

JOSÉ CARLOS BAFFA JÚNIOR

MECANISMOS DE FORMAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DURANTE A
PRODUÇÃO E ESTOCAGEM DE AGUARDENTE DE CANA-DE-AÇÚCAR

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B143m
2011

Baffa Júnior , José Carlos, 1981-

Mecanismos de formação de carbamato de etila durante a
produção e estocagem de aguardente de cana-de-açúcar / José
Carlos Baffa Júnior. – Viçosa, MG, 2011.
x, 83f. : il. ; 29cm.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Aguardente - Análise. 2. Aguardente - Qualidade.
3. Carbamato de etila - Análise. 4. Carbamato de etila -
Qualidade. 5. Carbamato de etila - Síntese. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 663.53

JOSÉ CARLOS BAFFA JÚNIOR

**MECANISMOS DE FORMAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DURANTE A
PRODUÇÃO E ESTOCAGEM DE AGUARDENTE DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 09 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Valéria Monteze Guimarães

**Prof. José Antônio Pereira Marques
(Coorientador)**

Prof. Washington Azevedo da Silva

Dr. João Cruz Reis Filho

**Prof^a. Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da existência, pela proteção e pela presença divina em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do programa.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço a minha família: meu pai (José Carlos), meus irmãos (David e Danielle) que estiveram presentes em minha vida com carinho e dedicação.

À toda minha família: tios, tias, avós e primos que contribuíram muito para mais essa etapa.

À minha namorada, Mayla, pela paciência, amor e carinho e incentivo. Principalmente por estar ao meu lado em todos momentos, fossem eles bons ou ruins.

A professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, pela orientação, pela confiança, pela amizade e pela força nos momentos difíceis.

Ao professor Washington Azevedo da Silva, pela orientação, pela paciência, pela dedicação, confiança, pelo carinho e amizade.

Ao professor José Antônio pelos conselhos e ajudas e a coorientação durante o todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos do Laboratório de Embalagens, pela enorme ajuda com os experimentos e a excelente convivência nesses 3 anos de doutorado.

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra contribuíram para a realização de mais essa etapa.

Dedico esse trabalho

À Deus

À Minha mãe(*in memoriam*), Maria do Carmo Ferreira Baffa

Ao meu pai, José Carlos Baffa.

Aos meus irmãos David e Danielle.

A minha namorada Mayla.

BIOGRAFIA

José Carlos Baffa Júnior, filho de José Carlos Baffa e Maria do Carmo Ferreira Baffa, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 04 de dezembro de 1981.

Em maio de 2006, graduou-se Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Em outubro de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título *Magister Scientiae*, no dia 10 de julho de 2008.

Em setembro de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título *Doctor Scientiae*, no mês de fevereiro de 2011.

CONTEÚDO

RESUMO	VIII
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO GERAL.....	4
CAPÍTULO 1 QUANTIFICAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DURANTE AS ETAPAS DE PRODUÇÃO DE AGUARDENTE E DE SEUS PRODUTOS DIPONÍVEIS EM MERCADO DA REGIÃO DE VIÇOSA-MG.....	6
RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Preparo das amostras para cromatografia	15
2.1.1 – Coleta das amostras na fermentação	15
2.1.2 – Coleta das amostras na destilação	15
2.2 – Quantificação do carbamato de etila.....	16
2.3 – Determinação do teor alcoólico.....	11
2.3 – Determinação do teor de cobre nas cachaças.....	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4. CONCLUSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 2 FORMAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DURANTE A FERMENTAÇÃO E SEUS PRINCIPAIS PRECURSORES	31
RESUMO	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Condução da fermentação	40
2.2. Coleta e preparo das Amostras.....	41
2.2.1 – Determinação da uréia.....	41
2.2.2 – Determinação de cianeto	42
2.2.3 – Determinação de arginina.....	43
2.2.4 – Determinação de carbamato de etila	44
2.3 – Análise estatística dos resultados	45

