Álcoois superiores em g/100 mL de álcool anidro	0,300	-	0,300	-
Soma dos álcoois isobutílico (2-metilpropanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol), em mg/100 mL de álcool anidro	-	-	360	-

A destilação é certamente uma etapa decisiva na qualidade da bebida destilada. Há muitos anos já se admite a necessidade de efetuar o seu controle, principalmente quando se possui uma destilação descontínua, na qual o operador tem que ter muita habilidade, pois só se apóia no uso de um alcoômetro. Atualmente, a boa qualidade da matéria prima também tem recebido grande importância como o processo de fermentação. Os métodos objetivos de análises como cromatografia gasosa e líquida tem contribuindo para melhoria da garantia e do controle de qualidade (VARNAN e SUTHERLAND, 1997).

O controle de qualidade deve ser feito durante a produção, observando os critérios de boas práticas de fabricação durante a realização de todas as etapas necessárias à obtenção do produto. As principais etapas são a seleção da variedade que será cultivada; os tratamentos culturais aplicados na produção da cana; o controle sanitário; a colheita e o transporte da cana; a fabricação da aguardente de cana; o armazenamento e o envelhecimento; a padronização da bebida e o envasamento (PEREIRA et al., 2006).

É importante destacar que algumas substâncias tóxicas podem comprometer seriamente a qualidade da aguardente de cana, dentre elas, o carbamato de etila e o cobre (LABANCA et al., 2008).

2. CARBAMATO DE ETILA

2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

O carbamato de etila (uretana), com fórmula molecular $\text{H}_2\text{NCOOC}_2\text{H}_5$, é o éster etílico do ácido carbâmico (Figura 2). Apresenta-se na forma de cristal incolor ou na forma de um pó branco granular, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo, tem ponto de fusão entre 48 e 50 °C, e ponto de ebulição entre 182 e 184 °C, com peso molecular de 89,09 (MERCK, 2001). Foi primeiramente utilizado como hipnótico, anestésico e também na síntese de alguns fármacos (SCHLATTER e LUTZ, 1990).

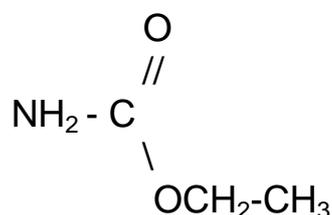
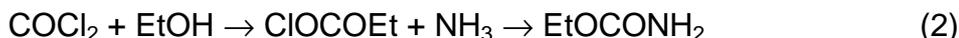


Figura 2. Estrutura química do carbamato de etila.

Como o carbamato de etila tem baixa volatilidade em soluções hidroalcoólicas, a contribuição do vinho para as quantidades presentes em bebidas destiladas não é significativa, pois dificilmente o carbamato de etila presente no vinho poderia destilar ou ser arrastado durante o processo de destilação. Por isso, os níveis de carbamato de etila nesses produtos foram associados a precursores nitrogenados que aparecem durante a destilação (BRUNO et al., 2007).

Segundo MACKENZIE et al. (1990), a formação do carbamato de etila em destilados, foi, primeiramente, observada em destilados de frutas e atribuída a reações induzidas pela luz envolvendo o cianeto de hidrogênio. Contudo, RIFFKIN et al. (1989), utilizando pequenos alambiques experimentais, um deles totalmente em cobre, mostraram que a formação do carbamato de etila em recém destilados só ocorria na presença de cobre, numa reação tempo dependente, que se completava após cerca de 48 h.

Normalmente, o carbamato de etila é produzido industrialmente a partir do fosfogênio, da ureia ou da cianamida. Por exemplo, através do fosfogênio, que é um gás altamente tóxico, o processo inicia-se com uma reação entre o monóxido de carbono e o cloro, conforme as reações abaixo (equações 1 e 2) (MORRISON e BOYD, 1973).



2.2. OCORRÊNCIA

A pesquisa sobre a formação de carbamato de etila em alimentos começou na década de 70. Somente em alimentos fermentados tem sido detectada sua presença, conforme alguns exemplos apresentados nas tabelas 2, 3 e 4. Ao contrário dos pesticidas da classe do carbamato, a presença de carbamato de etila em alimentos como pão, vinho, iogurte, queijo, cerveja e, principalmente, em bebidas alcoólicas, ocorre de forma natural (OUGH, 1976a e b; HASNIP et al., 2007). Os teores de carbamato de etila mais elevados estão associados às bebidas alcoólicas. Quanto aos alimentos fermentados, que fazem parte de uma dieta diária, como pães, iogurtes e molho de soja, os teores encontrados estão em níveis bem mais baixos (Tabela 2).

Alguns estudos foram realizados com relação aos teores de carbamato de etila em aguardente de cana no Brasil. ANDRADE-SOBRINHO et al. (2002) encontraram teores que variaram de 13 a 5700 $\mu\text{g/L}$ (média de 770 $\mu\text{g/L}$), para 126 amostras de diversas regiões do Brasil. LABANCA et al. (2008) avaliaram aguardentes de cana mineiras, encontrando resultados que variaram de <30 a 2609 $\mu\text{g/L}$ para 71 amostras (Tabela 3).

Tabela 2. Teores de carbamato de etila encontrados em alimentos fermentados

Produto	Nº de amostras	Faixa ($\mu\text{g/L}$)	Referência
Iogurte	1	1	OUGH (1976a)
	9	< 1	DENNIS et al. (1989)
Molho de soja	1	4,4	OUGH (1976a)
	18	3 – 78	FAUHL (1993)
Pão	4	0,7 – 1,7	OUGH (1976a)
	9	< 5	DENNIS et al. (1989)
	22	1,2 – 2,9	HADDON et al. (1994)

Tabela 3. Teores de carbamato de etila encontrados em 71 amostras de aguardentes de cana mineiras

Teores ($\mu\text{g/L}$)	Nº de amostras	% de amostras
< 30	1	1,4
> 30 – 150	4	5,6
> 150 – 400	10	14,1
> 400 – 1000	31	43,7
> 1000 – 2000	21	29,6
> 2000	4	5,6

Fonte: LABANCA et al. (2008).

2.3. LEGISLAÇÃO

A presença de carbamato de etila em aguardente de cana foi regulamentada no Brasil através da Instrução Normativa nº 13 de 20 de junho de 2005, que estabelece, para aguardentes de cana, um teor máximo de 150 $\mu\text{g/L}$, limite igual ao estabelecido pelo Canadá (CONACHER et al., 1987), com um prazo de cinco anos para regularização da análise pelos produtores (BRASIL, 2005a).

Em 1985, o governo canadense foi o primeiro a estipular um limite máximo (Tabela 5) para a presença deste composto em bebidas fermentadas (CONACHER et al., 1986; 1987). Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA) não estabeleceu limites para o carbamato de etila, mas fez um plano de redução dos níveis em bebidas destiladas, vinhos e uísques juntamente com os produtores. Os limites estabelecidos a partir de janeiro de 1988 foram: 125 $\mu\text{g/L}$ para uísques, 15 $\mu\text{g/L}$ para vinhos que contenham menos de 14% de álcool e 60 $\mu\text{g/L}$ para vinhos que contenham mais de 14% de álcool (SEGAL, 1988).

Tabela 4. Teores de carbamato de etila encontrados em bebidas alcoólicas

<i>Produto</i>	Nº de amostras	Teor ($\mu\text{g/L}$)	Referência
Aguardente de cana	126	13 - 5700	ANDRADE-SOBRINHO et al. (2002)
	13	30 - 645	BARCELOS (2006)
	71	33 - 2609	LABANCA et al. (2008)
	32	< 10 - 714	BRUNO et al. (2007)
	04	< 40	ROTA (2008)
Aguardente de frutas	4	<5 - 139	DENNIS et al. (1989)
	166	< 20 - 4330	BATTAGLIA et al. (1990)
Cerveja	3	0,6 - 3,9	OUGH (1976a)
	15	<1 - 1,8	DENNIS et al. (1989)
Gim	3	< 5 - 5	DENNIS et al. (1989)
	4	< 50	CLEGG et al. (1988)
Licores	1	50	CAIRNS et al. (1987)
	8	9 - 439	DENNIS et al. (1989)
	24	< 10 - < 40	BATTAGLIA et al. (1990)
Rum	20	< 50 - 150	CLEGG et al. (1988)
Saquê	1	170	OUGH (1976a)
Uísque	1	100	CAIRNS et al. (1987)
	44	< 50 - > 150	CLEGG et al. (1988)
	80	< 30 - 353	BATTAGLIA et al. (1990)
	11	19 - 90	DENNIS et al. (1989)
	229	15 - 100	AYLOTT et al. (1987)
Vermute	7	7 - 50	CLEGG et al. (1988)
Vinho de mesa	11	1,2 - 5,8	OUGH (1976a)
	32	<20 - 100	CAIRNS et al. (1987)
	74	< 10 - 84	BATTAGLIA et al. (1990)
	233	< 10 - 100	CLEGG et al. (1988)
	31	1 - 18	DENNIS et al. (1989)
Vinho fortificado	12	100 - 500	CAIRNS et al. (1987)
	256	< 10 - > 200	CLEGG et al. (1988)
	222	< 10 - 7800	BATTAGLIA et al. (1990)
	12	< 5 - 60	DENNIS et al. (1989)
Vodka	5	< 50	CLEGG et al. (1988)

Tabela 5. Limites estipulados pelo Canadá para o teor de carbamato de etila em bebidas alcoólicas

<i>Bebida</i>	Limite ($\mu\text{g/L}$)
Vinhos de mesa	30
Vinhos fortificados	100
Bebidas destiladas	150
Licores de frutas	400

Fonte: CONACHER et al. (1987).

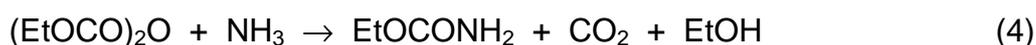
2.4. FORMAÇÃO

A principal forma de produção de carbamato de etila para fins comerciais é através da reação de condensação entre ureia e etanol (equação 3) (CANAS, 1999; ARESTA et al., 2001). Este não é o único mecanismo para a formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas. Na verdade, o carbamato de etila pode ser formado por diferentes vias dependendo da natureza do alimento a ser considerado e dos precursores disponíveis na matéria prima ou que venham a ser disponibilizados (ZIMMERLI e SCHLATTER, 1991).



2.4.1. Formação em vinhos

A pesquisa sobre carbamato de etila em alimentos começou com a investigação sobre a formação deste composto a partir da reação de amônia com pirocarbonato de dietila (equação 4), aditivo usado na fabricação de vinho, com a finalidade de controlar a atividade microbológica (VEGA e FLORENTINO, 2000; ARESTA et al., 2001).



Em seguida, foi observado que a ureia, uma fonte de nitrogênio para as leveduras, podia reagir com o etanol produzindo carbamato de etila (FUJINAWA et al., 1990; KODAMA et al., 1994; VARNAN e SUTHERLAND, 1997; POLASTRO et al., 2001). No passado era freqüentemente adicionada à dorna de fermentação, porém atualmente deixou de ser utilizada.

Os teores de ureia empregados na adubação de parreiras foram correlacionados com os teores de carbamato de etila em vinhos. Entretanto, foram encontrados níveis de carbamato de etila em bebidas nas quais não foi utilizada ureia na adubação (OUGH, 1976a,b). Mesmo quando não adicionada, a ureia pode ser produzida durante o processo fermentativo, devido ao metabolismo das leveduras, proveniente da degradação catalítica da arginina pela arginase (OUGH e AMERINE, 1988).

Os aminoácidos são também possíveis precursores de carbamato de etila, como,

por exemplo, a arginina, cuja degradação pelas leveduras produz a ornitina e a ureia. Portanto, a presença de aminoácidos também é indesejável no produto final (POLASTRO, 1999).

A formação de carbamato de etila foi observada, reagindo álcool etílico em pH 3,5 com carbamifosfato em diversas concentrações, com resultado proporcional às concentrações dos reagentes (OUGH, 1976a,b).

De acordo com MONTEIRO e BISSON (1991); LIU et al. (1994); MULLER e FUGELSANG (1996); ORDUÑA et al. (1999); FRANCISQUETTI et al. (2002); DIVOL et al. (2003); PARDO (2003); ARENA e NADRA (2005); FRANCIS (2006) e UTHURRY et al. (2006) e NADRA (2007) a ureia, o carbamifosfato, a arginina e a citrulina constituem os principais precursores para a formação de carbamato de etila em vinhos. Outros fatores que podem influenciar a formação do carbamato de etila incluem a luz, o tempo, e a temperatura de armazenamento (FIELD e LANG 1988; TEGMO-LARSSON e SPITTLER, 1990; STEVENS e OUGH, 1993).

TEGMO-LARSSON e SPITTLER (1990) pesquisaram em uma série de vinhos tintos e brancos o efeito do armazenamento durante 3, 6 e 12 meses, nas temperaturas de 22, 32 e 43 °C na ausência de luz, à 22 °C sob luz fluorescente, e em condições naturais de luz e temperatura, simulando o ponto de venda destes produtos. Os resultados mostraram que à temperatura de 43 °C, a concentração de carbamato de etila pode exceder níveis aceitáveis, mas à 22 °C, ou seja, em temperaturas mais baixas de estocagem, estas concentrações não foram alcançadas. Observaram também que a luz não teve influência significativa na formação do carbamato de etila.

HASNIP et al. (2004) avaliaram o efeito do tempo e da temperatura de armazenamento de vinhos por três anos sobre a concentração de carbamato de etila. O estudo acompanhou a formação do carbamato de etila e a concentração da ureia e citrulina, que são dois importantes precursores do carbamato de etila em vinhos. Uma relação baseada nos teores de ureia e de citrulina levou ao desenvolvimento de uma equação que pode ser usada para prever a concentração de carbamato de etila no vinho, na hora do consumo, resultante de um determinado tempo de armazenamento e temperatura.

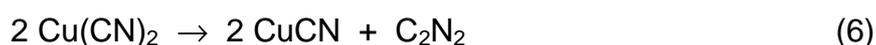
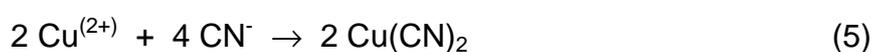
2.4.2. Formação em bebidas destiladas

A formação de carbamato de etila em destilados pode ocorrer antes, durante e depois do processo de destilação, incluindo o armazenamento da bebida. A formação antes da destilação deve ocorrer pelas mesmas vias que ocorrem em vinhos, mas

segundo COOK et al. (1990), a contribuição deste para o produto final não é considerável, uma vez que o carbamato de etila tem um ponto de ebulição de 185 °C e o processo de destilação não deveria carrear o composto.

A formação do carbamato de etila em uísque obtido de vários cereais foi estudada por AYLOTT et al. (1990). Após a destilação e a maturação por um ano em barris de carvalho foram analisados possíveis precursores da formação do carbamato de etila, como cianetos, cianatos, cianidrina e complexos cobre-cianeto. Foi observado que existe a necessidade da presença de traços destes compostos. Amostras de destilados engarrafadas em vidros de cor clara expostas à luz artificial fluorescente em laboratório, por 72 h a 43 °C apresentaram teores crescentes de carbamato de etila sendo esta formação completada após três dias.

De acordo com MACKENZIE et al. (1990), o precursor mais importante em destilados para a formação do carbamato de etila é o íon cianeto. Dois mecanismos químicos foram propostos como os mais prováveis para a sua formação. O primeiro é baseado na complexação do cianeto por Cu⁽²⁺⁾, proveniente do aparelho destilador seguido pela oxidação a cianogênio e com subsequente desproporcionamento a cianato (equações 5-8). O cianato pode reagir com etanol para formar carbamato de etila (equação 8).



Diferentes espécies de complexos cianeto-Cu^I foram encontradas em aparelhos de destilação de uísques, como CuCN, Cu(CN)₂⁻, Cu₂(CN)₃⁻, Cu₃(CN)₄⁻, dando suporte à hipótese de que a formação de carbamato de etila também pode começar mesmo durante o processo de destilação (MACKENZIE et al., 1990).

O segundo mecanismo químico é baseado na auto-oxidação induzida por radiação ultravioleta de compostos insaturados presentes nas bebidas alcoólicas, os quais produzem radicais livres (orgânicos ou peróxidos) que catalisam a oxidação do cianeto a cianato, como descrito nas equações 9 a 17 (ARESTA et al., 2001).

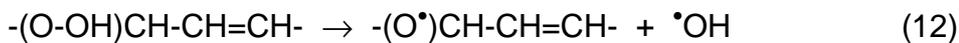
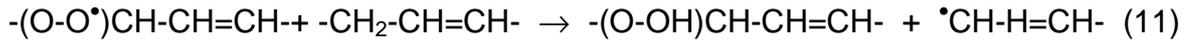
Período de iniciação



Período de propagação



Período de auto-oxidação



Formação de carbamato de etila



Estudos durante o processo de destilação do uísque, comparando os destiladores de cobre e de vidro, indicaram que a formação de carbamato de etila somente ocorre em presença de cobre. Observou-se ainda que quanto maior o tempo de armazenamento, maior a formação de carbamato de etila. Numa segunda destilação, várias frações foram coletadas em diferentes concentrações de etanol. Somente 1 a 2 % do carbamato de etila destila junto com a fração mais concentrada em álcool. Estes resultados permitiram concluir que o mecanismo de formação do carbamato de etila é dependente do contato do cobre com alguns compostos nitrogenados presentes no mosto, durante a destilação (RIFFKIN et al., 1989, CAPPELINI et al., 2007).

Existem relatos da influência das condições de maltagem da cevada na formação do carbamato de etila. Diversos compostos presentes naturalmente no malte foram

analisados, pois estes podem ser transferidos para o mosto e, durante a fermentação, originar cianeto e este passar ao destilado (COOK et al., 1990). Estes autores descreveram também o isolamento e a identificação de um glicosídeo cianogênico, que foi considerado o maior responsável pelo teor de carbamato de etila no destilado. Os fatores que influenciaram a formação deste precursor foram descritos e variedades diferentes de cevada foram escolhidas no sentido de se reduzir ainda mais os níveis de carbamato de etila no uísque.

O íon cianeto é formado a partir da degradação termo-enzimática de glicosídeos cianogênicos (Figura 3), como a epiheterodendrina presente na cevada e a amidalina, em frutas como maçã e pêssigo (MACKENZIE et al., 1990). A cana de açúcar já foi descrita como um vegetal cianogênico, mas o composto cianogênico ainda é desconhecido (JONES, 1998).

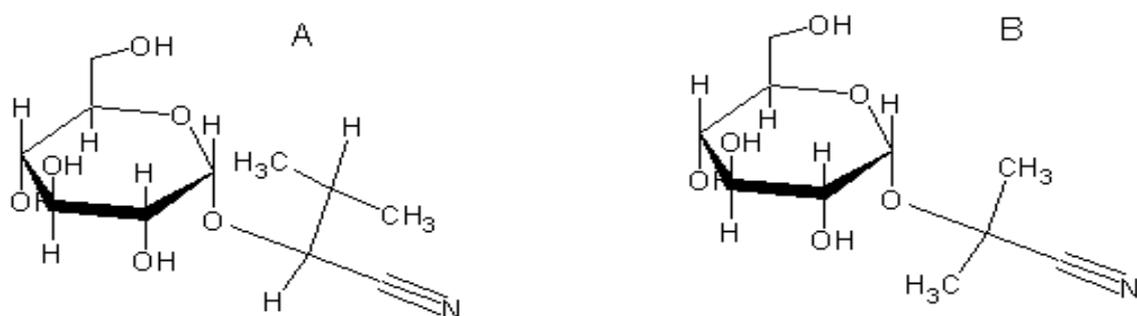


Figura 3. Exemplos de glicosídeos cianogênicos: (A) epiheterodendrina e (B) amidalina.

BOSCOLO (2002) estudou a influência do $\text{Cu}^{(2+)}$ na reação do etanol com cianato reagindo 5 mL de etanol aquoso (30%), KCN (6,7 mM), e CuSO_4 nas concentrações de 0,0; 1,0; 4,0; 6,4; 10; 20 e 40 mM. As amostras foram incubadas por 8 h a 80 °C e analisadas quanto aos teores de carbamato de etila, por GC-FID. O mesmo experimento foi realizado substituindo CuSO_4 por $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e Fe_2Cl_3 , em concentrações de 3,0; 6,0; e 12,0 mM. Foi encontrada correlação positiva para estes ensaios.

A reação da ureia com etanol na presença de íons $\text{Cu}^{(2+)}$ para a produção de carbamato de etila também foi verificada. Os resultados evidenciaram uma influência positiva na concentração de íons $\text{Cu}^{(2+)}$ para a formação de carbamato de etila a partir da ureia, uma explicação para tal fato é que, predominantemente, a ureia não reage com o etanol de forma direta, mas sim com o cianato. O aquecimento também foi fator positivo na formação do carbamato de etila (BOSCOLO, 2002).

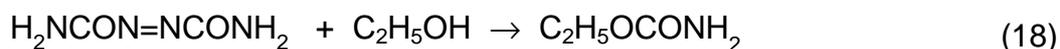
O efeito de atmosferas de O_2 , N_2 e CO_2 foi avaliado com reações envolvendo íons cianeto e íons $\text{Cu}^{(2+)}$. Em tubos com tampa foram adicionados 5 mL de solução etanólica

a 30% de CuSO₄ (20 mM), seguido da saturação das soluções com O₂, N₂ e CO₂. Após a saturação com estes gases, foram adicionados 260 µL de KCN (1,94 M). As amostras foram incubadas a 80 °C por 4 h. As soluções foram resfriadas a temperatura ambiente e analisadas para carbamato de etila. Não foi observada correlação para diferentes atmosferas, confirmando que o oxigênio dissolvido na solução não contribui significativamente para o processo de oxidação do cianeto. Baseado nestes estudos, BOSCOLO (2002) concluiu que os principais precursores do carbamato de etila em aguardente de cana seriam o cobre, a ureia e o cianeto.

Apesar de conhecido que a formação de carbamato de etila em destilados é afetada por luz, pelo teor de etanol, pela temperatura e pela concentração de íons Cu⁽²⁺⁾ na bebida, muitos fatores ainda merecem atenção na elucidação dos mecanismos que resultam na formação de carbamato de etila a partir de precursores nitrogenados em destilados.

2.4.3. Formação em cerveja, pães e molhos

A azodicarbonamida, um aditivo usado na produção de pão e cerveja, também é um agente formador de carbamato de etila (equação 18). Felizmente, a quantidade de carbamato de etila nestes produtos raramente atinge concentrações superiores a 10 µg/L (DENNIS et al., 1997).



Fosfato de carbamila produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode reagir com etanol e produzir carbamato de etila no mosto (equação 19). O fosfato de carbamila em sistemas biológicos é gerado a partir da síntese de arginina, catalisada pela carbamil sintase envolvendo ATP, CO₂ e NH₃ (BOSCOLO, 2002).



MATSUDO et al. (1993) analisaram o carbamato de etila por CG-EM em molho de soja e concluíram que a sua ocorrência estava correlacionada com o acúmulo de citrulina no molho cru. O estudo foi feito analisando carbamato de etila, ureia, etanol, ácido láctico e os aminoácidos citrulina, ornitina e arginina no molho antes da pasteurização. A concentração de carbamato de etila teve um aumento diretamente proporcional ao tempo de aquecimento à 80 °C, durante a pasteurização.

2.5. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC, 2007), o carbamato de etila é classificado no Grupo 2B, sendo que em 1974, era classificado no Grupo 2A (EFSA, 2007). Esta classificação está de acordo com a evidência de carcinogenicidade em humanos e em animais experimentais. Os agentes são divididos em grupos, conforme indicado na tabela 6 (IARC, 2006).

Tabela 6. Classificação dos grupos de compostos carcinogênicos pela IARC

Grupo	Efeito/ Observação
1	O agente é carcinogênico para humanos. Esta categoria é atribuída quando existe suficiente evidência de carcinogenicidade em humanos.
2	Esta categoria inclui agentes que apresentam evidência quase suficiente de carcinogenicidade em humanos, ou que apresentam suficiente evidência de carcinogenicidade em animais experimentais.
2A	Prováveis carcinogênicos para humanos. É utilizado para os agentes que apresentam limitada evidência de carcinogenicidade em humanos e suficiente evidência de carcinogenicidade em animais experimentais.
2B	Possíveis carcinogênicos para humanos. Refere-se a agentes para os quais há inadequada evidência de carcinogenicidade em humanos, mas há suficiente evidência de carcinogenicidade em animais experimentais.
3	O agente não é classificado como carcinogênico para humanos.
4	O agente é provavelmente não carcinogênico para humanos.

Fonte: IARC (2006).

A carcinogenicidade do carbamato de etila foi primeiramente relatada em 1943, quando Nettleship e colaboradores detectaram tumores, em sua maior parte adenomas, nos pulmões de fêmeas de camundongos, num período de 2 a 3 meses, após 2 ou 3 injeções intraperitoniais de uma dose anestésica mínima – 1 mL/100 g (HOFFLER et al., 2003).

A dose letal (LD₅₀) do carbamato de etila, ou seja, a dose necessária para provocar a morte da metade dos membros de uma população em roedores é de,

aproximadamente, 2000 mg/kg. Após doses repetidas, administradas via água de beber por 13 semanas, ocorreu um aumento na mortalidade de ratos e camundongos que receberam doses de cerca de 500–600 mg/kg por dia. Nesses roedores, o carbamato de etila fornecido em doses \geq 150 mg/kg por dia provocou redução no ganho de peso e efeitos nos pulmões, fígado, rim, coração, baço, nódulos linfáticos, timo, medula óssea e ovários. Tais efeitos não foram observados com doses de 50 mg/kg por dia (FAO/WHO, 2005).

HOFFLER et al. (2003) também observaram a produção de vários tumores em hamsters, porcos e sapos. Além disso, primatas não humanos submetidos a doses diárias (orais) de 250 mg/kg por 5 anos, durante um período de observação de até 22 anos, desenvolveram uma variedade de tumores semelhantes àqueles observados em roedores (incluindo adenocarcinoma do pulmão, adenoma e carcinoma hepatocelular, e hemangiosarcoma hepático). Quanto a observações em humanos, poucos dados foram disponibilizados e não reuniram qualificação suficiente para serem usados como parâmetros para avaliação de risco (FAO/WHO, 2005).

Sob condições normais de dieta, excluindo o consumo de bebidas alcoólicas, a ingestão diária do carbamato de etila em adultos é de, aproximadamente, 20 ng/kg de massa corpórea, sendo o pão a principal fonte, dentre os alimentos fermentáveis que geram teores baixos desse contaminante (FAO/WHO, 2005). O carbamato de etila, sendo prontamente absorvido pelo trato gastrintestinal e pela pele, é rápido e uniformemente distribuído pelo organismo. Sua eliminação, acima de 90%, como CO_2 , também é rápida e ocorre num período entre 6 e 24 h em camundongos e ratos, conforme relatado em diferentes estudos (HOFFLER et al., 2003; FAO/WHO, 2005).

A ativação metabólica é um pré-requisito para o desenvolvimento de tumores. Estudos recentes sugeriram que seu metabolismo ocorre através de duas vias principais. A primeira envolveria o metabolismo oxidativo, catalisado pelos citocromos P450 2E1, levando à formação do vinil carbamato (VC). Subseqüentemente, o VC pode sofrer oxidação, formando o vinil carbamato epóxido (VCE). O VCE é considerado o principal agente carcinogênico, tendo em vista a formação de derivados resultantes de sua ligação a ácidos nucléicos, a proteínas, ao RNA (HOFFLER et al., 2003) e ao DNA, cujos compostos formados por substituições em seus pares de base têm sido relatados como os responsáveis pela formação de tumores (BELAND et al., 2005; FAO/WHO, 2005).

A segunda via metabólica do carbamato de etila envolve a catálise pela esterase e leva à formação de CO_2 , etanol e NH_3 . O metabólito final, comum às duas vias, é o CO_2 . Diferentes quantidades de carbamato de etila e etanol, correspondentes a 0, 200, 500 e

1000 mg/L, e 0,5; 10 e 20% (v/v), respectivamente, foram adicionados à água consumida por fêmeas de camundongo por 12 semanas, ao final das quais os animais foram sacrificados. Todas as possíveis combinações dessas concentrações de carbamato de etila e etanol foram testadas (HOFFLER et al., 2003).

O carbamato de etila induziu a formação adenomas primários nos pulmões de todos os camundongos tratados em função da dose administrada. Uma média de 71 ± 15 tumores/camundongo se formou após tratamento com 1000 mg/L de carbamato de etila durante 2 semanas. A incidência de tumores foi reduzida em cerca de dois terços e pela metade, aproximadamente, quando do tratamento simultâneo com etanol a 20 e 10% v/v, respectivamente. Nesses casos, o efeito foi independente da dose de carbamato de etila. Contudo, em 5% de etanol, não houve redução estatisticamente significativa da incidência de tumores (KRISTIANSEN et al., 1990).

STOWENSAND et al. (1991) avaliaram a incidência de tumores em camundongos a partir de duas diferentes dosagens de carbamato de etila (10 e 20 mg por kg de massa corpórea), adicionadas à água, a vinhos e a etanol em água (12% v/v). Verificou-se que os tratamentos com vinho e álcool provocaram uma menor incidência de tumores, quando comparados à solução aquosa. Uma hipótese para explicar esse fato sugere que a co-administração do carbamato de etila com etanol poderia inibir a ativação do citocromo P450 2E1 e incrementar a eliminação pela esterase. Utilizou-se carbamato de etila marcado com carbono 14, verificando que, aproximadamente, 90% do composto é completamente degradado a CO_2 , H_2O e NH_3 , dentro de 24 h; e 5 a 10% é excretado na urina, principalmente como metabólitos, ou permanecem no corpo.

Em testes de toxicidade em animais, foi comprovado que o carbamato de etila foi causador de adenomas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos, hepatomas, carcinomas mamários, tumores de ovários, hemangiomas hepáticos e tumores melanóticos de pele e de íris, entre outros. Desta forma, existe um consenso para que, o teor de carbamato de etila em alimentos deva ser o menor possível (KAIL, 1990; SCHLATTER e LUTZ, 1990).

HUBNER et al. (1996) estudaram a genotoxicidade do carbamato de etila em *Salmonella*, leveduras e célula linfoblástico humana, confirmando este efeito. ABRAHAM et al. (1997) investigaram os efeitos antígenotóxicos do café, chá e especiarias em animais que consumiram carbamato de etila e comprovou que estes efeitos existiam.

2.6. REDUÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA EM BEBIDAS ALCOÓLICAS

Alguns trabalhos têm sido publicados sobre a redução do carbamato de etila formado durante o processo de produção do vinho, relatando cuidados específicos com fertilizantes, nas cultivares e na fermentação (BUTZKE e BISSON, 1997; MORRIS et al., 2003; ZIETSMAN et al., 2003).

Pesquisas indicam também que é possível reduzir os teores de carbamato de etila em vinhos, reduzindo o nível dos agentes precursores, selecionando o fermento, controlando a fermentação e ajustando o pH da massa fermentativa com sulfato de cobre, por exemplo (NOUT, 1994; BUTZKE e BISSON, 1997). Modificações genéticas em leveduras do vinho têm sido estudadas com objetivo de eliminar a produção de ureia e, conseqüentemente, a produção do carbamato de etila (VARNAN e SUTHERLAND, 1997; PARK et al., 2001; COULON et al., 2006a,b; PIZARRO et al., 2007).

BRUNO (2006), utilizando experimentos inéditos de coleta *in loco*, a partir de recém-destilados de cana de açúcar produzidos por 10 sistemas de destilação existentes em 9 estabelecimentos produtores do estado do Rio de Janeiro, demonstrou que a utilização de resina catiônica comercial reduziu em cerca de 60% os níveis do carbamato de etila em aguardentes de cana. Estes estudos de adequação dos processos de destilação e da utilização da resina Dowex-Marathon C permitiram reduzir drasticamente os principais contaminantes em aguardentes de cana, sem prejuízo da sua qualidade sensorial, representando significativa contribuição para a melhoria de sua qualidade.

O processo mais utilizado para reduzir os teores de carbamato de etila em aguardentes de cana tem sido a bidestilação ou dupla destilação (NOVAES, 1994). Contudo, este tipo de retificação geralmente pode provocar uma redução significativa do *flavor*, sem contar os custos adicionais de tempo e mão-de-obra. Baseado no fato de que o íon cianeto (CN⁻) é considerado precursor do carbamato de etila, ANDRADE-SOBRINHO et al. (2002), propuseram o enchimento da coluna dos alambiques com dispositivos em cobre (discos, anéis, etc.). Neste processo, seriam formados os complexos cobre-cianeto nas partes ascendentes dos aparelhos de destilação, o que evitaria a formação do carbamato de etila em suas partes descendentes.

Considerando o que já foi exposto, é razoável supor que o processo de bidestilação pode representar uma maneira eficaz para reduzir, ou mesmo evitar, a presença desse contaminante na aguardente de cana, tanto reduzindo a destilação dos precursores (na segunda destilação) quanto reduzindo os teores de cobre contaminante (ROTA, 2008).

Outro procedimento, o tratamento com resinas catiônicas, é baseado na supressão da ação catalítica do cobre na formação do carbamato de etila, em sua maior parte formada entre 1 e 48 h no recém pós-distilado (ARESTA et al., 2001; BOSCOLO, 2002). Este processo não foi estudado e desenvolvido sob a alegação de altos custos e redução nos componentes do *flavor*, visando a redução dos teores de cobre em aguardentes de cana. O referido trabalho não apresentou avaliação sensorial das aguardente de cana estudadas, sempre provenientes de um único processo produtivo. Outros fatores a serem considerados são a maior estabilidade e uniformidade das microesferas das resinas hoje produzidas.

Nos Estados Unidos, a partir de 1989, a Food and Drug Administration (FDA) e o Bureau of Alcohol, Tobacco and Fire Arms (BATF) estabeleceram um acordo com os organismos representantes dos produtores de vinhos e bebidas destiladas, implementando programas voluntários. Estes visavam uma redução gradativa dos níveis do carbamato de etila, ocasião em que foram estabelecidos os seguintes limites máximos: uísques (125 µg/L); vinhos de mesa (15 µg/L); vinhos licorosos (60 µg/L) (CANAS et al., 1994). Na Europa, a Suíça propôs, na mesma época, um limite máximo de 400 µg/L para esse contaminante em bebidas destiladas (RIFFKIN et al., 1989).

Considerando-se que altas concentrações de ureia e arginina, assim como elevadas temperaturas estão diretamente correlacionadas a altos teores de carbamato de etila em vinhos (FOULKE, 1993), várias ações preventivas foram propostas para a redução. Dentre elas, evitar excessivos teores de nitrogênio nos solos das vinhas e no mosto; atentar para o fato de que o uso de preparações a base de ureases não eliminam completamente a formação do carbamato de etila, pois não tem efeito sobre vários outros precursores nitrogenados e é limitado pela composição do mosto (pH, etc.) (ZIETSMAN et al., 2003); evitar teores de arginina no suco de uva maiores que 1000 mg/L; selecionar linhagens de leveduras com baixa excreção de uréia e evitar exposição do vinho a temperaturas elevadas durante a armazenagem e transporte. No caso de vinhos fortificados recomenda-se realizar testes de fortificação em laboratório e analisar as concentrações de ureia nos produtos, assim como o carbamato de etila no álcool utilizado (BUTZKE e BISSON, 1997).

Segundo SCHEHL (2005), as grandes faixas de concentrações do carbamato de etila em destilados de frutas refletem a influência da indução luminosa e da formação tempo-dependente subsequente à destilação e ao armazenamento. As principais medidas preventivas para reduzir os níveis de carbamato de etila nesses produtos

consistem em selecionar frutos sadios e sem contaminações bacterianas, e manter condições de higiene apropriadas durante a fermentação, destilação e armazenamento.

2.7. METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA

A quantificação de carbamato de etila tem sido descrita na literatura empregando a cromatografia gasosa, variando a forma de detecção.

2.7.1. Extração e purificação

Para vinhos, uísques e bebidas alcoólicas de matrizes complexas, a extração consiste em retirar o analito com um solvente adequado (clorofórmio, diclorometano, éter etílico e éter de petróleo) na presença ou não de solução saturada de sal (NaCl). Esta fase orgânica é então separada e concentrada a vácuo, ou em temperatura abaixo da qual não haja perdas, até um volume desejável (Tabela 7) (WALKER et al., 1974; DENNIS et al., 1986; CONACHER et al., 1987, CLEGG e FRANK, 1988; PIERCE Jr. et al., 1988). WALKER et al. (1974) fizeram a extração de carbamato de etila em vinho com clorofórmio, adicionada de NaCl. O extrato foi filtrado sobre sulfato de sódio anidro, evaporado e passado em coluna de Florisil com acetato de etila para purificação, e concentrado novamente. A purificação de extratos de vinhos pode também ser feita, usando-se colunas adsorventes de Florisil, alumina, celite ou sílica-gel para eliminação de interferentes (WALKER et al., 1974; DENNIS et al., 1986; CLEGG e FRANK, 1988).

NAGATO (1995) e ANDRADE-SOBRINHO et al. (2002) relataram que a análise de aguardentes de cana não requer processo de extração de carbamato de etila da amostra. Entretanto, ARESTA et al. (2001) e BOSCOLO et al. (2000) fizeram a extração do carbamato de etila em aguardente de cana usando 50 mL da amostra, com 25 mL de KCl (300 g/L), seguido de duas extrações sucessivas com 15 mL de diclorometano/éter (4:1) e o extrato orgânico foi evaporado a 40 °C sob vácuo até o volume final de 5,0 mL.

Tabela 7. Condições cromatográficas para separação e quantificação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas em colunas de vidro, todas com detecção FID

Coluna de vidro	Condições cromatográficas	Referência
Carbowax 20 mol/L tratada com KOH	Injetor: 250 °C, Interface: 320 °C, Inicial: 90 °C/2 min – 70 °C/min até 200 °C, vol. Inj.: 5,0 µL Gás arraste: He a 40,0 mL/min	NAGATO (1995)
10% de Carbowax 20 M	Injetor: 250 °C, forno: 95 °C, Inicial: 60 °C/2 min -15 °C/min até 150 °C, vol. Inj.: 1,0 µL “splitless” Gás arraste: He a 2,0 mL/min	CAIRNS et al. (1987)
Chromosorb (10 x 12 mm)	Injetor: 200 °C, Coluna: 155 °C, Inicial: 100 °C/10 min – 6 °C/min até 200 °C, vol. Inj.: 2,0 µL; Gás arraste: He a 25 mL/min	JOE et al. (1977)

Separação e quantificação

Na literatura, a técnica mais utilizada para análise de carbamato de etila em bebidas alcoólicas é a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

O primeiro método utilizando a cromatografia gasosa para carbamato de etila em vinhos foi feito por WALKER et al. (1974). Estes autores utilizaram uma coluna empacotada Carbowax 1540 revestida com 10% OV-17, com detector específico de Coulson. O limite de detecção foi de 100 µg/L.

Vários métodos analíticos propostos para o carbamato de etila envolvem geralmente detecção por espectrometria de massas (BRUMLEY et al., 1988; CLEGG e FRANK, 1988; HASEGAWA et al., 1990; SEN et al., 1993; NAGATO, 1995; LABANCA et al., 2008), detecção seletiva para nitrogênio/fósforo (AYLOTT et al., 1987; 1990), detector eletrolítico de condutividade de Hall (DENNIS et al., 1986), detector de infravermelho por transformada de Fourier (MOSSOBA et al., 1988), e detecção por luminescência (CANAS et al., 1989; DYER, 1994).

Existem ainda metodologias baseadas na derivação do carbamato de etila com ácido trifluoroacético, analisado por detector eletrolítico de condutividade de Coulson (WALKER et al., 1974), com 9-xantidrol por análise em cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GIACHETTI et al., 1991), e por metilação (BAILEY et al., 1986). Nestes casos são requeridos morosos procedimentos para desidratação dos extratos. De acordo com a metodologia utilizada, diferentes tipos de colunas são aplicados, conforme apresentado nas tabelas 7, 9 e 10. Dependendo da característica da matriz, métodos de extração são necessários (Tabela 8).

Tabela 8. Métodos utilizados para a extração de carbamato de etila em bebidas alcoólicas

Material	Extração	Método de quantificação	Referência
Aguardente de cana	50 mL amostra, com 25 mL KCl (300 g/L), e duas extrações sucessivas com 15 mL diclorometano/éter (4:1), extrato orgânico evaporado 40 °C sob vácuo até 5,0 mL	CG-FID	ARESTA et al. (2001); BOSCOLO et al. (2000)
Aguardente de cana	Análise direta sem extração	CG-EM	ANDRADE-SOBRINHO et al. (2002); NAGATO (1995)
Vinho	10 mL amostra com 5 mL n-pentano, agitar (1 min) e secar o solvente. Adicionar 200 mg de NaCl, extrair com diclorometano/acetato de etila (9:1), agitar (5 min) e remover solvente com N ₂	CG-EM	GIACHETTI et al. (1991)
Vinho e bebidas destiladas	Amostra saturada com NaCl e extraída com diclorometano em funil de separação	CG-EM	CLEGG e FRANK (1988)
Vinho e bebidas destiladas	30 g amostra, adicionar 60 mL acetona em funil de separação com 7 g de NaCl e 100 mL diclorometano e 100 mL éter de petróleo. Agitar por 40 s e extrair com 100 mL diclorometano, reduzir o volume a 6 mL	CG-EM	CAIRNS et al. (1987)
Vinho e uísque	Absorvente extrator (Chemtube – Analytichem, ou Extrelut, Merck), com sulfato de sódio para desidratação da amostra e diclorometano como solvente	CG-EM	DENNIS et al. (1986)
Bebidas alcoólicas	50 mL amostra, com 50 g KCl, 3 extrações sucessivas com 100 mL diclorometano, extrato orgânico evaporado a 28 °C sob vácuo até 5,0 mL e volume aferido com tolueno	CG-EM	BAILEY et al. (1986)

Tabela 9. Condições cromatográficas para separação e quantificação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas em colunas capilares e com detector EM

Coluna	Condições cromatográficas/ Detector	Referência
Polietilenoglicol H-FFAP (50 m x 0,2 mm x 0,33 µm)	Injetor: 250 °C, Interface: 230 °C, Inicial:90 °C/2 min – 10 °C/min a 150 °C, 40 °C/min a 230 °C, vol. Inj.: 2,0 µL, splitless, gás arraste: He 1,5 mL/min	ANDRADE-SOBRINHO et al. (2002)
Capilar DB 624 20M (25 m x 0,32 µm)	Injetor: 225 °C, Inicial: 200 °C, gás arraste: He 1,5 mL/min	HADDON et al. (1994)
Capilar DB Wax 0,25 µm	Inicial: 70 °C/2 min, 8 °C/min a 180 °C/3 min, 20 °C/min a 220 °C/15 min, gás arraste: He a 26 cm/s	FAUHL et al. (1993)
Capilar Supelcowax (60 m x 0,25 mm e 0,33 µm)	Injetor: 180 °C, Interface: 220 °C, Inicial: 40 °C/1 min, 5 °C/min até 120°C, 3 °C/min até 200 °C (50 min), gás arraste: He a 1,12 mL/min	MATSUDO et al. (1993)
Capilar DB 5 (0,25 µm) derivação com xantidrol	Injetor: 250 °C, Interface: 230 °C, Inicial: 150 °C/1 min 3,5 °C/min a 180 °C, 30 °C/min a 260 °C, gás arraste: He 1,5 mL/min	GIACHETTI et al. (1991)
Capilar CBP-20 (25 m x 0,2 mm x 0,25 µm)	Injetor: 180 °C, Inicial: 60 °C/2min a 140 °C a 32 °C/min, a 170 °C a 4 °C/min, vol. Inj.: 2,0 µL gás arraste: He a 1 mL/min	HASEGAWA et al. (1990)
Capilar Carbowax (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Injetor: 200 °C, Interface: 225 °C, Inicial: 40 a 150 °C a 12,5 °C/min, e a 250 °C com 20 °C/min, vol. Inj.: 2,0 µL, gás arraste: He a 38 cm/s	CANAS et al. (1989)
Capilar Carbowax (60 m x 0,25 µm x 0,25 mm)	Injetor: 180 °C, Interface: 220 °C, Inicial: 40 a 150 °C, com 12,5 °C/min, a 250 °C com 20 °C/min, gás arraste: He a 38 cm/s	BRUMLEY et al. (1988)
Supelcowax 10, sílica (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Injetor: 220 °C, Interface: 220 °C, Inicial: 60 °C - 5°C/min a 150 °C, 30 °C/min a 220 °C, pressão: 15 psi, gás arraste: He 30 cm/s	CLEGG e FRANK (1988)
Capilar Carbopack 18 m x 2 mm	Injetor: 250 °C, Interface: 250 °C, Inicial: 100 °C/2 min, 16 °C/min a 220 °C/5 min, vol. Inj. 2,0-4,0 µL	PIERCE et al. (1988)
Capilar HP (25 m x 0,20 µm)	Injetor: 200 °C, Inicial: 60 °C -5 °C/min a 195 °C, vol. Inj.: 1,0 µL splitless, gás arraste: He 20 cm/s	RIFFKIN et al. (1989)
Capilar DB wax (30 m x 0,32 mm)	Injetor: 250 °C, forno: 84 °C, Inicial: 50°C/2 min, 20 °C/min até 140 °C, 20 °C/min até 250 °C (10 min), gás arraste: He 30,0 mL/min e H a 80 mL/min	CONACHER et al. (1987)
CP Wax 52 CB Chrompack (25 m x 0,31 mm x 0,21 µm)	Injetor: 200 °C, Interface: 200 °C, Inicial: 65 °C/1 min, 10 °C/min a 100 °C, 20 °C/min a 220°C (10 min), vol. Inj.: 2,0 µL; gás arraste: He a 0,6 bar	DENNIS et al. (1986)

Tabela 10. Condições cromatográficas para separação e quantificação de carbamato de etila em bebidas alcoólicas por CG e diferentes detectores

Coluna	Condições cromatográficas	Detectores	Referência
2 capilares conectadas: 1ª - apolar (metilsiloxano) HPULTRA-1 (25 m x 0,2 mm x 0,3 µm) e a 2ª polar (polietilenoglicol) H-FFAP (50 m x 0,2 mm x 0,3 µm)	Injetor: 250 °C, Interface: 230 °C Inicial: 70 °C (1 min) – 25 °C/min até 185 °C 30 °C/min até 230 °C vol. inj.: 2,0 µL, splitless Gás de arraste: He a 200 kPa	CG-FID	ARESTA et al. (2001); BOSCOLO et al. (2002)
Capilar DB Wax (30 m x 0,53 mm x 1 µm)	Injetor: 250 °C, Interface: 250 °C Inicial: 110 °C (4min) 8 °C/min até 200 °C (5 min) 5°C/min até 230 °C (5 min) , vol. inj.: 2,0-4,0 µL	CG-FID	PIERCE et al. (1988)
De vidro empacotada com etilenoglicol, 12 x 4 mm	Injetor: 230 °C, Coluna: 150 °C, Inicial: 100 °C (10 min) – 6 °C/min até 200 °C, vol. inj.: 2,0 µL; Gás de arraste: He a 40 mL/min	CG-FID	JOE Jr. et al. (1977)
Capilar Carbowax 20M (30 m x 0,53 mm x 1 µm)	Injetor: 200 °C, Interface: 225 °C Inicial: 60 °C (1min) 7 °C/min até 150 °C, 25 °C/min até 200 °C (15 min) , vol. inj.: 2,0 µL, Gás de arraste: He a 6 psi	CG-TEA	DYER (1994)
Capilar DB Wax (30 m x 0,53 mm x 1 µm)	Injetor: 200 °C, Interface: 225 °C Inicial: 100 °C, vol. inj.: 2,0 µL Gás de arraste: He a 8 mL/min	CG-TEA	CANAS et al. (1988 e 1989)
CP Wax 52 CB Chrompack (25 m x 0,31 mm x 0,21 µm)	Interface: 200 °C vol. inj.: 2,0 µL Gás de arraste: He a 0,6 bar.	CG-TEA	DENNIS et al. (1986)
Capilar DBWAX-30W (0,25 µm) J e W Scientific e HPNP (Termiônica)	Injetor: 250 °C, Interface: 280 °C, Inicial: 60 °C (3 min) – 10 °C/min até 240 °C, vol. inj.: 2,0 µL splitless, Gás de arraste: He a 1,0 mL/min	CG-NPT	BAILEY et al. (1986)

2.7.3. Uso de padrão interno deuterado para determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM

Os resultados provenientes das medições em química constituem a base principal para tomadas de decisões importantes no âmbito econômico, político, ambiental, médico ou legal, haja vista que a química está presente na maioria dos segmentos da vida moderna. Os laboratórios em geral buscam métodos de análise rápidos e eficazes; no entanto, às vezes é necessário aderir a métodos primários com alta

confiabilidade metrológica. Os métodos primários são definidos como “métodos que possuem as mais altas qualidades metrológicas para o qual uma declaração completa de incerteza pode ser feita em termos de unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI) e cujos resultados são, portanto, aceitos sem referência a um padrão ou grandeza sob medição” (VIM, 2005).

Sendo a diluição isotópica por espectrometria de massas um dos métodos primários reconhecidos pelo Comitê Consultivo para a Quantidade de Matéria (CCQM, 1996), subordinado ao Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), a mesma pode ser usada para a análise de compostos orgânicos em matrizes complexas. Este método consiste no emprego de um isótopo diluente como padrão interno capaz de prover alta exatidão na razão analito/padrão interno para garantir rastreabilidade (KAARLS e MILTON, 2004; CRUZ et al., 2008). Dentre os fatores que afetam este processo estão: equilíbrio completo entre o isótopo diluente e a matriz, extração completa do analito em relação ao isótopo diluente, instabilidade no instrumento empregado, efeito de memória e diferenças na fragmentação do analito e do isótopo diluente (CRUZ et al., 2008).

Padronização interna é a adição de uma substância conhecida em concentração definida em todos os padrões e nas amostras. Este padrão não pode co-eluir com a amostra e dever ser estável e detectado na concentração em que se encontra. Faz-se uma curva de calibração baseada na relação entre as áreas e concentrações do padrão interno (PI) e da substância de interesse (WERNIMONT, 1985; CORREIA, 2004).

Para a correção dos efeitos da matriz, solução de padrão interno é adicionada às amostras e à curva analítica em concentração igual para todos os pontos. O padrão interno passa por todo processamento da amostra, portanto as flutuações ocorridas no padrão interno durante a análise são consideradas para a correção dos teores dos analitos presentes na matriz (FERNANDES et al., 2003).

Poucos trabalhos relatam o uso do carbamato de etila deuterado como padrão interno para análise em CG-EM (HEINISCH, 2005). Usa-se um padrão interno para o qual deve ser escolhida uma substância que não existe na amostra. É normalmente incorporada à solução da amostra antes da injeção no cromatógrafo. Especialmente aconselhável quando alta precisão é necessária porque o padrão interno sofre as mesmas condições da substância de interesse durante a corrida cromatográfica (ENGELHARDT, 1979; POOLE e POOLE, 1991). Pequenos desvios de tempo de

retenção e na sensibilidade do detector que ocorrem entre corridas diferentes em um mesmo dia de trabalho são corrigidos (WERNIMONT, 1985).

O tempo de retenção do composto de interesse pode ser calculado relativo ao padrão interno minimizando diferenças no tempo de retenção que ocorrem entre corridas diferentes. Uma das grandes utilidades de um padrão interno está nos casos em que o analito não é estável para armazenamento sob a forma de padrão, dificultando, portanto, seu uso como padrão externo, ou ainda quando é difícil de ser encontrado como padrão ou este apresenta preços muito elevados. Reduz ainda os erros devidos a variações no volume de injeção, o que representa um problema maior em cromatografia gasosa (ENGELHARDT, 1979).

2.7.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

HERBERT et al. (2002) desenvolveram uma metodologia para a determinação do carbamato de etila em vinho através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em coluna AminoQuant 200 x 2,1 mm, com partícula de 5 µm e pré coluna ODS Hypersil 5 µm e 20 x 2,1 mm, com detecção por fluorescência após reação com 9-xantidrol formando um derivado fluorescente, a xantiuretana.

Ao analisarem aminas biogênicas em vinho, observaram a possibilidade de quantificar o carbamato de etila, por ser um composto também nitrogenado. Segundo estes autores, a determinação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas por cromatografia gasosa apresenta problemas por apresentarem muitos interferentes. Esta nova técnica tem como objetivo oferecer análise mais simples, seletiva e segura, que poderá ser facilmente utilizada em laboratórios com grande demanda.

Estudos demonstraram que vários grupos químicos reagem com o xantidrol, como aminoácidos, insulina, lisozima, ribonuclease e triptofano (DICKMAN e WESTCOTT, 1954; DICKMAN e CROCKETT, 1956; CLARK et al., 2007). Comprometendo a análise direta do carbamato de etila com o xantidrol, sugere-se utilizar a cromatografia líquida, que separa estes compostos (JOE Jr. et al., 1977).

Recentemente, PARK et al. (2007) compararam a metodologia de análise do carbamato de etila por HPLC fluorescência (método de HERBERT et al., 2002), HPLC-EM-EM com a metodologia CG-EM, encontrando resultados satisfatórios para análise do carbamato de etila em molho de soja pelos métodos HPLC-EM-EM e CG-EM. Não foi possível a quantificação pelo método por HPLC fluorescência, pois a curva de calibração

foi de 50 a 1000 µL, valores estes maiores que os encontrados em amostras de molho de soja, provavelmente pela presença de interferentes da matriz.

3. PRINCIPAIS PRECURSORES DO CARBAMATO DE ETILA

3.1. UREIA

3.1.1. Características físico-químicas

A ureia, de fórmula molecular $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, peso molecular de 60,10 g/mol, e nome comercial de carbamida, apresenta-se como um pó cristalino branco, pequenas bolas de mesma cor ou cristais transparentes. É ligeiramente higroscópico, dificilmente pulverizável, inodoro ou quase inodoro e com um sabor salino amargo. Em presença de umidade pode desprender leve odor de amônia. A ureia aumenta a osmolaridade do plasma sanguíneo, aumentando o fluxo de água dos tecidos (cérebro e líquido cefalorraquidiano) para o plasma e o líquido intersticial. Desta maneira, reduz a pressão intracraniana elevada e o volume e a pressão do líquido cefalorraquidiano. Por um mecanismo similar reduz a pressão intra-ocular. É metabolizada no trato gastrintestinal a amoníaco e dióxido de carbono, que podem voltar a sintetizar ureia. A eliminação é renal, com uma reabsorção de aproximadamente 50% (UREA, 2008).

Em baixas concentrações (até 2%), a ureia é usada em compressas para ferimentos, para limpeza e estimular a cicatrização. Em concentrações de até 10% é usada como hidratante, de 10 a 20% para hiperqueratose, de 10 a 40% para psoríase e de 20 a 40% para língua nigra vilosa. Pode também ser usada em infusão intravenosa em adultos, como diurético ou antiglaucomatoso (UREA, 2008).

3.1.2. Ocorrência em bebidas alcoólicas

Acredita-se que o precursor mais importante do carbamato de etila em vinhos seja a ureia, formada durante o metabolismo da arginina pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A arginina é um dos aminoácidos predominantes no suco de uva, sendo degradada pelas leveduras gerando ornitina, NH_3 e CO_2 durante a fermentação, por meio da enzima arginase. A ureia é um produto intermediário que se acumula na célula da levedura e, sendo um agente desnaturante, seu excesso é excretado para o mosto. O

etanol produzido na fermentação reage com a ureia, formando o carbamato de etila (ZIETSMAN et al., 2003; BRUNO, 2006).

A ureia é freqüentemente formada durante o início ou no meio da fermentação, e a subsequente geração de leveduras provoca sua metabolização durante os períodos finais. Os vinhos fortificados ou licorosos são, geralmente, produzidos pela interrupção da fermentação com álcool vínico. Altas concentrações de ureia serão formadas se a fermentação cessar no auge da extração máxima que, para muitas leveduras, ocorre na faixa de 12 a 16 Brix; seguido da metabolização da arginina remanescente e da reabsorção da ureia (BUTZKE e BISSON, 1997; BRUNO, 2006).

A ureia é uma fonte de nitrogênio para as leveduras. No passado era freqüentemente adicionada à dorna de fermentação, porém, atualmente, sabe-se que não é aconselhável, pois este composto pode reagir com o etanol produzindo carbamato de etila. Mesmo quando não adicionada, a ureia pode ser produzida durante o processo fermentativo, devido ao metabolismo das leveduras (POLASTRO et al., 2001; LABANCA e GLÓRIA, 2008). Alguns estudos sugerem a adição de urease em vinhos com objetivo de reduzir a ureia, e assim, o precursor do carbamato de etila (RIBEREAU-GAYON et al., 2000; FRANCIS et al., 2002; GALPIN, 2006).

Muitas linhagens de *S. cerevisiae* contêm um gene que codifica a enzima ureia amidolase, que degrada a ureia em NH_2 e CO_2 . Entretanto, certas linhagens não metabolizam completamente a ureia durante a fermentação, o que resulta no aumento dos teores de ureia no mosto, com conseqüente formação adicional de carbamato de etila. A deficiência da metabolização da ureia é, provavelmente, resultado da repressão do gene da ureia amidolase na presença de altos teores de fontes de nitrogênio, encontradas no suco de uva. Como resultado, esta enzima não é produzida em quantidades suficientes para degradar a ureia (BRUNO, 2006).

Considerando-se que altas concentrações de ureia estão diretamente correlacionadas a altos teores de carbamato de etila em vinhos (FOULKE, 1993), várias ações preventivas foram propostas para sua redução. As principais são evitar excessivos teores de nitrogênio nos solos das vinhas e no mosto; atentar ao fato de que o uso de preparações a base de ureases não eliminam completamente a formação do carbamato de etila, pois não tem efeito sobre vários outros precursores nitrogenados e é limitado pela composição do mosto (ZIETSMAN et al., 2006); selecionar linhagens de leveduras com baixa excreção de ureia; evitar exposição do vinho a temperaturas elevadas durante a armazenagem e transporte (BUTZKE e BISSON, 1997).

CAPPELINI et al. (2007) analisaram 192 amostras de aguardente de cana coletadas em São Paulo quanto aos teores de ureia por método colorimétrico (114 coletadas em 2002 e 78 em 2005). Para as amostras coletadas em 2002 o valor máximo de ureia encontrado foi de 0,44 mg/L e o mínimo e a mediana foram 0,14 e 0,20 mg/L, respectivamente. Para as amostras referentes ao ano de 2005, o valor máximo foi de 0,40, o mínimo 0,11 e a mediana de 0,24 mg/L.

3.1.3. Aspectos toxicológicos

A ureia, por si só, não é considerada um substância tóxica (UREA, 2008), mas por ser precursor do carbamato de etila é importante estudá-lo, visando a prevenção da sua formação.

3.1.4. Metodologia analítica

A ureia em bebidas alcoólicas pode ser analisada por método espectrofotométrico, conforme sugerido por ALMY e OUGH (1989). Em vinho, a ureia é extraída usando coluna de troca iônica, Dowex[®] de 5 mm em colunas de vidro de 90 mm, podendo ser regenerada após o uso com água, etanol, HCl (2 mol/L), NaOH (1,5 mol/L), água e HCl (0,1 mol/L). O extrato é adicionado ao reagente de cor (1-fenil-1,2-propanediona-2-oxima), deixado em repouso por 30 min no escuro, e analisado por espectrofotometria à 540 nm. Estes autores também sugeriram fazer a análise por CLAE-fluorescência, relatando não haver diferença entre os dois métodos quanto aos resultados obtidos.

DUTRA et al. (1999) e POLASTRO et al. (2001) utilizaram o mesmo método usado por ALMY e OUGH (1989) em vinhos e em aguardente de cana, respectivamente, com pequenas modificações. LAMBERT, et al. (2004) relatam em trabalho de revisão, a análise da ureia em extratos de soja pelo método colorimétrico.

3.2. CIANETO

3.2.1. Características físico-químicas

O cianeto de hidrogênio é um gás incolor, e os cianetos de sódio e de potássio são pós brancos granulares. As solubilidades para o cianeto de sódio e de potássio são de 370 e 716 g/L, respectivamente (MERCK, 2001).

3.2.2. Ocorrência em bebidas alcoólicas

O íon cianeto pode ser formado a partir da degradação termo-enzimática de glicosídeos cianogênicos (CURTIS et al, 2002) (Figura 4) como a epieterodendrina e a amidalina (MACKENZIE et al., 1990). A cana-de-açúcar já foi descrita como um vegetal cianogênico, mas o composto responsável ainda é desconhecido (JONES, 1998).

O conteúdo em cianeto é maior em mostos de frutos infectados e danificados naturalmente. Este fato foi confirmado em amostras cujos altos teores de carbamato de etila eram freqüentemente acompanhados por altas concentrações de n-propanol e séc-butanol, indicativos de fermentações contaminadas por microorganismos indesejáveis (SCHEHL, 2005).

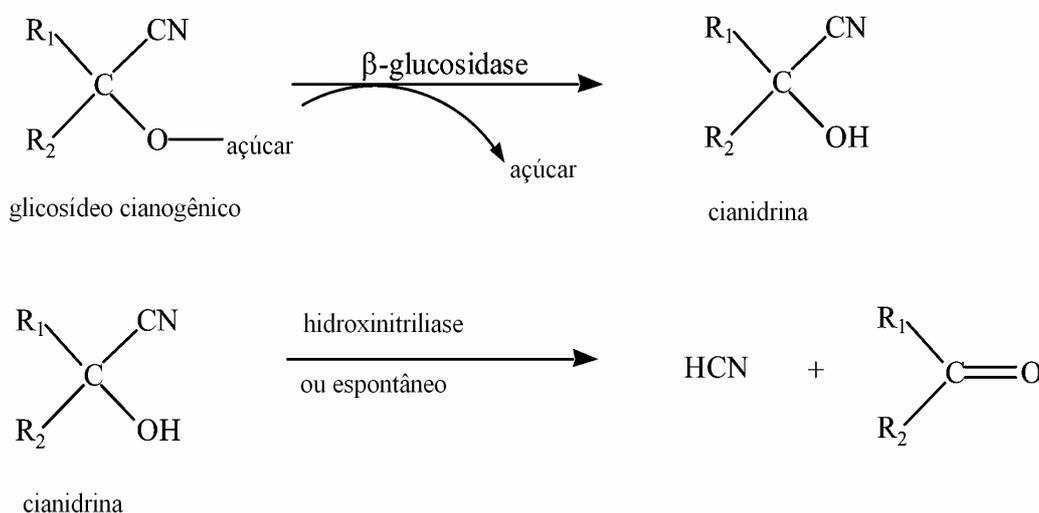


Figura 4. Esquema para cianogênese em plantas (CURTIS et al., 2002).

Alguns alimentos são ricos em cianeto (JECFA, 1993; CICAD, 2004). No Brasil a mandioca é o alimento que apresenta a maior concentração de glicosídeos cianogênicos (CORRÊA et al., 2002; 2004) (Tabela 11).

Tendo o cianeto como precursor, os principais fatores que influenciam a formação do carbamato de etila em bebidas destiladas são pH, etanol (RIFFKIN et al., 1989; ARESTA et al., 2001), temperatura, concentração dos íons Cu⁺² (ARESTA et al., 2001) e incidência de luz ultravioleta (LACHENMEIER et al., 2005; SCHEHL, 2005).

Tabela 11. Concentração de cianeto em alimentos

Tipo de produto	CN em mg/kg ou mg/L
Grãos de cereais e dos seus produtos	0,001–0,450
Produtos a base de soja	0,07–0,30
Casca de soja	1,24
Damasco (peso úmido)	89–2170
Suco natural de cereja	5,1
Suco de cereja com caroços triturados	23
Suco de fruta comercial de cereja	4,6
Suco de fruta comercial de damasco	2,2
Mandioca (amargo) / raiz secos córtex	2360
Mandioca (amargo) / sem casca	300
Mandioca (amargo) / toda tubérculos	380
Mandioca (doce) / sem casca	451
Mandioca (doce) / toda tubérculos	445
Sorgo / vegetal imaturo	2400
Bambu / vegetal imaturo	7700
Feijão Java (cor)	3000
Feijão Porto Rico (preto)	2900
Feijão Birmânia (branco)	2000

Fonte: JECFA (1993); CICAD (2004).

3.2.3. Aspectos toxicológicos

Os cianetos (CN⁻ e HCN) por si só, já são tóxicos para todo tipo de vida animal, pois bloqueiam o transporte de oxigênio no organismo. Esses compostos são absorvidos rapidamente pela pele, por inalação ou ingestão, e carregados no plasma sanguíneo, afetando diversos constituintes essenciais dos processos vitais, dentre os quais a enzima citocromooxidase responsável pela respiração celular. Os cianetos não possuem efeito cumulativo no organismo, mas pelo alto grau de toxicidade, quando absorvidos pelos seres vivos, provocam a morte. O manuseio deve, portanto, ser cercado de cuidados utilizando-se, para tanto, equipamentos de segurança adequados (luvas, máscara etc.). A dose letal para o ser humano adulto é de 150 mg de cianeto de sódio (BREThERICK, 1981). No Brasil, a legislação vigente permite um valor máximo de 0,005 mg/L de cianeto para água doce (BRASIL, 2005c) e para água potável, um valor de 0,07 mg/L (BRASIL, 2004).

O índice TLV (Threshold Limit Value) para o cianeto solúvel é de 5 mg/m³, e de 10 mg/m³ para o gás cianídrico (BREThERICK, 1981). O TVL refere-se a concentrações de

substâncias suspensas ou dispersas no ar dos ambientes de trabalho, e representam condições sob as quais se supõe que quase todos os trabalhadores possam estar expostos repetidamente, dia após dia, sem efeito adverso. Devido à suscetibilidade individual, contudo, uma pequena porcentagem dos trabalhadores pode não se sentir bem a algumas substâncias em concentrações iguais ou abaixo dos TLV, e uma menor porcentagem pode ser afetada mais seriamente, por agravamento de uma condição preexistente, ou pelo desenvolvimento de uma doença ocupacional (ACGIH, 1991). Um estudo estabeleceu a NOAEL (nível de efeito não adverso) para o cianeto de 10,8 mg/Kg por dia (OBIRI et al., 2006).

Qualquer que seja a forma de absorção pelo organismo, a intoxicação pelo cianeto (CN⁻) é sempre muito danosa. Os primeiros sintomas são fraqueza geral, dificuldade de respiração, dor de cabeça, náuseas e vômitos, que podem ser seguidos, de acordo com a intensidade do envenenamento, por inconsciência e morte (GRANATO, 1995).

3.2.4. Metodologia analítica para a detecção de cianeto em bebidas alcoólicas

Vários métodos para determinação de cianeto são encontrados na literatura (Tabela 12). Devido à alta toxicidade, são necessários métodos seletivos e sensíveis para que evite o consumo de alimentos contaminados (SADECKA e POLONSKY, 1999). Contudo, para bebidas destiladas não existe um método quantitativo oficial. A AOAC (1995a) (met. 973.19) preconiza um método qualitativo, não sendo viável no caso de baixas concentrações de cianeto (Figura 5). Em relatórios da comissão da AOAC, é enfatizada a importância de métodos quantitativos, os quais estão sendo estudados, contudo, sem previsão de publicação (AOAC, 2002; 2003).

A União Européia (EEC, 1999) e a Organização Internacional de Vinhos e Vinagres (OIV, 2008), estabeleceram um método oficial para a análise de cianeto em vinhos. ESSER et al. (1993) e CÔRREA et al. (2002; 2004) sugeriram um método para análise de cianeto em mandioca reagindo o cianeto com ácido pícrico. DROCHIOIU et al., (2000) elucidaram a reação do cianeto com o ácido pícrico (Figura 6). Outros métodos sugeridos são a titulação do cianeto com AgNO₃ (FÁVERO, 1999), métodos voltamétricos (FURTADO et al., 2007), potenciométricos (MARIN et al., 2000) e cromatográficos (CAGNON et al., 2002; CURTIS et al., 2002; KOSKINEN-SOIVI et al., 2005; MURPHY et al., 2006); espectrofotométricos (LAMBERT et al., 1975) mas nenhum em bebidas destiladas.

Tabela 12. Teores de cianeto em matrizes e métodos diversos, encontrados na literatura

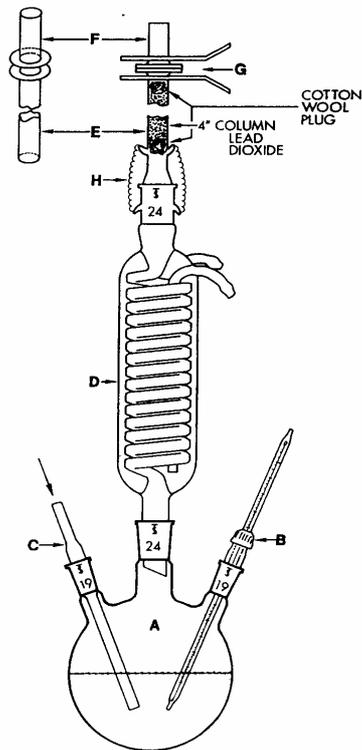
Produto	Nº de amostras	Teor mg/L ou mg/Kg	Metodologia	Referência
Água	-	0,2 – 6,0	FIA	GÓMEZ e CALATAYUD (1998)
	-	0,0005 9,94 0,32 – 270	Espectrofotométrico Ácido pícrico Determinação potenciométrica seqüencial	SUN e NOLLER (1998) DROCHIOIU et al. (2000) MARIN et al. (2000)
Ar	-	13,38	Ácido pícrico	DROCHIOIU et al. (2000)
Cevada	5	-	Cloramina-T	SWANSTON (1999)
Ração animal	-	0,05	GOW- balanço de densidade de massa	REN e MAHON (2007)
Legumes	7	ND	Método picrato	OKAFOR et al. (2002)
Mandioca	3	29	MIEM (espectrometria de massas)	CAGNON et al. (2002)
Bebidas destiladas	60 5	- 0,76 ± 0,07	Cloramina-T Voltametria	BRERETON et al. (2003) FURTADO et al. (2007)
Vinhos	-	0,10 – 0,80	Biosensor amperiométrico	FILIPOVIC-KOVACEVIC et al. (2002)
Sangue	-	0,06 – 1,50	CG-EM	MURPHY et al. (2006)
Gases	-	0,05 – 1000	CG detector emissão atômica	KOSKINEN-SOIVI et al. (2005)
Plantas cianogênicas	-	0,069	CG detector captura de elétrons	CURTIS et al. (2002)

- = dados não apresentados na literatura.

3.3. COBRE

3.3.1. Características físico-químicas

O cobre é um metal de cor avermelhada, de número atômico 29, massa atômica 63,54, dureza 2,5 a 3,0, ponto de fusão 1.023 °C, brilho metálico, ótimo condutor de calor e eletricidade, dúctil e maleável. Apresenta elevada resistência à tensão física e à corrosão. Possui propriedade não magnética e é de fácil formação de ligas com outros metais (LABANCA et al., 2006).



Legenda:

- A – balão de destilação
- B – termômetro
- C – tubo para entrada de ar
- D – condensador
- E – tubo de vidro
- F – tubo de vidro superior
- G – garra
- H – trava segurança

Figura 5. Aparato para a determinação quantitativa de cianeto em bebidas destiladas (AOAC, 1995a).

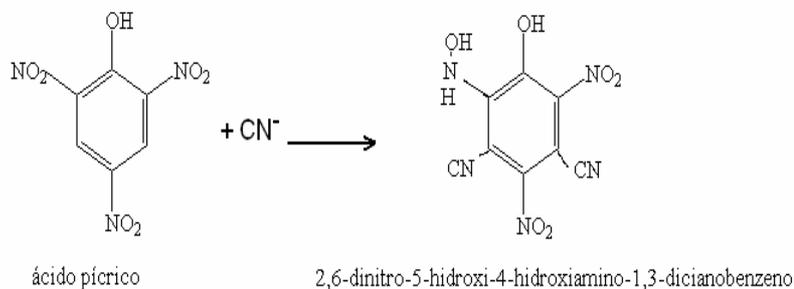


Figura 6. Reação do ácido pícrico com o cianeto formando 2,6-dinitro-4-hidroxiamino-1,3-dicianobenzeno.

3.3.2. Ocorrência e legislação em aguardentes de cana

A presença de cobre na aguardente de cana em elevadas concentrações é indesejável, pois é prejudicial à saúde humana, sendo, portanto, fundamental sua quantificação. A legislação nacional contempla valores de 5,0 mg/L como o limite máximo permitido em aguardentes de cana (BRASIL, 2005a), valores maiores que contemplados em outros países (2,0 mg/L) (CARDOSO et al., 2003).

A presença de cobre nas aguardentes de cana é uma preocupação antiga dos pesquisadores brasileiros. Os alambiques, em sua grande maioria, são construídos em

cobre e as colunas de destilação em aço inoxidável. A escolha do cobre como material para a construção das colunas de destilação deve-se à sua alta resistência à corrosão, o que evita problemas de manutenção (NOVAES, 1994). Entretanto, os destilados provenientes de aparelhos construídos exclusivamente em aço inoxidável apresentam características sensoriais desagradáveis, principalmente devido aos teores de dimetil sulfeto (DMS), acima de 4,0-5,0 mg/L, liberado no processo, e que permanece no produto final (BRUNO, 2006).

Os alambiques de cobre são amplamente utilizados, especialmente por produtores que trabalham em microescala. Existem várias controvérsias sobre o uso desse metal; no entanto, muitos pesquisadores atribuem ao cobre o papel de catalisador, isto é, facilita os processos oxidativos durante a destilação da aguardente de cana os quais são importantes no sabor da bebida. Tanto é que, quando a aguardente de cana é fermentada e destilada em recipientes constituídos de outros materiais, como o aço inox, alumínio ou porcelana, o produto final contém compostos sulfurados, sendo a bebida resultante de baixa qualidade organoléptica (BOZA e HORII, 2000; AZEVEDO et al., 2003; CARDOSO et al., 2003). FARIA et al. (1993) confirmaram a redução que o cobre causa nos teores de enxofre nas aguardentes de cana, melhorando seu paladar.

A contaminação da aguardente de cana ocorre durante o processo de destilação, no qual se forma o azinhavre, um carbonato básico de cobre $[CuCO_3Cu(OH)_2]$ nas paredes internas dos alambiques de cobre. Esse composto é dissolvido pelos vapores alcoólicos ácidos, contaminando o destilado (BOZA e HORII, 2000; AZEVEDO et al., 2003).

As aguardentes de cana obtidas a partir de alambiques de cobre contêm normalmente teores entre 3 e 5 mg/L deste metal que é arrastado através da condensação dos vapores ao longo dos compartimentos do alambique.

Segundo BOZA e HORRI (2000), a presença de cobre durante a destilação pode mudar o perfil do destilado, alterando a composição de equilíbrio líquido-vapor, podendo, devido ao seu efeito catalítico, aumentar a concentração de acetato de etila. A medida preventiva mais utilizada para evitar a contaminação das aguardentes de cana pelo cobre consiste em manter limpas as áreas internas do alambique e a serpentina cheia de água durante o tempo em que não se está destilando, para evitar o processo de oxidação do cobre.

FARIA (2000) propôs a utilização de dispositivos de cobre na parte ascendente dos alambiques em substituição à área de cobre exposta na parte ascendente das mesmas. Outras medidas utilizadas para reduzir os teores de cobre são baseadas na utilização de

resinas catiônicas e do emprego de carvão ativado (BRUNO, 2006) e, mais recentemente, na utilização do processo de bidestilação da aguardente de cana (ROTA, 2008).

Segundo BIZELLI et al. (2000), a bidestilação das aguardentes de cana pode também ser utilizada, permitindo a redução dos teores de cobre. A contaminação da aguardente de cana por cobre também pode ser reduzida utilizando-se carvão ativo ou resinas de troca iônica. Entretanto, os compostos que dão o sabor e aromas característicos das aguardentes de cana podem ser igualmente retidos, prejudicando assim a qualidade do produto final (CANTANHEDE et al., 2005).

A principal justificativa para altos teores de cobre em aguardentes de cana pode estar relacionada à falta de higiene dos alambiques, sendo o cobre proveniente da dissolução do “azinhavre” (carbonato básico de cobre solúvel em ácido) que se forma no interior do alambique e, principalmente, nas partes internas da serpentina da resfriadeira. Com assepsia adequada do aparelho, pode-se obter aguardente de cana com um teor de cobre menor. CARDOSO (2006) recomendou que a primeira destilação do dia deve ser feita adicionando-se suco de limão (ou ácido cítrico) à água na concentração de 5 L do suco para 100 L de água. Assim, esta removerá o azinhavre existente no interior da serpentina de condensação dos vapores do alambique.

Segundo BOZA e HORII (2000), a presença de cobre no alambique favorece a oxidação do gás sulfídrico e das mercaptanas a sulfetos e dissulfetos, compostos de baixa solubilidade, catalisada pelo íon Cu^{2+} (do azinhavre), reduzindo a concentração de compostos sulfurados nos destilados, conforme indicado nas equações (20 e 21) abaixo:



Conforme os mesmos autores, os sais de cobre durante a destilação mudam o perfil do destilado, pois alteram a composição de equilíbrio líquido-vapor, obtendo-se maior separação entre os componentes e através de seu efeito catalítico, aumenta a concentração de acetato de etila, com correspondente redução na concentração de acetaldeído. O cobre também reage com ácidos de odor desagradável, como o ácido butírico (suor, queijo), caprílico (ácido graxo, óleo vegetal), cáprico (cera, ranço, sabão) e láurico, formando compostos organo-cúpricos, insolúveis na fase líquida em destilação (BOZA e HORII, 2000; OLIVEIRA, 2000).

BOZA e HORII (2000) concluíram que os teores de cobre durante a destilação correlacionam-se com os teores de acidez encontrados no destilado, sendo elevados principalmente na fração cauda (final) da destilação. Concluíram também que o grau de remoção da fração cauda influi no teor de cobre do destilado, embora aumente a manipulação na operação de destilação em processo intermitente e, separando-se a fração cauda a qualidade da aguardente de cana será melhorada pela redução dos níveis de cobre.

O teor de cobre no destilado está associado também com a acidez do vinho e do vapor e com a prática da destilação, já que o corte da cauda reduz a acidez e o grau de contaminação por esse metal (CANTANHEDE et al., 2005).

Outra razão que justifica o desenvolvimento dessa tecnologia é o fato de algumas empresas nacionais de grande porte não produzirem o volume total de destilado que comercializam. Estas compram as aguardentes de cana de vários pequenos produtores e, através de misturas de diversas aguardentes de cana compõem e rotulam o seu produto. Como a grande maioria dos pequenos alambiques é constituída essencialmente por cobre, essas empresas, por mais que conscientizem os seus fornecedores da necessidade da higienização constante e dos cuidados durante o processo de destilação, não detêm o real controle do processo e, em última estância, dos teores de cobre nos destilados adquiridos. Deste modo, a remoção dos íons cobre no destilado cumpre duplo objetivo: garantir níveis seguros de ingestão e enquadrar o produto dentro das especificações internacionais, permitindo a sua exportação (CANTANHEDE et al., 2005).

AZEVEDO et al. (2003), estudando quarenta e cinco diferentes aguardentes de cana provenientes de diversas localidades do norte e sul do estado de Minas Gerais, por meio de medidas espectrofotométricas, a 546 nm, e constataram a contaminação de cobre em 6,7% das amostras, que se encontravam com valores acima do permitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que é de 5 mg/L (BRASIL, 2005a). BOZA e HORII (2000) observaram teores de cobre de até 14 mg/L e ainda que 25% das amostras analisadas apresentaram teores superiores aos estabelecidos pela legislação. LABANCA et al. (2006) avaliaram 71 amostras de aguardente de cana. O cobre foi detectado em todas as amostras analisadas em teores que variaram de 0,05 a 8,10 mg/L, sendo o teor médio de 2,30 mg/L. Sete por cento das amostras não atenderam à legislação vigente, que limita o teor de cobre a um valor máximo de 5 mg/L.

A higiene do alambique no momento da destilação é imprescindível para evitar contaminações com o metal. Um recurso utilizado por alguns produtores de aguardente para minimizar essa contaminação é a filtragem da aguardente de cana por meio do uso

de carvão vegetal, tomando-se o devido cuidado para que o carvão vegetal não retire também os compostos que dão o sabor característico das aguardente de cana. Alguns procedimentos variam de produtor para produtor, e alguns costumam manter os destiladores cheios de água no período de entressafras; outros preferem manter os destiladores vazios nesse período e a cada início de safra lavam com solução de bicarbonato. Lavagens diárias com água ao final do dia de trabalho também são utilizadas (AZEVEDO et al., 2003).

3.3.3. Aspectos toxicológicos

O cobre é essencial ao organismo em níveis traços, sendo que o Food and Nutrition Bureau (FNB) estabeleceu para o cobre a RDA de 1,5 a 3,0 mg/dia para adultos (RDA, 1989). Porém, seu excesso no organismo é nocivo. Encontra-se distribuído praticamente em todo o organismo em diferentes concentrações, o que indica seu papel funcional. As atividades protéicas, como a tirosinase, a citocromo oxidase e a ceruloplasmina, são basicamente regidas pelo cobre. Alguns estudos sobre a atuação do cobre no organismo, revelam também sua associação com a absorção de ferro da dieta para biossíntese de hemoglobina (SERPE e FREITAS, 1991; SARGENTELLI et al., 1996).

O metal é encontrado em carnes, frutos-do-mar, em muitos vegetais, cereais e nozes. O cobre assimilado é, então, distribuído para os tecidos, soro, glóbulos e fígado. Esse processo é chamado de fluxo normal de cobre. Pequenas mudanças podem ser desprezíveis e não acarretam complicações. Todavia, grandes alterações podem provocar graves distúrbios e até doenças. Essas últimas podem ser decorrentes tanto do excesso como também da falta de cobre, causando a hiper e hipocupremia, respectivamente (SARGENTELLI et al., 1996).

A mais conhecida enfermidade decorrente dos distúrbios do metabolismo do cobre é a degeneração hepato-lenticular ou doença de Wilson que, a primeira vista, parece tratar-se de um caso de hipercupremia. Os sintomas apresentados pelos pacientes são: peso do lado direito do corpo (dilatação da cápsula do fígado), dores ao correr e andar (alterações musculares), mudança na cor da pele para amarela (alteração da função bioquímica do fígado), e tremores fortes nos dedos (alterações nervosas) (SERPE e FREITAS, 1991; SARGENTELLI et al., 1996).

A epilepsia, o melanoma e a artrite reumatóide são também alguns exemplos e o papel do cobre ainda é motivo de controvérsias e discussões. A epilepsia é uma afecção que, além de incidir no homem, ocorre em vários

animais, consistindo em acessos de distúrbios de consciência, movimentos musculares involuntários e perturbações no sistema nervoso. O melanoma é um tipo de câncer maligno que aparece em forma de mancha preta, podendo levar à cegueira e à morte. A artrite reumatóide é uma doença de natureza imunológica, definida como afecção que atinge as articulações, vários órgãos e sistemas como: coração, pulmão e rins. Essas três enfermidades apresentam em comum o fato de provocarem alterações generalizadas e aumentarem a concentração de cobre no plasma sanguíneo, podendo ser consideradas, portanto, como casos de hipercupremia (SARGENTELLI et al., 1996).

3.3.4. Metodologia analítica

Alguns trabalhos na literatura trazem resultados de cobre em bebidas com metodologias variadas, sendo as principais, o método espectrofotométrico, absorção atômica por chama, forno de grafite e ICP (espectrômetro em plasma indutivamente acoplado) (Tabela 13).

O método oficialmente aceito no Brasil para a determinação de cobre em aguardente de cana é a técnica de espectrometria de absorção atômica em chama (EAA), pelo método de adição de padrão (IAL, 2005). Nos Estados Unidos a AOAC também recomenda esta metodologia, com os padrões preparados numa mistura 50% v/v de etanol e água (AOAC, 1995b). Métodos voltamétricos também têm sido empregados (KÜCHLER e SILVA, 1999).

Tabela 13. Teores médios e valores mínimos e máximos de cobre encontrados em bebidas por diversas metodologias

<i>Produto</i>	N	Médio (mg/L)	Faixa (mg/L)	Metodologia	Referência
Aguardente de cana	15	-	0,15 – 0,88	Absorção Atômica (chama)	CARDOSO (2003)
	94	2,57 ± 2,57	nd – 12,25	Espectrofotométrico	MIRANDA et al. (2007)
	16	4,0 ± 0,25	0,2 – 10,7	Espectrofotométrico	FERNANDES et al. (2007)
	71		0,05 – 8,10		
	25	5,71 + 5,29	0,92 – 22,30	Absorção Atômica (chama)	GARBIN et al. (2005)
	27			Absorção Atômica (chama)	
	74	3,06 ± 1,02	0,006 – 5,20	Absorção Atômica (chama)	CARDOSO et al. (2003a)
	7	4,20 + 4,90	0,01 – 14,30	Absorção Atômica (chama)	NASCIMENTO et al. (1999)
		-	0,70 - 12,50	Absorção Atômica (forno de grafite)	SILVA et al. (2004)
Água	30	-	0,005 – 0,287	Absorção Atômica (forno de grafite)	SEGURA-MUNOZ et al. (2003)
Chás	31	-	0,025 – 0,348	ICP-OES	MALIK et al. (2008)
	10	4,74	1,39 – 7,62	Absorção Atômica (chama)	CATARINO et al. (2003)
Vinhos	35	-	0,02 – 0,642	Absorção Atômica (forno de grafite)	AJTONY et al. (2008)
	17	-	0,11 – 105,0	Absorção Atômica (chama)	GALANI-NIKOLAKAKI et al. (2002)
Solução parenteral	4	7,2 + 3,0	6,0 – 11,7	ICP-OES	TAKARA et al. (2005)

Nd= não detectado

4. OTIMIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS

4.1. PLANEJAMENTO FATORIAL

Os métodos de otimização surgiram em função da necessidade de aprimorar o desempenho dos mais diversos sistemas que ocorrem no cotidiano. Otimização corresponde a tornar algo "tão perfeito, efetivo ou funcional quanto possível". Desta forma, pode-se definir otimização como sendo um processo baseado em instruções que permitam obter o melhor resultado de uma dada situação. Cientificamente, estas instruções são freqüentemente expressas através de métodos matemáticos que procuram maximizar ou minimizar alguma propriedade específica do sistema em estudo. É na escolha desta propriedade a ser otimizada e das condições de controle que se encontra grande parte das discussões sobre qual a melhor indicação para um desempenho ideal do sistema. Em diversas circunstâncias, esta propriedade a ser otimizada é denominada de função objetivo ou resposta (BEVERIDGE e SCHECHTER, 1970; BURTON e NICKLESS, 1987).