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4. CONCLUSÃO	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPÍTULO 3 EFEITO DA COR DA EMBALAGEM, TEOR DE COBRE E GRAU ALCOÓICO NA FORMAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA DURANTE A ESTOCAGEM DE CACHAÇA.....	59
RESUMO	59
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1. Remoção de cobre da cachaça.....	66
2.2. Efeito do teor cobre, grau alcolico e cores das embalagem na formação do carbamato de etila.....	66
2.3. Efeito do teor de ureia e formação de carbamato no periodo de estocagem em garrafas transparentes.....	67
2.4. Quantificação carbamato de etila	68
2. 5. Análise estatística dos resultados	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4. CONCLUSÃO	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
CONCLUSÃO GERAL	83

RESUMO

BAFFA JÚNIOR, José Carlos D.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Mecanismos de formação do carbamato de etila durante produção e estocagem de aguardente de cana-de-açúcar.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: José Benício Paes Chaves, José Antonio Marques Pereira e Juraci Alves de Oliveira

O carbamato de etila (CE) ou uretana é um éster de etila do ácido carbâmico que ocorre em níveis baixos (ng/L ou mg/L) em muitos alimentos fermentados e bebidas destiladas como vinhos, whisky e cachaças. O CE é genotóxico e carcinogênico para um grande número de espécies como ratos, camundongos e macacos. O composto foi classificado pela Organização Mundial da Saúde (Agência de Pesquisa do Câncer) como pertencente ao grupo 2A, o que significa que é cancerígeno ao homem. O seu limite de ingestão diária aceitável (IDA) é de $0,3 \text{ ng.Kg}^{-1}$ por dia, porém esse nível foi calculado através de estudos em alimentos como pão e produtos fermentados do leite. As bebidas destiladas não foram incluídas nesses cálculos apesar de serem os produtos que maior apresentaram contaminação pelo carbamato de etila, alcançando valores de 12 mg/L. Portanto bebidas como a cachaça devem ser consideradas uma das principais fontes desse composto tóxico, ainda mais em países como o Brasil onde o consumo do produto é elevado. O Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento brasileiro através da Instrução Normativa Nº 13 de 21 de junho de 2005, propõe 150 $\mu\text{g/L}$ como limite máximo deste contaminante em cachaças. Entretanto não se tem o conhecimento da(s) sua(s) via(s) de formação no processo de produção da cachaça. Três hipóteses são apresentadas, mas necessitam serem confirmadas por estudos mais aprofundados. Em primeiro existe a possibilidade da uréia, proveniente do metabolismo da principal levedura do processo, *Saccharomyces cerevisiae*, reagir com etanol e formar o carbamato de etila durante o processo de fermentação. Para analisarmos esta hipótese analisamos o processo de fermentação alíquotas foram retiradas para análises da quantidade do composto. O teor de carbamato de etila após a fermentação foi de $122076 \mu\text{g.L}^{-1}$. A hipótese foi confirmada ao aumentar a concentração de ureia no caldo e consequentemente promover uma maior formação de carbamato. Analisamos a etapa de destilação em suas frações cabeça, coração e cauda que apresentaram teor de $59.700 \mu\text{g.L}^{-1}$, $52 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1.570 \mu\text{g.L}^{-1}$ de CE respectivamente. Para o resíduo contido no alambique de cobre, o vinhoto a concentração de carbamato de etila foi de $53.070 \mu\text{g.L}^{-1}$. Outra hipótese verificada foi uma cadeia de reações envolvendo compostos glicocianogênicos utilizando o cobre como catalisador para formação do carbamato de etila. Nesse estudo podemos concluir que existe mais de um mecanismo de formação do carbamato de etila durante a fermentação.. O segundo mecanismo está relacionado ao teor de compostos cianogênicos que sofre oxidação