Usualmente utilizam-se modelos univariados. Este método de otimização é classificado como um método seqüencial, e é também conhecido como método clássico de pesquisa, método do fator único ou estratégia um fator de cada vez. Neste método, fixam-se todos os fatores que estão sendo pesquisados em certo nível, menos um deles. Este último é então variado até que se encontre a melhor resposta, passando então esta condição a ser fixada e um novo fator sofre variação. O processo se repete até que todos os fatores tenham sido adequados para fornecer a melhor resposta. O método univariado é muito bom para sistemas onde as variáveis otimizadas são independentes, o que de fato é relativamente raro para sistemas químicos (EIRAS et al., 1994). Além disto, há um número excessivo de análises, o que inviabiliza o processo.

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples. Este contribui para a redução do número de monitoramentos em experimentos, sem comprometer o trabalho. Tem sido muito utilizado com o objetivo de minimizar as análises e evitar trabalhar na tentativa e erro (SILVA et al., 2008).

O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, no qual as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Para realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores. A seguir são realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados (ROUTH et al., 1977; BOX et al., 1978; EIRAS et al., 1994; BARROS NETO et al., 1995; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

4.2. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS

É necessário, cada vez mais, demonstrar qualidade nas análises químicas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados não confiáveis podem conduzir a decisões erradas e a prejuízos financeiros. Validar é demonstrar que um ensaio analítico, nas condições em que é realizado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com uma confiabilidade exigida (MARTINS, 2008), através de exame e evidência objetiva (BRITO et al., 2002).

3.1. Validar é demonstrar que um ensaio analítico, nas condições em que é realizado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com uma confiabilidade exigida (MARTINS, 2008).

3.2. Para validação de um método analítico quantitativo, não normalizado, levam-se em conta os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção do equipamento e do método e limite de quantificação do método (SOUZA, 2007).

4.2.1. Linearidade

A linearidade do método é aplicada através da regressão linear simples. Contudo, algumas considerações devem ser avaliadas (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005). Na prática, o ensaio para verificar se a curva é linear consiste em construir uma curva de calibração estabelecida com pelo menos cinco concentrações (abscissa) fora o zero e suas

absorbâncias (ordenada). A solução de cada concentração é analisada em triplicatas independentes, isto é, não repetir a leitura, e sim, preparar três curvas distintas. As amostras devem ser lidas em ordem aleatória (BURKE, 2001a; 2001b).

O método utilizado para a análise de dados é o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), e o ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO assume várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo. Os resíduos devem ser variáveis aleatórias com média e variância constante e desconhecida; os resíduos devem seguir a distribuição normal; os resíduos devem ser homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X; o resíduo de uma observação não é correlacionado com o resíduo em outra observação, ou seja, a covariância deve ser zero e a relação entre X e Y deve ser linear (INMETRO, 2007).

Após as curvas prontas, é feito o cálculo do resíduo padronizado, mediante o teste de Jacknife, onde se elimina a presença de outliers. A seguir, as premissas de linearidade são avaliadas, isto é, são feitos os cálculos estatísticos para avaliar se a curva é linear (MELOUN e MILITK'Y, 2001).

4.2.2. Efeito da matriz

O delineamento experimental para testes de efeitos da matriz consiste do preparo de curvas de calibração simples (curvas de analito em solventes) e curvas de materiais de referência ou de adição de analito em amostras brancas ou não (curvas de analito em matriz), com concentrações idênticas ou abrangendo a mesma faixa de concentração (INMETRO, 2007).

Consideram-se amostras brancas aquelas das matrizes isentas do analito ou para as quais o analito não tenha sido detectado. O uso de amostras típicas de cada matriz é fundamental para eliminar a possibilidade de efeitos da matriz que diferem em magnitude de uma amostra para a outra. As curvas do analito na matriz são preparadas por adição do analito a soluções teste, obtidas de amostras ensaiadas nas mesmas condições dos procedimentos normais. Isto para que as quantidades e características dos interferentes presentes no extrato final de uma amostra sejam reproduzidas nas curvas. Cumpre observar que não somente os interferentes provenientes da matriz são avaliados nestes experimentos, mas também todos aqueles provenientes de materiais, reagentes e soluções utilizados no preparo das amostras (LABANCA et al., 2008).

Estudos de efeitos da matriz se espelham nos experimentos de avaliação da linearidade. Assim, as considerações sobre o delineamento experimental para comprovação da linearidade também são válidas para o preparo das curvas de calibração

destinadas às verificações dos efeitos da matriz (SOUZA, 2007).

A escolha do método é feita de acordo com a matriz. Quando não existe influência da matriz, constrói-se a curva a partir da solução padrão; quando existir a possibilidade da influência da matriz, traça-se uma curva utilizando a amostra fortificada. Brancos serão preparados e analisados para ajuste do equipamento, mas não serão incluídos nos cálculos (SOUZA, 2007).

4.2.3. Seletividade

Apesar dos estudos de efeitos da matriz garantirem uma avaliação parcial da seletividade do método, em relação aos interferentes presentes na amostra e no processo analítico, outras interferências também poderão acontecer. Entender os diferentes mecanismos que causam interferências pode ajudar na estruturação dos experimentos complementares para avaliação da seletividade e também na identificação de soluções para os problemas encontrados (VESSMAN et al., 2001).

Estudos da seletividade são usualmente limitados pelo conhecimento sobre o analito e potenciais interferentes. Há casos em que interferências químicas podem ser identificadas para um método em particular, mas as chances de serem encontradas na prática podem ser improváveis. Também é muito difícil determinar que não exista interferentes, uma vez que sempre a possibilidade de encontrar um interferente não é reconhecida previamente. Assim, os analistas têm que equilibrar, com base em tempo, custos e benefícios, a busca por interferentes no processo de validação (VESSMAN et al., 2001; RIBANI, 2004).

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação intralaboratorial de métodos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras brancas, amostras contendo o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais (VESSMAN et al., 2001).

4.2.4. Exatidão e precisão

Experimentos para avaliação de exatidão envolvem ensaios com materiais de referência certificados, materiais de referência, amostras brancas e amostras adicionadas, enquanto na verificação da precisão são necessários ensaios replicados de amostras

idênticas ou homogêneas, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, preestabelecidas (EURACHEM, 1998).

Materiais de referência certificados são relacionados a todos os aspectos da tendência (do método, do laboratório e do ensaio), por apresentarem incerteza estabelecida e rastreabilidade a padrões internacionais comprovada. Estes materiais são considerados ferramentas úteis para alcançar a rastreabilidade em medidas analíticas, para calibrar equipamentos e métodos, para monitorar o desempenho de laboratórios, validar métodos e permitir a comparação entre métodos. Entretanto, os materiais de referência certificados são caros e podem não ser representativos de amostras típicas, não garantindo a exatidão do método. A condição ideal seria um material de referência certificado da matriz de interesse. No caso da precisão, o uso de materiais de referência certificados, os quais são freqüentemente bem mais homogêneos que amostras verdadeiras, podem subestimar a variação dos resultados (BURNS et al., 2002).

Na área de alimentos, materiais de referência certificados são escassos e dispendiosos, principalmente devido às dificuldades no preparo, homogeneização e garantia de estabilidade durante armazenamento e transporte. Quando não há material de referência certificado disponível, uma amostra branca da matriz de interesse pode ser adicionada de quantidades conhecidas de analito na forma de material puro (ou de pureza conhecida) e estável ou de outro material bem caracterizado, para realização de ensaios de recuperação aparente (SOUZA, 2007).

Outra opção é o método de adição, empregado nos casos em que não é possível obter amostras brancas para os analitos e matrizes em questão. Estes experimentos permitem o estudo de diferentes tipos de analitos, concentrações e matrizes. Embora amostras adicionadas não tenham incertezas associadas, estudos de recuperação aparente com tais materiais permitem avaliar tendências devidas a efeitos relacionados ao analito adicionado. Na maioria das vezes, amostras adicionadas não representam fielmente a forma na qual o analito se encontra na matriz em amostras naturais, fornecendo uma impressão pouco realista de eficiência dos processos de extração. Em decorrência disto, recuperações aparentes satisfatórias em ensaios com amostras adicionadas não são garantia de exatidão, mas recuperações aparentes insatisfatórias são indicativas de falta de exatidão (EURACHEM, 1998).

Ensaio das mesmas amostras pelo método em validação e por um outro método de referência também podem ser empregados para avaliação da exatidão. Todavia, estes experimentos exigem que o laboratório tenha condições de operar adequadamente os dois métodos. Exatidão e precisão são geralmente dependentes da concentração do

analito, devendo ser determinadas para um diferente número de concentrações. Na literatura sobre validações intralaboratoriais de métodos, um mínimo de três níveis de concentração, com três a dez replicatas por nível, é freqüentemente recomendado. Nos experimentos para avaliação da exatidão e precisão, as variações entre ensaios devem representar o que normalmente acontece no laboratório em condições de rotina. Os materiais usados devem ser típicos em termos de tipos da matriz, devendo representar as amostras encontradas na aplicação do método (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2007).

Variações de lotes e marcas de reagentes, analistas e equipamentos também devem ser representativas no delineamento dos parâmetros repetitividade e reprodutibilidade parcial (SOUZA, 2007).

Na área de alimentos, o sugerido é trabalhar com os dados de HORWITZ (1982) e THOMPSON (2000) conforme tabela 14, onde o “c” de concentração é adimensional e precisa ser dividido pela sua ordem de grandeza.

TABELA 14. Valores de concentrações e respectivos valores de recuperação média e desvio padrão relativos aceitáveis para resultados quantitativos em análise de analitos traços

Exatidão		Precisão	
Valor referência	Recuperação (%)	Valor referência	DPR _R - σ_T ou σ_H
$c \geq 1,0 \times 10^{-8}$	80 – 110	$c > 0,138$	$\sigma_T = 0,01c^{0,5}$
$1,0 \times 10^{-9} < c < 1,0 \times 10^{-8}$	70 – 110	$1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138$	$\sigma_H = 0,02c^{0,8495}$
$c \leq 1,0 \times 10^{-9}$	50 – 120	$c < 1,2 \times 10^{-7}$	$\sigma_T = 0,22c$

*c é adimensional: para 1 µg/L= 1 ppb tem-se $c = 10^{-9}$.

σ_T = desvio padrão de reprodutibilidade estimado pela equação de Thompson.

σ_H = desvio padrão de reprodutibilidade estimado pela equação de Horwitz.

Fonte: HORWITZ (1982), THOMPSON (2000).

Recentemente, THOMPSON (2000) demonstrou a necessidade de descrever um critério para fazer o modelo de HORWITZ (1982) mais acurado. Utilizando esse critério, o desvio padrão é determinado para uma dada concentração, c. Para tal, c deve ser expresso como uma grandeza adimensional, por exemplo, um mg/L é igual a 10^{-6} ou 1% é igual a 10^{-2} .

Assim, para se expressar o desvio padrão adimensional através da equação de HORWITZ (1982) nas unidades de concentração originais, esta precisa ser dividida pela

ordem de grandeza (OG) onde, em todos os casos, c é a concentração, isto é, o valor designado e ordem de grandeza é o que torna c adimensional:

- i) para concentrações de analito $< 120 \mu\text{g/L}$

$$dp = \frac{0,22c}{(OG)}$$

- ii) para concentrações de analito $\geq 120 \mu\text{g/L}$ e $\leq 13,8\%$

$$dp = \frac{0,02c^{0,8495}}{(OG)}$$

- iii) para concentrações de analito $> 13,8\%$

$$dp = \frac{0,01c^{0,5}}{(OG)}$$

As estatísticas para análise de dados com objetivo de avaliação da precisão, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade, estão bem estabelecidas pela ISO 5725 (ISO, 1994). Esta norma recomenda a análise de variância para este propósito, sendo citada em alguns documentos que tratam da validação intralaboratorial de métodos. A análise de variância assume várias premissas como:

- a) os resíduos são variáveis aleatórias, normalmente distribuídas;
- b) os resíduos são homoscedásticos, com distribuição constante i ao longo dos valores de X ;
- c) o resíduo de uma observação não é correlacionado com o resíduo de outra observação; e
- d) os efeitos dos diferentes fatores são aditivos. A verificação da premissa de aditividade pode ser feita pelo teste de aditividade de Tukey.

Em experimentos delineados somente sob condições de repetitividade, a estimativa direta do desvio padrão dos resultados é considerada. A função de Horwitz (HORWITZ, 1982) constitui uma generalização útil e amplamente reconhecida do desvio padrão sob condições de reprodutibilidade em análises de alimentos. Valores estimados a partir desta equação são muitas vezes utilizados como requisitos analíticos para precisão. O trompete de Horwitz, proposto com base em inúmeros resultados de ensaios interlaboratoriais do setor de alimentos, demonstra que conforme a concentração do analito decresce em duas ordens de grandeza, o desvio padrão da reprodutibilidade aumenta com um fator de dois. Embora a função de Horwitz funcione bem independentemente do analito, matriz e natureza do material analisado, este modelo é deficiente para níveis de concentração extremos.

Dois modelos complementares à função de Horwitz foram propostos por THOMPSON (2000), em virtude das diferentes faixas de concentração do analito na amostra. As pesquisas deste autor, com dados provenientes de estudos colaborativos na área de alimentos, indicam desvios padrão de reprodutibilidade sistematicamente menores que aqueles preditos pela função de Horwitz, para concentrações de analito inferiores a 100 µg/Kg. Contudo, regulamentações específicas de valores críticos de desvio padrão de repetitividade e reprodutibilidade também são estabelecidas (EC, 2002).

4.2.5. Limites de detecção e quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado (Limite de detecção do método - LDM) e quantificado (Limite de quantificação do método - LQM) pelo método (INMETRO, 2007).

A importância desta determinação ocorre pelo fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável. O termo limite de detecção não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais (INMETRO, 2007; SOUZA, 2007).

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. O LDM é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito. O LDM para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção (INMETRO, 2007).

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática, ou seja, “Branco + 3s” e “0 + 3s”, considerando-se análise de sete ou mais amostras de branco e de brancos com adição, respectivamente (INMETRO, 2007).

O LQM é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do

analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias. A diferença entre os limites de detecção e de quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas (INMETRO, 2007).

Quando não está trabalhando com valores de traços, é sugerido utilizar como LQM o primeiro ponto da curva onde resultado de exatidão e precisão foram satisfatórios (SOUZA, 2007).

PARTE EXPERIMENTAL

Para atender aos objetivos deste trabalho, foram criados capítulos os quais serão apresentados a seguir:

- I. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE UREIA EM AGUARDENTE DE CANA
- II. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA ANÁLISE DE CIANETO E QUANTIFICAÇÃO DESTES TEORES EM AGUARDENTE DE CANA
- III. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COBRE EM AGUARDENTE DE CANA POR ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA E SUA DETERMINAÇÃO EM DIFERENTES FRAÇÕES ALCOÓLICAS
- IV. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA POR ESPECTROFLUORIMETRIA
- V. DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM AGUARDENTES DE CANA POR CG-EM UTILIZANDO PADRÃO INTERNO DEUTERADO
- VI. TEORES DE CARBAMATO DE ETILA, COBRE, CIANETO, UREIA, ACIDEZ E GRADUAÇÃO ALCOÓLICA EM AGUARDENTES DE CANA NO PROCESSO DE DESTILAÇÃO
- VII. FORMAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM DIFERENTES FRAÇÕES ALCOÓLICAS DE AGUARDENTES DE CANA DURANTE ARMAZENAMENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS

CAPÍTULO I.

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE UREIA EM AGUARDENTE DE CANA

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo otimizar e validar metodologia analítica para a determinação de ureia em aguardente de cana; determinar os teores de ureia em aguardentes de cana comercializadas em Belo Horizonte, MG; e verificar a existência de correlação entre os teores de ureia e de carbamato de etila.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Amostras

Amostras de aguardente de cana, num total de 68, foram coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004. As amostras foram submetidas à análise de ureia. Os resultados foram analisados individualmente e agrupados em quatro regiões – Metropolitana, Noroeste, Sudoeste e Leste, sendo que as duas últimas englobam algumas macrorregiões propostas pelo IBGE (2003), como pode ser observado na tabela I.1.

Tabela I.1. Número de amostras de aguardente de cana coletadas por regiões de Minas Gerais

Regiões propostas	Macrorregiões*	Número de amostras
Metropolitana	Metropolitana	18
Noroeste	Noroeste	24
Sudoeste	Sul de Minas Alto São Francisco Triângulo Mineiro	13
Leste	Vale do Jequitinhonha Zona da Mata Rio Doce	13
Total		68

* IBGE (2003).

2.1.2. Reagentes padrões e soluções

A maioria dos reagentes utilizados foi de grau analítico. A ureia foi adquirida da Sigma (St Louis, MO, EUA).

A solução estoque de ureia (1000 mg/L) foi preparada por dissolução de $100 \pm 0,1$ mg de ureia para 100 mL de etanol (40% v/v). A solução intermediária (100 mg/L) foi obtida por diluição de 1000 μ L da solução estoque para 10 mL de etanol (40% v/v) e através desta foi diluído as concentrações necessárias para a curva analítica. As soluções estoque, intermediária e final foram armazenadas sob refrigeração entre 4 e 8 °C e preparadas quando necessário.

A solução ácida (1:3:1,25) de H_2SO_4 18 mol/L + H_3PO_4 14 mol/L + H_2O foi preparada por dissolução de 100 mL de ácido sulfúrico concentrado com 300 mL de ácido fosfórico concentrado e 125 mL de água deionizada. A solução foi preparada em frasco âmbar em capela, por ser uma solução exotérmica, aguardou seu resfriamento para a utilização.

A solução de 1-feniL,2-propanediona-2-oxima a 4% foi preparada por dissolução de $400 \pm 0,1$ mg para 10 mL de etanol. A solução foi armazenada sob refrigeração a 6 ± 1 °C.

A curva analítica foi feita utilizando solução de ureia. O mesmo procedimento foi repetido, alterando a concentração da solução ácida para (1:3:1) de H_2SO_4 18 mol/L + H_3PO_4 14 mol/L + H_2O . Repetindo novamente o procedimento alterando desta vez o tempo e a temperatura do banho-maria de duas horas para uma hora e trinta minutos e de 70 para 80 °C. Para três pontos da curva (2,0; 5,0 e 10,0 mg/L) foram repetidas as análises em triplicata, com estas variações.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Otimização do método para a determinação dos teores de ureia em aguardente de cana

Os teores de ureia foram determinados pelo método espectrofotométrico (POLASTRO et al., 2001), com pequenas modificações. O método consiste em adicionar à amostra, solução alcoólica de 1-feniL,2-propanediona 2-oxima 4% e, simultaneamente, em outro tubo etanol 40% v/v, ambos adicionados de solução ácida (H_2SO_4 18 mol/L + H_3PO_4 14 mol/L + H_2O ; 1:3:1,25),

homogeneizados, deixados em repouso por 2 h horas no escuro em banho-maria a 80 °C, e analisados espectrofotometricamente à 540 nm (Figura I.1). A leitura da amostra com reagente de cor foi subtraída da leitura da amostra sem o reagente de cor, pois amostras de cachaça coloridas poderiam interferir no resultado encontrado.

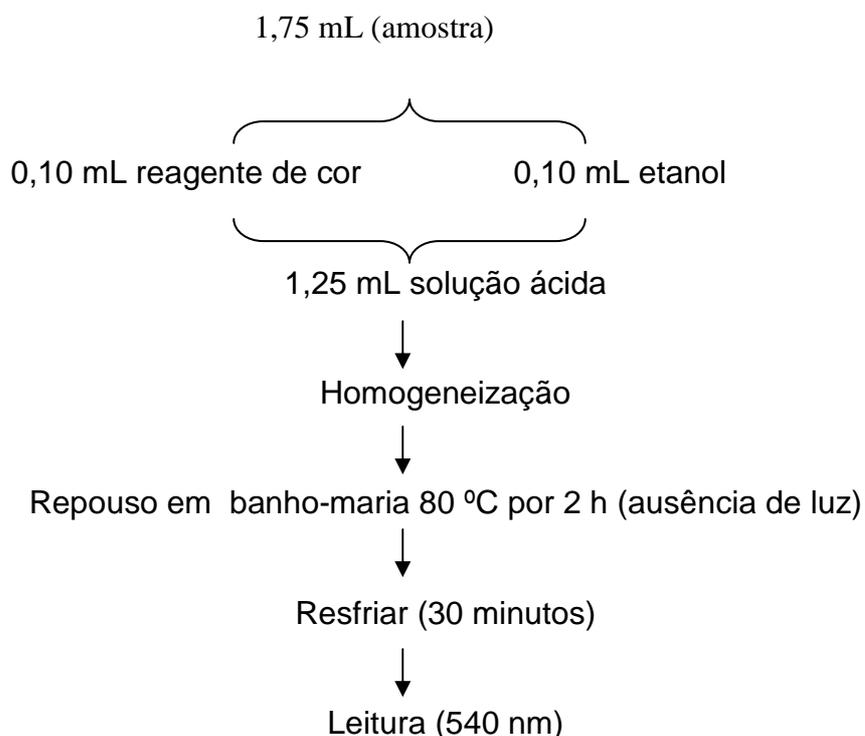


Figura I.1. Etapas para preparo de amostra de aguardente de cana para análise espectrofotométrica da ureia após otimização.

2.2.2. Validação da metodologia para determinação de ureia em aguardente de cana

Para validação da metodologia foram testados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção do equipamento, limites de detecção e quantificação do método, especificidade, exatidão e precisão.

2.2.2.1. Linearidade

Foram realizados ensaios com soluções padrão para determinação da linearidade sem interferência da matriz (EURACHEM, 1998).

Para a construção da curva analítica foi utilizado a ureia em solução alcoólica, a 40% nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10 e 15 mg/L, em seguida foi construído o

gráfico absorvância a 540 nm x concentração e, por regressão linear, foram determinados a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2).

2.2.2.2. Limite de detecção do equipamento

Foram analisadas soluções padrão em concentrações cada vez menores a fim de se estabelecer a menor concentração capaz de obter leitura (ISO/IEC 17025 - NBR, 2001).

2.2.2.3. Limite de detecção do método

Foram analisadas amostras da matriz adicionadas de padrão cada vez menores a fim de se estabelecer a menor concentração capaz de conseguir leitura, mesmo que não tenham sido contemplados os valores percentuais de recuperação e coeficientes de variação descritos como aceitáveis (EURACHEM, 1998).

2.2.2.4. Limite de quantificação do método

Foram analisadas amostras da matriz adicionadas de padrão cada vez menores, sendo o limite de quantificação considerado como a menor concentração detectada pelo equipamento com valores percentuais de recuperação e coeficientes de variação descritos como aceitáveis (EURACHEM, 1998).

2.2.2.5. Especificidade e seletividade

Foram avaliados a capacidade dos métodos em determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes presentes na matriz, isto com o preparo de amostras adicionadas do padrão e foram observados a leitura no comprimento de 540 nm.

2.2.2.6. Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método foram calculadas através da recuperação média (exatidão) e coeficientes de variação (precisão) das amostras (matriz) adicionadas de

concentrações conhecidas de padrão e resultados comparados com os valores sugeridos pelo CODEX ALIMENTARIUS (1993) (Tabela I.2).

2.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE UREIA E OS TEORES DE CARBAMATO DE ETILA NAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DE AGUARDENTE DE CANA

Para avaliação das correlações entre o carbamato de etila e a ureia, foi utilizado o estudo de correlação de Pearson para dados paramétricos e o teste de hipótese F, que foi utilizado para saber se a correlação é devida aos dois parâmetros X e Y ou se estão relacionados com outros parâmetros (TRIOLA, 2005).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em duplicata, sendo feita análise estatística descritiva dos dados obtidos. Para avaliar a influência das diferentes regiões e das alterações na metodologia foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Para determinação da curva analítica padrão foi utilizado regressão linear. Na validação da metodologia foram calculados os valores de recuperação e o coeficiente de variação dos dados (TRIOLA, 2005). Utilizou-se sempre o programa Excel for Windows.

TABELA I.2. Valores de concentrações e respectivos valores de recuperação média e coeficiente de variação aceitáveis para resultados quantitativos

Adição Valor referência	Percentual (%)	
	Recuperação	CV*
> 100 µg/L	80 – 110	< 15
10 – 100 µg/L	70 – 110	< 20
1,0 – 10 µg/L	60 – 120	< 30
< 1,0 µg/L	50 – 120	<35

Fonte: CODEX ALIMENTARIUS (1993).

2.5. CUIDADOS

Foram utilizados equipamentos de proteção individual (avental, óculos, luvas e máscara) e capela de exaustão química durante a realização das análises. Boas práticas de laboratório foram seguidas (RODRIGUES e ROSSI, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OTIMIZAÇÃO DE METODO PARA DETERMINAÇÃO DOS TEORES UREIA EM AGUARDENTE DE CANA

Para otimização da metodologia descrita por ALMY e OUGH (1989), pequenas modificações foram feitas e os resultados obtidos estão apresentados na tabela I.3.

Análise estatística comparando os ensaios demonstrou não haver diferença significativa pelo teste ANOVA (5%), para 3 concentrações diferentes (2,0; 5,0 e 10,0 mg/L), os ensaios foram feitos em triplicata. Conforme os resultados obtidos, não houve uma melhor condição, portanto a escolhida foi a solução ácida nas concentrações H₂SO₄ 18 mol/L + H₃PO₄ 14 mol/L + H₂O (1:3:1), e em banho-maria a 80 °C, por uma hora e trinta minutos.

Tabela I.3. Resultados encontrados para análise de ureia com modificações na metodologia

Concentração mg/L	Teores médios* (mg/L)/Métodos		
	POLASTRO et al. (2001)	Alteração solução ácida	Alteração no tempo e na temperatura
2,0	1,77 ^a	1,77 ^a	1,87 ^a
5,0	5,20 ^b	5,29 ^b	5,18 ^b
10,0	9,96 ^c	10,24 ^c	10,36 ^c

*Não houve diferença significativa pelo teste ANOVA (5%).

3.2. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE UREIA EM AGUARDENTE DE CANA

3.2.1. Linearidade

Conforme indicado na tabela I.4 e figura I.2, foi verificada a linearidade da resposta do equipamento baseado na leitura da absorbância em espectrofotômetro, a 540 nm, em três dias consecutivos, sendo o coeficiente de correlação superior a 0,9816.

3.2.2. Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção do equipamento para a ureia foi de 0,1 mg/L, por apresentar leitura diferente de zero em etanol 40% (ISO/IEC 17025 - NBR, 2001).

3.2.3. Limite de detecção do método

O limite de detecção encontrado para o método foi de 0,1 mg/L, por apresentar leitura diferente de zero em amostras de aguardente de cana adicionada de ureia.

Tabela I.4. Equação das retas das curvas-padrão e respectivos coeficientes de determinação obtidas para ureia em três dias consecutivos

Dias	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R ²)
1	$y = 0,1684x + 0,0342$	0,9858
2	$y = 0,1638x + 0,0334$	0,9856
3	$y = 0,1638x + 0,0395$	0,9816

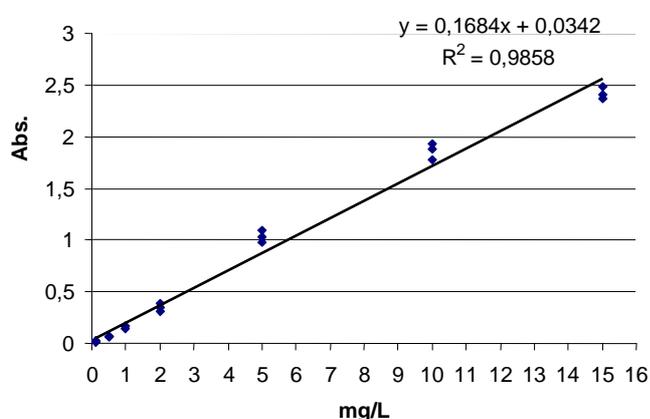


Figura I.2. Curva analítica, equação da reta e R² para análise da ureia em espectrofotômetro UV-vis a 540 nm em concentrações de 0,1 a 15 mg/L.

3.2.4. Limite de quantificação do método

O limite de quantificação encontrado para o método foi de 0,5 mg/L, por apresentar leitura em amostra de aguardente de cana adicionada do analito de interesse e ter valores percentuais de recuperação e coeficientes de variação aceitáveis, conforme descrito por EURACHEM (1998) (Tabela I.5).

3.2.5. Especificidade e seletividade

Foram avaliados a capacidade dos métodos em determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes presentes na matriz, isto com o preparo de amostras adicionadas do padrão e foram observados a leitura no comprimento de 540 nm, com resultados positivos na presença do padrão.

Tabela I.5. Limite de quantificação do método para análise de ureia, através dos valores de recuperação e coeficiente de variação

Concentração	Percentual (%)	
	Recuperação	Coefficiente de variação
Valor referência*		
> 0,1 mg/L	80 – 110	< 15
0,01 – 0,1 mg/L	70 – 110	< 20
Valor experimental		
0,1 mg/L	92	41
0,5 mg/L	94	11

* CODEX ALIMENTARIUS (1993).

3.2.6. Exatidão e precisão

Como não foi possível obter uma matriz sem o analito de interesse, estudos de recuperação foram feitos pelo método de adição, adicionando-se quantidades conhecidas de padrão à uma amostra de aguardente de cana. Os percentuais de recuperação e os coeficientes de variação obtidos (Tabela I.6) estão de acordo com o CODEX ALIMENTARIUS (1993).

Tabela I.6. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação para amostras adicionadas de ureia

Concentração	Percentual	
	Recuperação	Coefficiente de Variação
Valor referência*		
> 0,1 mg/L	80 – 110	< 15
0,01 – 0,1 mg/L	70 – 110	< 20
Valor experimental		
1 mg/L	99	8
5 mg/L	106	2
10 mg/L	108	2

* CODEX ALIMENTARIUS (1993).

Os resultados obtidos neste estudo (Figura I.3 e Tabelas I.7 e I.8) foram menores quando comparados aos resultados de POLASTRO et al. (2001) que encontraram teores médio, máximo e mínimo para amostras de aguardente de cana de 19, 73 e 0,2 mg/L, respectivamente, em 51 amostras de diversas regiões do Brasil. Estes resultados sugerem que as aguardentes de cana mineiras apresentaram teores de ureia inferiores aos encontrados em amostras de outras regiões do país.

Maiores percentuais (50%) de ureia foram detectados na faixa de 0,5 a < 1,0 mg/L, indicando que os teores de ureia não são muito elevados e que 31 % das amostras apresentarem teores abaixo de 0,5 mg/L (não detectado). Teores baixos de ureia em aguardentes de cana são esperados, já que o ponto de ebulição da ureia é de 132 °C. A ureia presente na aguardente provavelmente é proveniente do arraste desta durante a destilação.

Levando-se em consideração as regiões, as amostras não apresentaram diferenças significativas (ANOVA) 5% (Tabela I.9). Não foram encontrados outros relatos na literatura sobre os teores de ureia em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais.

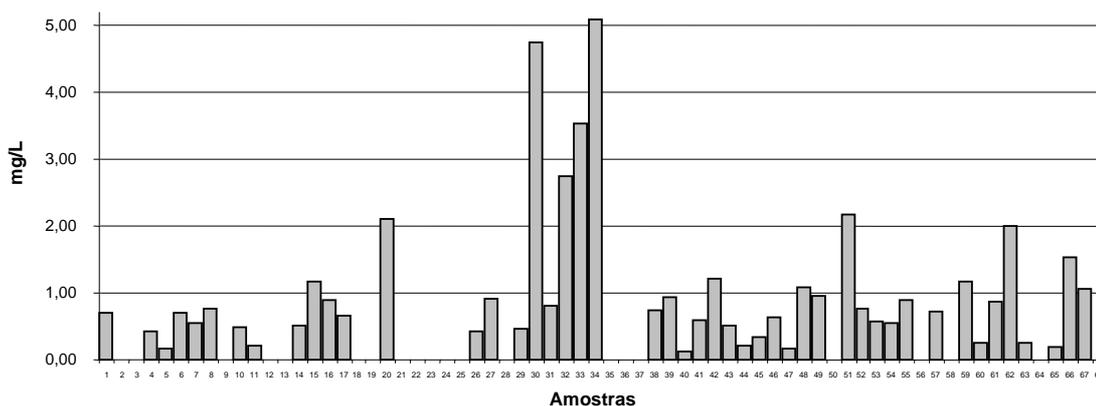


Figura I.3. Concentração de ureia (mg/L) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais no período de maio de 2003 a março de 2004.

Tabela I.7. Análise estatística descritiva do teor de ureia em aguardentes de cana coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004

Parâmetro	Ureia (mg/L)
Média	0,71
Erro padrão	0,12
Mediana	0,49
Modo	0,00
Desvio padrão	1,01
Intervalo	5,10
Mínimo	0,00
Máximo	5,10
Contagem	68,00

Tabela I.8. Teores de ureia em aguardentes de cana de Minas Gerais

Faixa (mg/L)	Nº de amostras	% de amostras
Não detectado (<0,5)	33	49
0,5 – < 1,0	22	32
1,0 - < 3,0	10	15
≥ 3,0	3	4

Tabela I.9. Teores de ureia em aguardentes produzidas em diferentes regiões de Minas Gerais

Regiões	n	Teores de ureia (mg/L)	
		faixa	Média \pm desvio padrão
Metropolitana	18	nd – 1,17	0,40 \pm 0,37 ^a
Noroeste	24	nd – 5,10	1,02 \pm 1,52 ^a
Sudoeste	13	nd – 2,00	0,59 \pm 0,62 ^a
Leste	13	nd – 2,17	0,70 \pm 0,60 ^a
Total	68	nd – 5,10	0,71 \pm 1,01

Valores médios (\pm desvio padrão) com uma mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. nd = não detectado (teores menores que 0,1 mg/L).

3.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE UREIA E OS TEORES DE CARBAMATO DE ETILA NAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DE AGUARDENTE DE CANA

Estudos de correlação de Pearson entre os teores carbamato de etila com os teores de ureia (Figura I.4), indicaram não haver correlação positiva significativa em nível de 5% de significância. Algumas variáveis não controladas neste estudo, como amostras com diferentes condições e tempos de armazenamento, tempo de envelhecimento variado, entre outros, provavelmente, contribuíram para estes resultados.

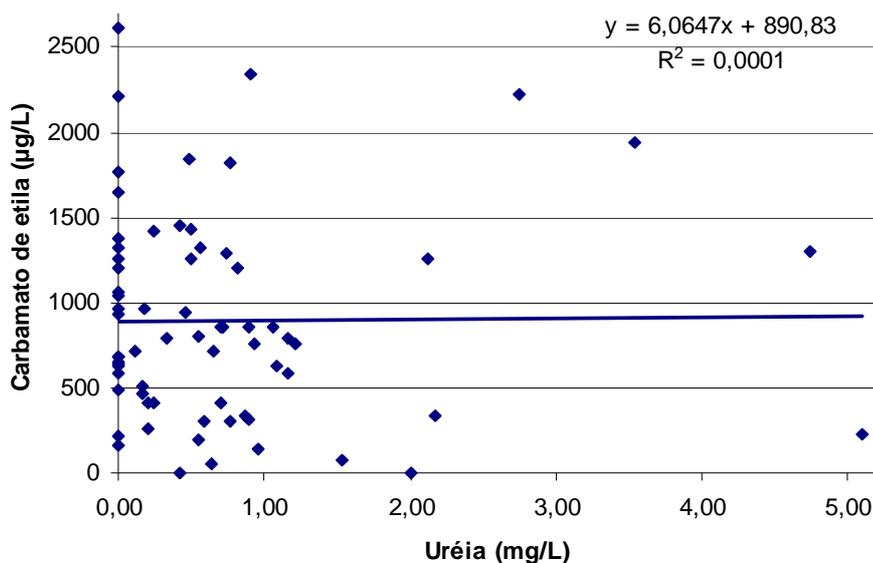


Figura I.4. Correlação entre a concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) e ureia (mg/L) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais no período de maio de 2003 a março de 2004 com a equação da reta e o R^2 .

4. CONCLUSÕES

O método analítico proposto para a quantificação da ureia, utilizando espectrofotometria a 540 nm, mostrou-se sensível, preciso, reprodutível e linear nas faixas de 0,5 a 15 mg/L, sendo adequado para a matriz aguardente de cana.

A presença de ureia foi detectada em 52% das 68 amostras de aguardente de cana produzidas em Minas Gerais em teores que variaram de 0,50 a 5,10 mg/L, com valor médio de 0,66 mg/L.

Estudos de correlação entre o carbamato de etila com o teor de ureia foram feitos e indicaram não existir correlação significativa (5%).

CAPÍTULO II.

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A ANÁLISE DE CIANETO EM AGUARDENTES DE CANA

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo otimizar um método simples e prático para a quantificação de cianeto em aguardente de cana. Duas metodologias (cloramina-T e ácido pícrico) foram comparadas e a que apresentou menor limite de quantificação foi validada. O método validado foi utilizado para quantificar os teores de cianeto em aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais no período de maio de 2003 a março de 2004. Os teores obtidos foram correlacionados aos teores de carbamato de etila destas mesmas amostras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Amostras

Amostras de aguardente de cana, num total de 51, foram coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004. As amostras foram submetidas às análises de cianeto, utilizando o método otimizado.

As amostras foram submetidas à análise de cianeto. Os resultados foram analisados individualmente e agrupados em quatro regiões – Metropolitana, Noroeste, Sudoeste e Leste, sendo que as duas últimas englobam algumas macrorregiões propostas pelo IBGE (2003), como pode ser observado na tabela II.1.

2.1.2. Reagentes, padrões e soluções

Todos dos reagentes utilizados eram de grau de pureza apropriado. Cianeto, cloramina-T, ácido 1,3-dimetilbarbitúrico e ácido pícrico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). A maioria dos reagentes utilizados era de grau analítico, porém, os solventes eram de grau cromatografia.

A solução estoque de cianeto (800 mg/L) foi preparada por dissolução de $80 \pm 0,1$ mg de cianeto de potássio (KCN) para 100 mL de água deionizada. Para a determinação do título da solução, dissolveu-se cerca de 0,20000 g de KCN, pesados com exatidão,

em 100 mL de água destilada em balão volumétrico de 300 mL. Adicionou-se 0,20 mL de solução de iodeto de potássio e titulou com a solução 0,1 M de nitrato de prata até a obtenção de uma coloração amarelada estável. Calculou-se o título desta solução de KCN, sabendo que 1 mL de solução 0,1 M de nitrato de prata correspondem a 13,2 mg de KCN.

Tabela II.1. Número de amostras de aguardente de cana coletadas por regiões de Minas Gerais

Regiões propostas	Macrorregiões*	Número de amostras
Metropolitana	Metropolitana	18
Noroeste	Noroeste	13
Sudoeste	Sul de Minas	10
	Alto São Francisco	
	Triângulo Mineiro	
Leste	Vale do Jequitinhonha	10
	Zona da Mata	
	Rio Doce	
Total		61

* IBGE (2003).

A solução foi armazenada sob refrigeração entre 4 e 8 °C e diluída quando necessário. Para o método de CÔRREA et al. (2004), a curva analítica foi preparada utilizando o KCN diluído em solução alcoólica, a 40% (0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 mg/L). Para a metodologia da União Européia (EEC, 1999), a curva foi 0; 0,010; 0,020; 0,50; 0,100 e 0,200 mg/L. Em seguida foram construídos os gráficos (absorbância x concentração) e, por regressão linear, foram determinados a equação da reta e os coeficientes de determinação.

A solução 2,4-dinitrofenol (1,4%) foi preparada por dissolução de $1400 \pm 0,1$ mg em 100 mL de água. A solução de carbonato de sódio (5%) foi preparada por dissolução de $5000 \pm 0,1$ mg em 100 mL de água e depois, no momento da análise foram misturadas na proporção de 1:1.

A solução de cloramina-T ($C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$) (3% m/v) foi preparada por dissolução de $1500 \pm 0,1$ mg de cloramina-T para 50 mL de água deionizada.

A solução de 1,3-dimetilbarbitúrico foi preparada por dissolução de 3,658 g de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico ($C_6H_8N_2O_3$) em 15 mL de piridina e 3 mL de ácido clorídrico concentrado e completou o volume até 50 mL com água destilada.

A solução de iodeto de potássio (10%) foi preparada por dissolução de $1000 \pm 0,1$ mg de iodeto de potássio para 10 mL de água deionizada.

A solução de nitrato de prata (0,10 mol/L) foi preparada por dissolução de $1,7000 \pm 0,0001$ g de nitrato de prata para 100 mL de água deionizada e armazenada em frasco âmbar.

A solução estoque de sacarose (10 g/L) foi preparada por dissolução de $1000 \pm 0,1$ mg de sacarose para 100 mL de água deionizada. A solução foi armazenada sob refrigeração entre 4 e 8 °C e diluída quando necessário.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Comparação de métodos para a quantificação de cianeto em aguardente de cana

Foram comparados os métodos de CÔRREA et al. (2004) e da União Européia (EEC, 1999). Para ambos os métodos, as curvas analíticas foram preparadas utilizando o cianeto de potássio diluído em solução alcoólica, a 40% conforme metodologia sugerida (Figura II.1). Em seguida foram construídos os gráficos (absorbância x concentração) e, por regressão linear, foram determinados a equação da reta e os coeficientes de determinação. O método com menor limite de quantificação foi validado.

2.2.1.1. Otimização dos métodos para determinação dos teores de cianeto em aguardente de cana

O método da União Européia foi feito conforme sugerido (Figura II.1), somente a matriz que mudou de vinho para aguardente de cana. Com isto, fez-se um teste para investigar se seria necessário executar novamente a destilação da bebida. Este teste consistiu em destilar amostras de aguardente de cana em triplicata contendo 0,10 mg/L de KCN adicionado e procedeu-se a análise, sendo utilizando como controle a mesma amostra sem destilação, com a mesma quantidade de cianeto.

O método citado por CÔRREA et al. (2004) passou por pequenas modificações e a matriz foi trocada, de extrato de mandioca para aguardente de cana. Amostras de aguardente de cana (1,00 mL) foram adicionadas de solução de 2,4-dinitrofenol (1,4%) e carbonato de sódio (5%) na proporção de 1:1 (4,00 mL), deixadas em repouso por 10 min, adicionadas de 7,50 mL de água e aquecidas em banho-maria com água em ebulição por 12 min. Em seguida, foram resfriadas e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 530 nm.

O método da União Européia (EEC, 1999) foi feito da seguinte forma: pipetou-se 2,5 mL de amostra num tubo Falcon de 15,0 mL com tampa, adicionou 100 µL de solução de cloramina-T e tampou hermeticamente. Transcorridos exatamente 60 segundos, adicionou-se 300 µL de solução de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico, tampou hermeticamente e deixou em repouso durante 10 min. Selecionou-se o comprimento de onda de 578 nm e zerou-se o equipamento com o branco (2,5 mL de água destilada tratada da mesma forma que a amostra) para a leitura.

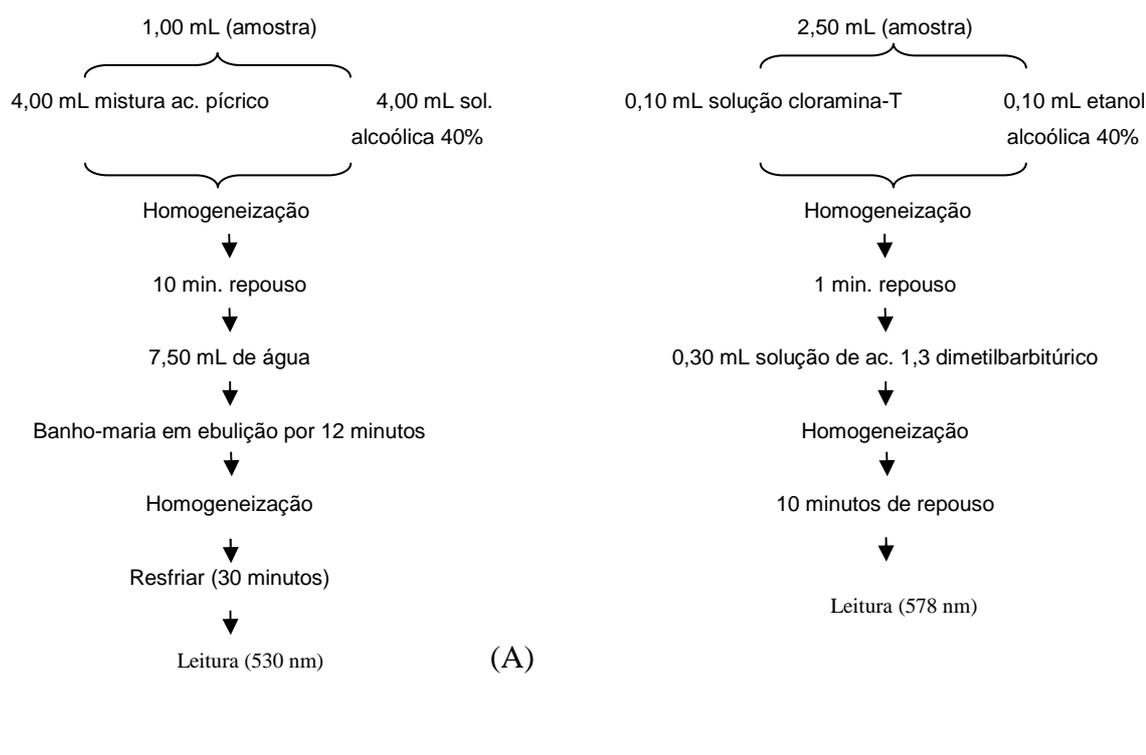


Figura II.1. Etapas para preparo de amostras de aguardente de cana para análise espectrofotométrica de cianeto utilizando-se (A) método com ácido pícrico (CÔRREA et al., 2004) e o (B) método com cloramina-T (EEC, 1999).

2.2.1.2. Estudo da interferência da sacarose com ácido pícrico para determinação de cianeto em aguardentes de cana por espectrofotometria

Amostras de aguardente de cana foram adicionadas de sacarose nas concentrações de 0,0; 1,5; 3,0 e 6,0 g/L. Estas foram deixadas em repouso à temperatura ambiente e analisadas ao longo de 120 dias. A glicose foi utilizada como grupo controle positivo na concentração de 0,1 g/L. A análise foi qualitativa, sendo o grupo controle comparado às amostras analisadas. A reação foi considerada positiva com o aparecimento da coloração castanha-avermelhada.

2.2.2. Validação da metodologia para determinação de cianeto em aguardente de cana

3.3. O método foi validado segundo SOUZA (2007), levando-se em conta os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção do equipamento e do método e limite de quantificação do método.

2.2.2.1. Linearidade

A linearidade do método foi aplicada através da regressão linear simples. Após as curvas prontas, foi feito o cálculo do resíduo padronizado, mediante o teste de Jackknife, onde se elimina a presença de *outliers*. A seguir, as premissas de linearidade foram avaliadas, isto é, foram feitos os cálculos estatísticos para avaliar se a curva era linear. Para normalidade, utilizou-se o teste de Ryan & Joiner, homocedasticidade, o teste de Levene, modificado por Brown & Forsythe e independência dos resíduos da regressão o teste de Durbin & Watson.

Por fim, foi feita a avaliação da linearidade pelo desvio da linearidade, sendo a variância devida ao desvio da linearidade foi comparada com a relativa ao erro puro (SOUZA, 2007).

2.2.2.2. Efeito da matriz

O delineamento experimental para testes de efeitos de matriz consistiu no preparo da curva de calibração do cianeto em etanol (40%) e curva do cianeto em amostra de aguardente no qual o analito não tinha sido identificado.

Primeiramente, o teste de F foi utilizado para avaliar a premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão, confrontando a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (há homocedasticidade) contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heterocedasticidade). Quando o teste indicou homocedasticidade, as inclinações e interseções das curvas do solventes e da matriz foram comparadas pelo teste de t com variâncias combinadas. Se houve heterocedasticidade, o teste de t foi empregado utilizando as variâncias amostrais de cada curva.

2.2.2.3. Exatidão e precisão

Foram utilizadas amostras adicionadas e a estatística empregada foi a recuperação aparente, a qual foi posteriormente comparada com valores críticos estabelecidos como

requisitos analíticos do método, que variam em função da concentração do analito na amostra. HORWITZ (1982) recomenda recuperação aparente para análises de traços, sendo valores mínimos aceitáveis de 60 % e 80 % para concentrações de $\mu\text{g/Kg}$ e mg/Kg , respectivamente. A EC (2002) determina faixas de médias de recuperação aparente de 50 % a 120 %, 70 % a 110 % e de 80 % a 110 %, respectivamente, para níveis $\leq 1 \mu\text{g/Kg}$, $> 1 \mu\text{g/Kg}$ a $10 \mu\text{g/Kg}$ e $\geq 10 \mu\text{g/Kg}$.

Foram adicionadas concentrações conhecidas (20, 50 e 200 $\mu\text{g/L}$) de KCN em amostras de aguardente de cana e avaliado o percentual de recuperação e o coeficiente de variação, para todas as concentrações testadas.

Na prática, a eficiência do método foi determinada mediante o cálculo da porcentagem de recuperação do(s) composto(s), segundo o seguinte procedimento:

- a) dez replicatas do branco dos reagentes, submetidos ao processo de análise (LDE);
- b) dez replicatas da matriz, em três níveis de concentração - baixo, médio e alto (20, 50 e 200 $\mu\text{g/L}$), adicionadas à aguardente de cana.

Normalmente é chamado de baixo o menor ponto de concentração da curva diferente do branco, médio a concentração intermediária e alta a maior concentração da curva.

A recuperação foi estimada segundo a equação:

$$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) * 100,$$

em que: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada;

C_3 = concentração adicionada.

3.4. Foram determinados as médias, os desvios-padrão, as medianas e a presença de *outliers*, utilizando o teste de Grubbs, as recuperações (R%) e os coeficientes de variação (cv) dos resultados de cada concentração (baixo, médio e alta – de acordo com a curva).

Após o cálculo da recuperação média (média de todas as recuperações para cada concentração) e do cv das médias, verificou-se se a recuperação média e o cv estavam de acordo com HORWITZ (1982) e THOMPSON (2000) (Tabela 14 – Revisão de Literatura). Caso não estivesse, o processo era repetido. Se os valores de recuperação e DPR não estavam dentro do tabelado, o método não poderia ser validado. Para DPR_r (desvio padrão relativo de repetitividade) foram aceitos valores de até 2/3 os desvios aceitos para DPR_R (desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial).

2.2.2.4. Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção do equipamento (LDE) foi estabelecido depois de realizado dez análises do branco da amostra e calculado o desvio padrão e multiplicado por três, somando o valor médio encontrado.

2.2.2.5. Limite de quantificação do método

O limite de quantificação do método (LQM) foi calculado levando-se em conta o primeiro ponto da curva na matriz da qual foi possível observar que atendia os parâmetros sugeridos para cálculo de precisão e exatidão do método, conforme sugerido por HORWITZ (1982) e THOMPSON (2000) (Tabela 14). LQM equivaleu ao primeiro ponto da curva que atendesse os parâmetros de exatidão e precisão.

2.2.3. Determinação dos teores de cianeto em amostras de aguardente de cana

O método otimizado e validado foi utilizado para a determinação do cianeto nas amostras coletadas. As amostras foram submetidas à análise de cianeto. Os resultados foram analisados individualmente e agrupados em quatro regiões – Metropolitana, Noroeste, Sudoeste e Leste, sendo que as duas últimas englobam algumas macrorregiões propostas pelo IBGE (2003).

2.2.4. Correlação entre os teores de cianeto e carbamato de etila em amostras de aguardente de cana

A análise de correlação de Pearson (5% de significância) foi feita com o objetivo de determinar a influência positiva ou negativa dos teores dos analitos pesquisados. Os teores de cianeto foram correlacionados com os teores de carbamato de etila (LABANCA et al., 2008) destas mesmas amostras.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Foi feita a estatística descritiva dos dados obtidos. Para avaliação das alterações na metodologia foi utilizada a Análise de Variância e os testes F e t a 5% de significância. Para a curva analítica foi utilizado regressão linear (TRIOLA, 2005). Para validação foram utilizados os testes estatísticos citados. Utilizou-se sempre o programa Excel for Windows.

2.4. CUIDADOS

Devido às características de toxicidade dos reagentes e padrões empregados neste trabalho, equipamentos de proteção individual (avental, óculos, luvas e máscara) e capela de exaustão química foram utilizados durante a realização das análises. Boas práticas de laboratório foram seguidas (RODRIGUES e ROSSI, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CIANETO EM AGUARDENTE DE CANA

Por meio das estimativas dos desvios padrão comparou-se as duas amostras (destilada e não destilada), não observando diferença significativa (5%) nos resultados, portanto, as amostras foram analisadas sem um processo prévio de destilação.

Para a otimização da metodologia descrita por CÔRREA et al. (2004), pequenas modificações foram feitas. A solução de 2,4-dinitrofenol (1,4%) e carbonato de sódio (5%) na proporção de 1:1 foi previamente filtrada e preparada à temperatura ambiente, diferindo da metodologia descrita que prepara a solução a 30 °C. O restante do procedimento foi semelhante ao método citado.

3.1.1. Estudo da interferência da sacarose com ácido pícrico para determinação de cianeto em aguardentes de cana por espectrofotometria

A sacarose adicionada não afetou a análise por até 90 dias, entretanto, após este período de tempo, resultados positivos foram encontrados. A possível justificativa para tal resultado, é que, com o passar do tempo, a sacarose pode ser hidrolisada a glicose, que reage com o ácido pícrico. Com este estudo qualitativo, observou-se que o método para análise de cianeto em aguardente de cana com ácido pícrico não foi o mais viável, já que esta hidrólise pode ocorrer e que a adição de sacarose em aguardente de cana é permitida (Tabela II.2.).

3.2. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CIANETO EM AGUARDENTE DE CANA

Inicialmente, foram comparados os dois métodos e a faixa de linearidade estudada. Foi possível observar de imediato que o método da EEC (1999) era muito mais sensível que o método utilizando o ácido pícrico, proposto por CÔRREA et al. (2004). Faixas iguais para avaliação de linearidade foram propostas para os dois métodos, contudo, o método com ácido pícrico precisou ser mil vezes mais concentrado, já demonstrando menor sensibilidade. As faixas avaliadas para a linearidade foram de 0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; e 160,0 mg/L, para o método utilizando o ácido pícrico e 0; 0,010; 0,020; 0,50; 0,100 e 0,200 mg/L para a metodologia com a cloramina-T.

Tabela II.2. Resultados qualitativos do estudo da interferência da sacarose com ácido pícrico na análise de cianeto em aguardente de cana

Dias	Ácido pícrico + glicose	Ácido pícrico + aguardente
0	Positivo	Negativo
3	Positivo	Negativo
6	Positivo	Negativo
9	Positivo	Negativo
12	Positivo	Negativo
24	Positivo	Negativo
30	Positivo	Negativo
60	Positivo	Negativo
90	Positivo	Positivo
120	Positivo	Positivo

3.2.1. Linearidade

Conforme indicado na Figura II.2, foram construídos os gráficos e calculadas as equações da reta e os coeficientes de determinação. Os perfis dos gráficos de resíduos demonstraram que não houve tendências óbvias de heterocedasticidade ou desvios de linearidade. Os intervalos de confiança dos resíduos não sugeriram a presença de *outliers* nestes gráficos, que foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

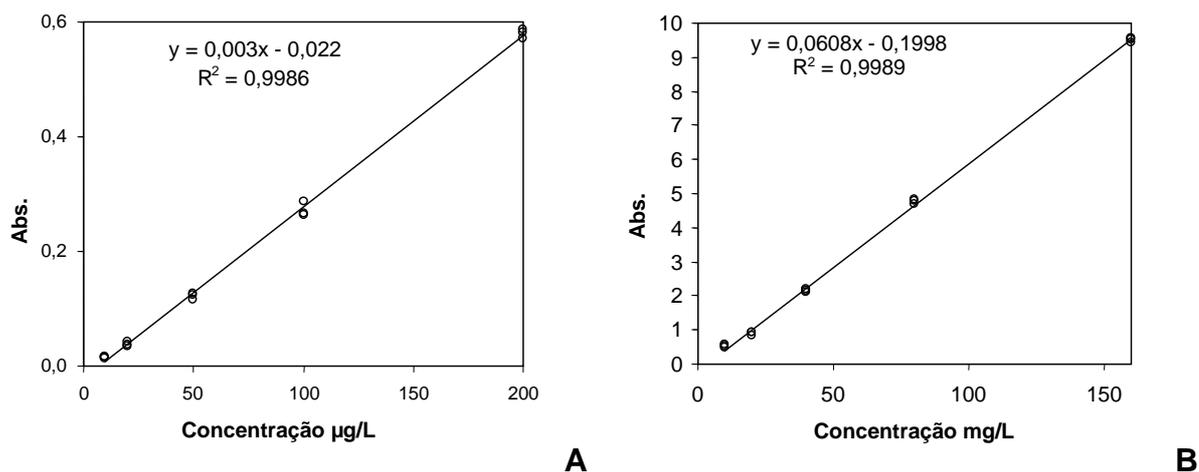


Figura II.2. Curvas padrão, equação da reta e R^2 para análise de cianeto nas concentrações de 10 a 200 µg/L, pelo método com cloramina-T (A) e nas concentrações de 10 a 160 mg/L pelo método com ácido pícrico (B).

As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal e são homoscedásticos e independentes foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F , além do emprego adequado da análise de variância sem ponderações para estimativa da significância da regressão e do desvio da linearidade. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$). A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo homocedasticidade. Autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ($p > 0,10$), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) determinaram linearidade na faixa de 10 a 200 µg/L para o cianeto pelo método da cloramina-T.

3.2.2. Efeito da Matriz

As curvas em solvente e na matriz (aguardente de cana), com os respectivos equação e coeficiente de determinação, estão apresentadas na Figura II.3. Pelo teste de resíduos padronizados Jackknife não foram detectados *outliers*. Todas as premissas relativas ao MMQO também foram feitas para a curva de solvente e matriz do analito. Uma distribuição normal dos resíduos da regressão foi observada pelos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner. Homocedasticidade foi obtida com estatísticas t de Levene não significativas ($p > 0,05$). Independência dos resíduos da regressão foi indicada pelas

estatísticas de Durbin-Watson ($p > 0,10$). Regressões significativas ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) foram diagnosticados pelos testes de F da análise de variância. Estes resultados de confirmação do modelo linear permitiram a comparação das inclinações e interseções pelo teste de t para avaliação dos efeitos da matriz.

O teste de F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas de solventes e matrizes e a possibilidade do uso do teste t com variâncias combinadas para avaliação dos efeitos de matriz. Assim, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando as inclinações e interseções das curvas de solventes foram comparadas com aquelas estimadas para as curvas de matriz para cianeto. Com base nestes resultados, foi possível verificar que a curva de solvente de cianeto forneceu a mesma resposta que a amostra de aguardente de cana, estudadas nas mesmas faixas de concentração.

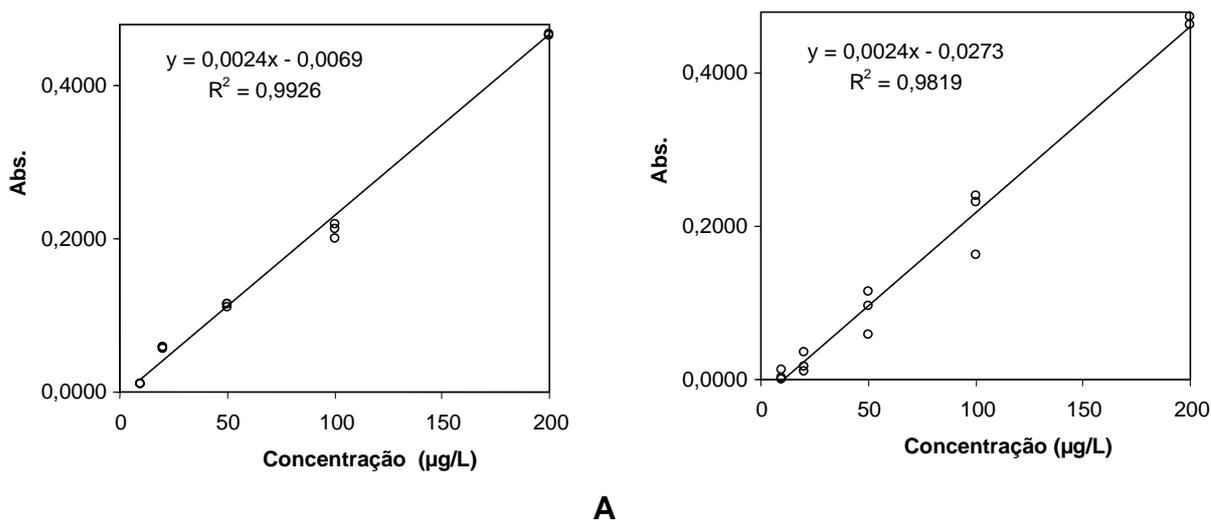


Figura II.3. Curva padrão equação da reta e R^2 para análise do cianeto em concentrações de 10 a 200 µg/L, método com cloramina-T em solvente (A) e na matriz (B).

3.2.3. Exatidão e precisão

Estudos de exatidão e precisão só foram conduzidos para o método utilizando a cloramina-T. Como não foi possível obter uma matriz sem o analito de interesse, a recuperação do método foi determinada pelo método de adição, utilizando-se quantidades conhecidas de padrão a uma amostra de aguardente de cana. Os percentuais de recuperação e os coeficientes de variação obtidos estão de acordo com a CE (2002).

Os resultados de porcentagem de recuperação individuais e a porcentagem de recuperação média calculada para os níveis de 20, 50 e 200 ug/L do método da

cloramina-T encontram-se dentro da faixa de aceitabilidade, indicando que não há falta de exatidão nestes níveis de concentração estudados (Tabela II.3).

Tabela II.3. Resultados de exatidão para análises de cianeto em aguardente de cana

Concentração*		Percentual (%) Recuperação
Valor referência		
$c \geq 0,010$ mg/L		80 – 110
$0,010 < c < 0,001$ mg/L		70 – 110
$c \leq 0,001$ mg/L		50 – 120
Valor experimental	Adicionado	
	(mg/L)	
	0,020	79,8
	0,050	72,9
	0,200	80,4

*c é adimensional: para 1 $\mu\text{g/L} = 1$ ppb tem-se $c = 10^{-9}$.

Fonte: HORWITZ (1982), THOMPSON (2000).

Os desvios padrão relativos de repetitividade e de reprodutividade parcial para os níveis de 10, 50 e 200 $\mu\text{g/L}$ do método da cloramina-T estão na faixa de aceitabilidade, indicando precisão do método nos níveis de concentração estudados (Tabela II.4).

Tabela II.4. Resultados de precisão para análises de cianeto em aguardente de cana

Concentração*		DPR_r	DPR_R
Valor referência			
$c \geq 13,8$ g/L		0,7	1,0
$0,120$ mg/L $< c < 13,8$ g/L		10,7	16,0
$c \leq 0,120$ mg/L		14,7	22,0
Valor experimental	Adicionado		
	(mg/L)		
	0,010	5,95	5,95
	0,050	7,75	7,75
	0,200	4,28	4,28

*c é adimensional: para 1 $\mu\text{g/L} = 1$ ppb tem-se $c = 10^{-9}$.

DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade) DPR_R = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial.

Fonte: HORWITZ (1982), THOMPSON (2000).

3.2.4. Limites de detecção do equipamento, limites de detecção e de quantificação do método

Os limites de detecção e quantificação estão demonstrados na Tabela II.5. Os limites de quantificação de cianeto em aguardente de cana obtidos são menores que os descritos por FURTADO et al. (2007), ou seja, 0,78 mg/L para o método voltamétrico e 0,81 mg/L para o método espectrofotométrico.

Tabela II 5. Limites em mg/L obtidos para o cianeto em dois métodos utilizados

Método	Limites (mg/L)		
	LDE	LDM	LQM
Cloramina-T	0,010	0,020	0,020
Ácido pícrico	8,9	10,0	10,0

LDE = Limite de detecção do equipamento; LDM = Limite de detecção do método; e LQM = Limite de quantificação do método.

3.3. TEORES DE CIANETO EM AGUARDENTE DE CANA

Setenta e sete por cento das amostras analisadas continham cianeto, em teores que variaram de 20 a 115 µg/L. A análise estatística descritiva revelou uma média de 28,8 µg/L, valor de desvio padrão de 24,9 µg/L e coeficiente de variação de 86,5% (tabelas II.6. e II.7.).

Tabela II.6. Análise estatística descritiva do teor de cianeto em aguardentes de cana coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004

Parâmetro	Cianeto (µg/L)
Média	28,8
Erro padrão	3,5
Mediana	25,8
Desvio padrão	24,9
Intervalo	115,1
Mínimo	0
Máximo	115,1
Contagem	51

A maioria das amostras apresentou teores abaixo de 50 µg/L, indicando que o cianeto está presente em baixas concentrações em aguardentes de cana, um fato importante, já que o cianeto é indicado como um dos principais precursores do carbamato de etila. Os teores mais encontrados (43%) foram na faixa de 20 a 30 µg/L. Vinte por cento das amostras apresentaram teores na faixa de 30 – 50 µg/L e 13% apresentaram teores acima de 50 µg/L (figura II.4).

Tabela II.7. Percentual de amostras em faixas de concentração de cianeto em aguardente de cana coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004

Faixa (µg/L)	Nº de amostras	% de amostras
Não detectado (<20)	12	23
20 - < 29	22	43
30 - < 50	10	20
≥ 50	7	13

Levando-se em consideração as regiões, as amostras não apresentaram diferenças significativas (ANOVA) 5% (Tabela II.8.). Não foram encontrados outros relatos na literatura sobre os teores de cianeto em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais.

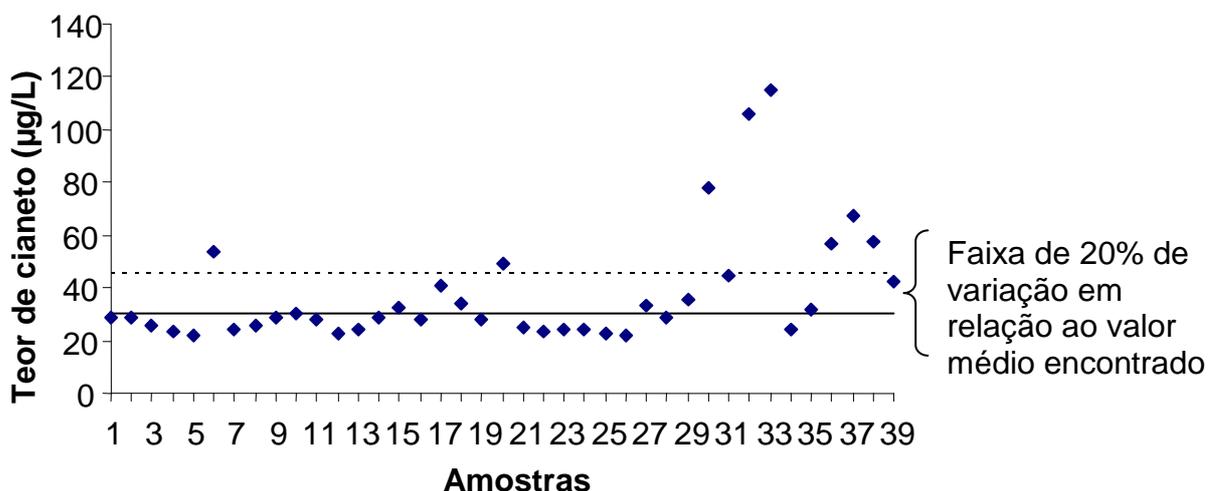


Figura II.4. Concentração de cianeto (µg/L) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais que apresentaram teores acima do limite de quantificação.

3.4. CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE CIANETO E CARBAMATO DE ETILA EM AMOSTRAS DE AGUARDENTE DE CANA

Estudos de correlação entre o carbamato de etila e cianeto foram feitos (Figura II.5), no entanto, não foi encontrada correlação significativa (5%). Algumas variáveis não controladas neste estudo, como amostras com diferentes condições e tempos de armazenamento, tempo de envelhecimento variado, etc, provavelmente contribuíram para estes resultados. Ainda não há relatos na literatura com relação aos teores de cianeto em amostras de aguardente de cana. MACKENZIE et al. (1990) e AYLOTT et al. (1990) observaram correlação positiva da presença de cianeto em uísque com a formação de carbamato de etila, contudo, relataram teores médios menores, na faixa de 50 µg/L.

Tabela II.8. Teores de cianeto em aguardentes produzidas em diferentes regiões de Minas Gerais

Regiões	n	Teores de cianeto (µg/L)	
		faixa	Média ± desvio padrão
Metropolitana	18	nd – 115,1	40,8 ± 31,2
Noroeste	13	nd – 41,0	23,0 ± 13,8
Sudoeste	10	nd – 49,0	19,3 ± 15,5
Leste	10	nd – 77,6	24,5 ± 25,5
Total	51	nd – 115,1	28,8 ± 24,9

Valores médios (± desvio padrão) com uma mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. nd = não detectado (teores menores que 20 µg/L).

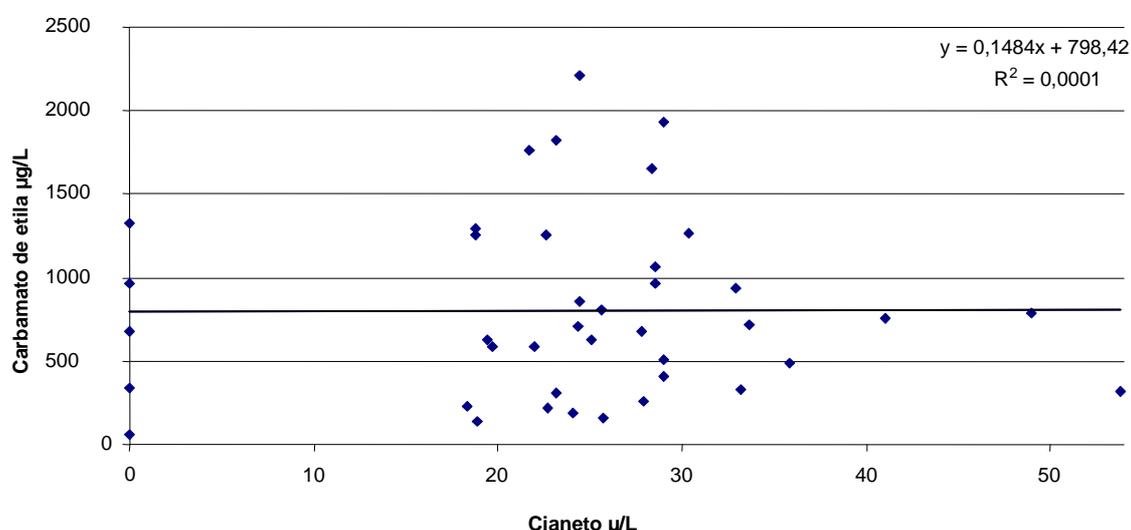


Figura II.5. Correlação entre a concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) e cianeto ($\mu\text{g/L}$) em amostras de aguardente de cana de Minas Gerais no período de maio de 2003 a março de 2004.

Cianeto foi encontrado em 77 % das amostras analisadas em concentrações que variaram de 20 a 115 $\mu\text{g/L}$, com valor médio de 33 $\mu\text{g/L}$. Não houve correlação entre os teores de carbamato de etila, para as amostras analisadas.

4. CONCLUSÕES

O método proposto pela União Européia (EEC, 1999) para análise de cianeto em vinhos pode ser utilizado para análise em aguardentes de cana, sendo simplificado pela redução da etapa de destilação da amostra. O método foi validado na faixa de linearidade de 20 a 200 $\mu\text{g/L}$. O limite de quantificação do método foi de 20 $\mu\text{g/L}$. O método analítico proposto para a quantificação do cianeto por espectrofotometria a 530 nm, mostrou ser sensível, preciso e reprodutível.

Amostras de aguardente de cana produzidas no estado de Minas Gerais apresentaram teores de cianeto que variaram de 0,020 a 0,115 mg/L. Não houve correlação significativa entre estes teores e os teores de CE nas amostras analisadas.

CAPÍTULO III.

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE COBRE EM AGUARDENTE DE CANA POR ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA E TEORES EM DIFERENTES FRAÇÕES ALCOÓLICAS NO PROCESSO DE DESTILAÇÃO

1. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi validar método analítico para determinar os teores de cobre em aguardentes de cana utilizando absorção atômica por chama e investigar a influência da fração alcoólica (cabeça, coração e cauda) nos teores de cobre em aguardentes de cana artesanais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Amostras

Amostras de aguardente de cana, coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) em março de 2004 foram utilizadas para a validação do método.

Amostras de cabeça, cauda e coração de três alambiques artesanais situados em Vianópolis, Itabira e Santo Antônio do Monte, no estado de Minas Gerais foram coletadas *in loco* em recipientes de vidro de primeiro uso. As amostras foram coletadas no período de setembro e outubro de 2007, em três bateladas distintas (Tabela III.1).

Tabela III.1. Planejamento de coleta das amostras nos alambiques artesanais produtores de aguardente de cana

Experimentos	Variáveis*	
	Fração (± 2 °GL)	
1	-1	Cabeça (65)
2	-1	Coração (45)
3	1	Cauda (25)
4	1	Cabeça (65)
5	0	Coração (45)
6	0	Cauda (25)
7	-1	Cabeça (65)
8	1	Coração (45)
9	0	Cauda (25)

*O grau alcoólico da fração tem um desvio padrão de 2.

2.1.2. Reagentes, padrões e soluções

Todos os reagentes utilizados eram de grau de pureza apropriado. Cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) foi adquirido da Merck (Darmstad, Alemanha) na forma de solução estoque de cobre ($1001 \pm 2 \text{ mg/L}$). Uma solução intermediária foi feita pela dissolução de $1000 \mu\text{L}$ da solução padrão estoque de cobre para 100 mL de água deionizada, ficando com a concentração de 10 mg/L .

A curva padrão foi feita utilizando soluções nas concentrações de $0,05$; $0,50$; $1,00$; $2,50$ e $5,00 \text{ mg/L}$ em solução alcoólica a 40% . A maioria dos reagentes utilizados era de grau analítico, porém, os solventes eram de grau cromatografia.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Validação da metodologia para análise de cobre em aguardente de cana

As análises de cobre foram feitas utilizando absorção atômica por chama em espectrômetro ACC modelo AA100 da Perkin Elmer (Überlingen, Alemanha) com chama de ar e acetileno nos fluxos de $4,0$ e $2,0 \text{ L/min}$, respectivamente, queimador do tipo monofenda, comprimento de onda de $324,8$, corrente de 25 mA e fenda de $0,7 \text{ nm}$.

Para validação do método, foram utilizados procedimentos de validação (SNEDECOR e COCHRAN, 1989; EURACHEM, 1998; EC, 2002; ANVISA, 2005; INMETRO, 2007; SOUZA, 2007; 2008). O método foi validado levando-se em conta os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção do equipamento e do método e limite de quantificação do método.

2.2.1.1. Linearidade

Para a construção da curva analítica foi utilizado o cobre diluído em solução alcoólica a 40% . Em seguida foram construídos os gráficos (absorbância x concentração) e, por regressão linear, foram determinados a equação da reta e o coeficiente de determinação.

2.2.1.2. Efeito da matriz

O delineamento experimental para testes de efeitos de matriz consistiu do preparo da curva de calibração do cobre em etanol (40%) e em amostra de aguardente onde o

analito tinha sido identificado em baixa concentração.

As comparações das inclinações e interseções foram feitas. Foi utilizado o método de adição (SOUZA, 2007).

2.2.1.3. Exatidão e precisão

Foram utilizadas amostras adicionadas de quantidades conhecidas de cobre e a estatística empregada foi a recuperação aparente, a qual foi posteriormente comparada com valores críticos estabelecidos como requisitos analíticos do método, que variam em função da concentração do analito na amostra (INMETRO, 2003).

Na prática, a eficiência do método foi determinada mediante o cálculo da porcentagem de recuperação do analito, segundo o seguinte procedimento:

- a) dez replicatas do branco dos reagentes, submetidos ao processo de análise (LDE); e
- b) dez replicatas da matriz, em três níveis de concentração - baixo, médio e alto (0,05; 2,50 e 5,00 mg/L), adicionadas à aguardente de cana.

Normalmente é chamado de baixo o menor ponto de concentração da curva diferente do branco; médio, a concentração intermediária; e alta, a maior concentração da curva.

A recuperação foi estimada. Foi feito o cálculo das médias, dos desvios-padrão, das medianas e da presença de *outliers*, utilizando o teste de Grubbs. As recuperações (R%) e os coeficientes de variação (CV) dos resultados de cada concentração (baixo, médio e alta – de acordo com a curva) foram também calculados.

Após o cálculo da recuperação média (média de todas as recuperações para cada concentração) e do CV das médias, verificou-se se a recuperação média e o CV estavam de acordo com a Tabela 14.

2.2.1.4. Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção do equipamento (LDE) foi estabelecido depois de realizadas dez análises do branco da amostra e calculado o desvio padrão e multiplicado por três, somando o valor médio encontrado.

2.2.1.5. Limite de quantificação do método

O limite de quantificação do método (LQM) foi calculado levando-se em conta o primeiro ponto da curva na matriz que atendia os parâmetros sugeridos para cálculo de precisão e exatidão do método (Tabela 14).

2.2.2. Determinação dos teores de cobre em diferentes frações nos alambiques

2.2.2.1. Coleta das amostras de aguardente de cana nos alambiques

O mosto, preparado nas condições típicas de cada produtor, foi colocado, em sistema de batelada, diretamente no alambique de cobre. O alambique foi aquecido de forma a promover a evaporação e posterior resfriamento do destilado. As amostras de destilado foram coletadas diretamente da saída do alambique. Primeiro coletou-se 1000 mL da cabeça (65 °GL). A fração seguinte retirada foi o coração (45 °GL). O volume total coletado foi homogeneizado, coletando-se deste pool uma fração de 1000 mL. Amostras dos últimos 10%, chamados de cauda ou água fraca (25 °GL), foram também coletados. Em cada alambique, as coletas das diferentes frações - cauda, coração e cabeça - foram feitas em garrafas de um litro de primeiro uso.

As características dos alambiques utilizados neste experimento estão indicadas na tabela III.2. De um modo geral, estes eram muito semelhantes, eram em cobre, de um só corpo e o processo era monodestilação. Contudo, o alambique B trabalha com leveduras selvagens, e os alambiques A e C usam leveduras de origem selecionada. Outro fator a ressaltar, é que o alambique B é mais rudimentar e sua produção é menor. Observou-se também, que no alambique C o aquecimento foi feito com fogo direto e seu fluxo de destilação era menor, comparado aos nos alambiques A e B.

Tabela III.2. Características gerais da produção da aguardente de cana artesanal nos alambiques selecionados

Características	Alambiques		
	A	B	C
Extração do caldo	engenho simples sem embebição	engenho simples sem embebição	engenho simples sem embebição
Tratamento do caldo	filtrado em tela	filtrado em tela	filtrado em tela
Leveduras alcoólicas do mosto	cepa selecionada propagadas em caldo diluído	selvagem propagadas em caldo diluído	cepa selecionada propagadas em caldo diluído
Suplementação ao mosto	fubá grosso, farelo de arroz, e farelo de soja	milho	farelo de milho
°Brix do mosto (final)	15	16	16
Temperatura de fermentação (°C)	30	32	34 - 35
Tempo de fermentação (h)	24	24	15
Material das dornas	inox	inox	inox
Material do alambique	cobre	cobre	cobre
Modelo do alambique	simples	simples	simples
Aquecimento do alambique	vapor	vapor	fogo direto
Volume de aguardente produzido por batelada (L)	230	80	100
Tempo de destilação, considerando só o coração (h)	3,5	1,3	2,0
Volume/tempo de destilação (L/h)	65,7	61,5	50
Temperatura da aguardente de cana na saída (°C)	22 - 24	22 - 24	20 - 22
Tipo de destilação	monodestilação	monodestilação	monodestilação

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Foi feita estatística descritiva dos dados. Para avaliação das alterações na metodologia foi utilizada análise de variância e os testes F e t a 5% de significância. Para a curva analítica padrão foi utilizado regressão linear. Para validação foram utilizados os testes estatísticos citados. Utilizou-se sempre o programa Excel for Windows.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE EM AGUARDENTE DE CANA

3.1.1. Linearidade

A curva de calibração foi obtida de 0,05 a 5,00 mg/L para o cobre com resultados de correlação acima de 0,999 (Figura III.1). A presença de *outliers* foi avaliada pelo teste de Jackknife, tendo estes sido eliminados.

As premissas de que os resíduos da regressão seguem distribuição normal, são homoscedásticos e independentes, foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego adequado da análise de variância sem ponderações para estimativa da significância da regressão e do desvio da linearidade. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$).

A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo homoscedasticidade. Autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ($p > 0,10$), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) indicaram linearidade na faixa de 0,05 a 5,00 mg/L para o cobre em aguardente de cana pelo método de espectrometria de absorção atômica com chama.

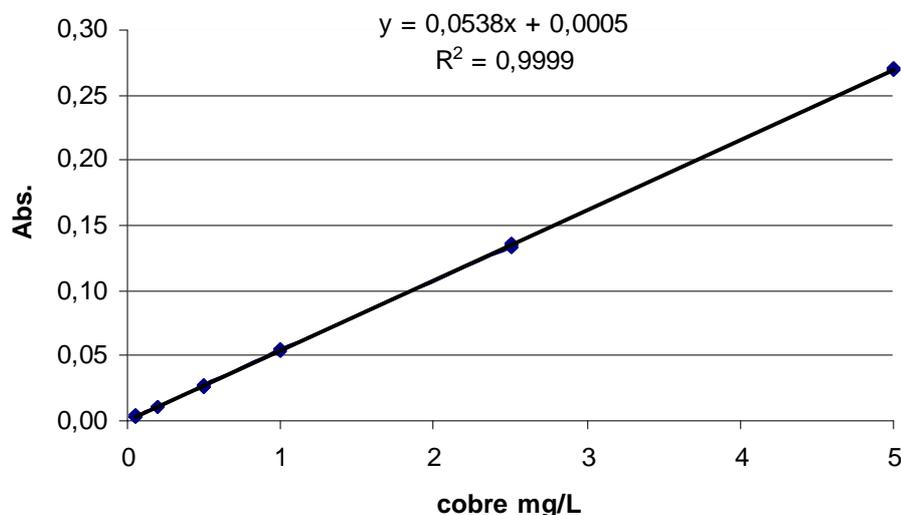


Figura III.1. Curva analítica, equação da reta e coeficiente de correlação (R^2) para análise de cobre em solução de etanol 40% depois de retirar os *outliers*.

3.1.2. Efeito da Matriz

As curvas analíticas em solvente e na matriz assim como as equações e coeficientes de determinação, obtidas nos estudos de efeitos de matriz estão apresentadas na Figura III.2. Pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife não foram detectados *outliers*. Todas as premissas relativas ao MMQO também foram feitas para a curva de solvente e matriz do analito.

Uma distribuição normal dos resíduos da regressão foi observada pelos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner. Homoscedasticidade foi obtida com estatísticas *t* de Levene não significativas ($p > 0,05$). A independência dos resíduos da regressão foi indicada pelas estatísticas de Durbin-Watson ($p > 0,10$). Regressões significativas ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) foram diagnosticados pelos testes de *F* da análise de variância. Estes resultados de confirmação do modelo linear permitiram a comparação das inclinações e interseções pelo teste de *t* para avaliação dos efeitos de matriz.

O teste de *F* indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas de solventes e matrizes e a possibilidade do uso do teste de *t* com variâncias combinadas para avaliação dos efeitos de matriz. Assim, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando as inclinações e interseções das curvas dos solventes foram comparadas com aquelas estimadas para as curvas de matriz para cobre. Com base nestes resultados, foi possível verificar que a curva de cobre em solvente forneceu a mesma resposta que a de cobre em amostra de aguardente de cana, estudadas nas mesmas faixas de concentração.