liberando o cianeto que reage com etanol para formação de CE. Por fim, um terceiro mecanismo está correlacionado com a concentração do aminoácido arginina, mesmo em pequena concentração entraria no ciclo da ureia proporcionando uma maior formação de ureia e com isso maior formação do carbamato de etila. A fermentação é a etapa que mais produz o carbamato de etila, em níveis de mg, bem acima do permitido pela legislação brasileira. Essa alta concentração ao final das 24 horas pode estar associada a combinação dessas 3 vias de formação. Por fim a possibilidade de uma reação fotoquímica pós-destilação para formação do carbamato de etila envolvendo luz ultravioleta, cobre e composto glicocianogênicos foi verificada. Cachaças acondicionadas em garrafas âmbar, transparente, verde e azul, com e sem cobre foram avaliadas por 90 dias. Obtivemos resultados onde após 90 dias de estocagem mostram que o cobre é o catalisador da reação, pois os tratamentos sem cobre obtiveram uma média menor na concentração de carbamato de etila ao final ($62 \mu\text{g.L}^{-1}$). Os tratamentos com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e 10 mg.L^{-1} de cobre tiveram em média $164 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $228 \mu\text{g.L}^{-1}$ de teor de CE, respectivamente. Também após 90 dias de análises podemos afirmar que quanto maior o teor alcoólico maior a concentração de carbamato formado. Os teores alcoólicos avaliados de 40° GL , 45° GL e 50° GL apresentaram média de CE foi de $115,98 \mu\text{g.L}^{-1}$, $131,65 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $150,67 \mu\text{g.L}^{-1}$. Nos experimentos que avaliariam a interferência da luz, especificamente a ultravioleta, as garrafas âmbar apresentaram em média um teor de carbamato 60 % a menos que as garrafas verdes, azuis e transparentes ao final dos 90 dias de estocagem. Quanto ao teor de compostos cianogênicos o destilado na ausência de luz ultravioleta (garrafa âmbar) obteve uma redução de apenas 9 %, 10 % e 14 % nas cachaças sem cobre, cobre no limite ($5,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e cobre 2 vezes o limite (10 mg.L^{-1}) respectivamente. Porém na presença da luz ultravioleta a redução de compostos cianogênicos foi de 12 %, 18 % e 24 % sem cobre, cobre no limite ($5,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e cobre 2 vezes o limite (10 mg.L^{-1}) respectivamente. Podemos então concluir que o processo de oxidação dos compostos cianogênicos através da luz ultravioleta e a sua conversão em carbamato de etila pela reação com etanol existe. Portanto, como medidas preventivas afim de evitar a formação do carbamato, recomendamos a estocagem da cachaça em garrafas âmbar na ausência de cobre após uma destilação com coleta separada das frações (cabeça, coração e cauda).

ABSTRACT

BAFFA JÚNIOR, José Carlos D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2011. **Mecanismos de formação do carbamato de etila durante produção e estocagem de aguardente de cana-de-açúcar.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-Advisers: José Benício Paes Chaves, José Antonio Marques Pereira.