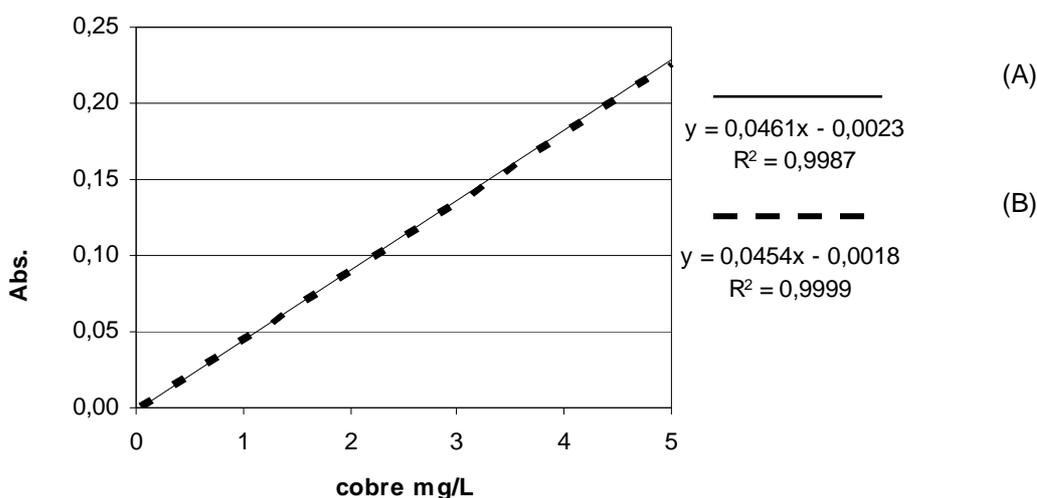


Figura III.2. Curva padrão, equação da reta e coeficiente de correlação (R^2) para análise de cobre em concentrações de 0,05 a 5,00 mg/L em (A) aguardente de cana (matriz) e em (B) solvente.

3.1.3. Exatidão e Precisão

Os resultados de recuperação e coeficiente de variação (CV) se encontram na tabela III.4. Como não foi possível obter uma matriz sem o analito de interesse, a recuperação do método foi determinada pelo método de adição, adicionando-se quantidades conhecidas de padrão a uma amostra de aguardente de cana. Os percentuais de recuperação e os coeficientes de variação obtidos estão de acordo com a CE (2002). Foram adicionadas concentrações conhecidas (0,05, 2,50 e 5,00 mg/L) de cobre nas amostras de aguardente de cana e avaliado o percentual de recuperação e o coeficiente de variação, para todas as concentrações testadas, os resultados atenderam a recomendação da CE (2002).

Os resultados de porcentagem de recuperação individuais e a porcentagem de recuperação média calculada para os níveis de 0,05; 2,50; e 5,00 mg/L encontram-se dentro da faixa de aceitabilidade, indicando que não há falta de exatidão nestes níveis de concentração estudados (Tabela III.3).

Os desvios padrão relativos de repetitividade e reprodutividade parcial para os níveis de 0,05; 2,50; e 5,00 mg/L encontram-se nas faixas de aceitabilidade, indicando precisão do método nos níveis de concentração estudados (Tabela III.4).

Tabela III.3. Resultados de exatidão comparados aos valores de referência para análises de cobre em aguardente de cana

Concentração*		Percentual (%) Recuperação
Valor referência		
$c \geq 0,010$ mg/L		80 – 110
$0,010 < c < 0,001$ mg/L		70 – 110
$c \leq 0,001$ mg/L		50 – 120
Valor experimental	Adicionado (mg/L)	
	0,05	99,20
	2,50	103,49
	5,00	97,31

*c é adimensional: para $1 \mu\text{g/L} = 1 \text{ ppb}$ tem-se $c = 10^{-9}$.
Fonte: HORWITZ (1982), THOMPSON (2000).

Tabela III.4. Resultados de precisão comparados aos valores de referência para análises de cobre em aguardente de cana

Concentração*		DPR _r	DPR _R
Valor referência			
$c \geq 13,8$ g/L		0,7	1,0
$0,120 \text{ mg/L} < c < 13,8$ g/L		10,7	16,0
$c \leq 0,120$ mg/L		14,7	22,0
Valor experimental	Adicionado (mg/L)		
	0,05	2,57	2,59
	2,50	1,24	1,20
	5,00	0,25	0,26

*c é adimensional: para $1 \mu\text{g/L} = 1 \text{ ppb}$ tem-se $c = 10^{-9}$.
Fonte: HORWITZ (1982), THOMPSON (2000).

3.1.4. Limites de detecção do equipamento e de quantificação do método

Os limites de detecção do equipamento e de quantificação do método foram de 0,05 mg/L, cem vezes menor que o limite máximo permitido de cobre em aguardentes de cana na legislação brasileira (BRASIL, 2005a).

3.2. INFLUÊNCIA DA FRAÇÃO ALCOÓLICA NOS TEORES DE COBRE EM AGUARDENTE DE CANA ARTESANAL

Os resultados obtidos para os teores de cobre em função da graduação alcoólica do destilado estão representados na tabela III.6. Foram observados teores médios de cobre valores significativamente diferentes (10% de confiança) para as amostras dos

alambiques A em relação ao B e C. Apesar das diferenças observadas nos valores médios das amostras dos diferentes alambiques, ao se considerar as amostras do coração, ou seja, a fração alcoólica usualmente recolhida e destinada ao consumo, todos os teores estariam de acordo com a legislação vigente, ou seja, teores menores que 5,0 mg/L (Figura III.3).

Tabela III.6. Teores de cobre em aguardentes de cana artesanais produzidas nos diferentes alambiques em função do grau alcoólico

Experimentos	Variáveis		Cobre (mg/L) / Alambique		
	±2 °C	Fração (±2 °GL)	A	B	C
1	23	Cauda (25)	2,36	7,23	9,59
2	23	Cabeça (65)	4,53	12,58	7,37
3	23	Coração (45)	1,78	4,98	3,74
média			2,89 ^a	8,26 ^b	6,90 ^b
CV			50,16	47,24	42,80

Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (teste de Duncan $p < 0,05$).

Amostras com teores de cobre mais elevados estavam na fração cabeça nos alambiques A e B. BOZA e HORII (2000) afirmaram que maiores teores de cobre são encontrados na cauda. Uma possibilidade de este fato ter acontecido é o alambique conter resíduo e azinhavre da destilação anterior. O descuido na higienização dos alambiques de cobre manifesta-se rapidamente pelo aparecimento de uma coloração escura, associada ao azinhavre. Sua limpeza artesanal é feita usando-se limão e sal, permitindo recuperar a limpeza e o brilho natural do cobre. A cada parada do alambique, esse deve ser lavado e é recomendável encher sua panela e serpentina com água, para evitar oxidação do cobre e contaminação da cachaça por esse metal. A cada início de safra, o alambique deve ser totalmente desmontando e lavado com água, limão e sal ou com água e bicarbonato. Cuidado especial deve merecer a serpentina do refrigerador, principal parte do aparelho a contaminar a aguardente com o cobre. Depois da lavagem e limpeza do aparelho, a primeira destilação deve ser realizada com água, de modo a eliminar todos os resíduos de cobre e de produtos utilizados na limpeza.

No alambique C, teores mais elevados de cobre foram observados na cauda. Estes resultados estão de acordo com resultados de BOZA e HORII (1998; 2000) e CAVALHEIRO et al. (2003), reforçando a importância do corte na destilação, isto é, separar a cabeça e a cauda do coração.

4. CONCLUSÕES

O método passou pela validação intralaboratorial seguindo critérios rigorosos e, abrangendo o limite regulamentado pela legislação vigente. Limites de detecção do equipamento e quantificação do método de 0,05 mg/L foram encontrados. Assim, pode-se concluir que o método é reprodutível e pode ser considerado validado intralaboratorialmente. Teores de cobre em concentração mais baixa na fração coração foram observados nos três alambiques acompanhados.

CAPÍTULO IV.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA POR ESPECTROFLUORIMETRIA

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo padronizar metodologia analítica para a determinação de carbamato de etila em aguardente de cana por derivação com 9-xantidrol e detecção por espectrofotometria no UV-visível ou fluorescência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Amostras

Amostras de aguardente de cana foram coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) no período de maio de 2003 a março de 2004.

2.1.2. Reagentes, padrões e soluções

Todos dos reagentes utilizados eram de grau de pureza apropriado. Carbamato de etila (CE) com 99,0% de pureza e 9-xantidrol (>99,0%) foram adquiridos da Sigma (St Louis, MO, EUA). A maioria dos reagentes utilizados foi de grau analítico, porém, os solventes eram de grau cromatografia.

A solução estoque de CE (200 mg/L) foi preparada por dissolução de $200 \pm 0,1$ mg de CE para 10 mL de etanol (40% v/v). A solução intermediária (20 µg/mL) foi obtida por diluição de 1000 µL da solução estoque para 100 mL de etanol (40% v/v). As soluções estoque, intermediária e final foram armazenadas sob refrigeração entre 2 e 8 °C e preparadas quando necessário.

A solução de 9-xantidrol (0,02 mol/L) foi preparada por dissolução de $39,6 \pm 0,1$ mg de 9-xantidrol para 10 mL de propanol. A solução foi preparada em frasco âmbar e armazenada em ausência de luz até o momento da análise. A solução era sempre preparada na hora da utilização.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinação dos espectros de absorção do carbamato de etila por espectrofotometria na região do UV-visível e por espectrofluorimetria

O espectro de absorção de solução de CE foi determinado de 200 a 800 nm no espectrofotômetro UV-vis 160A da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão). Foi utilizada solução de CE (200 mg/L) em 40% de etanol, na concentração de 200 mg/L. O espectro de absorção da solução de CE foi também determinado no fluorímetro RF – 5301 PC (Shimadzu, Kyoto, Japão).

2.2.2. Determinação dos espectros de absorção do carbamato de etila derivado com 9-xantidrol por espectrofotometria na região do UV-visível

2.2.2.1. Reação de derivação

Os testes foram feitos usando CE (200 mg/L) em solução de etanol a 40%, sendo adicionado 0,8 mL de 9-xantidrol na concentração de 0,02 mol/L em 4,0 mL da solução de CE, conforme citado por HERBERT et al. (2002). Após 5 min, realizou-se a varredura do espectro de absorção do derivado do CE com 9-xantidrol de 200 a 800 nm no espectrofotômetro UV-vis 160A da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão).

2.2.2.2. Estudo da influência do pH na reação do CE com 9-xantidrol

Os testes foram realizados usando CE (200 mg/L) em solução de etanol a 40%, sendo adicionado de 9-xantidrol 0,02 mol/L, conforme citado por HERBERT et al. (2002). Foram adicionados HCl, NaOH ou água (Tabela IV.1) com o objetivo de se obter valores de pH distintos e verificar se havia alteração na resposta espectrofotométrica.

Tabela IV.1. Soluções e volumes utilizados para obtenção de solução com diferentes valores de pH

Solução	Solução CE 200 mg/L (mL)	9-xantidrol 0,02 mol/L (mL)	HCl 1,5 mol /L (mL)	H ₂ O (mL)	NaOH 1,5 mol/L (mL)	pH
A	4,00	0,8	0,4	0	0	0,6
B	4,00	0,8	0	0,4	0	7,0
C	4,00	0,8	0	0	0,4	12,3

2.2.3. Determinação dos espectros de absorção do carbamato de etila derivado com 9-xantidrol por espectrofluorimetria

2.2.3.1. Reação de derivação

Os testes foram feitos usando CE (200 mg/L) em solução de etanol a 40% (v/v), sendo adicionado de 9-xantidrol 0,02 mol/L (HERBERT et al., 2002). Após 5 min, realizou-se varredura do espectro de absorção do derivado do CE com 9-xantidrol de 200 a 800 nm (excitação e emissão), em fluorímetro RF-5301 PC (Shimadzu, Kyoto, Japão).

2.2.3.2. Estudo da influência do pH

Os testes foram realizados usando CE (200 mg/L) em solução de etanol a 40% v/v, sendo adicionado de 9-xantidrol 0,02 mol/L, como citado por HERBERT et al. (2002). Foram adicionados HCl, NaOH ou água (Tabela IV.1) com objetivo de variar o pH do meio e verificar se havia alteração na resposta fluorimétrica.

2.2.3.3. Estudo da influência do tempo de contato e estabilidade do composto fluorescente

Realizou-se varredura do espectro de absorção da solução A (Tabela IV.1) de 200 a 800 nm no fluorímetro, fixando o comprimento de excitação e depois o de emissão (233 e 600 nm) com leituras a cada 30 segundos, em período de até 30 min.

Após determinar o tempo de reação, foi estudada a estabilidade da reação, analisando a solução em intervalos de 30 min, durante 3 h. Realizou-se varredura do espectro de absorção do CE com 9-xantidrol de 200 a 800 nm no fluorímetro, variando o comprimento de excitação e depois de emissão.

2.2.4. Validação da metodologia para determinação de carbamato de etila derivado com 9-xantidrol por espectrofluorimetria em aguardente de cana

Para validação da metodologia foram testados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção do equipamento, limites de detecção e quantificação do método, especificidade, exatidão e precisão (INMETRO, 2003).

2.2.5. Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para avaliação dos diferentes tempos para alterações na metodologia foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Duncan, quando necessário, a 5% de significância. Para a curva analítica foi utilizada regressão linear (TRIOLA, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL E POR ESPECTROFLUORIMETRIA

Para as análises feitas no espectrofotômetro UV visível, não foram observados picos de absorção, o que era esperado pela natureza química da substância. No fluorímetro, o CE apresentou diversos picos fixando-se excitação em 233 nm. Fixando a emissão em 600 nm, os picos de absorção mais significativos ocorreram em 300 e 600 nm (Figura IV.1).

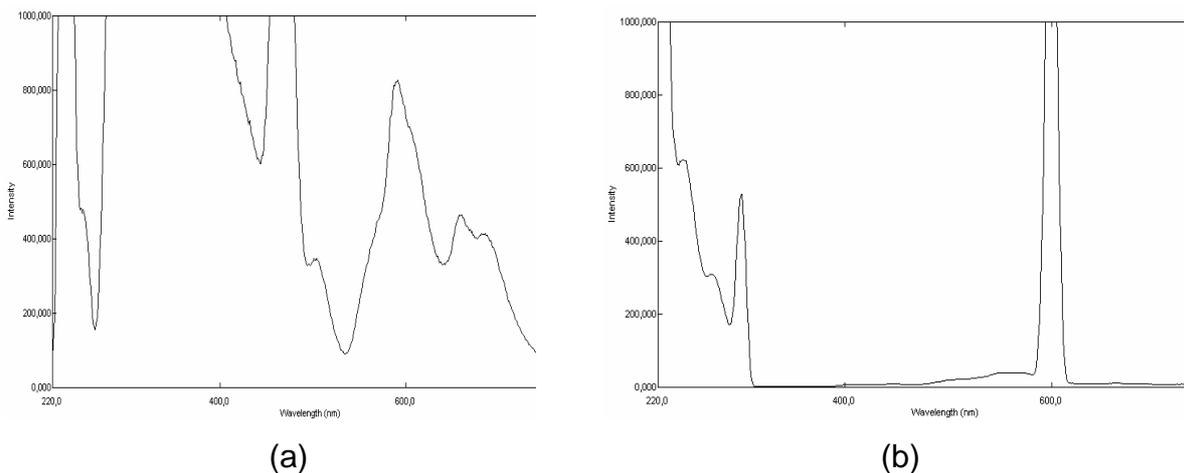


Figura IV.1. Espectro de absorção do carbamato de etila (200 mg/L) em 40% v/v de etanol, (a) fixando-se a excitação a 233 nm e (b) fixando-se a emissão em 600 nm.

3.2. DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DERIVADO COM 9-XANTIDROL POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL

3.2.1. Reação de derivação

Para as análises no espectrofotômetro UV-visível, foi observado para o derivado xantiuretano (Figura IV.2), o pico no comprimento de onda de 343 nm (Figura IV.3.b.).

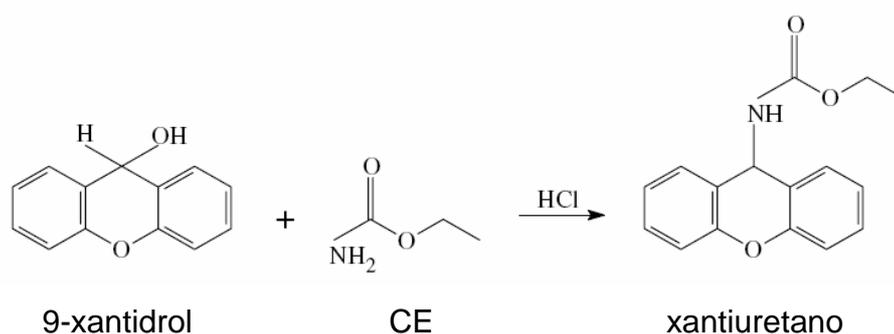


Figura IV.2. Formação do xantiuretano a partir do 9-xantidrol com o carbamato de etila em meio ácido.

3.2.2. Estudo da influência do pH

O espectro de absorção do CE após derivação com 9-xantidrol de 200 a 800 nm em diferentes valores de pH pode ser observado na Figura IV.3. O pH ácido foi o que apresentou diferença de intensidade no comprimento de onda de 343 nm em relação ao espectro do 9-xantidrol sem o CE, com variações de concentração, confirmando que a reação é favorecida em meio ácido, pela ação catalítica do ácido (HERBERT et al., 2002).

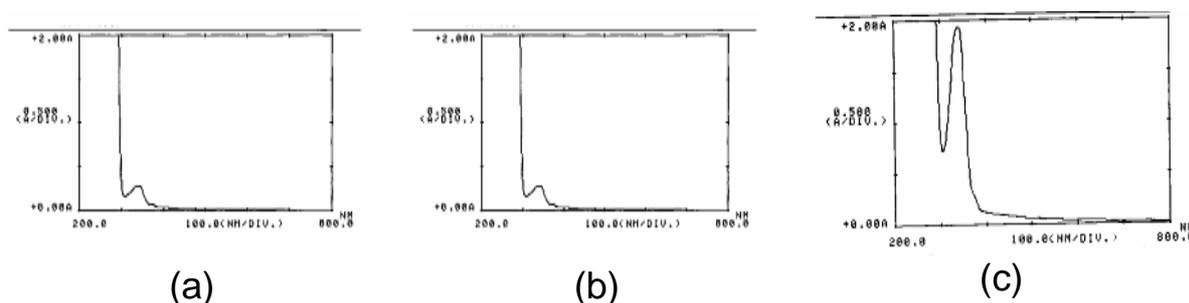


Figura IV.3. Espectro de absorção do carbamato de etila (200 mg/L) em 40% v/v de etanol com xantidrol (0,02 mol/L) (5:1), variando o pH (a) 12,3 (b) 7,0 e (c) 0,6, por espectrofotômetro UV-visível.

3.3. DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DERIVADO COM 9-XANTIDROL POR ESPECTROFLUORIMETRIA

3.3.1. Reação de derivação

O CE com o 9-xantidrol apresentou um pico em 298 nm, fixando excitação em 233 nm, e não apresentou picos, fixando emissão em 600 nm, conforme figura IV.5 (b).

3.3.2. Estudo da influência do pH

O CE com o 9-xantidrol em pH 12,3 e 7,0 apresentaram um pico em 298 nm, fixando a excitação em 233 nm, e não apresentaram picos, fixando a emissão em 600 nm, conforme indicados nas figuras IV.5. (a) e (b). Em meio ácido observou-se um pico em 298 nm, fixando a excitação em 233 nm, e 4 picos em 264, 298, 510 e 600 nm, fixando a emissão em 600 nm, conforme figura IV.5 (c).

3.3.3. Estudo da influencia do tempo de contato e estabilidade do derivado fluorescente

O tempo de reação ideal para a análise do CE com o 9-xantidrol por espectrofluorimetria foi de 4 min (Figura IV.4.). Após análise do tempo de reação, observou-se a estabilidade da reação, analisando a amostra a cada 30 min, durante um período de 3 horas. A varredura do espectro de absorção do CE com 9-xantidrol de 200 a 800 nm foi realizada no fluorímetro, variando o comprimento de excitação e depois de emissão. Pelo teste de Duncan (5%), a faixa de tempo de 3 a 4 minutos seria o tempo ideal para executar a leitura das amostras (Tabela IV.2).

Não houve diferença significativa pelo teste de variância (ANOVA, 5%) entre os tempos de análise (Tabela IV.3.; Figura IV.6), concluindo que em até 3 horas o complexo formado mantém-se estável.

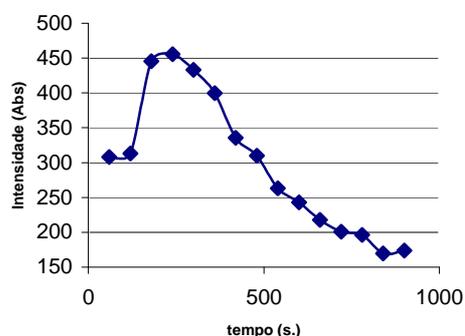


Figura IV.4. Tempo de reação do carbamato de etila com 9-xantidrol, a 233 nm de excitação e 600 nm de emissão.

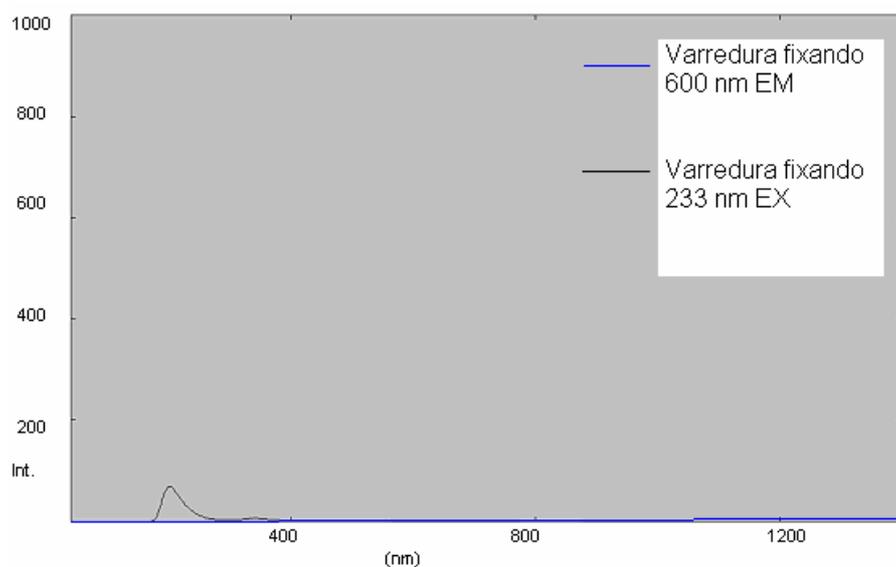
Tabela IV.2. Determinação do tempo de reação ideal para o carbamato de etila com o 9-xantidrol em espectrofluorímetro a 298 nm de excitação e 600 nm de emissão

Tempo (seg)	Absorbância (298 nm de excitação e 600 nm de emissão)			Média	CV*
60	309	307	308	308 ^{e, f}	0,32
120	315	309	315	313 ^{f, g}	1,11
180	448	445	443	445 ^j	0,57
240	459	449	459	456 ^j	1,27
300	434	434	432	433 ⁱ	0,27
360	386	356	457	400 ^h	12,97
420	337	335	334	335 ^g	0,46
480	312	309	309	310 ^{e, f}	0,56
540	271	254	265	263 ^d	3,28
600	243	243	243	243 ^d	0,00
660	219	218	216	218 ^c	0,70
720	202	200	200	201 ^c	0,57
780	196	198	195	196 ^{b, c}	0,78
840	180	150	179	170 ^a	10,02
900	174	174	173	174 ^{a, b}	0,33

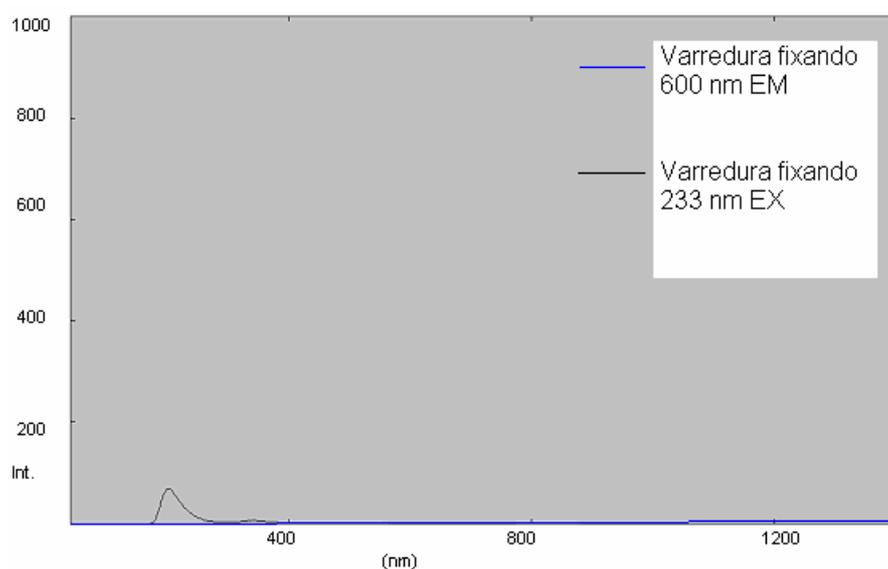
* Coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (teste de Duncan, $p < 0,05$).

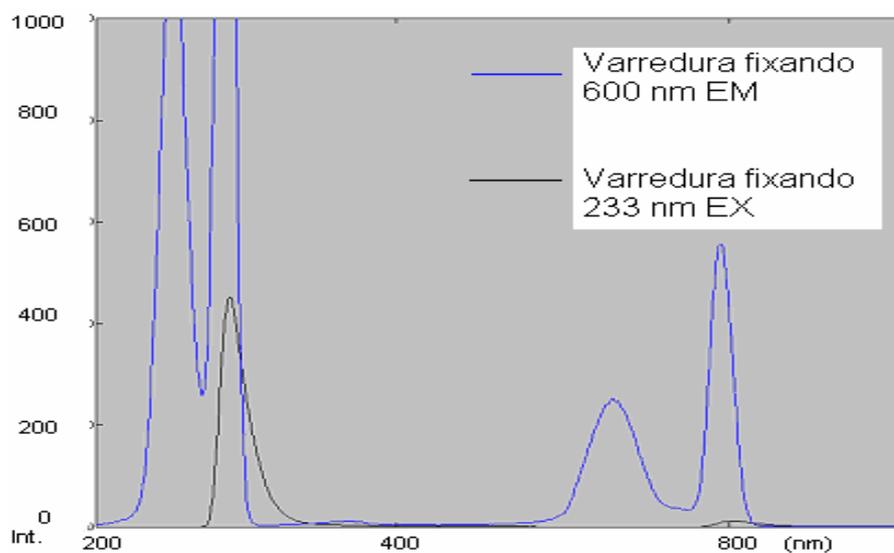
Valores em negrito representam valores de maior absorbância.



A



B



C

Figura IV.5. Espectro de absorção do carbamato de etila (300 mg/L) em 40% v/v de etanol com xantidrol (0,02 mol/L) (5:1), pH 7,0 (A); pH 12,3 (B) e pH 0,6 (C).

Os melhores resultados foram observados em pH ácido, usando 4,0 mL do carbamato de etila (200 mg/L), 0,8 mL de solução de 9-xantidrol (0,02 mol/L) e 0,4 mL de HCl (1,5 mol/L), em temperatura ambiente e na ausência de luz. Os comprimentos de onda selecionados para a quantificação foram 233 nm para a excitação e 600 nm para a emissão. A absorvância aumentou com o tempo de reação, alcançando um valor máximo em 4 min.

Tabela IV.3. Determinação da estabilidade da reação do carbamato de etila com o 9-xantidrol em espectrofluorimetria a 298 nm de excitação 600 nm de emissão

Tempo (min.)	Absorvância			Média	CV*
	(298 nm de excitação 600 nm de emissão)				
30	157	158	158	158 ^a	0,4
60	152	168	158	159 ^a	5,1
90	150	154	154	153 ^a	1,5
120	168	165	160	164 ^a	2,5
150	165	154	165	161 ^a	3,9
180	165	154	154	158 ^a	4,0

* Coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (teste de Duncan, $p < 0,05$).

3.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA POR FLUORÍMETRO EM AGUARDENTE DE CANA

3.4.1. Linearidade

Conforme indicado na tabela IV.4, foi verificada a linearidade da resposta do equipamento baseado na área do pico em três dias consecutivos, tendo-se encontrado o coeficiente de correlação superior a 0,9816.

O coeficiente de determinação (R^2) da curva padrão do CE na faixa de concentração de 50 a 300 mg/L foi adequado para a substância pura, no valor acima de 0,9808 (Figura IV.6., Tabela IV.4).

Tabela IV.4. Equações das retas das curvas-padrão e respectivos coeficientes de determinação obtidos para carbamato de etila em três dias consecutivos

Dias	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R ²)
1	$y = 0,2982x + 86,85$	0,9808
2	$y = 0,3105x + 82,18$	0,9835
3	$y = 0,3787x + 79,48$	0,9911

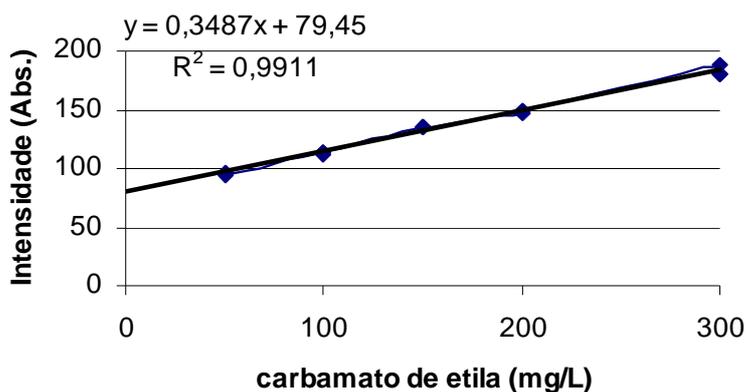


Figura IV.6. Curva padrão, equação da reta e R² para análise do carbamato de etila com leitura de absorvância a 233 nm de emissão e 600 nm de excitação em concentrações de 50 a 300 mg/L.

3.4.2. Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção do equipamento para foi de 50 mg/L, por apresentar leitura diferente de zero em etanol 40% v/v (NBR/ISO/IEC 17025, 2001).

3.4.3. Limites de detecção e de quantificação do método

O limite de detecção encontrado para o método foi de 50 mg/L, por apresentar leitura em amostras de aguardente de cana adicionada de CE.

O limite de quantificação do método para CE foi de 100 mg/L, por apresentar leitura em amostra de aguardente de cana adicionadas do analito de interesse e possuir percentuais de recuperação e coeficientes de variação aceitáveis, conforme descritos por EURACHEM (1998) (Tabela IV.5).

Tabela IV.5. Limite de quantificação do método determinados em função dos valores de recuperação e coeficiente de variação

Concentração	Percentual	
	Recuperação	CV*
Valor referência		
> 0,1 mg/L	80 – 110	< 15
0,01 – 0,1 mg/L	70 – 110	< 20
Valor experimental		
50 mg/L	125	15
100 mg/L	96	8

*CV = coeficiente de variação.

3.4.4. Exatidão e precisão

Como não foi possível obter uma matriz sem o analito de interesse, a recuperação do método foi determinada pelo método de adição, adicionando-se quantidades conhecidas de padrão à uma amostra de aguardente de cana. Os percentuais de recuperação e os coeficientes de variação obtidos (Tabela IV.6) estão de acordo com o CODEX ALIMENTARIUS (1993).

Tabela IV.6. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação para amostras adicionadas de carbamato de etila

Concentração	Percentual (%)	
	Recuperação	CV*
Valor referência		
> 0,1 mg/L	80 – 110	< 15
0,01 – 0,1 mg/L	70 – 110	< 20
Valor experimental		
100 mg/L	106	4
200 mg/L	90	3

*CV = coeficiente de variação.

O carbamato de etila no espectrofotômetro UV visível, na faixa de 200 a 800 nm não apresentou picos de absorção. No fluorímetro, o CE apresentou diversos picos fixando-se excitação em 233 nm. Fixando a emissão em 600 nm, os picos de absorção mais significativos foram em 300 e 600 nm.

O CE com xantidrol no espectrofotômetro UV visível, apresentou maior absorvância no comprimento de onda de 343 nm.

O espectro de absorção (220 a 800 nm) em espectrofotômetro do CE com 9-xantidrol com variação de pH mostrou que o pH ácido foi o que apresentou uma diferença de intensidade no comprimento de onda de 343 nm em relação ao espectro do 9-xantidrol sem o CE.

O método analítico proposto para a detecção e quantificação do CE, usando fluorímetro, a 298 nm de excitação e 600 nm de emissão, mostrou-se preciso, reprodutível e linear nas faixas de 50 a 300 mg/L. O limite de quantificação para o método foi de 100 mg/L e o de detecção, 50 mg/L. Para análise de CE em aguardente de cana, as amostras teriam que ser concentradas 700 vezes, tornando inviável o uso desta metodologia.

4. CONCLUSÕES

Os melhores resultados para análise do carbamato de etila por espectrofluorimetria foram observados em pH ácido, usando 4,0 mL do CE (200 mg/L), 0,8 mL de solução de 9-xantidrol (0,02 mol/L) e 0,4 mL de HCl (1,5 mol/L), em temperatura ambiente e na ausência de luz. Os comprimentos de onda selecionados para a quantificação foram 233 nm para a excitação e 600 nm para a emissão. A absorvância aumentou com o tempo de reação, alcançando um valor máximo em 4 min. A curva analítica para o carbamato de etila em etanol 40% v/v de 50,0 a 300,0 mg/mL foi linear ($R^2 = 0,9911$). O método analítico proposto para a detecção e quantificação do CE, usando espectrofluorímetro, a 298 nm de excitação e 600 nm de emissão, mostrou-se preciso, reprodutível e linear nas faixas de 50 a 300 mg/L. O limite de quantificação para o método foi de 100 mg/L e o de detecção, 50 mg/L.

CAPÍTULO V.

DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM AGUARDENTE DE CANA POR CG-EM UTILIZANDO PADRÃO INTERNO DEUTERADO

1. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de melhorar a precisão e a exatidão dos resultados analíticos, que são obtidos na análise de carbamato de etila em aguardente de cana utilizando cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Amostras

Amostras de aguardente de cana coletadas aleatoriamente no mercado consumidor de Belo Horizonte (MG) foram utilizadas para a validação do método.

2.1.2. Reagentes, padrões e soluções

Todos dos reagentes utilizados eram de grau de pureza apropriado. Carbamato de etila (CE) com 99,0% de pureza e carbamato de etila deuterado (>99,0%) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). A maioria dos reagentes utilizados era de grau analítico, porém, os solventes eram de grau cromatografia.

A solução estoque de CE (200 mg/L) foi preparada por dissolução de $2,00 \pm 0,1$ mg de CE para 10 mL de etanol (40% v/v). A solução intermediária (20 µg/mL) foi obtida por diluição de 1000 µL da solução estoque para 100 mL de etanol (40% v/v). As soluções estoque, intermediária e final foram armazenadas sob refrigeração (2 a 8 °C) e preparadas quando necessário.

A curva padrão foi feita utilizando soluções nas concentrações de 5,0; 50,0; 150,0; 300,0 e 600,0 µg/L em solução alcoólica a 40%. A curva de calibração foi construída, utilizando-se a resposta (área) de cada ponto com suas respectivas concentrações. O padrão interno (CE deuterado) foi adicionado em todos os pontos na concentração de 10,0 µg/L.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinação de carbamato de etila em aguardente

O método utilizado foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) utilizando-se equipamento mod. GC EM-QP 2010 da Shimadzu, Kyoto, Japão (LABANCA et al., 2008).

As condições para a determinação de carbamato de etila por CG-EM em aguardente de cana foram: injeção manual, temperatura do injetor de 250 °C e temperatura da interface de 230 °C; programação da temperatura do forno era de 90 °C (2 min), elevada a 10 °C/min até 150 °C (0 min), e elevada a 40 °C/min até 230 °C (10 min); e coluna HP-FFAP (50 m; 0,25 mm e 0,25 µm); recoberta com filme polar de PEG esterificado (0,3 µm espessura). O volume de injeção foi de 1,0 µL no modo *splitless* com o tempo de abertura da válvula de purga de 60 segundos. O fluxo do gás de arraste hélio era de 1,5 mL/min.

Para monitoramento do carbamato de etila foi selecionado o modo SIM, e o íon de massa m/z 62, por ser o mais específico, apresentar intensidade relativa razoável, e apresentar menos interferentes na determinação de carbamato de etila em aguardente de cana. Para o carbamato de etila deuterado, foi monitorado o íon de massa m/z 64. O parâmetro de quantificação utilizado foi a área.

As amostras de aguardente de cana foram analisadas diretamente. O carbamato de etila foi identificado por comparação do tempo de retenção entre o padrão e as amostras. A confirmação foi feita pela adição de padrão interno deuterado à amostra e pela comparação dos espectros de massas obtidos com o espectro do padrão nas mesmas condições. A quantificação do carbamato de etila foi feita por interpolação em curva analítica e corrigida pelo percentual de recuperação do padrão interno. Todas as análises foram feitas em duplicata. As amostras foram analisadas diretamente. As amostras cujas leituras extrapolaram a curva analítica foram diluídas com etanol 40% e submetidas novamente à análise.

2.2.2. Comparação de duas possibilidades para análise do carbamato de etila em aguardente de cana, com e sem o uso do padrão interno deuterado

O método foi validado e comparado levando-se em conta os parâmetros de linearidade. Para a construção da curva analítica foi utilizado o carbamato de etila diluído em solução alcoólica, a 40%. Em seguida foram construídos os gráficos (absorbância x concentração) e, por regressão linear, foram determinados a equação da reta e o

coeficiente de determinação. A linearidade do método foi determinada por regressão linear simples.

3.5. O ensaio para avaliar a linearidade consistiu em construir uma curva de calibração estabelecida com cinco concentrações (abscissa) fora o zero e suas absorvâncias (ordenada). A solução de cada concentração foi analisada em triplicatas independentes, isto é, não repetiu a leitura, e sim preparou três curvas distintas. As análises foram lidas em ordem aleatória. Foram feitas seis curvas, sendo três adicionadas de padrão interno. O estudo foi feito conforme descrito por SOUZA (2007).

Após as curvas prontas, foi feito o cálculo do resíduo padronizado, mediante o teste de Jackknife, com a eliminação de *outliers*. A seguir, as premissas de linearidade foram avaliadas. Para normalidade utilizou-se o teste de Ryan & Joiner, homoscedasticidade, o teste de Levene, modificado por Brown & Forsythe e independência dos resíduos da regressão o teste de Durbin & Watson.

Por fim, foram comparadas as duas curvas, uma com adição de padrão interno e a outra sem o padrão interno.

2.3. CUIDADOS

Devido às características de toxicidade dos reagentes e padrões empregados neste trabalho, equipamentos de proteção individual (avental, óculos, luvas e máscara) e capela de exaustão química foram utilizados durante a realização das análises. Boas práticas de laboratório foram seguidas (RODRIGUES e ROSSI, 2007).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram feitas em triplicata. Para avaliação dos diferentes tempos para alterações na metodologia foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Duncan a 5% de probabilidade quando necessário. Para curva analítica foi utilizada regressão linear (TRIOLA, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. COMPARAÇÃO DE DUAS POSSIBILIDADES PARA ANÁLISE DO CARBAMATO DE ETILA EM AGUARDENTE DE CANA, COM E SEM O USO DO PADRÃO INTERNO DEUTERADO

A curva analítica sem adição do padrão interno foi construída conforme metodologia para verificação dos parâmetros da validação (Figura V.1), obtendo-se uma correlação de 0,8849. A presença de *outliers* foi avaliada pelo teste de Jackknife e estes foram eliminados.

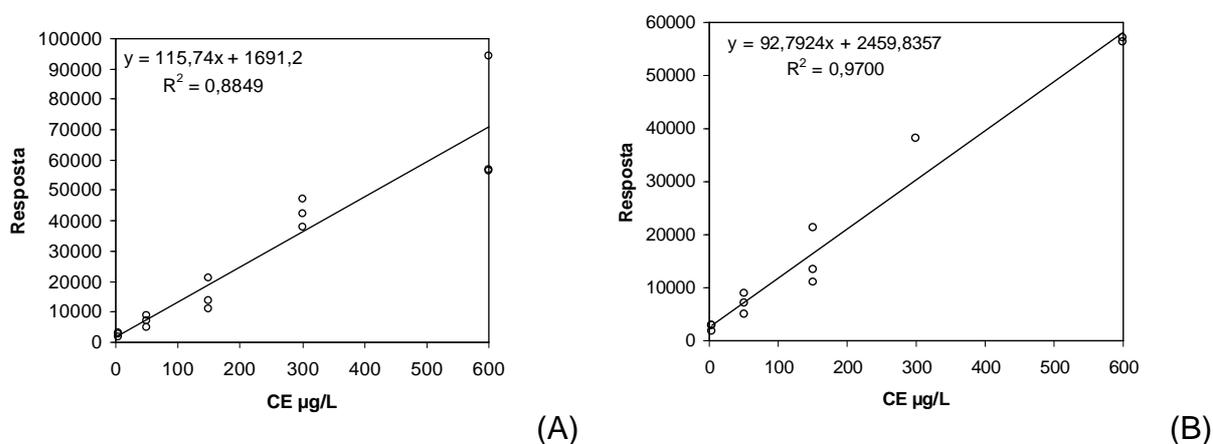


Figura V.1. Curva analítica, equação da reta e R^2 para análise do carbamato de etila em etanol 40% antes (A) e depois (B) de retirar os *outliers*, sem adição de padrão interno.

As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são homoscedásticos e independentes, foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego adequado da análise de variância sem ponderações para estimativa da significância da regressão e do desvio da linearidade. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$).

A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo homoscedasticidade. Autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ($p > 0,10$), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) determinaram linearidade na faixa de 5 a 600 µg/L para o carbamato de etila em aguardente de cana pelo método de CG-EM.

A curva analítica com a adição do padrão interno foi construída conforme metodologia para verificação dos parâmetros da validação (Figura V.2), com resultado de correlação de 0,9930. A presença de outliers foi avaliada pelo teste de Jackknife e eliminados.

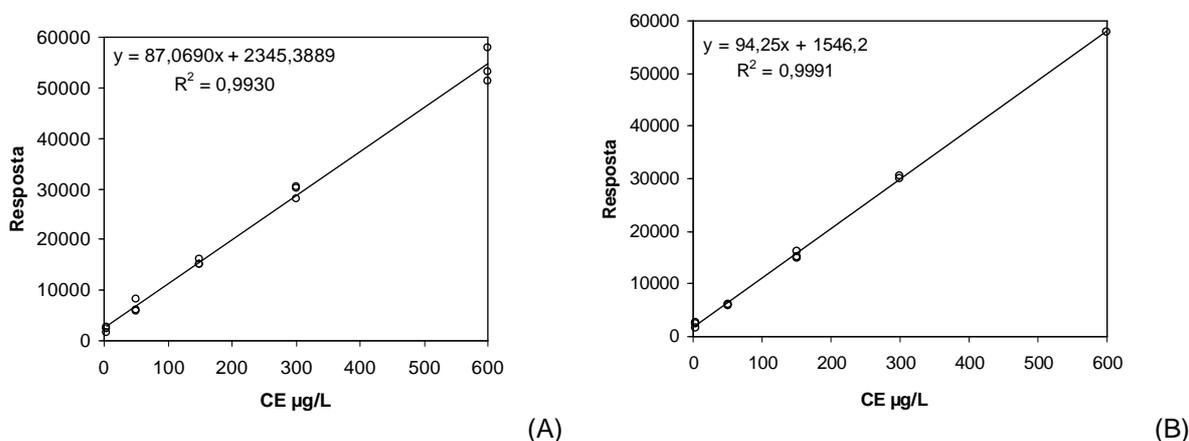


Figura V.2. Curva analítica, equação da reta e R^2 para análise do carbamato de etila em solução de etanol 40% antes (A) e depois (B) de retirar os *outliers*, com adição de padrão interno.

As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são homoscedásticos e independentes, foram confirmadas garantindo a aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego adequado da análise de variância sem ponderações para estimativa da significância da regressão e do desvio da linearidade. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$). A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo homoscedasticidade. Autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ($p > 0,10$), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) determinaram linearidade na faixa de 5 a 600 µg/L para o carbamato de etila em aguardente de cana pelo método de CG-EM.

Os erros de volume de injeção foram eliminados ao adicionar o padrão interno. Conforme indicado na Figura V.3A., as três primeiras áreas são de padrão interno e as três seguintes são do carbamato de etila, sendo a linha preta na concentração de 5 µg/L, a rosa de 150 µg/L e a azul de 600 µg/L.

A resposta do cromatograma foi apresentada em m/z 64 (padrão interno – carbamato de etila deuterado); m/z 62 (carbamato de etila) e o somatório das duas (TIC). Na figura V.3B são representados respectivamente pelas cores rosa, azul e preto.

Mesmo o equipamento sendo muito específico, na matriz aguardente de cana foram observados outros picos em m/z 62 e 64, contudo, estes apresentaram tempos de retenção distintos, não interferindo na análise (Figura V.4).

São poucos os dados disponíveis na literatura sobre carbamato de etila em aguardente de cana. BOSCOLO et al. (2000) e ANDRADE SOBRINHO et al. (2002 e 2009) indicaram não utilizar padrão interno em suas análises, justificando a seletividade do método. No trabalho de LABANCA et al. (2008), foi utilizado o carbamato de metila. BRUNO et al. (2007), YONAMINE et al. (2000) e NAGATO (1995) utilizaram o n-propila como padrão interno em análise de carbamato de etila em aguardente de cana.

Recentemente, um procedimento de microextração, seguido pela detecção por GC-EM-EM, usando o padrão interno deuterado, foi feito para quantificar o carbamato de etila em amostras de brandies de frutas. A seleção deste padrão interno levou em consideração a estabilidade nas condições de análise, a eluição da coluna adequadamente separado de todos os componentes da amostra e o mais próximo possível dos analitos de interesse. Esses requisitos têm levado à utilização de isótopo deuterado do carbamato de etila como padrão interno (LACHENMEIER et al., 2006).

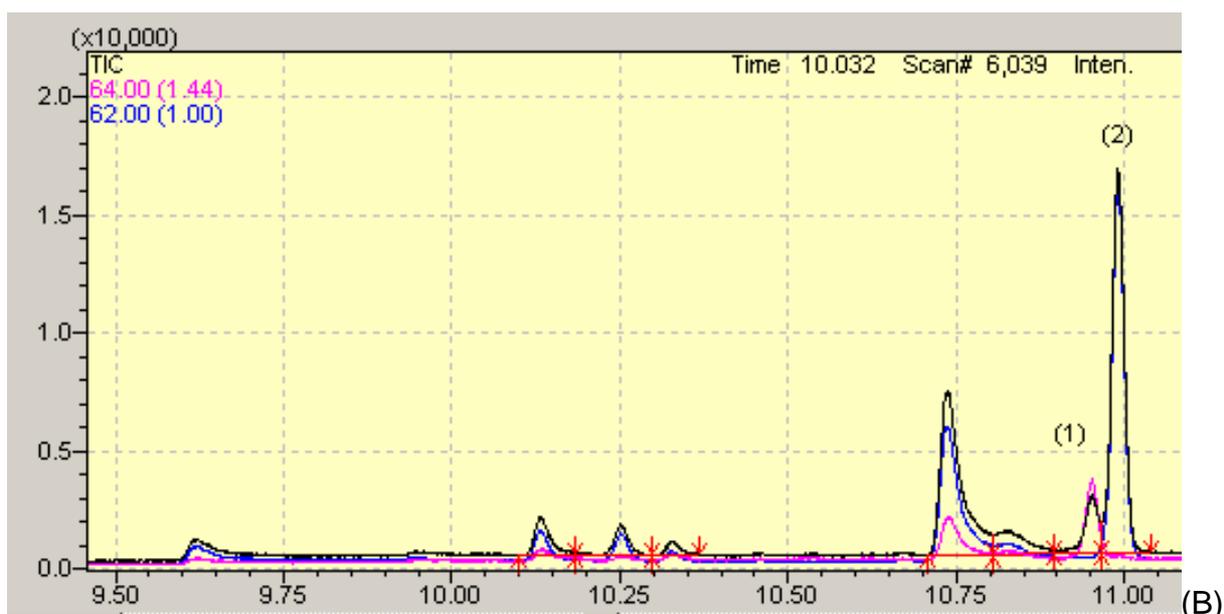
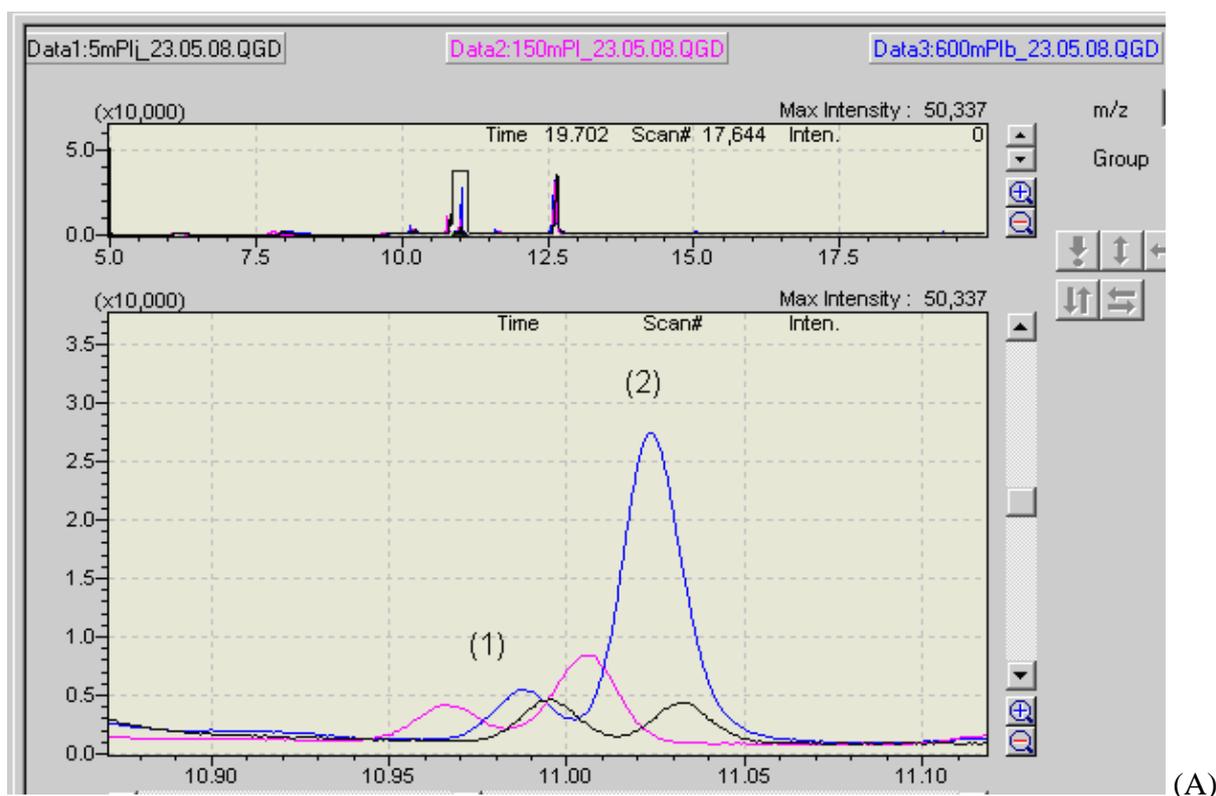


Figura V.3. Perfil cromatográfico de carbamato de etila em amostra de aguardente, as três primeiras áreas são do padrão interno de CE deuterado (1) e as três outras são de 5; 150 e 600 µg/L de CE (2); preto, rosa e azul, consecutivamente (A - expandido; B - normal) (GC-EM - Injeção manual, temperatura do injetor de 250 °C e temperatura da interface de 230 °C. Programação da temperatura do forno de 90 °C (2 min), elevada a 10 °C/min até 150 °C (0 min), e elevada a 40 °C/min até 230 °C (10 min), coluna HP-FFAP (50 m, 0,25 mm e 0,25 µm); recoberta filme polar de PEG esterificado (0,3 µm espessura). Volume de injeção foi de 1,0 µL no modo *splitless* com o tempo de abertura da válvula de purga de 60 segundos. Fluxo do gás de arraste, Hélio, a 1,5 mL/min; íon monitorado m/z 62).

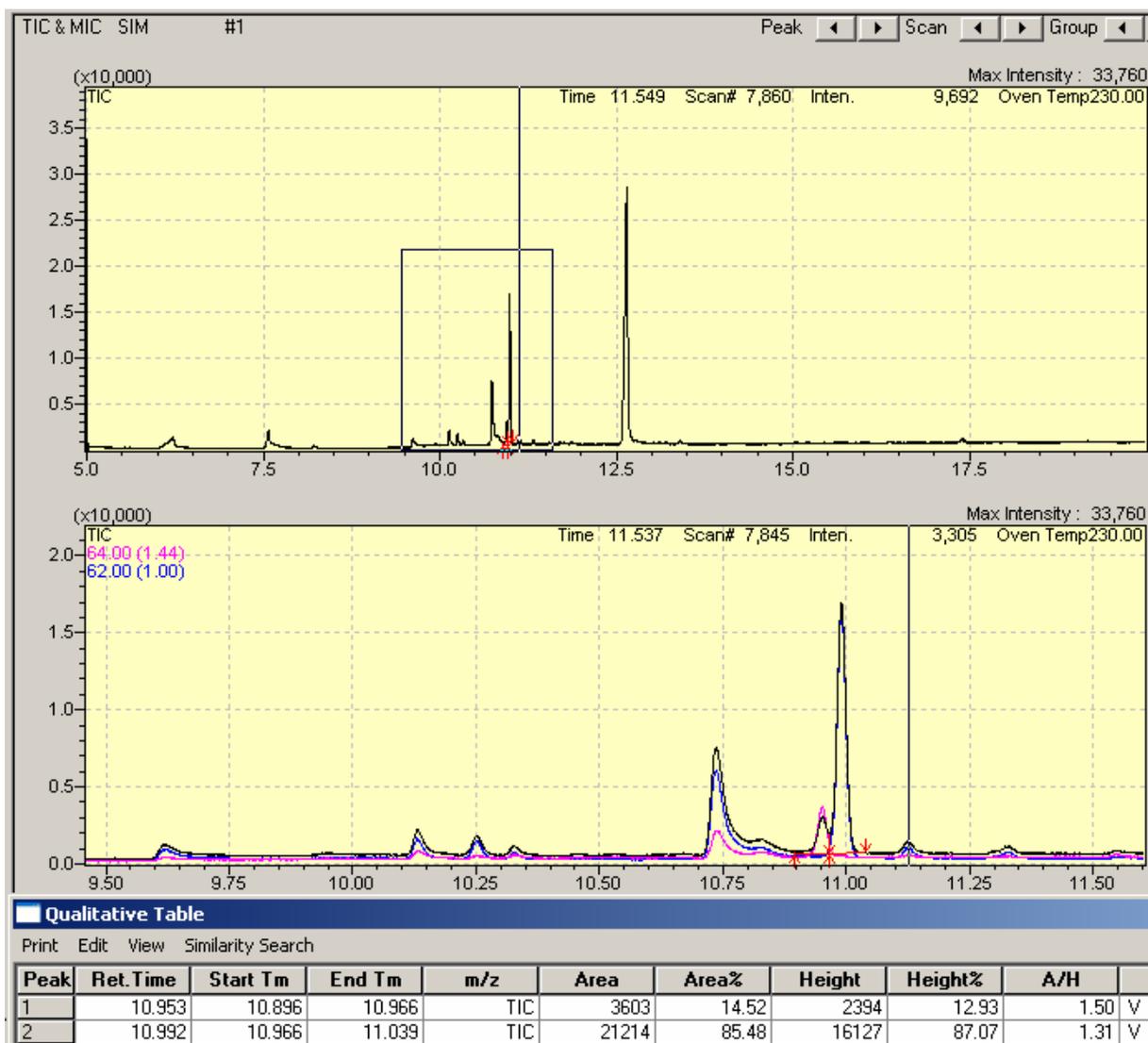


Figura V.4. Cromatograma de carbamato de etila e carbamato de etila deuterado em amostra de aguardente de cana (GC-EM - Injeção manual, temperatura do injetor de 250 °C e temperatura da interface de 230 °C. Programação da temperatura do forno de 90 °C (2 min), elevada a 10 °C/min até 150 °C (0 min), e elevada a 40 °C/min até 230 °C (10 min), coluna HP-FFAP (50 m, 0,25 mm e 0,25 µm); recoberta filme polar de PEG esterificado (0,3 µm espessura). Volume de injeção foi de 1,0 µL no modo *splitless* com o tempo de abertura da válvula de purga de 60 segundos. Fluxo do gás de arraste, hélio, a 1,5 mL/min; íon monitorado m/z 62).

O método para determinação de carbamato de etila por GC-EM utilizando ou não o padrão interno carbamato de etila deuterado foram comparados quanto a linearidade. Foi possível concluir que mesmo sem o padrão interno, o método demonstrou linearidade, apesar de apresentar um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9700$) menor que o coeficiente de determinação da curva utilizando o padrão interno ($R^2 = 0,9991$).

No presente trabalho, a utilização de padrão interno deuterado possibilitou a obtenção de excelentes coeficientes de determinação, mas com ou sem padrão interno, as duas curvas apresentaram linearidade. Principalmente quando se utiliza injeção manual ao invés de auto-injetor, a análise fica mais susceptível a erros, justificando o uso

do padrão interno já que este ajuda a corrigir as diferenças de volumes injetados de uma amostra para outra.

4. CONCLUSÕES

O uso do carbamato de etila deuterado como padrão interno para análise de carbamato de etila em aguardente de cana é indicado, já que os ajustes dos pontos a curva são melhores, principalmente em injeções manuais, onde o volume injetado tem uma variação maior, comparado ao injetor automático.

CAPÍTULO VI.

TEORES DE CARBAMATO DE ETILA, COBRE, CIANETO, UREIA,
ACIDEZ E GRADUAÇÃO ALCOÓLICA EM AGUARDENTES DE
CANA AO LONGO DO PROCESSO DE DESTILAÇÃO

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar os teores de carbamato de etila, cobre, cianeto, ureia, acidez e o grau alcoólico durante o processo de destilação de aguardentes de cana artesanais e correlacioná-los.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Amostras

Amostras de cabeça, cauda e coração de um alambique artesanal situado em Vianópolis, Minas Gerais foram coletadas *in loco* em recipientes de vidro de primeiro uso. As amostras foram coletadas a cada trinta minutos, ao longo do processo de destilação. em junho de 2009. O processo foi repetido novamente e nova coleta foi feita.

2.1.2 Reagentes e padrões

A maioria dos reagentes utilizados eram de grau de analítico, exceto os utilizados na cromatografia gasosa, que eram de grau cromatográfico. Carbamato de etila (CE), carbamato de etila deuterado (d5), ureia, cianeto, cloramina-T e ácido 1,3-dimetilbarbitúrico foram adquiridos da Sigma (St Louis, MO, EUA). Cobre foi adquirido da Merck (Darmstad, Alemanha).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Coleta das amostras de aguardente de cana

O alambique utilizado era simples e de cobre (Tabela VI.1). O vinho preparado no próprio local foi colocado, em sistema de batelada, diretamente na dorna de cobre. Este foi aquecido a 70 °C, por aquecimento a vapor. As amostras de destilado foram coletadas diretamente da saída do alambique. Primeiro retirou-se a cabeça, em um volume de 300 mL. O volume seguinte, a ser retirado, foi após 30 minutos e assim consecutivamente, até o término da destilação. No total foram coletadas dez amostras para cada alambique.

Tabela VI.1. Caracterização do alambique utilizado para destilação e produção de aguardente de cana

Características	Especificação
Extração do caldo	engenho simples sem embebição
Tratamento do caldo	filtrado em tela
Leveduras alcoólicas do mosto	origem selecionada propagadas em caldo diluído
Suplementação ao mosto	fubá grosso; farelo de arroz; farelo de soja
Brix do mosto (final)	15
Temperatura de fermentação (°C)	30
Tempo de fermentação (h)	24
Material das dornas	inox
Material do alambique	cobre
Modelo do alambique	simples
Aquecimento do alambique	vapor
Volume de aguardente produzido por batelada (L)	230
Tempo de destilação, considerando só o coração (h)	4
Volume/tempo de destilação (L/h)	57,5
Temperatura de saída da aguardente de cana (°C)	23 ± 1
Tipo de destilação	monodestilação

2.2.2. Caracterização do vinho

Para caracterização do vinho foram feitas as análises de carbamato de etila, cobre, cianeto, ureia, acidez e grau alcoólico. O tempo e a temperatura de fermentação foram registrados, assim como a composição inicial do pé de cuba.

2.2.3. Métodos de análise

2.2.3.1. Determinação do grau alcoólico

As análises do grau alcoólico foram feitas pelo método do picnômetro (AOAC, 1995).

2.2.3.2. Determinação do carbamato de etila

A determinação do carbamato de etila nas aguardentes foi feita em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu, mod. GCMSQP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) sendo utilizadas as condições cromatográficas definidas e validadas por LABANCA et al. (2008) e descritas no capítulo VI. A curva padrão foi feita utilizando soluções nas concentrações de 5,0; 50,0; 150,0; 300,0 e 600,0 µg/L em solução alcoólica a 40%. A curva de calibração foi construída, utilizando-se a resposta (área) de cada ponto com suas respectivas concentrações. O padrão interno (CE deuterado) foi adicionado em todos os pontos na concentração de 10,0 µg/L.

2.2.3.3. Determinação de cobre

As análises de cobre foram feitas por absorção atômica por chama utilizando-se o espectrômetro ACC modelo AA100 (Perkin Elmer, Uberlingen, Alemanha), sendo utilizadas as condições definidas e validadas no capítulo III.

2.2.3.4. Determinação de ureia

As análises de ureia foram feitas a 540 nm em espectrofotômetro UV modelo 8451A da Perkin Elmer (Uberlingen, Alemanha) conforme metodologia definida e validada no capítulo I.

2.2.3.5. Determinação de cianeto

As análises de cianeto foram feitas a 578 nm em espectrofotômetro UV modelo 8451A da Perkin Elmer (Uberlingen, Alemanha), conforme metodologia definida e validada no capítulo II.

2.2.3.6. Determinação da acidez

As análises de acidez foram feitas pelo método titulométrico (IAL, 2004).

2.2.4. Influência do tempo de destilação na concentração de CE, cobre, cianeto, acidez e ureia

Após análise de CE, cobre, cianeto, ureia e acidez, foram construídos gráficos correlacionando tempo x analito.

2.2.5. Correlação dos analitos pesquisados

Para avaliação das correlações entre o carbamato de etila, cobre, ureia, cianeto, grau alcoólico e acidez, foi utilizado o estudo de correlação de Pearson para dados paramétricos e o teste de hipótese F, que foi utilizado para saber se a correlação é devida aos dois parâmetros X e Y ou se estão relacionados com outros parâmetros (TRIOLA, 2005).

2.3. CUIDADOS

Devido às características de toxicidade dos reagentes e padrões empregados, equipamentos de proteção individual (avental, óculos, luvas e máscara) e capela de

exaustão química foram utilizados durante a realização das análises. Boas práticas de laboratório foram seguidas (RODRIGUES & ROSSI, 2007).

2.4. ANALISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Para a curva analítica foi utilizado regressão linear (TRIOLA, 2005). Para avaliação das correlações foi utilizado o estudo de correlação de Pearson para dados paramétricos e o teste de hipótese F, utilizado para saber se a correlação é devida aos dois parâmetros X e Y ou se estão relacionados com outros parâmetros (TRIOLA, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO VINHO

Os resultados da caracterização do vinho estão na tabela VI.2. O CE estava acima do teor máximo permitido (150 µg/L) em aguardente de cana. Há relatos de CE em bebidas fermentadas como o vinho de uva. No Canadá, para vinho de mesa, o valor máximo permitido de CE é de 30 µg/L. No Brasil, ainda não existe legislação para esta bebida. Cobre foi quantificado em teores abaixo de 0,22 mg/L. Cianeto e uréia estavam presentes em quantidades significativas (0,58 e 5,14 mg/L, respectivamente), comparadas aos teores encontrados na aguardente de cana. O grau alcoólico era de 20,5 °GL e não foram detectados açúcares.

Tabela VI.2. Caracterização do vinho utilizado para destilação e produção de aguardente de cana

Composição	Valores
CE (µg/L)	300,7 ± 0,8
Cu (mg/L)	0,22 ± 0,01
CN (µg/L)	583 ± 57
Ureia (mg/L)	5,14 ± 0,08
Grau alcoólico (°GL)	20,5 ± 0,7

3.2. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE DESTILAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE CE, COBRE, CIANETO, ACIDEZ E UREIA

3.2.1. Grau Alcoólico

Na figura VI.1 estão apresentados os resultados do grau alcoólico versus tempo, permitindo uma melhor visualização da variação do grau alcoólico ao longo dos 270 minutos de destilação da aguardente de cana. Observou-se uma correlação negativa (5% de confiança), conforme esperado, inicialmente o grau alcoólico era alto, com redução ao longo da destilação.

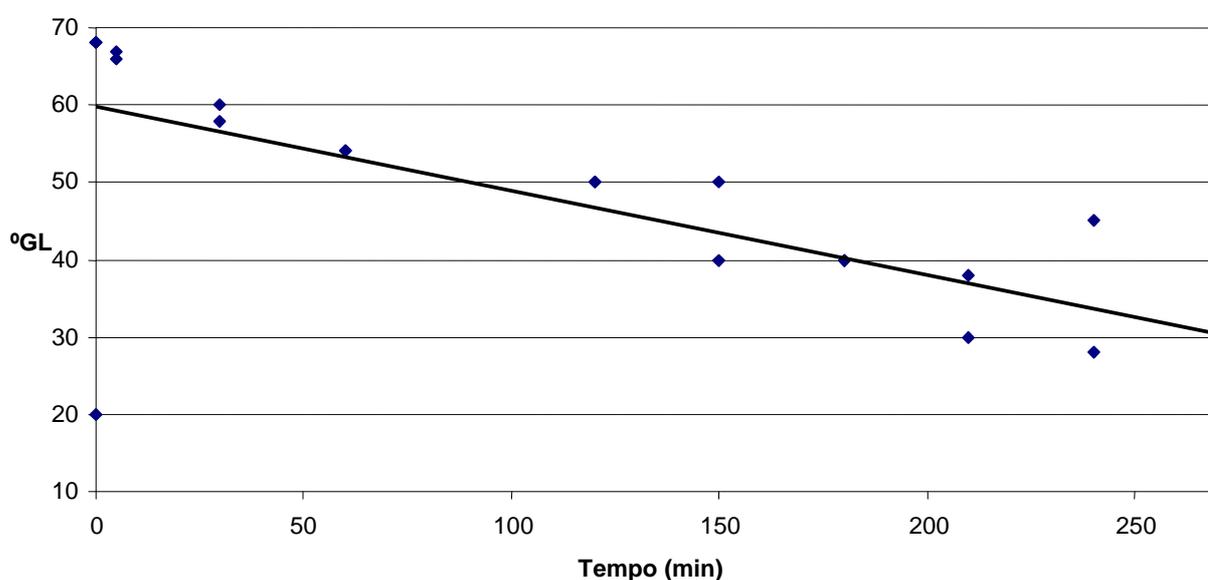


Figura VI.1. Correlação entre grau alcoólico e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre.

3.2.2. Carbamato de etila

Na figura V.II.2 estão apresentados os resultados do carbamato de etila versus tempo, permitindo uma melhor visualização do teor de CE ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana. Não se observou uma correlação linear (5% de confiança) ao longo da destilação.

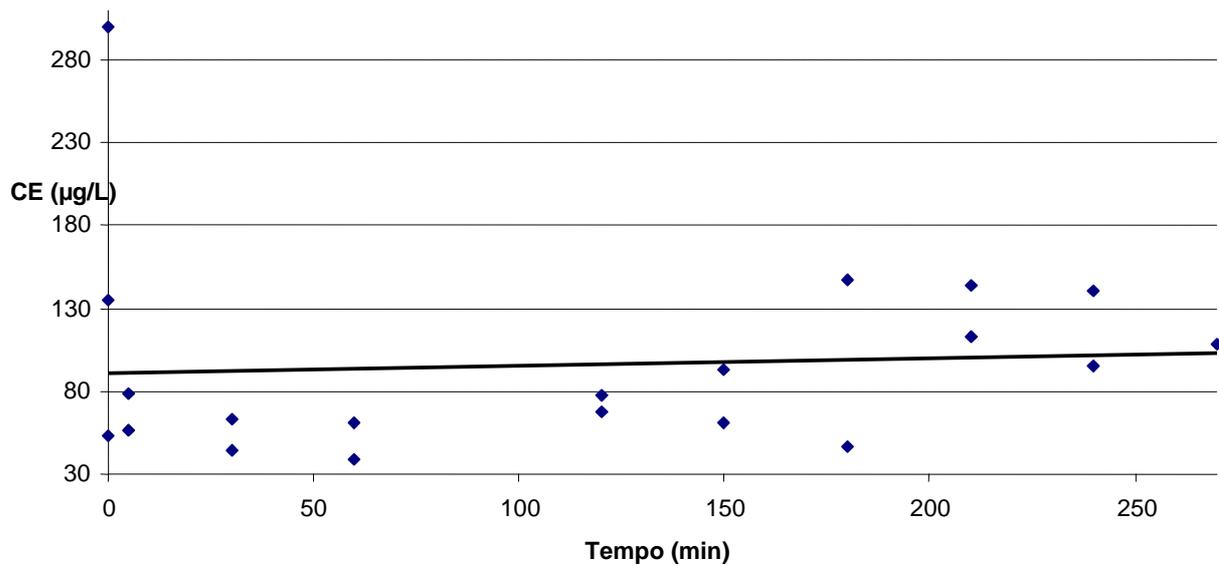


Figura VI.2. Correlação do teor de carbamato de etila (CE) e tempo, ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre.

3.2.3. Cobre

Na figura V.II.3 estão apresentados os resultados dos teores de cobre versus tempo, permitindo uma melhor visualização ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana. Observou-se uma correlação positiva (5% de confiança), conforme esperado, inicialmente o teor de cobre é menor, com aumento ao longo da destilação.

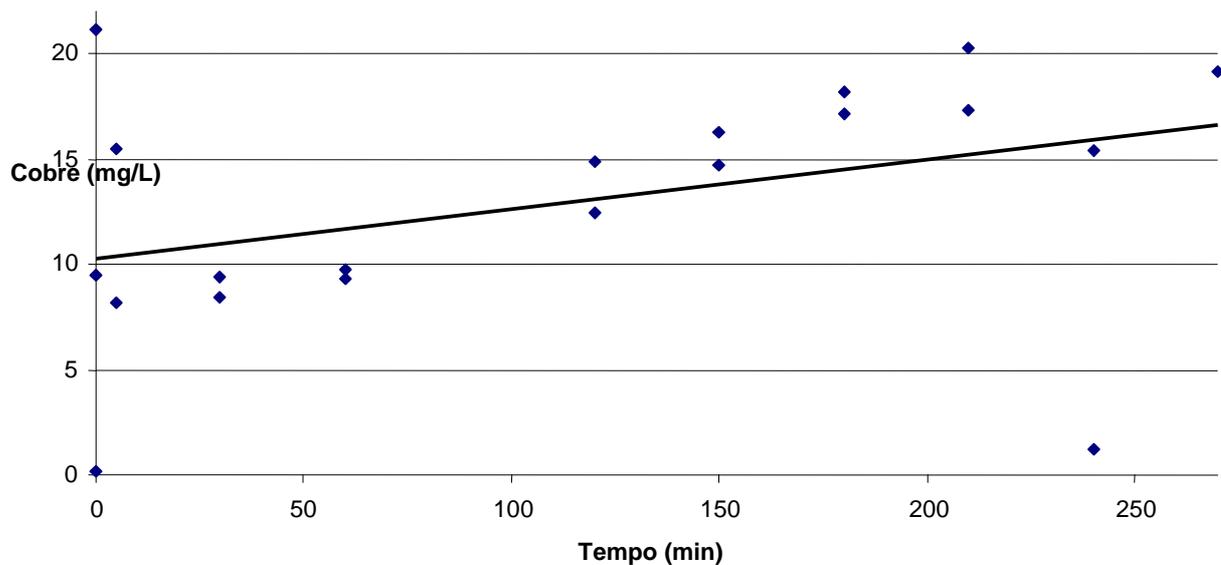


Figura VI.3. Correlação dos teores de cobre e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre.

No presente estudo, o teor de cobre das amostras (12,9 mg/L) apresentaram valores acima do permitido pela legislação brasileira (5 mg/L). As amostras foram destiladas em alambique de cobre e duas hipóteses poderiam explicar tal contaminação. A primeira seria a presença de azinhavre na parede interna do alambique de cobre, uma vez que o aparelho apresentava pontos de difícil acesso para limpeza. A outra hipótese seria a remoção ineficiente da fração cauda durante o processo de destilação anterior. Chama a atenção o fato dos destilados passarem por um filtro de troca iônica e um filtro de carvão ativado ao final do processo, posterior a coleta, apresentando redução nos teores de cobre para 1,2 mg/L.

3.2.4. Ureia

Na figura V.II.4 estão apresentados os resultados de ureia versus tempo, permitindo uma melhor visualização ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana. Não se observou uma correlação linear (5% de confiança) ao longo da destilação.

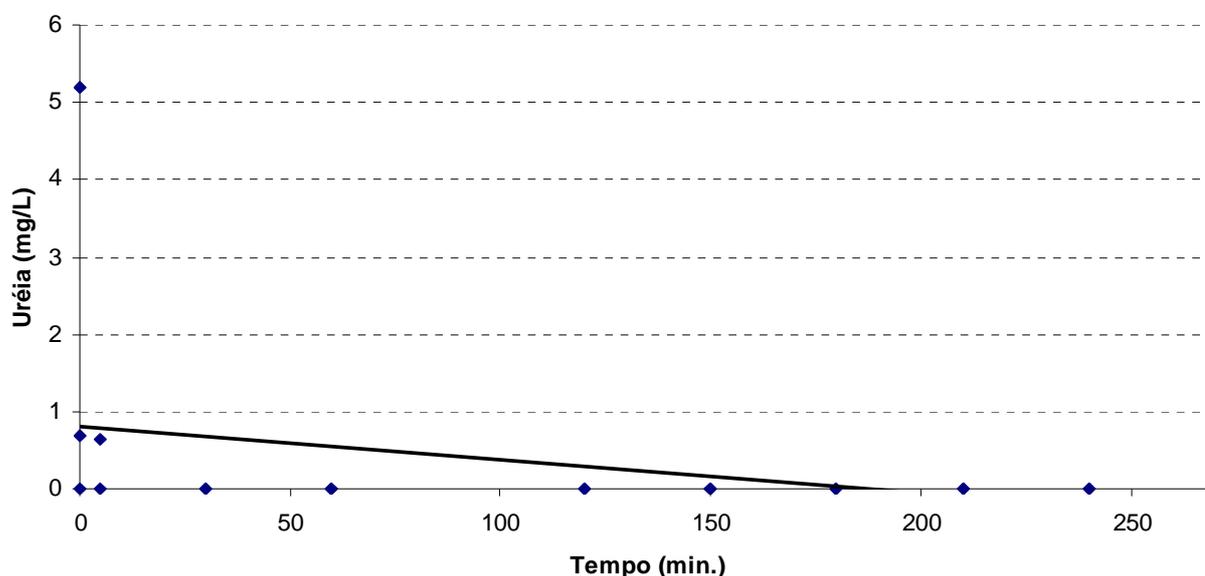


Figura VI.4. Correlação dos teores de ureia e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre.

3.2.5. Cianeto

Na figura V.II.5 estão apresentados os resultados de cianeto versus tempo, permitindo uma melhor visualização ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana. Não se observou uma correlação linear (5% de confiança) ao longo da destilação.

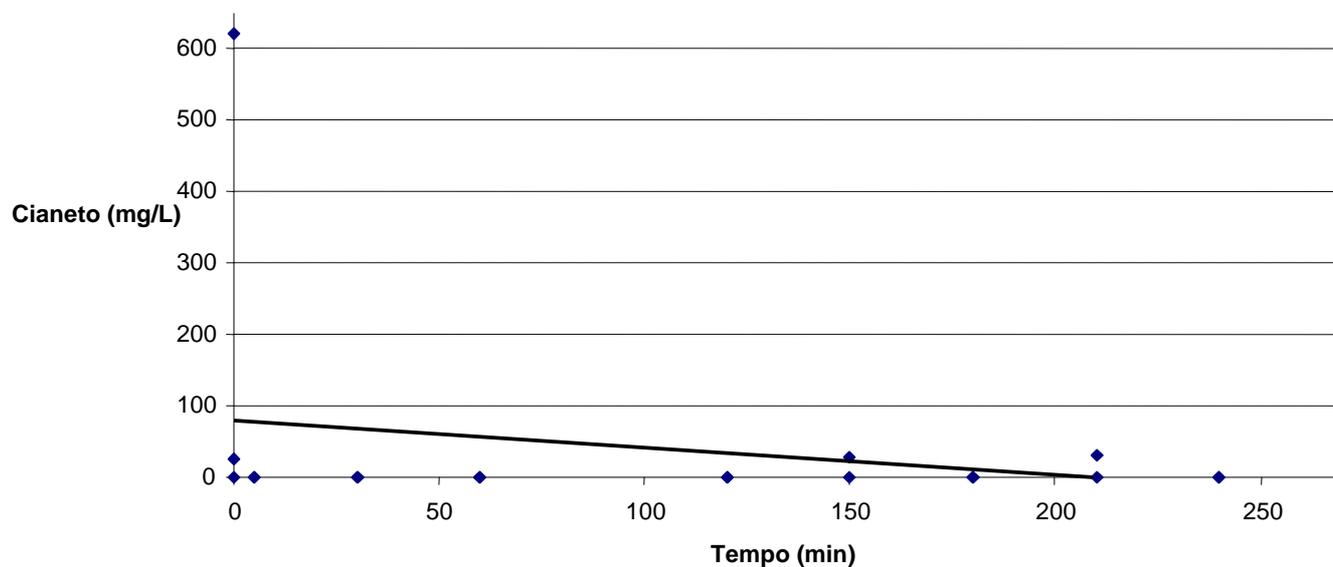


Figura VI.5. Correlação do cianeto com tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre.

3.2.6. Acidez

Na figura V.II.6. estão apresentados os resultados de acidez versus tempo, permitindo uma melhor visualização ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana. Não se observou uma correlação (5% de confiança) ao longo da destilação.

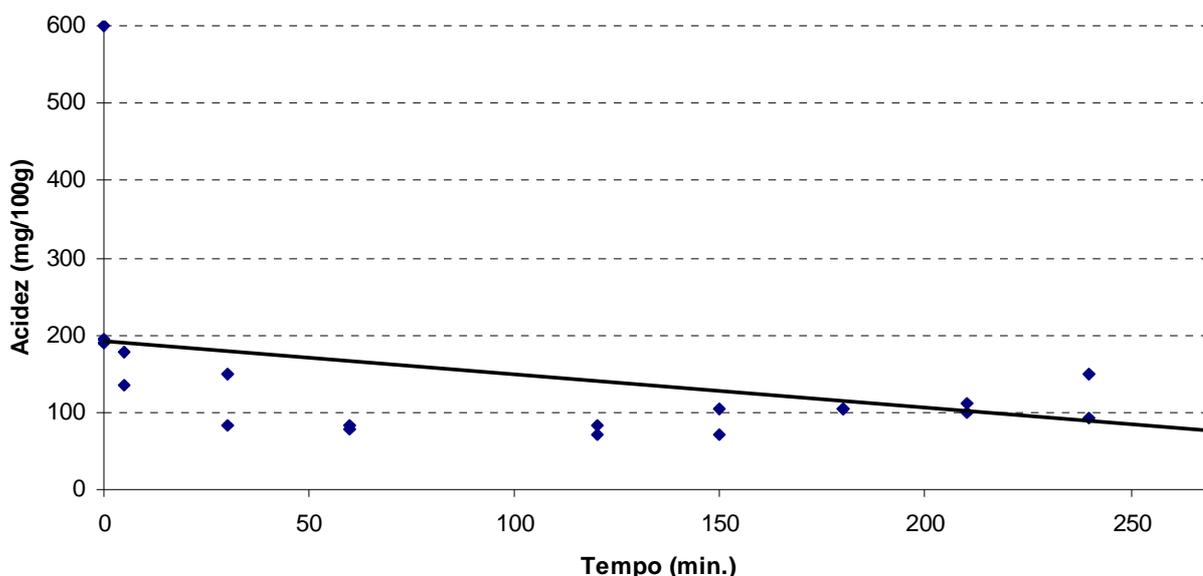


Figura VI.6. Correlação da acidez e tempo ao longo de 270 minutos de destilação da aguardente de cana em alambique artesanal de cobre.

3.3. CORRELAÇÃO DOS ANALITOS PESQUISADOS

Correlações negativas substanciais (0,50 - 0,69) foram encontradas entre carbamato de etila e o grau alcoólico e o tempo de destilação e o grau alcoólico (Tabelas VI.3 e Figura VI.7).

Os resultados das análises (Tabela VI.3) demonstraram que ocorreu correlação positiva muito forte em seis verificações. A mais acentuada foi do cianeto com a ureia, seguido da ureia com acidez e do cianeto com a acidez. O carbamato de etila apresentou correlação mais forte com o cianeto (Figura VI.8). Resultados semelhantes foram obtidos por AYLOTT (1990) para uísque e por ARESTA e colaboradores (2001) e BOSCOLO (2002) em aguardente de cana.

Em estudo recente (ANDRADE-SOBRINHO, 2009), não se observou correlação entre os teores de cobre e de carbamato de etila, tanto para as amostras de aguardente de cana como para as amostras de aguardente de mandioca. Provavelmente a ausência de correlação entre os teores de íons de cobre e carbamato de etila na aguardente de cana em aguardente de mandioca deva-se ao fato de que estas análises foram efetuadas em amostras já estabilizadas. Assim, há a necessidade de monitorar os teores destes precursores em amostras recém destiladas.

A acidez correlacionou de forma significativa com cianeto, ureia e carbamato de etila (Tabela VI.3 e Figura VI.7). O pH e o conteúdo em etanol (RIFFKIN et al.,1989;

ARESTA et al., 2001), também são citados na literatura como contribuintes para a formação do carbamato de etila em destilados.

Tabela VI.3. Coeficientes de correlação calculados pelo teste de Pearson para analitos de amostras de aguardente de cana durante o processo de destilação

	Tempo (min)	CE (µg/L)	CN (µg/L)	Ureia (mg/L)	Cu (mg/L)	Acidez (mg/100 g)
CE (µg/L)	0,0728	1				
CN (µg/L)	-0,2517	0,8117	1			
Ureia (mg/L)	-0,3524	0,7622	0,9837	1		
Cu (mg/L)	0,3771	-0,3737	-0,4690	-0,4929	1	
Acidez (mg/100 g)	-0,3509	0,7813	0,9399	0,9457	-0,4037	1
°GL	-0,6953	-0,5787	-0,4653	-0,3537	-0,0949	-0,3335

Valores em negrito representam alta correlação.

CN= cianeto; CE= carbamato de etila; Cu= cobre; °GL= grau alcoólico

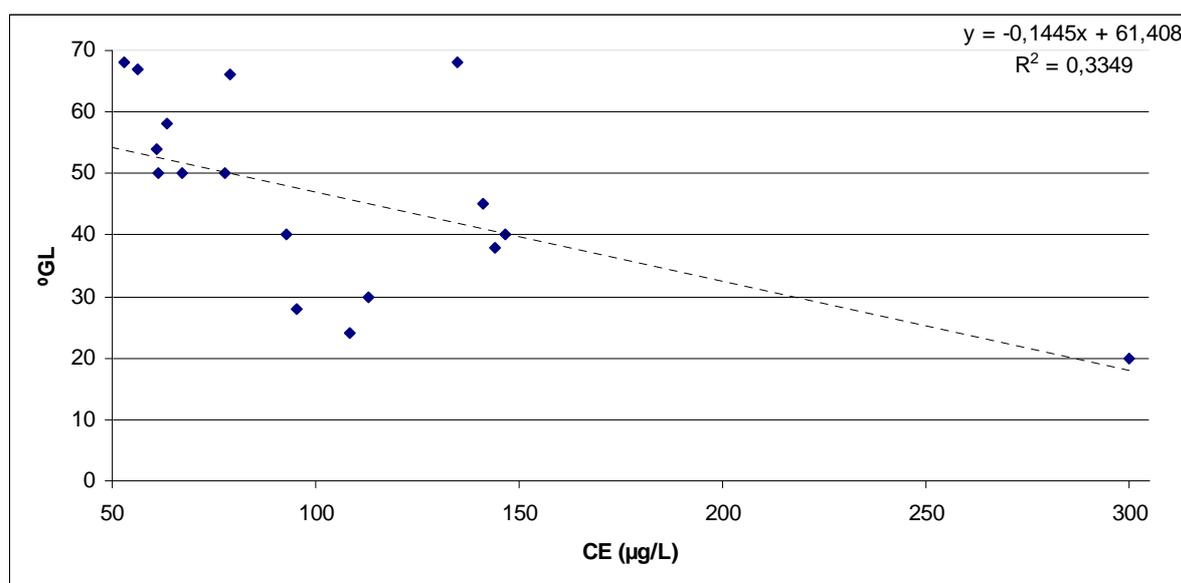


Figura VI.8. Correlação negativa entre o CE e grau alcoólico quantificados na aguardente de cana, equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação (R^2).