The ethyl carbamate (EC) or urethane is an ethyl ester of carbamic acid that occurs at low levels (ng / L or mg / L) in many fermented foods such as wines and spirits, whiskey and rum. The EC is genotoxic and carcinogenic to a large number of species including rats, mice and monkeys. The compound has been classified by the World Health Organization (Agency for Research on Cancer) as belonging to group 2A, which means that it is carcinogenic to humans. Its limit of acceptable daily intake (ADI) is 0.3 ng.Kg⁻¹ per day, but that level was calculated by studies in foods such as bread and fermented milk products. The spirits were not included in these calculations despite being the largest products were contaminated by ethyl carbamate, reaching values of 12 mg / L. So drinks like rum should be considered a major source of this toxic compound, even in countries like Brazil, where consumption of the product is high. The Ministry of Agriculture and Livestock and Food Supply of Brazil by Instruction No. 13, June 21, 2005, proposes 150 mg / L as the upper limit of the contaminant in cachaça. However there is no knowledge of (s) your (s) route (s) of training in the production of rum. Three hypotheses are presented, but need to be confirmed by further studies. First there is the possibility of urea, derived from the metabolism of the main process of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, reacts with ethanol to form ethyl carbamate during the fermentation process. To analyze this hypothesis we analyzed the process of fermentation aliquots were removed for analysis of the amount of the compound. The content of ethyl carbamate after fermentation was 122,076 microg.L⁻¹. The hypothesis was confirmed by increasing the concentration of urea in the broth and hence promote further formation of carbamate. We analyzed the distillation step in fractions head, heart and tail that had content microg.L⁻¹ 59700-1, 52 µg.L⁻¹ and 1570 CE respectively. To the residue contained in the copper still, the stillage concentration of ethyl carbamate was 53,070 µg.L⁻¹. Another hypothesis was verified a chain of reactions involving compounds glicocianogênicos using copper as catalyst for the formation of ethyl carbamate. In this study we can conclude that there is more than one mechanism of formation of ethyl carbamate during fermentation. The second mechanism is related to cyanogenic compounds that undergo oxidation releasing the cyanide reacts with ethanol to form EC. Finally, a third mechanism is correlated with the concentration of arginine, even at low concentration in the urea cycle would provide a greater formation of urea and a larger formation of ethyl carbamate. Fermentation is the step that produces the most ethyl carbamate, in mg levels

well above those permitted by Brazilian law. This high concentration at 24 hours may be associated with the combination of these three training courses. Finally the possibility of a photochemical reaction after distillation for ethyl carbamate formation involving ultraviolet light, and copper compound has been verified glicocianogênicos. Cachaças bottles packed in amber, transparent, green and blue, with and without copper were evaluated for 90 days. Returned results where after 90 days of storage show that copper is the catalyst of the reaction, because the treatments without copper had a lower mean concentration of ethyl carbamate to the end ($62 \mu\text{g.L}^{-1}$). The treatment with 5.0 mg.L^{-1} and 10 mg.L^{-1} of copper averaged 164 and $228 \mu\text{g.L}^{-1}$ content of CE, respectively. Also after 90 days of analysis we can say that the higher the alcohol content higher the concentration of carbamate formed. The levels of alcohol assessed 40° GL , 45 GL and 50 had an average GL was $115.98 \mu\text{g.L}^{-1}$ of EC, 131.65 and $150.67 \mu\text{g.L}^{-1}$. In experiments that would evaluate the interference of light, specifically ultraviolet amber bottles exhibited an average content of carbamate 60% less than the bottle green, blue and transparent to the end of 90 days of storage. As for the cyanogenic compounds in the distillate absence of ultraviolet light (amber bottle) achieved a reduction of only 9%, 10% and 14% in cachaças without copper, copper in the limit (5.0 mg L^{-1}) and copper 2 times the limit (10 mg.L^{-1}) respectively. But in the presence of ultraviolet light to reduce cyanogenic compounds was 12%, 18% and 24% without copper, copper in the limit (5.0 mg L^{-1}) and copper 2 times the limit (10 mg.L^{-1}), respectively. We can then conclude that the oxidation process of cyanogenic compounds by ultraviolet light and its conversion into ethyl carbamate by reaction with ethanol exists. Therefore, as preventive measures in order to prevent the formation of carbamate, we recommend storage of liquor bottles in amber in the absence of copper after distillation with a collection of separate fractions (head, heart and tail).

1- INTRODUÇÃO GERAL

O carbamato de etila (CE) ou uretana ($H_2NCOOC_2H_5$) é um éster de etila do ácido carbâmico. Pode ser comercializado de várias formas; como preparação e modificação de resinas de aminas, como base em pesticidas (drogas) e intermediários químicos da indústria têxtil (IARC 1974). No passado o CE era também usado como anti-neoplásico e outros fins medicinais (PATERSON et al., 1946). O carbamato de etila também foi usado como hipnótico em humanos e como anestésico para animais em laboratórios (HADDOW e SEXTON, 1946). Só em meados de 1940 foi descoberta sua toxicidade e carcinogenicidade (NETTLESHIP et al., 1943; HADDOW e SEXTON 1946). Por isso atualmente o carbamato de etila ou os carbamatos simples como fenil, metil ou butil são apenas usados para fins de pesquisas (GOTOR et al., 1999).