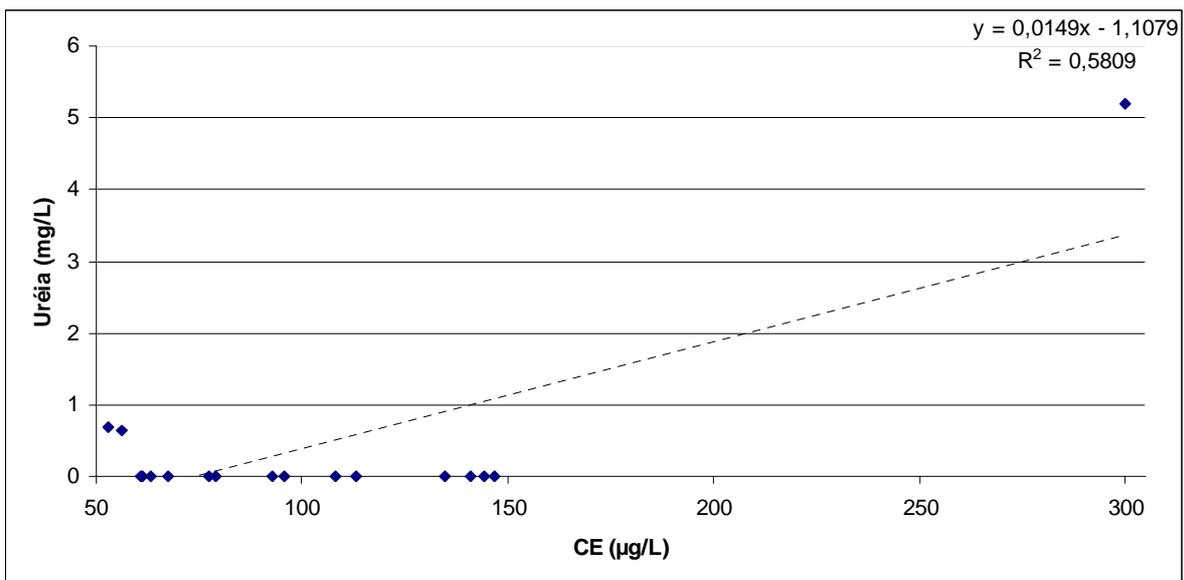
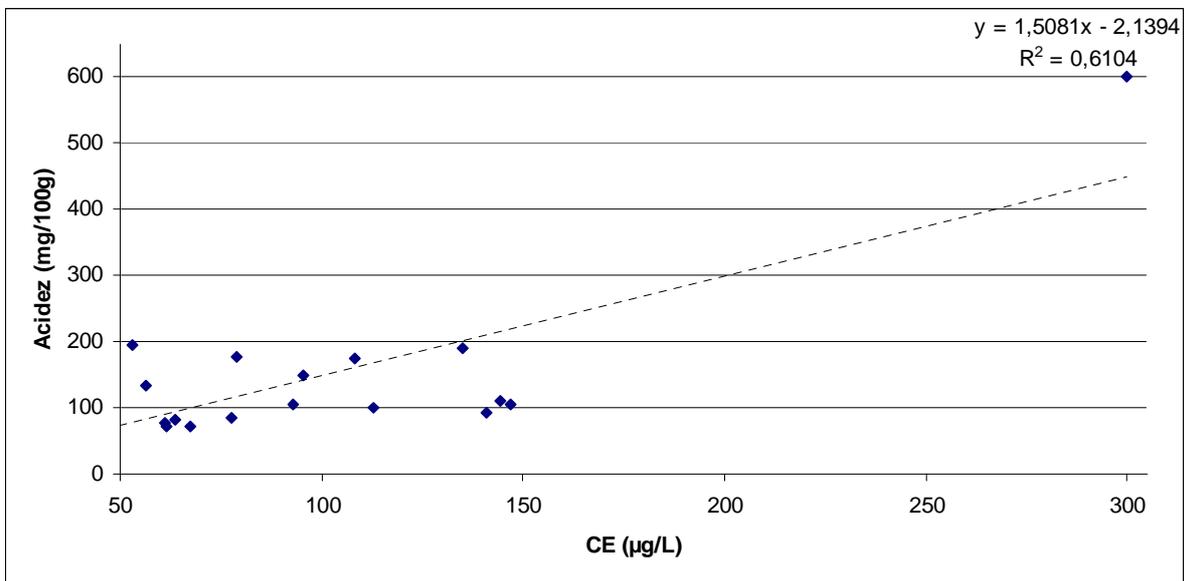
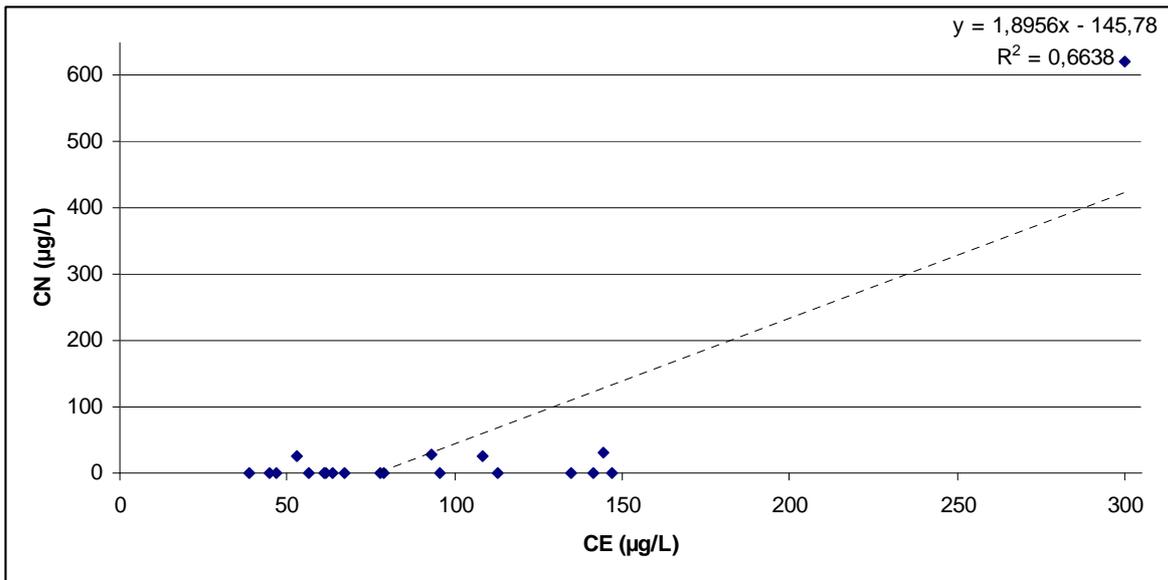


Figura VI.7. Correlação positiva entre CE e os parâmetros quantificados na aguardente de cana, equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação (R^2).

4. CONCLUSÕES

O carbamato de etila apresentou correlação positiva significativa com os seus precursores, cianeto e ureia. Correlação também foi observada entre o carbamato de etila e acidez. O carbamato de etila apresentou correlação negativa substancial com o grau alcoólico. Desta forma, as análises de cianeto e ureia poderiam ser utilizadas para prever os teores de carbamato de etila presente em amostras de aguardente de cana.

CAPÍTULO VII.

INFLUÊNCIA DA FRAÇÃO ALCOÓLICA E DA TEMPERATURA
DE ARMAZENAMENTO NOS TEORES DE CARBAMATO DE
ETILA EM AGUARDENTES DE CANA

1. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da fração alcoólica (cabeça, coração e cauda) e da temperatura de armazenamento (10, 23 e 36 °C) nos teores de carbamato de etila em aguardentes de cana artesanais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Amostras

Amostras de cabeça, cauda e coração de três alambiques artesanais situados em Vianópolis, Itabira e Santo Antônio do Monte, no estado de Minas Gerais foram coletadas *in loco* em recipientes de vidro de primeiro uso. As amostras foram coletadas no período de setembro e outubro de 2007, em três bateladas distintas.

2.1.2. Reagentes e soluções

Carbamato de etila (CE) com 99,0% de pureza e carbamato de etila deuterado (>99,0%) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). A maioria dos reagentes utilizados era de grau analítico, porém, os solventes eram de grau cromatografia.

A solução estoque de CE (200 mg/L) foi preparada por dissolução de 2,00 mg de CE para 10 mL de etanol (40% v/v). A solução intermediária (20 µg/mL) foi obtida por diluição de 1000 µL da solução estoque para 100 mL de etanol (40% v/v). As soluções estoque e intermediária foram armazenadas sob refrigeração a 5 °C e as soluções padrão foram preparadas quando necessário. A curva de calibração foi preparada a partir da solução-estoque do carbamato de etila. Diluições foram feitas a fim de obter cinco concentrações (5,0; 50,0; 150,0; 300,0; e 600,0 µg/L). As diluições foram feitas com solução de etanol 40%. A curva de calibração foi construída, utilizando-se a área de cada ponto com suas concentrações respectivas.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Coleta das amostras de aguardente de cana nos alambiques

O vinho, preparado nas condições típicas de cada produtor, foi colocado, em sistema de batelada, diretamente no alambique de cobre. O alambique foi aquecido de forma a promover a evaporação e posterior resfriamento do destilado. As amostras de destilado foram coletadas diretamente da saída do alambique. Primeiro coletou-se 1000 mL da cabeça (65 °GL). A fração seguinte retirada foi o coração (45 °GL). O volume total coletado foi homogeneizado, coletando-se deste pool uma fração de 1000 mL. Amostras dos últimos 10%, chamados de cauda ou água fraca (25 °GL), foram também coletados.

Em cada alambique, as coletas das diferentes frações - cauda, coração e cabeça - foram feitas em garrafas de primeiro uso. Estas foram levadas ao laboratório, onde foram fracionadas para armazenamento nas temperaturas de 10, 23 e 36 (± 1) °C, conforme tabela VII.1. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro transparente incolor em luz ambiente. Ao final do armazenamento por 260 dias (± 9 meses) as amostras foram analisadas.

Tabela VII.1. Planejamento de coleta das amostras nos alambiques artesanais produtores de aguardente de cana

Experimentos	Variáveis	
	Temperatura (± 2 °C)	Fração alcoólica (± 2 °GL)
1	10	Cabeça (65)
2	10	Coração (45)
3	10	Cauda (25)
4	23	Cabeça (65)
5	23	Coração (45)
6	23	Cauda (25)
7	36	Cabeça (65)
8	36	Coração (45)
9	36	Cauda (25)

2.2.2. Caracterização dos alambiques de aguardente artesanais

As características dos alambiques utilizados neste experimento estão indicadas na tabela VII.2. De um modo geral, estes eram semelhantes: eram em cobre, de um só corpo e o processo era monodestilação. Contudo, o alambique B trabalha com leveduras

selvagens, já os alambiques A e C usam leveduras de origem selecionada. Outro fator importante a ressaltar, é que o alambique B é mais rudimentar e sua produção é menor.

Tabela VII.2. Características gerais da produção da aguardente de cana artesanal nos alambiques selecionados

Características	Alambiques		
	A	B	C
Extração do caldo	engenho simples sem embebição	engenho simples sem embebição	engenho simples sem embebição
Tratamento do caldo	filtrado em tela	filtrado em tela	filtrado em tela
Leveduras alcoólicas do mosto	cepa selecionada propagadas em caldo diluído	selvagem propagadas em caldo diluído	cepa selecionada propagadas em caldo diluído
Suplementação ao mosto	fubá grosso, farelo de arroz, e farelo de soja	milho	farelo de milho
°Brix do vinho	15	16	16
Temperatura de fermentação (°C)	30	32	34 - 35
Tempo de fermentação (h)	24	24	15
Material das dornas	inox	inox	inox
Material do alambique	cobre	cobre	cobre
Modelo do alambique	simples	simples	simples
Aquecimento do alambique	vapor	vapor	fogo direto
Volume de aguardente produzido por batelada (L)	230	80	100
Tempo de destilação, considerando só o coração (h)	3h e 30 min	1h e 20 min	2h
Volume/tempo de destilação (L/h)	65,7	61,5	50
Temperatura da aguardente de cana na saída (°C)	22 - 24	22 - 24	20 - 22
Tipo de destilação	monodestilação	monodestilação	monodestilação

2.2.3. Métodos de análise

2.2.3.1. Determinação dos teores de carbamato de etila

A determinação do carbamato de etila nas aguardentes foi feita por CG-EM tipo quadrupolo modelo QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) sendo utilizadas as condições cromatográficas definidas e validadas por LABANCA et al. (2008) e resumidas na Tabela VII.3.

Para monitoramento foi selecionado o íon de massa 62 m/z para o carbamato de etila e m/z 64 para o carbamato de etila deuterado utilizado como padrão interno.

Tabela VII.3. Condições de análise do carbamato de etila por CG-EM em aguardente de cana

Condições	Valores
temperatura do injetor	250 °C
temperatura da interface	230 °C
temperatura do forno	90 °C (2 min), elevada a 10 °C/min até 150 °C (0 min), e elevada a 40 °C/min até 230 °C (10 min)
Coluna	HP-FFAP (50 m, 0,25 mm e 0,25 µm); recoberta com PEG esterificado (0,3 µm espessura)
volume de injeção	1,0 µL
modo de injeção	<i>splitless</i>
íon de massa	m/z 62
padrão interno	carbamato de etila deuterado (m/z 64)
tempo abertura válvula de purga	60 segundos
fluxo gás de arraste, hélio	1,5 mL/min

2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da influência das condições experimentais (grau alcoólico e temperatura de armazenamento) nos teores de carbamato de etila, foi feito um planejamento fatorial com nove experimentos, conforme descrito na tabela IV.4. Cada ponto representa a relação com a variável temperatura e graduação alcoólica. Os dados foram analisados no Statistic Analysis System (SAS) versão 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A análise de variância foi usada para detectar diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras.

Neste experimento, foram investigados os teores de carbamato de etila em função do grau alcoólico (fator A), com dois níveis, denominados de baixo (-) e alto (+) e temperatura (fator B), também em dois níveis: baixa (-) e alta (+) e o ponto central, conforme indicado na Tabela VII.4. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Tabela VII.4. Planejamento fatorial usado para investigar da formação do carbamato de etila em aguardentes de cana de cada um dos alambiques

Experimentos	Temperaturas ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)		Fração alcoólica ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{GL}$)	
	1	-1	10	-1
2	1	36	-1	Cauda (25)
3	-1	10	1	Cabeça (65)
4	1	36	1	Cabeça (65)
5	-1	10	0	Coração (45)
6	1	36	0	Coração (45)
7	0	23	-1	Cauda (25)
8	0	23	1	Cabeça (65)
9	0	23	0	Coração (45)

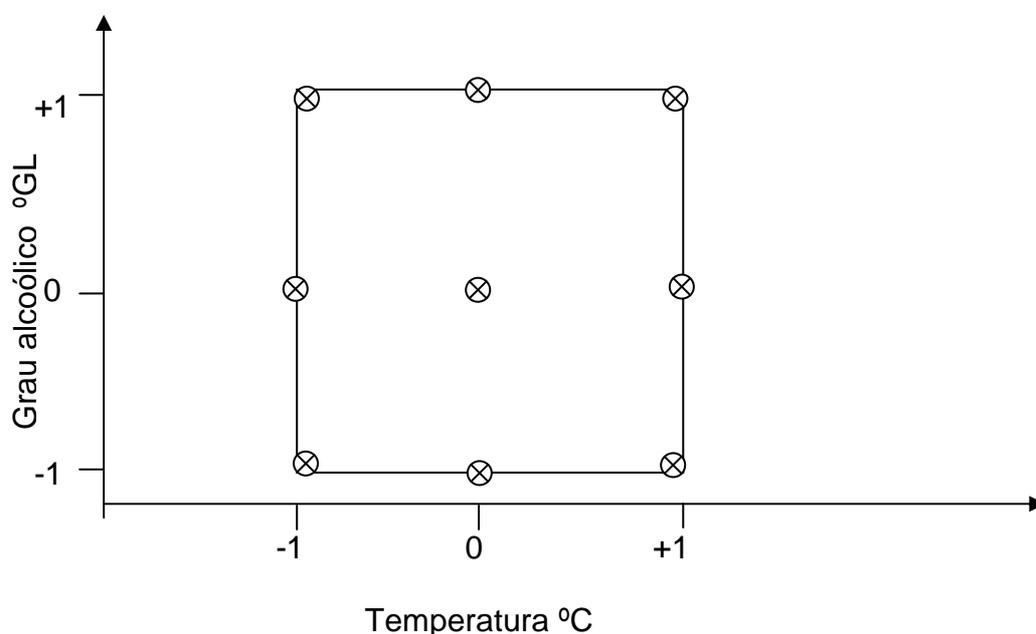


Figura VII.1. Diagrama representando o planejamento fatorial 3², mais o ponto central, totalizando 9 experimentos.

2.4. CUIDADOS

Devido às características de toxicidade dos reagentes e padrões empregados, equipamentos de proteção individual (avental, óculos, luvas e máscara) e capela de exaustão química foram utilizados durante a realização das análises. Boas práticas de laboratório foram seguidas (RODRIGUES & ROSSI, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. INFLUÊNCIA DA FRAÇÃO ALCOÓLICA E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NOS TEORES DE CARBAMATO DE ETILA

Os teores de CE em função da graduação alcoólica e da temperatura de armazenamento estão indicados na tabela VII.5. Os teores médios de CE obtidos foram maiores para o alambique B. Os coeficientes de variação foram altos para os três alambiques, resultados esperados já que houve variação das condições.

Tabela VII.5. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana artesanal produzidas nos diferentes alambiques em função do grau alcoólico na coleta e armazenadas sob diferentes temperaturas por 260 dias

Experimentos	Variáveis			Carbamato de etila (µg/L) / alambique			
	Temperatura (± 2 °C)		Fração (± 2 °GL)	A	B	C	
1	-1	10	-1	Cauda (25)	5,1	40,7	6,2
2	1	36	-1	Cauda (25)	59,5	86,4	161,1
3	-1	10	1	Cabeça (65)	54,0	116,0	29,8
4	1	36	1	Cabeça (65)	91,2	248,0	114,3
5	-1	10	0	Coração (45)	36,4	77,0	79,3
6	1	36	0	Coração (45)	99,6	334,0	171,1
7	0	23	-1	Cauda (25)	27,8	38,2	19,6
8	0	23	1	Cabeça (65)	89,3	196,0	45,3
9	0	23	0	Coração (45)	66,1	157,0	81,9
média					58,8 ^b	143,7 ^a	78,7 ^b
CV					54,0	69,7	76,3

Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (teste de Duncan $p < 0,05$).

3.1.1. Alambique A

Os efeitos das variáveis (temperatura e fração alcoólica) na formação do CE foram obtidos a partir do planejamento fatorial realizado. Os resultados estão sumarizados nas Tabelas VII.6. e VII.7. Valores em negrito foram considerados significativos com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$). Assim, foi significativo o termo linear da temperatura e do grau alcoólico, gerando um modelo ajustado - $\hat{Y} = 69,66 + 25,80 x_1 + 23,68x_2$, sendo x_1 = temperatura e x_2 = grau alcoólico.

Verifica-se que houve diferença significativa (10% de confiança) da fração alcoólica em relação a temperatura para o CE. O aumento da temperatura e da graduação alcoólica causaram um incremento nos teores de CE, indicando que a temperatura e o

grau alcoólico estão relacionados com a formação de CE nas amostras de aguardente de cana analisadas no alambique A (Figura VII.2.).

Tabela VII.6. Coeficientes de regressão para o carbamato de etila versus temperatura de armazenamento e grau alcoólico da aguardente de cana produzida no alambique A

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t crít.	p-valor
Média	69,66	7,19	9,69	0,0023
Temperatura (L)	25,80	3,94	6,55	0,0072
Temperatura (Q)	-3,43	6,82	-0,50	0,6494
Grau alcoólico (L)	23,68	3,94	6,01	0,0092
Grau alcoólico (Q)	-12,88	6,82	-1,89	0,1554
Temperatura x Grau alcoólico	-4,30	4,82	-0,89	0,4383

Os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos a letra Q.

Valores em negrito foram considerados significativos com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$).

Tabela VII.7. ANOVA para o carbamato de etila em aguardente de cana produzida no alambique A

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	7788,7	2	3894,4	83,8	3,46	96,5
Resíduo	279,2	6	46,5			
Total	8067,9	8	1008,5			

3.1.2. Alambique B

Resultados semelhantes ao alambique A foram observados no alambique B (Tabelas VII.8 e VII.9). Valores em negrito foram considerados significativos com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$). Assim, foi significativo o termo linear da temperatura e do grau alcoólico, gerando um modelo ajustado - $\hat{Y} = 176,03 + 72,45 x_1 + 65,78x_2$, sendo $x_1 =$ temperatura e $x_2 =$ grau alcoólico.

Como já foi observado no alambique A, verifica-se que houve diferença significativa (10% de confiança) da fração alcoólica em relação à temperatura de armazenamento para o CE, indicando que estas estão relacionadas com a formação do CE nas amostras de aguardente de cana analisadas no alambique B, igualmente comentado para o alambique A (Figura VII.3).

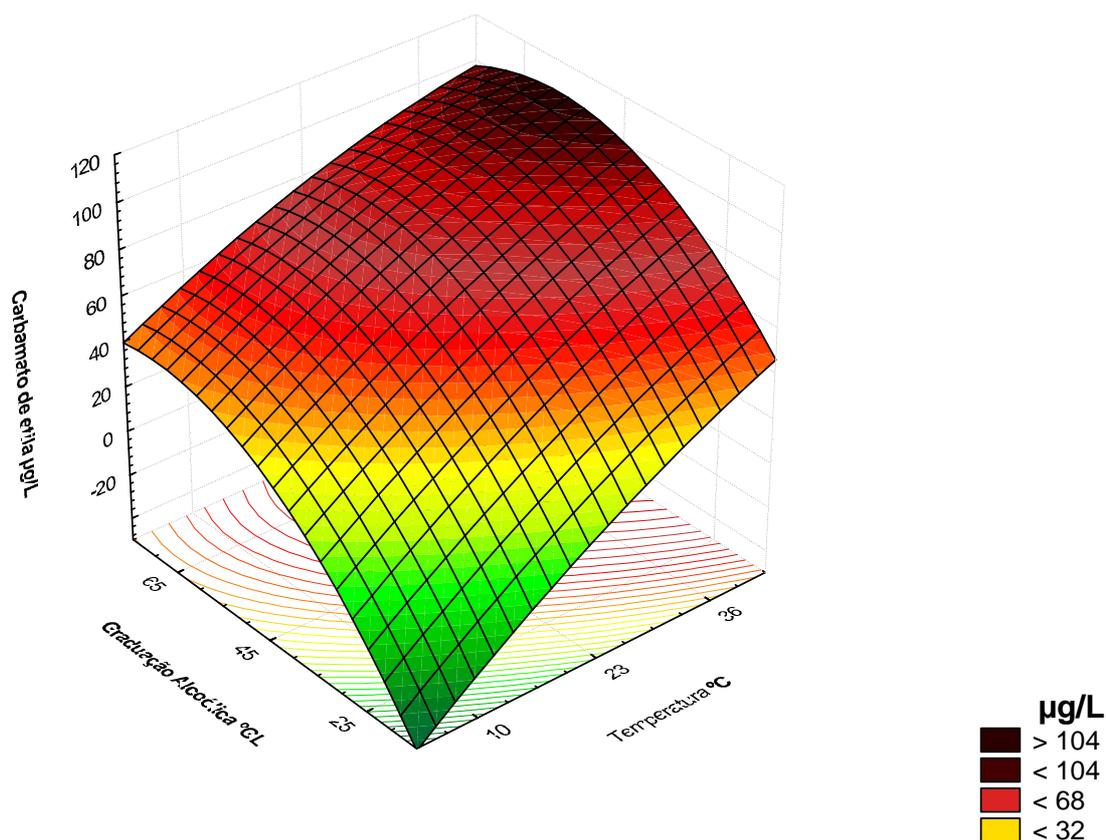


Figura VII.2. Superfície de resposta e curva de contorno do modelo ajustado para o carbamato de etila, relacionando ao grau alcoólico e a temperatura de armazenamento, no alambique A.

Tabela VII.8. Coeficientes de regressão para o carbamato de etila versus temperatura de armazenamento e grau alcoólico da aguardente de cana produzida no alambique B

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t crít.	p-valor
Média	176,03	44,63	3,94	0,0291
Temperatura (L)	72,45	24,45	2,96	0,0594
Temperatura (Q)	19,95	42,34	0,47	0,6697
Grau alcoólico (L)	65,78	24,45	2,69	0,0743
Grau alcoólico (Q)	-68,45	42,34	-1,62	0,2044
Temperatura x Grau alcoólico	21,58	29,94	0,72	0,5232

Os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos a letra Q.

Valores em negrito foram considerados significativos com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$).

Tabela VII.9. ANOVA para o carbamato de etila em aguardente de cana produzida no alambique B

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	69487,4	2	34743,7	19,4	3,46	86,6
Resíduo	10756,1	6	1792,7			
Total	80243,5	8				

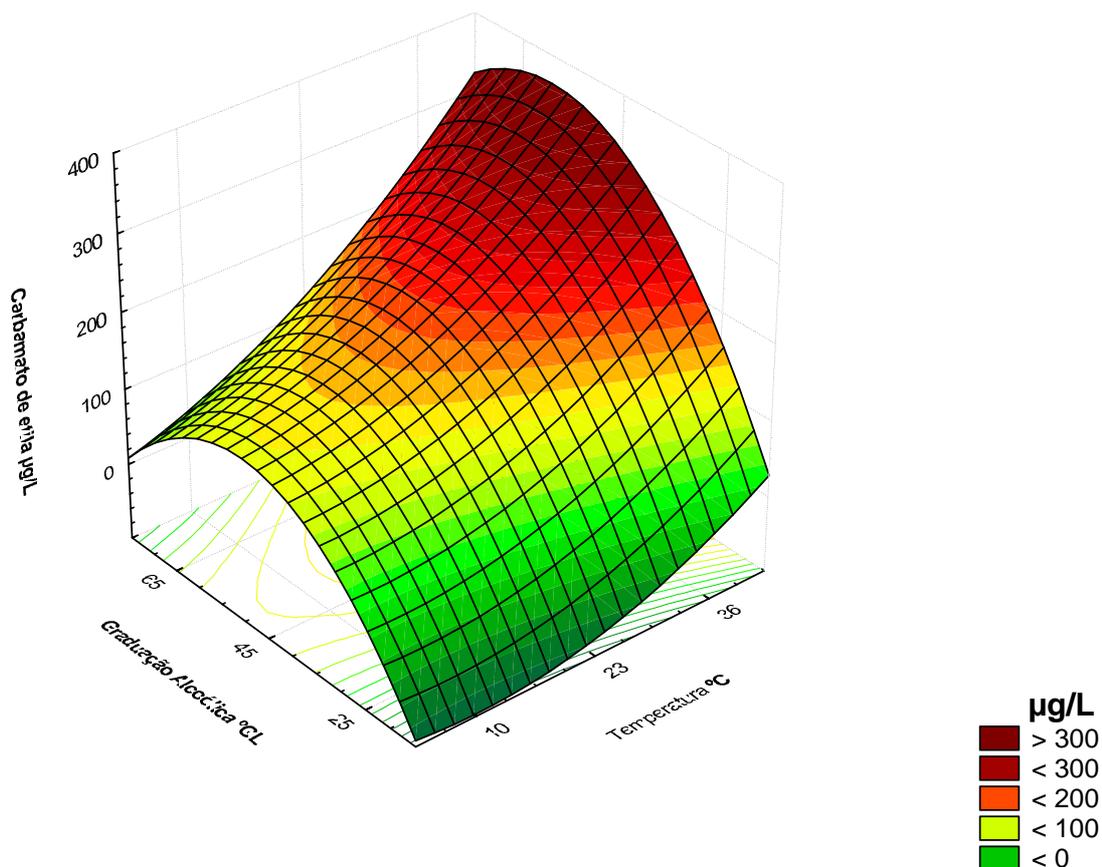


Figura VII.3. Superfície de resposta e curva de contorno do modelo ajustado para o carbamato de etila, relacionando ao grau alcoólico e a temperatura de armazenamento, no alambique B.

3.1.3. Alambique C

Resultados semelhantes aos alambiques A e B foram observados no alambique C em relação a temperatura (Tabelas VII.10. e VII.11.). Valores em negrito conferem valores considerados significativos com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$). Assim, foi significativo o termo linear e quadrático da temperatura. Entretanto, para o grau alcoólico,

somente o termo linear negativo foi significativo, gerando um modelo ajustado - $\hat{Y} = 80,97 + 55,20 x_1 + 44,70x_1^2 - 48,05 x_2^2$, sendo x_1 = temperatura e x_2 = grau alcoólico.

Verifica-se que houve diferença significativa (10% de confiança) da fração alcoólica em relação a temperatura para o CE. O aumento de temperatura de armazenamento causou aumento na formação de CE, como observado nos outros dois alambiques, confirmando que a temperatura está relacionada com a formação de CE nas amostras de aguardente de cana analisadas no alambique C (Figura VII.4.).

Em relação ao grau alcoólico, para o alambique C, foi observado o inverso dos alambiques A e B. Com um aumento da graduação alcoólica, houve uma redução significativa (10% de confiança) nos teores de CE. As características do alambique C diferem apenas em relação à temperatura de fermentação, que era mais alta, comparada a dos alambiques A e B e o fluxo de destilação que foi menor para C. Observa-se também que os teores de CE no alambique C foram menores, o que pode justificar esta correlação inversa. Ao avaliar a figura VII.4., verifica que esta diferença não é tão acentuada.

Tabela VII.10. Coeficientes de regressão para o carbamato de etila versus temperatura de armazenamento e grau alcoólico da aguardente de cana produzida no alambique C

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t Crít.	p-valor
Média	80,97	11,59	6,99	0,0060
Temperatura (L)	55,20	6,35	8,70	0,0032
Temperatura (Q)	44,70	10,99	4,07	0,0268
Grau alcoólico (L)	0,42	6,35	0,07	0,9518
Grau alcoólico (Q)	-48,05	10,99	-4,37	0,0222
Temperatura x Grau alcoólico	-17,60	7,77	-2,26	0,1085

Os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos a letra Q.

Valores em negrito foram considerados significativos com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$).

Tabela VII.11. ANOVA para o carbamato de etila em aguardente de cana produzida no alambique C

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	28136,1	3	9378,7	64,7	3,62	97,5
Resíduo	725,2	5	145,0			
Total	28861,3	8				

Através destes resultados, foi possível verificar que para os três alambiques houve uma resposta semelhante em relação à temperatura de armazenamento, ou seja,

temperaturas elevadas comprometem a qualidade da aguardente de cana em relação à formação do CE. Entretanto, para a graduação alcoólica, verificou-se para os alambiques A e B, uma maior concentração de CE na cabeça, diferindo do alambique C, que apresentou teores menores na fração cabeça.

Foi feito o teste ANOVA (tabelas VII.7, 9 e 11). Como o F calculado foi maior que o F tabelado e o percentual de variação explicado (R^2) foi alto para os três alambiques, pode-se concluir que os modelos se ajustam bem aos dados experimentais.

Com base nos resultados encontrados para os três alambiques é possível recomendar que após a produção da bebida, esta deve ser armazenada em temperaturas mais baixas. O grau alcoólico contribuiu para o aumento dos teores de carbamato de etila, recomendando bebidas com uma graduação alcoólica mais baixa.

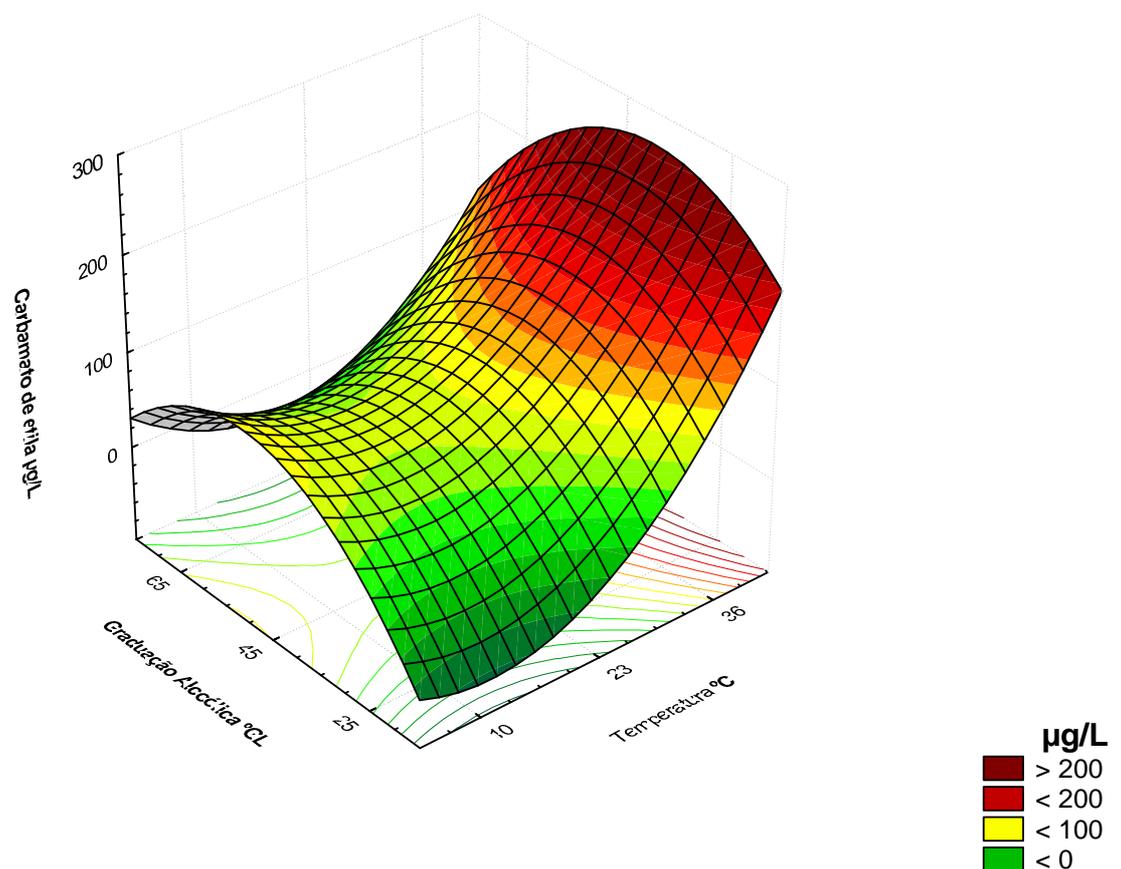


Figura VII.4. Superfície de resposta e curva de contorno do modelo ajustado para o carbamato de etila, relacionando ao grau alcoólico e a temperatura de armazenamento, no alambique C.

4. CONCLUSÕES

A temperatura de armazenamento (10 a 36 °C) e a fração alcoólica (cabeça, coração e cauda) da aguardente influenciaram os teores de carbamato de etila em aguardentes de cana artesanais. O aumento da temperatura de armazenamento aumenta significativamente a formação do CE. A fração cabeça apresentou teores mais elevados de carbamato de etila quando comparados as frações cauda e coração.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

Três métodos simples e rápidos foram desenvolvidos e validados, para a quantificação dos precursores do carbamato de etila - uréia, cianeto e cobre - em aguardente de cana. Os métodos da uréia e do cianeto envolvem detecção por espectrofotometria na região do visível, tendo sido obtidos limites de quantificação de 500 e 20 µg/L, respectivamente. O método de análise para cobre foi feito por absorção atômica, em chama, com limite de quantificação de 0,05mg/L.

O método analítico proposto para a quantificação da ureia, utilizando espectrofotometria a 540 nm, mostrou-se sensível, preciso, reprodutível e linear nas faixas de 0,5 a 15 mg/L, sendo adequado para a matriz aguardente de cana. A presença de ureia foi detectada em 52% das 68 amostras de aguardente de cana produzidas em Minas Gerais em teores que variaram de 0,50 a 5,10 mg/L, com valor médio de 0,66 mg/L.

O método proposto pela União Européia (EEC, 1999) para análise de cianeto em vinhos pode ser utilizado para análise em aguardentes de cana, sendo simplificado pela redução da etapa de destilação da amostra. O método foi validado na faixa de linearidade de 20 a 200 µg/L. O método analítico proposto para a quantificação do cianeto por espectrofotometria a 530 nm, mostrou ser sensível, preciso e reprodutível.

O método de análise proposto para o cobre foi validado na faixa de linearidade de 0,05 a 5,00mg/L. O cobre apresentou valor elevado tanto na cabeça (65 ± 2 °GL) como na cauda (25 ± 2 °GL), sendo que na fração coração (45 ± 2 °GL) observou menor teor, justificando o corte feito pelos produtores artesanais de utilizar somente esta fração para comercialização.

A quantificação do carbamato de etila por CLAE após derivação com xantidrol apresentou altos limites de quantificação, tornando-se necessária a concentração em 1000 vezes das amostras de aguardente de cana antes da análise. Este fato inviabilizou a utilização deste método para análise de CE em aguardentes de cana.

Na quantificação de carbamato de etila por CG-EM, o uso do carbamato de etila deuterado como padrão interno para análise de carbamato de etila em aguardente de cana mostrou melhores ajustes dos pontos da curva de calibração. Seu uso é recomendado, principalmente em injeções manuais, em que o volume injetado pode ter uma variação maior, comparado ao injetor automático.

Durante processos de destilação em três alambiques de cobre de diferentes regiões de Minas Gerais, foi comprovado o papel crítico das frações alcoólicas e da temperatura na formação do carbamato de etila em aguardentes de cana. Os teores de carbamato de etila apresentaram correlação com o grau alcoólico, obtendo-se maiores concentrações na cabeça (65 ± 2 °GL), comparados ao coração (65 ± 2 °GL) e a cauda (25 ± 2 °GL).

Durante o armazenamento de aguardente de cana por até 260 dias, observou-se que o carbamato de etila apresentou correlação positiva significativa com a temperatura. Temperaturas mais elevadas contribuíram para o aumento de CE nas amostras. Foi observada correlação positiva entre o CE e seus precursores, CN e uréia. Correlação também foi observada entre o carbamato de etila e acidez. O carbamato de etila apresentou correlação negativa substancial com o grau alcoólico. Desta forma, em função dos teores de cianeto, uréia e da acidez do destilado, pode-se prever os teores de carbamato de etila em amostras de aguardente de cana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIPTI – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INSTITUIÇÕES DE PESQUISA TECNOLÓGICAS. Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília, 474 p. 1999.
- ABRAHAM, S.K.; SINGH, S.P.; KESAVAN, P.C. In vivo antigenotoxic effects of dietary agents and beverages co-administered with urethane: assessment of the role of glutathione S-transferase activity. *Gen. Toxic. Env. Mutag.* 413, 103-110, 1997.
- ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. ACGIH, Cincinnati. 1991.
- AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; SUSKÓ, E. K.; MEZEI, P.; GYÖRGY, K.; BENCS, L.; Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. *Talanta*, 2008, 76, 627.
- ALMY, J.; OUGH, C.S. Urea analysis for wines. *J. Agric. Food Chem.* 37, 968-970, 1989.
- ANDRADE-SOBRINHO, A.L.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). *Quim. Nova*, 36, 1, 165-169, 2002.
- ANDRADE SOBRINHO L. G., CAPPELINI L. T. D., SILVA A. A., GALINARO C. A., BUCHVISER S. F., CARDOSO D. R., FRANCO D. W. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. *Quim. Nova*, 32, 1, 116-119, 2009.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 973.19). Arlington: AOAC. 1995a.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 967.08). Arlington: AOAC, chapter 26. p. 6-7. 1995b.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Methods Committee Reports. *J. AOAC Int.* 85, 1, 278-290, 2002.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Methods Committee Reports. *J. AOAC Int.* 86, 1, 165-167, 2003.

- ARENA, M.E.; NADRA, M.C.M. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic bacteria from wine. *Res. Microbiol.*, 156, 8, 858-864, 2005.
- ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D.W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. *J. Agric. Food Chem.* 49, 6, 2819-2824, 2001.
- AYLOTT, R.I.; MCNEISH, A.S.; WALKER, D.A. Determination of ethyl carbamate in distilled spirits using nitrogen specific and mass spectrometric detection. *J. Inst. Brew.* 93, 382-386, 1987.
- AYLOTT, R.; COCHRANE, C.; LEONARD, M.J.; MACDONALD, L.S.; MACKENZIE, W.M.; MCNEISH, A.S.; WALKER, D.A. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part I: Post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky. *J. Inst. Brew.* 96, 213-221, 1990.
- AZEVEDO, S.M.; CARDOSO, M.G.; PEREIRA, N.E.; RIBEIRO, C.F.S.; SILVA, V.F.; AGUIAR, F.C. Levantamento da contaminação por cobre nas cachaças de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. *Ciênc. Agrotecnol.* 27, 3, 618-624, 2003.
- BAILEY, R.; NORTH, D.; MYATT, D.; LAWRENCE, J.F. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by methylation and gas chromatography with nitrogen-phosphorus thermionic detection. *J. Chromatogr.* 369, 199-202, 1986.
- BARCELOS, L.V.F. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes aguardentes produzidas em Minas Gerais. 2006. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Lavras (UFLA. MG).
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. "Planejamento e otimização de experimentos". Editora Unicamp, Campinas, 1995. 299 p.
- BATTAGLIA, R.; CONACHER, H.B.S.; PAGE, B.D. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Addit. Contam.* 7, 4, 477-496, 1990.
- BELAND, F.A.; BENSON, R.W.; MELLICK, P.W.; KOVATCH, R.M.; ROBERTS, M.K.; FANG, J.L.; DOERGE, D.R. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. *Food Chem. Toxicol.*, 43, 1, 1-19, 2005.
- BEVERIDGE, G.S.G.; SCHECHTER, R.S. *Optimization: Theory and Practice*. McGraw-Hill, New York, 1970. 629 p.
- BETTIN, S.M. Da presença de cetonas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e compostos fenólicos em aguardente de cana por cromatografia. 2001. Tese (Doutorado em Química Analítica), Universidade de São Carlos, USP, São Paulo. 193 p.

- BIZELLI, L.C.; RIBEIRO, C.A.F.; NOVAES F.V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. *Sci. Agric.* 57, 4, 100-104, 2000.
- BOGUSZ JUNIOR, S.; KETZER, D.C.M.; GUBERT, R.; ANDRADES, L.; GOBO, A.B. Composição química da cachaça produzida na região Noroeste do Rio grande do Sul, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24, 4, 793-798, 2006.
- BOSCOLO, M.; BEZERRA, C.W.B.; CARDOSO, D.R.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugarcane spirit. *J. Braz. Chem. Soc.* 2, 1, 86-90, 2000.
- BOSCOLO, M. Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana: ocorrência e quantificação. São Carlos, 2002. Tese (doutor em química analítica) IQSC – Instituto de Química de São Carlos. 100 p.
- BOX, G.P.G.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. *Statistics for Experimenters: An Introduction To Design, Data Analysis And Model Building.* John Wiley & Sons, New York, 1978.
- BOZA, Y.; HORII, J. Influência do grau alcóolico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 20, 3, 232-234, 2000.
- BRASIL. Portaria nº 371 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Diário Oficial da União, Seção I, Parte I, Suplemento, Brasília, 19 set. 1974. p. 53-62.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 2314, de 4 de setembro de 1997 que regulamenta a Lei de 8918 de 14 de julho de 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 4062, de 21 de dezembro de 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº. 518, de 25 de março de 2004.
- BRASIL. Instrução normativa nº. 13, de 29 de junho de 2005. Diário oficial da união, s.1, p. 3, Brasília, 30/06/2005a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Diário Oficial da União, Brasília, 29 jun. 2005b.
- BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial nº 87 da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09, maio, 2005c.
- BRERETON, R.G. *Chemometrics in Analytical Chemistry - A Review.* *Analyst*, 112, 1635-1657, 1987.

- BRERETON, P.; HASNIP, S.; BERTRAND, R.A.; WITTKOWSKI, R.; GUILLOU, C. Analytical methods for the determination of spirit drinks. *Trends in Anal. Chem.* 22, 1, 19-25, 2003.
- BRETHERRICK, L. Hazard in the Chemical Laboratory. 3^a Ed., Oxford, Alden Press. 1981. 567 p.
- BRITO, N. M. AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE L.; SANTOS T. C.R.; RIBEIRO M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, 12,155-168, 2002.
- BRUMLEY, W.C.; CANAS, B.J.; PERFETTI, G.A.; MOSSOBA, M.M.; SPHON, J.A.; CORNELIUSSEN, P.E. Quantification of ethyl carbamate in whisky, sherry, port, and wine by gas chromatography/tandem mass spectrometry using a triple quadrupole mass spectrometer. *Anal. Chem.* 60, 975-978, 1988.
- BRUNO, S.N.F. Adequação dos processos de destilação e de troca iônica na redução dos teores de carbamato de etila em cachaças produzidas no estado do rio de janeiro. 2006. 238 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Rio de Janeiro.
- BRUNO, S.N.F.; VAITSMAN, D.S.; KUNIGAMI, C.N.; BRASIL, M.G. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. *Food Chemistry*, 117, 4, 693-697. 2007.
- BURKE, S. Regression and calibration. *LC GC*, 13-18, 2001a.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods. *LC GC*, 19-24, 2001b.
- BURNS, D.T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms "recovery" and "apparent recovery" in analytical procedures. *Pure Appl. Chem.*, 74, 2201-2205, 2002.
- BURTON, K.W.C.; NICKLESS, G. Optimization via simplex. Part I. Background, definitions and a simple application. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1, 135-149, 1987.
- BUTZKE, C.E.; BISSON, L.F. Ethyl carbamate, preventative action manual. UC Davis; 1997. Disponível em: <http://www.envtox.ucdavis.edu/cebs/TOXINS/urethane.htm>. Acesso em: 05 de maio de 2006.
- CAGNON, J.R.; CEREDA, M.P.; PANTAROTTO S. Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas. Cap. 5. Glicosídeos cianogênicos da mandioca: biossíntese, distribuição, destoxificação e métodos de dosagem. In Cd-rom. Série: Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas. Fundação Cargill. Agosto/2002.

- CAIRNS, T.; SIEGMUND, E.G.; LUKE, M.A.; DOOSE, G.M. Residue levels of ethyl carbamate in wines and spirits by gas chromatography and mass spectrometry/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 59, 2055-2059, 1987.
- CANAS, B.J.; HAVERY, D.C.; ROBINSON, L.R.; SULLIVAN, M.P.; JOE Jr., F.L.; DIACHENKO, G.W. Ethyl carbamate levels in selected foods and beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 6, 873-876, 1989.
- CANAS, B.J.; HAVERY, D.C.; ROBINSON, L.R.; SULLIVAN, M.P.; JOE Jr., F.L.; DIACHENKO, G.W. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by gas chromatography with mass selective detection. Collaborative study. *J. AOAC Int.*, 77, 6, 1530-1536, 1994.
- CANAS B.J., DIACHENKO G.W., NYMAN P.J. Ethyl carbamate levels resulting from azodicarbonamide use in bread. *Food Addit. Contam.* 14, 1, 89-94. 1997.
- CANAS, B.J. e M.P. YURAWECZ. Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids. *JAOCS*, 76, 4, 537. 1999.
- CANTANHEDE, L.B.; LIMA, J.B. de; LOPES, G.S.; FARIAS, R.B.; BEZERRA, C.W.B. Uso de sílica e sílica-titânia organofuncionalizadas para a remoção de Cu (II) em aguardentes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 25, 3, 500-505, 2005.
- CANTÃO, F.O. Análises físico-químicas e avaliação da presença do cobre em aguardentes de cana por aluminossilicatos. 2006. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG).
- CAPPELINI, L.T.D.; SILVA, A.A.; BUCHVISER, S.F.; GALINARO, C.A.; RECHE, R.V.; FRANCO, D.W. Perfil da uréia em cachaças produzidas no Estado de São Paulo. In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Resumos...2006, T1437-1.
- CAPPELINI, L.T.D.; SILVA, A.A.; BUCHVISER, S.F.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; FRANCO, D.W. Carbamato de etila em cachaças. Um retrospecto sobre seus teores no período de 2001a 2006. *Engarrafador Moderno*, 153, 34-36, 2007.
- CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 20, 1, 32-36, 2000.
- CARDOSO, M.G. Produção de aguardente de cana-de-açúcar. 2 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 445 p.
- CARDOSO, M.G. Análises físico químicas de aguardente. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. *Ciênc. Agrotecnol.*, 27, 3, 618-624, 2003.

- CARDOSO, D.R.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W.; NASCIMENTO, R.F. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes cana. Parte II. *Quim. Nova*, 26, 165-169, 2003.
- CATARINO, S.; PINTO, D.; CURVELO-GARCIA, A.S. Validação e comparação de métodos de análise em espectrofotometria de absorção atômica com chama para doseamento de cobre e ferro em vinhos e aguardentes. *Ciênc. Téc. Vitiv.* 18, 2, 65-76, 2003.
- CHERUBIN, R.A. Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. 2003. 123 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- CICAD. Hydrogen cyanide and cyanides: human health aspects. 2004. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad61.htm>. Acesso em: 05 de setembro de 2008.
- CLARK S.; FRANCIS, P.S.; CONLAN, X.A.; BARNETT, N.W. Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after automated derivatisation with xanthyrol. *J. Chromatog. A*, 1161, 207-213, 2007.
- CLEGG, B.S.; FRANK, R. Detection and quantitation of trace levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 36, 502-505, 1988.
- CLEGG, B.S.; FRANK, R.; RIPLEY, B.D.; CHAMPMAN, N.D.; BRAUN, H.E.; SOBOLOV, M.; WRIGHT, S.A. Contamination of alcoholic products by trace quantities of ethyl carbamate (urethane). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 6, 832-837, 1988.
- CODEX ALIMENTARIUS. V. 3. Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos. 2 ed. Roma. 1993. 54 p.
- CONACHER, H.B.S.; PAGE, B.D. Ethyl carbamate in alcoholic beverages: a Canadian case history. *Proceedings of Euro Food Tox*, II, Zurich, October 15-18, Schwerzenbach, 237-242, 1986.
- CONACHER, H.B.S.; PAGE, B.D.; LAU, B.P.; LAWRENCE, J.F.; BAILEY, R.; CALWAY, P.; HANCHAY, J.; MORI, B. Capillary column gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 4, 749-751, 1987.
- COOK, R.; MACCAIG, N.; MACMILLIAN, J.M.B.; LUMSDEN, W.B. Ethyl carbamate formation in grain-based spirits. Part III. The primary source. *J. Inst. Brew.*, 96, 233-244, 1990.

- CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; NATIVIDADE, M.A.E.; ABREU, C.M.P.; XISTO, A.L.R.P.; CARVALHO, V.D. Farinha de folhas de mandioca. I - Efeito da secagem de folhas sobre atividade da linamarase. Ciênc. Agrotecnol., 26, 2, 368-374, 2002.
- CORRÊA, A.D.; SANTOS, S.R.; ABREU, C.M.P.; JOKL, L.; SANTOS, C.D. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. Ciênc. Tecnol. Aliment., 24, 2, 159-164, 2004.
- CORREIA, P.R.M. Estudo da utilização de padrão interno em determinações multielementares por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e detecção simultânea. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Instituto de Química. 2004. 115 p.
- COULON, J.; HUSNIK, J.I.; INGLIS, D.L.; VAN DER MERWE, G.K.; LONVAUD A.; ERASMUS, D.J.; VAN VUUREN, H.J.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. Am. J. Enol. Vitic. 57, 113-124, 2006.
- COULON, J.; HUSNIK, J.I.; INGLIS, D.L.; VAN DER MERWE, G.K.; LONVAUD A.; ERASMUS, D.J.; VAN VUUREN, H.J.J. Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. Am. J. Enol. Vitic., 57, 2, 113-124, 2006.
- COUTINHO, E.P. Dinâmica da modernização do setor de produção de aguardente de cana-de-açúcar no Brasil: Construindo uma cachaça de qualidade (tese de doutorado). COPPE/UFRJ. Rio de Janeiro. 2001. 160 p.
- CRUZ, M.H.C.; MATTOS, J.S.; NUNES, F.F.; ALVARENGA, S.D.S.; MONTEIRO, T.M.; CUNHA, R.D.C.; RODRIGUES, J.M.; AQUINO NETO, F.R.; CUNHA, V.S. High precision method for determination of ethyl carbamate in cachaça by HRGC-MS. Simpósio de Metrologia, 2008, Santiago de Querétaro, México. 1-6.
- CURTIS, A.J.C.; GRAYLESS, C.; FALL, R. Simultaneous determination of cyanide and carbonyls in cyanogenic plants by gas chromatography-electron capture/photoionization detection. Analyst, 127, 1446-1449, 2002.
- DAUDT, C. E.; OUGH, C. S.; STEVENS, D.; HERRAIZ, T. Investigations into ethyl carbamate, n-propyl carbamate, and urea in fortified wines. Am. J. Enol. Vitic., 43, 318-322, 1992.
- DENNIS, M.J.; HOWARTH, N.; MASSEY, R.C.; PARKER, I.; SCOTTER, M.; STARTIN, J.R. Method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary gas chromatography. J. Chromatogr., 369, 193-198, 1986.

- DENNIS, M.J.; HOWARTH, N.; KEY, P.E.; POINTER, M.; MASSEY, R.C. Investigation of ethyl carbamate levels in some fermented foods and alcoholic beverages. *Food Addit. Contam.*, 6, 3, 383-389, 1989.
- DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; GINN, R.; PARKER, I.; CREWS, C.; ZIMMERLI, B.; ZOLLER, O.; RHYN, P.; OSBORNE, B. The effect of azodicarbonamide concentrations on ethyl carbamate concentrations in bread and toast. *Food Addit. Contam.* 14, 95-100, 1997.
- DICKMAN, S.R.; WESTCOTT, W.L. Reactions of xanthinol. *J. Biol. Chem.* 210, 481-489, 1954.
- DICKMAN S.R., CROCKETT A.L. Reactions of xanthinol. IV. *J. Biol. Chem.* 220, 957-965, 1956.
- DIVOL, B.; TONON, T.; MORICHON, S.; GINDREAU, E.; LONVAUD-FUNEL, A. Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *J. Appl. Microb.*, 94, 738-746, 2003.
- DROCHIOIU, G.; MANGALAGIU, I.; TATARU, V. Specific spectrophotometric determination of hydrocyanic acid in the environment. *The Analyst*, 125, 930-941, 2000.
- DUTRA, S. V.; DAUDT, C. E.; SOUZA, M. Aminoácidos livres e uréia durante a fermentação de mosto de Chardonnay com diferentes leveduras. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 19, n. 2, p. 179-182, 1999.
- DYER, R.H. Determination of ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages using capillary gas chromatography with thermal energy analyzer detection: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 77, 1, 64-67, 1994.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Europ. Commun.*, Brussels, 2002, L 221/8.
- EEC, 1990. Commission Regulation nº 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. *Off. J. Europ. Commun.* 272, 03/10/1990. 35-38.
- EEC. REGULAMENTO DA COMUNIDADE EUROPÉIA Nº 761/1999 DA COMISSÃO de 12 de Abril de 1999.
- EFSA (European Food Safety Authority). Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants. 2007. Acesso em 01/09/08. Disponível em: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/Contam_ej551_ethyl_carbamate_en_rev.1.pdf

- EIRAS, S.P.; CUELBAS, C.J.; DE ANDRADE, J.C. Um estudo comparativo sobre a eficiência de estratégias quimiométricas de otimização. *Quim. Nova*, 1, 216-219, 1994.
- ENGELHARDT, H. High performance liquid chromatography. Saarbrucken, Springer Verlag, 1979. 248 p.
- ESSER, A.J.A.; BOSVELD, M.; VAN DER GRIFT III, R.M.; VORAGEN, A.G.J. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *J. Sci. Food Agric.*, 63, 3, 287-296, 1993.
- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 61 p., 1998.
- FAO/WHO. Ethyl carbamate. In: Expert Committee on Food Additives. Sixty-fourth meeting, Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Summary and Conclusions. Rome, Feb. 8 -17, 2005. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf. Acesso em 19 out. 2008.
- FARIA, J.B.; DELIZA, R.; ROSSI, E.A. Compostos sulfurados e a qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 13, 1, 89-93, 1993.
- FARIA, J.B. Determinação dos compostos responsáveis pelo defeito sensorial das aguardentes de cana (*Saccharum* ssp) destiladas na ausência de cobre. Araraquara, 2000. 99p. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista.
- FARIA, J. B.; LOYOLA, E.; LOPEZ, M.G.; DUFOUR, J.P Cachaça, pisco and tequila. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. (Org.). *Fermented Beverage Production*, 2nd ed., New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, p. 335-363, 2003.
- FAUHL, C.; CATSBURG, R.; WITTKOWSKI, R. Determination of ethyl carbamate in soy sauces. *Food Chem.*, 48, 3, 313-316, 1993.
- FÁVERO, J.A.D. Determinação spot-test semi-quantitativa de cianeto livre em efluentes industriais. 179 p. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 1999.
- FERNANDES, K.G.; GOMES NETO, J.A.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. *Quim. Nova*, 26, 2, 249-252, 2003.
- FERNANDES, W.J.; CARDOSO, M.G.; VILELA, F.J.; MORAIS, A.R.; SILVA, V.F.; NELSON, D.L. Physicochemical quality of a blend of domestic cachaças from the south of Minas Gerais. *J. Food Comp. Anal.*, 20, 257-261, 2007.

- FIELD, K.J.; LANG, C.M. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. *Lab. Anim.*, 22, 3, 255-262, 1988.
- FILIPOVIC-KOVACEVIC, Z.; MIKSAJ, M.; SALAMON, D. Cyanide determination in fruit brandies by an amperometric biosensor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 347-352, 2002.
- FOULKE, J. Urethane in alcoholic beverages under investigation. U.S. Food and Drug Administration, 1993. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/fc0293ur.html>. Acesso em: 21 julho 2005.
- FRANCIS, P.S. The determination of urea in wine – a review. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 12, 97-106, 2006.
- FRANCIS, P.S.; LEWIS, S.W.; LIM, K.F. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *Trends Anal. Chem.*, 21, 5, 389-400, 2002.
- FRANCISQUETTI, E.L., R. VANDERLINDE, J.L. CARRAU; P. MOYNA Ethyl carbamate content in wines produced and commercialized in southern Brazil. *Acta Farm. Bonaerense.* 21, 3, 201-204. 2002.
- FUJINAWA, S.; TODOROKI, H. Application of an acid urease to wine: determination of trace urea in wine. *J. Food Sci.* 55, 4, 1018-1020, 1990.
- FURTADO, J.L.B.; BEZERRA, C.W.B.; MARQUES, E.P.; MARQUES, A.L.B. Cianeto em tiquiras: riscos e metodologia analítica. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 27, 4, 787-792, 2007.
- GALANI-NIKOLAKAKI, S.; KALLITHRAKAS-KONTOS, N.; KATSANOS, A.A. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *The Sci. Total Environm.*, 285, 1-3, 155-163, 2002.
- GALPIN, V. C. A comparison of legislation about winemaking additives and process. *South African Computer Journal*, 26, 13-21, 2006.
- GARBIN, R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; MONTANO, M.A. Níveis de cobre em amostras de cachaça na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc. Rural*, 35, 6, 1436-1440, 2005.
- GIACHETTI, C.; ASSANDRI, A.; ZANOLO, G. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate as the xanthylamide derivative in Italian aqua vitae (grappa) samples. *J. Chromatogr.* 585, 1, 111-115, 1991.
- GOMES C.O., F.; PATARO, C.; GUERRA, J. B.; NEVES, M. J.; CORREA, S. R.; S.A.MOREIRA, E.; ROSA, C. A. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces cerevisiae pombe* strains isolated from spontaneous fermentation during the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Canadian Journal of Microbiology, Canada*, 48, 5, 399-406, 2002.

- GÓMEZ, A.V.L.; CALATAYUD, D.J.M. Determination of cyanide by a flow injection analysis-atomic absorption spectrometric method. *Analyst*, 123, 2103-2107, 1998.
- GRANATO, M. Utilização do aguapé no tratamento de efluentes com cianetos. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, Série Tecnologia Ambiental; 5, 39 p., 1995.
- HADDON, W.F.; MANCINI, M.L.; McLAREN, M.; EFFIO, A.; HARDEN, L.A.; DEGRE, R.L. Occurrence of ethyl carbamate (urethane) in U.S. and Canadian breads: measurements by gas chromatography-mass spectrometry. *Cereal Chem.*, 71, 2, 207-215, 1994.
- HASEGAWA, Y.; NAKAMURA, Y.; TONOGAI, Y.; TERASAWA, S.; ITO, Y.; UCHIYAMA, M. Determination of ethyl carbamate in various fermented foods by selected ion monitoring. *J. Food Protect.*, 53, 12, 1058-1061, 1990.
- HASNIP, S.; CAPUTI, B.; CREWS, C.; BRERETON, P. Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. *Food Addit. Contam.*, 21, 12, 1155-1161, 2004.
- HASNIP, S.; CREWS, C.; POTTER, N.; CHRISTY, J.; CHAN, A.; BONDU T.; MATTHEWS, W.; WALTERS, B.; PATEL, K. Survey of ethyl carbamate in fermented foods sold in the united kingdom in 2004. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2755-2759, 2007.
- HEINISCH, J.J. Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors--targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1754, 1-2, 171-182, 2005.
- HERBERT, P.; SANTOS, L.; BASTOS, M.; BARROS, P.; ALVES, A. New CLAE method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. *J. Food Sci.*, 67, 1616-1620, 2002.
- HOFFLER, U.; MASRI, H.A.; GHANAYEM, B.I. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is the principal enzyme responsible for urethane metabolism: comparative studies using CYP2E1-null and wild-type mice. *The J. Pharmacol. Experim. Therap.*, 305, 2, 557-564, 2003.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, 54, 1, 67-76, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, 67, 331-343, 1995.
- HUBNER, P.; GROUX, P.M.; WEIBEL, B.; SENGSTAG, C.; HORLBECK, J.; MORGENTHALER, P.M.L.; LUTHY, J. Genotoxicity of ethyl carbamate (urethane) in *Salmonella*, yeast and human lymphoblastoid cells. *Mut. Res.*, 24, 9-11, 1996.

- IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. 2004. 4ª edição. 1032 p.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Some Anti-thyroid and Related Substances, Nitrofurans and Industrial Chemicals. v. 7. World Health Organization, Lyon, France. 1974.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Preamble, 2006. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>. Acesso em 01 de setembro de 2008.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate (urethane). v. 96, 6-13, February 2007. World Health Organization, Lyon, France. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol96-summary.pdf>. Acesso em 01 de setembro de 2008.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 01 março 2003.
- IIDA, Y.; IKEDA, M.; AOTO, M.; SATOH, I. Fluorimetric determination of urea in alcoholic beverages by using an acid urease column-FIA system. *Talanta*, 64, 1278-1282, 2004.
- INMETRO. Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo. Portaria INMETRO nº 88, de 24/05/96. Brasília: INMETRO, 1996.
- INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. NORMATIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 02. Junho de 2007.
- ISO/IEC 17025. ABNT. NBR Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001. 20p.
- JANZANTTI, N.S. Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça. 2004. 179 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- JECFA. Summary and conclusions of the sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 19-23. 2005. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_report_64_final.pdf. Acesso em 01 de setembro de 2008.
- JOE Jr., F.L.; KLINE, D.A.; MILETTA, E.M.; ROACH, J.A.G.; ROSEBORO, E.L.; FAZIO, T. Determination of urethane in wines by gas-liquid chromatography and its confirmation by mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60, 3, 509-516, 1977.

- JONES, D.A. Why are many food plants cyanogenic? *Phytochem.*, 47, 2, 155-162, 1998.
- KAARLS, R.; MILTON, M.J.T. Metrology in chemistry: considerations, approaches and developments on the applicability of methods of higher order - Introduction., 5, 908, 2004.
- KAIL, K. Effects of nutrition on the induction, prevention and management of neoplasia. *J. Naturopathic Med.*, 1, 1, 1-19, 1990.
- KODAMA, S.; SUZUKI, T.; FUJINAWA, S.; TEJA, P.; YOTSUZUKA, F. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 1, 17-24, 1994.
- KOSKINEN-SOIVI, M.; LEPPAMAKI, E.; HLBERG P. Determination of HCN sampled from gasification product gases by headspace gas chromatography with atomic emission detector. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 1625-1630, 2005.
- KRISTIANSEN, E.; CLEMMENSEN, S.; MEYER, O. Chronic ethanol intake and reduction of lung tumours from urethane in strain a mice. *Food Chem. Toxicol.*, 28, 1, 35-38, 1990.
- KÜCHLER, I.L.; SILVA, F.A.M. Método potenciométrico para determinação de cobre em cachaça. *Quim. Nova*, 22, 3, 339-342, 1999.
- LABANCA, R.A. Teores de carbamato de etila, cobre e grau alcoólico em aguardentes produzidas em Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004, 61 p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos). UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).
- LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; GOUVEIA, V.J.P.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de cobre e dos teores alcoólicos em aguardentes de cana produzidas no estado de Minas Gerais. *Quim. Nova*, 29, 5, 1110-1113, 2006.
- LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM. *Quim. Nova*, 31, 7, 1860-1864, 2008.
- LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M.B.A. Spectrophotometric determination of urea in sugar cane distilled spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 13, 5211-5215, 2008.
- LACHENMEIER D. W. SCHEHL B., KUBALLA T., FRANK W., SENN T. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. *Food Addit. Contam.*, 22, 5, 5397-5405, 2005.
- LACHENMEIER, D.W.; UTA N.; THOMAS, K. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1108, 116-120, 2006.

- LAMBERT, J.L.; RAMASAMY, J.; PAUKSTELIS, J. Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified Konig reactions. *Anal. Chem.* 6, 916-918, 1975.
- LAMBERT, D.F.; SHERWOOD, J.E.; FRANCIS, P.S. The determination of urea in soil extracts and related samples – a review. *Austr. J. Soil Res.*, 42, 709-717, 2004.
- LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 1, 90-103, 1990.
- LIMA, U.A. Estudos dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana. Piracicaba: Escola superior de Agricultura Luís de Queiroz de USP, 1964. 141p. (Tese, concurso efetivo ao cargo de professor catedrático – ESALQ).
- LIMA, U.A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. (Ed.) Edgar Blucher Ltda: Biotecnologia Industrial, São Paulo: Brasil, 4, 145-182, 2001.
- LIMA, A.J.B.; CARDOSO, M.G.; GUERREIRO, M.C.; PIMENTEL, F.A. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. *Quim. Nova*, 29, 2, 247-250, 2006.
- LIU, S.Q.; PRITCHARD, G.G.; HARDMAN, M.J.; PILONE, G.J. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 2, 235-242, 1994.
- MACKENZIE, W.M.; CLYNE, H.; MACDONALD, L.S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II. The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch grain whisky. *J Inst Brew.*, 96, 4, :223–232, 1990.
- MAIA, A.B.R.A.; PEREIRA, A.J.G.; LIMA, L.A. Fermentação alcoólica semi-contínua destinada à produção de aguardentes. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, 25, 33-36, 1991.
- MALIK J.; SZAKOVA J.; DRABEK O.; BALIK J.; KOKOSKA L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. *Food Chemistry Volume 111*, 2, 520-525, 2008.
- MARIN, M.A.B.; SILVA R.C.; LEHMKUHL, A.; SILVA, J.B.B.; GANZAROLLI, E.M.; QUEIRÓZ, R.R.U. Sistema automático para determinação seqüencial de cianeto livre e total empregando eletrodo tubular íon-seletivo de membrana homogênea. *Quim. Nova*, 23, 1, 23-29, 2000.
- MARTINS, I. Validação. In: MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. *Toxicologia Analítica*. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2008. p. 20-39.

- MATSUDO, T.; AOKI, T.; ABE, K.; FUKUTA, N.; HIGUCHI, T.; SASAKI, M.; UCHIDA, K.
Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 3, 352-356, 1993.
- MELOUN M., MILITKY J. Detection of single influential points in OLS regression model building. *Anal. Chim. Acta* 439, 169–191. 2001.
- MERCK Index. 13 ed. Ed. S. Budavari. Merck and Co. Inc., Rahway, NJ., 2001.
- MIRANDA, M.B.; MARTINS, N.G.S.; BELLUCO, A.E.S.; HORII, J.; ALCARDE, A.R.
Qualidade química de cachaças e aguardentes brasileiras. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27, 4, 897-901, 2007.
- MONTEIRO, F.F.; BISSON, L.F. Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 199-208, 1991.
- MORI, F.A.; MENDES, L.M.; TRUGILHO, P.F.; CARDOSO, M.G. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento da aguardente de cana-de-açúcar. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23, 3, 100-105, 2003.
- MORRIS, J.R.; MAIN, G.; THRELFALL, R. Fermentations: problems, solutions and prevention, 2003. Disponível em: <Fermentations: problems, solutions and prevention>. Acesso em: 05 de maio de 2003.
- MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. *Química Orgânica*, 3^a ed. PHB Ltda: Lisboa, Portugal, 1973. p. 826-827.
- MOSEDALE, J.R.; PUECH, J.L. Wood maturation of distilled beverages. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 95-101, 1998.
- MOSSOBA, M.M.; CHEN, J.T.; BRUMLEY, W.C.; PAGE, S.W. Application of gas chromatography/matrix isolation/Fourier transform infrared spectrometry to the determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and foods. *Anal. Chem.*, 60, 945-948, 1988.
- MULLER, C.J.; FUGELSANG K.C. 3a, 6a-dimethylglycoluril, the product of the interaction of urea and diacetyl, as a source of post-bottling ethyl carbamate in wines. *Vitic. Enol. Res. Cent.*, CATI Publ. 960502, May, 1996.
- MURPHY, K.E.; SCHANTZ, M.M.; BUTLER, T.A.; BRUCE, B.A., WOOD, L.J., TURK, G.C.
Determination of cyanide in blood by isotope-dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Clin. Chem.* 52, 3, 458-467, 2006.
- NADRA M.C.M. Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends. In A. Applied Microbiology, Méndez-Vilas* , Tucumán, 2007.

- NAGATO, L.A.A.F. Análise de uretana em bebidas alcoólicas fermento-destiladas. São Paulo, 1995. Dissertação (Mestre em tecnologia de alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. USP. 84 p.
- NAGATO, L.A.A.F.; NOVAES, F.V.; PENTEADO, M.V.C. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. Bol. SBCTA, 37, 1, 40-47, 2003.
- NASCIMENTO, R.F.; NASCIMENTO R. F.; BEZERRA C. W. B.; FURUYA S. M. B.; SCHULTZ M. S.; POLASTRO L. R., LIMA NETO B. S.; FRANCO D. W. Mineral profile of Brazilian cachaças and other international spirits. J. Food Comp. Anal., 12, 17-25, 1999.
- NÓBREGA, I.C.C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do headspace e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. Ciênc. Tecnol. Aliment. 23, 2, 100-106, 2003.
- NOGUEIRA, M.P.; VENTURINI FILHO, W.G. Aguardente de cana. UNESP, Botucatu, SP, 2005. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/intranet/arquivos/waldemar/Aguardente%20de%20Cana%20-Completo.pdf>>. Acesso em: 22 dez.2008.
- NOUT, M.J.R. Fermented foods and food safety. Food Res. Int., 27, 291-298, 1994.
- NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, E.R.; VALSECHI, O. I Curso de Extensão em Tecnologia de aguardente. Piracicaba: ESALQ/USP, Apontamentos. 104 p. 1974.
- NOVAES, F.V. Noções básicas sobre a teoria da destilação. Piracicaba: ESALQ, Depto de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, 1994. 22p.
- OBIRI, S; DODOO, D.K.; OKAI-SAM, F.; ESSUMANG, D.K. Non-cancer health risk assessment from exposure to cyanide by resident adults from the mining operations of Bogoso gold limited in Ghana. Environ. Monit. Assessm., 118, 51–63, 2006.
- OIV, Compendium of international methods of wine and must analysis OENO 4/94. Office International de la Vigne et du Vin. 2008. 471 p.
- OJEDA, C.B.; ROJAS, F.S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. Anal. Chim. Acta. 518, 1-24, 2004.
- OKAFOR, P.N.; ABARA, C.N.; NWABUKO, C.U.; OGBONNA, U. Assessment of cyanogenic potential, nitrate and nitrite contents, and trypsin inhibitor activity of some Nigerian legumes. J. Agric. Food Chem., 50, 4965-4968, 2002.
- OLIVEIRA, A.F.; ANEFALOS, L.C.; GARCIA, L.A.F.; ISTAKE, M.; BUMQUIST, H.L. Sistema agroindustrial da cachaça e potencialidades de expansão das exportações. Disponível em: <fearp.usp.br/egna/resumos/Oliveira.pdf>. Acesso em: 05 de setembro de 2003.

- OLIVEIRA, E.S. Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais. 2001. 136p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- OLIVEIRA, J.M.M. Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das Castas Loureiro e Alvarinho. 2000. 267 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Escola de Engenharia, Universidade do Moinho, Portugal.
- ORDUNÃ, R.M.; LIU, S.Q.; PATCHETT, M.L.; PILONE, G.J. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 183, 31-35, 1999.
- OUGH, C.S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 323-328, 1976a.
- OUGH, C.S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 328-331, 1976b.
- OUGH, C.S.; AMERINE, M.A. *Methods for analysis of musts and wines*. 2^a ed., New York: J. Wiley & Sons, 1988. 377 p.
- OUGH C.S., HUANG Z., AN D., STEVENS D. Amino acid uptake by 4 commercial yeasts at different temperatures of growth and fermentation-effects of urea excretion and reabsorption. *Am. J. of Oenology and Viticulture*. 42, 1, 26-40. 1991.
- PARDO, I. Metabolismo de substratos del mosto y vino por bacterias lácticas y sus implicaciones en la calidad del vino. *ACE Rev. Enol.* 2003. Disponível em: <[Http://www.Acenologia.Com/Ciencia64_1.Htm](http://www.Acenologia.Com/Ciencia64_1.Htm)>. Acesso em: 06 de junho de 2005.
- PARK, H.; SHIN, M.; WOO, I. Antisense-mediated inhibition of arginase (CARI) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosc. Bioeng.*, 92, 5, 481-484, 2001.
- PARK, S.; KIM, C.T.; LEE, J.; JHEE, O.H.; OM, A.S.; KANG, J.S., MOON, T.W. Analysis of ethyl carbamate in Korean soy sauce using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection or tandem mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry. *Food Control*, 18, 975-982, 2007.
- PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R.; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. *Informe Agropecuário (Belo Horizonte)*, 23, 37-43, 2002.

- PBDC. Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça. Disponível em: <[Http://www.apexbrasil.com.br](http://www.apexbrasil.com.br)>. Acesso em: 01 de novembro de 2008.
- PEREIRA, J.A.M.; ROSA, C.A.; FARIA, J.B. Cachaça de alambique. Brasília: LK, 2006. 180 p.
- PEREIRA, N.M.; CARDOSO, M.G.; AZEVEDO, S.M.; MORAIS, A.R.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P.M. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de Minas Gerais. *Ciênc. Agrotecnol.*, 27, 5, 1068-1075, 2003.
- PIERCE Jr, W.M.; CLARK, A.O.; HURST, H.E. Determination of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 4, 781-784, 1988.
- PIZARRO, F.; VARGAS, F.A.; AGOSIN, E.A. Systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*; 24, 977-991, 2007.
- POLASTRO, L.R. Análise de íons metálicos, amônio, uréia e aminoácidos em aguardente. 1999. 55 p. Tese (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química da São Carlos (IQSC, USP).
- POLASTRO, L.R.; BOSO, L.M.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 21, 1, 179-182, 2001.
- POOLE, C.F.; POOLE, S.K. *Chromatography today*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1991. 1026 p.
- RDA. RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES. Subcommittee on the 10th Ed. of RDAs. Washington, National Academic Press, 10, 195-246, 1989.
- RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.P.; THOMASSEN, Y. Evaluation of internal standardization in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Commun.*, 36, 13-16, 1999.
- RECHE R.V.; LEITE NETO, A.F.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Uso de íons metálicos alternativa na distinção. *São Paulo*, 42, p. 36. 2006.
- RECHE, Roni V.; FRANCO, D. W. Distinção entre cachaças destiladas em alambiques e em colunas usando quimiometria. *Química Nova*, 32, 332-336, 2009.
- REFSGAARD, H.H.F.; SCHAUMBURG, K.; SKIBSTED, L.H. Solid-state ¹³C NMR investigations of insoluble deposits in aromatic bitters. *Z. Lebensmit.-Unters. Forsch.*, 203, 287-292, 1996.
- REN, Y.; MAHON, D. Evaluation of microwave irradiation for analysis of carbonyl sulfide, carbon disulfide, cyanogen, ethyl formate, methyl bromide, sulfuryl fluoride, propylene oxide, and phosphine in hay. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 32-37, 2007.

- RIBANI, M.L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Revisão. Quim. Nova, 27, 5, 771-780, 2004.
- RIBEIRO, J.C.G.M. Fabricação artesanal da cachaça mineira. Minas Gerais: O Lutador. 2ª ed, 2002. 221 p.
- RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Handbook of Enology: v. 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley. 2000. 441 p.
- RIFFKIN, H.L.; WILSON, R.; BRINGHURST, T.A. The possible involvement of Cu⁺⁺ peptide/protein complexes in the formation of ethyl carbamate. J. Inst. Brew., 95, 2, 121-122, 1989.
- RIZZON, L.A.; SALVADOR, M.B.G.; MIELE, A. Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. Ciênc. Tecnol. Aliment., 28, 3, 635-641. 2008.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas, SP: Casa do Pão, 2005. 326p.
- RODRIGUES FILHO, M.G.; LEITE NETO, A.F.; AQUINO, F.W.B.; PLEPIS, A.M.G.; RODRIGUES-FILHO, U.P.; FRANCO, D.W. Quantificação de dextranas em açúcares e em cachaças. Quim. Nova, 30, 5, 1115-1118, 2007.
- RODRIGUES N.A.; ROSSI, E.C.P. Segurança em laboratório. 2ª ed. Belo Horizonte, MG: ICB. 2007. 77p.
- ROTA, M.B. Efeito da bidestilação na qualidade sensorial da cachaça. Araraquara, 2008. 60 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição.
- ROUTH, M.W.; SWARTZ, P.A.; DENTON, M.B. Performance of the super modified simplex. Anal. Chem. 49, 1422-1428, 1977.
- SADECKA, J.; POLONSKY, J. Determination of inorganic ions in food and beverages by capillary electrophoresis. Review. J. Chromatogr. A, 834, 401-417, 1999.
- SARGENTELLI, V.; MAURO, A.E.; MASSABNI, A.C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. Quim. Nova, 19, 3, 290-293, 1996.
- SCHEHL, B. Development of a genetically defined diploid yeast strain for the application in spirit production. 2005. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha. Disponível em: <http://www.uni-hohenheim.de/ub/opus/volltexte/2005/119/pdf/Dissertation_Schehl_B.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2008.

- SCHLATTER, J.; LUTZ, W.K. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem. Toxicol.* 28, 205-211, 1990.
- SCOLARI, D.D.G. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. *Revista da Fundação Milton Campos, Brasília, DF.* 25, 09-86, 2006.
- SEBRAE. O novo ciclo da cana: Estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos. Brasília: IEL/NC; SEBRAE, 2005. 337 p.
- SEBRAE. Cachaça. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>. Acesso em: 12 mai. 2008.
- SEGAL, M. Too many drinks spiked with urethane. *FDA Consum.*, 22, 3, 16-17, 1988.
- SEGURA-MUÑOZ, S.I.; TREVILATO, T.M.B.; TAKAYANAGUI, A.M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. Metales pesados en agua de bebederos d presión. *Archiv. Latinoam. Nutric.*, 53, 1, 59-64, 2003.
- SEN, N.P.; SEAMAN, S.W.; BOYLE, M.; WEBER, D. Methyl carbamate and ethyl carbamate in alcoholic beverages and other fermented foods. *Food Chem.*, 48, 4, 359-366, 1993.
- SERPE, E.R.; FREITAS, R.J.S. Avaliação do cobre e zinco em alimentos de consumo diário. *Bol. CEPPA*, 9, 2, 141-148, 1991.
- SIEBERT, K.J.; CARRASCO, A.; LYNN, P.Y. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 8, 1997-2005, 1996.
- SIEBERT, K.J.; TROUKHANOVA, N.V.; LYNN, P.Y. Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1, 80-85, 1996.
- SILVA, R.M.C.; ALMEIDA, E.; VALENCIA, E.P.E.; NASCIMENTO FILHO, V.F. Determination of Fe, Cu and Zn in sugar-cane spirits commercialized in Southeastern Brazil by TXRF. *J. Radioanal. Nuclear Chem.*, 260, 1, 3-7, 2004.
- SILVA, J.A.; DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, F.L.H.; MADRUGA, M.S.; SANTANA, D.P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. *Quim. Nova*, 31, 5, 1077-1077, 2008.
- SORATTO, A.N.; VARVAKIS, G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 27, 681-687, 2007.
- SOUSA, M.V.F. Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal. 2005. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Lavras (UFLA, MG).

- SOUZA, L.M. Estudo das biomoléculas encontradas na cifomedusa phyllorhiza punctata: isolamento e caracterização estrutural. Dissertação de mestrado em Bioquímica, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. 2005. 87p.
- SOUZA, S.V.C. Procedimentos para validação de métodos de ensaio: delineamento, aplicações em análises de resíduos em alimentos e avaliação da eficiência. 2007. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chim. Acta*, 552, 1-2, 25-35, 2005.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em tecidos de origem animal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 21, 1, 34-38, 2001.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M.; SANTOS, E.V.; LIMA, J.A.; TEODORO, J.C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23, 54-58, 2003.
- STEVENS, D.F.; OUGH, C.S. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 1, 309-312, 1993.
- STOEWSAND, G.S.; ANDERSON, J.L.; MUNSON, L. Inhibition by wine of tumorigenesis induced by ethyl carbamate (urethane) in mice. *Food Chem. Toxicol.* 29, 291-295, 1991.
- SUN, B.M.; NOLLER, B. Simultaneous determination of trace amounts of free cyanide and thiocyanate by a stopped-flow spectrophotometric method. *Wat. Res.* 32, 12, 3698-3704, 1998.
- SWANSTON, J.S. Quantifying cyanogenic glycoside production in the acrospires of germinating barley grains. *J. Sci. Food Agric.* 79, 745-749, 1999.
- TAKARA, E.A.; PASINI-CABELLO, S.D.; CERUTTI, S.; GÁSQUEZ, J.A.; MARTINEZ, L.D. On-line preconcentration/determination of copper in parenteral solutions using activated carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, 735-739, 2005.
- TEGMO-LARSSON, I.M.; SPITTLER, T.D. Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. *J. Food Sci.*, 55, 4, 1166-1167, 1169, 1990.

- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Anal.* 125, 3, 385-386, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, 74, 835-855, 2002.
- TRIOLA, M.F. *Introdução à Estatística*. Editora LTC, 8ª Edição, 2001.
- UNICA. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>. Acesso em: 12 mai. 2008.
- UREA. Disponível em: <http://www.mapric.com.br/anexos/boletim256_14112007_184815.pdf. Acesso em: 12 jul. 2008.
- UTHURRY, C.A.; LEPE, J.A.S.; LOMBARDERO, J.; HIERRO, J.R.G. Ethyl carbamate production by selected yeast and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chem.*, 94, 2, 262-270, 2006.
- VALSECHI, O. *Aguardente de cana*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1960, 119p.
- VAN LOCO, J.; BEERNAERT, H. An alternative method validation strategy for the European Decision 2002/657/EC. In: *PROCEEDINGS OF EUROPEAN FOOD CHEMISTRY*, 12, 2003, Brugges, Belgium. *Proceedings...* Brugges: European Food Chemistry, 91-94, 2003..
- VARGAS, E.A.; GLÓRIA, M.B.A. Qualidade da aguardente de cana (*Saccharum officinarum* L.) produzida, comercializada e/ou engarrafada no Estado de Minas Gerais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 15, 1, 43-49, 1995.
- VARGAS, E.A. Qualidade da aguardente de cana produzida, engarrafada e/ou comercializada em Minas Gerais. Belo Horizonte, 1995. 81p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.
- VARNAN, A.H.; SUTHERLAND, J.P. *Acribia SA: Bebidas – Tecnología, química y microbiología*. Espanha: Spain, p. 417-465, 1997.
- VEGA, P.V.; FLORENTINO, B.L. *Toxicologia de alimentos*. Instituto Nacional de Salud Publica. Centro Nacional de Salud Ambiental. México. 2000. 260p.
- VERDI, A.R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. *Informações Econômicas*, SP, 36, 2, 2006.
- VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; VAN STADEN, J.E.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*, 73, 1381-1386, 2001.
- VIM, *Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais da Metrologia*. 2005, 4.ed. Rio de Janeiro, 75p.

- WALKER, G.; WINTERLIN, W.; FOUUDA, I.; SEIBER, J. Gas chromatographic analysis of urethane (ethyl carbamate) in wine. *J. Agric. Food Chem.* 22, 944-947, 1974.
- WERNIMONT, G.T. Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods, W. Spendley (Ed.), AOAC INTERNATIONAL, 481 N. Frederick Ave, Suite 500, Gaithersburg, USA, 1985.
- YOKOYA, F. Fabricação de aguardente de cana. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1995. 87 p. (Série fermentações industriais).
- ZIETSMAN, A.; VILJOEN, M.; VUUREN, H. Preventing ethyl carbamate formation in wine. 2003. Disponível em: <http://www.wyhbber.co.za/recentarticles>. Acesso em: 20 de março de 2006.
- ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mut. Res. Gen. Toxicol.*, 259, 325-350, 1991.

276 Referências bibliográficas citadas