O carbamato de etila é genotóxico e carcinogênico em um grande número de espécies animais incluindo ratos, hamsters e macacos (BELAND et al., 2005). O CE é rapidamente absorvido pelo trato gastro-intestinal e pela pele (CHA et al., 2000). O seu metabolismo envolve 3 principais vias; N-hidroxilação, C- hidroxilação e Oxidação. A principal via é a conversão do carbamato de etila pelo citocromo P-450 para N-hidroxicarbamato, pois 90% do carbamato inicial é hidrolisado e apenas 8 a 10% é excretado sem modificações. O problema do metabolismo do CE está na formação de compostos ainda mais tóxicos, como o vinil carbamato, que é convertido em vinil epóxido por reações de epoxidação o qual é capaz de se ligar covalentemente ao DNA, RNA e proteínas (PARK et al., 1993).

Baseado nos inúmeros estudos toxicológicos do carbamato de etila órgãos internacionais como *International Agency for Research on Cancer* (IARC) reclassificou o composto como carcinogênico para humanos (BAAN et al., 2007).

A partir desses estudos foram determinados limites de ingestão diária aceitável (IDA) para o composto, que seria de 0,3 ng/Kg por dia, isto é, 0,3 ng de carbamato de etila a cada quilo de pessoa por dia (FAO/WHO,2007).

Carbamato de etila é um composto formado em alimentos e bebidas tais como pão, iogurte, vinho, cerveja e, principalmente, bebidas destiladas; como vinho, whisky e cachaça (STEVENS e OUGH, 1993).

Tendo em vista essa contaminação, o Canadá em 1985 através do “*Health and Welfare Department*”, estabeleceu os limites de carbamato de etila para bebidas alcoólicas sendo 30; 100; 150 e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para vinhos, vinhos fortificados; bebidas destiladas e destilados de frutas e licores, respectivamente (HWD,1985). Em março de 1990, o *Food and Drug Administration* publicou nota na qual os produtores de uísques americanos se comprometeram, a partir daquela data, a limitar o teor de carbamato de etila em 125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (FDA, 1990). No Brasil, a Instrução Normativa Nº 13 de 21 de junho de 2005, estabelece 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como limite máximo deste contaminante em cachaças, tendo um prazo de 5 anos para cada produtor promover a mudança (BRASIL, 2005). Portanto as cachaças a partir de agosto de 2010 devem estar com teor de CE abaixo do limite estabelecido. Porém em 09 de junho de 2010 em reunião a comissão decidiu prorrogar por mais 2 anos esse prazo.

Para o Brasil, o maior produtor mundial de cachaça (PBDAC, 2010), é importante garantir a produção de cachaça e outras bebidas com níveis de carbamato de etila dentro do regulamentado, não somente por ser um problema de saúde pública, quando encontrada concentrações superiores a 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mas também por constituir uma barreira à exportação da cachaça todos os países que já estabeleceram os limites de CE.

Considerando que a principal fonte de ingestão de carbamato de etila é através das bebidas destiladas, muitos países estipularam limites para esse composto (Tabela 01).

Tabela 01: Limites máximos para carbamato de etila em bebidas alcoólicas

Países	Vinho ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Vinho Fortificado ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Saquê ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Destilados ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Canadá	30	100	200	150
República Theca	30	100	200	150
França	Nr	Nr	Nr	150
Alemanha	Nr	Nr	Nr	Nr
USA	15	60	180	150r

Nr corresponde a não regulamentado (até o momento)

O carbamato de etila é produzido em baixos níveis (ng/L a mg/L) em bebidas destiladas por vários precursores como uréia, citrulina, compostos N-carbamil (carbamil-fosfato) e compostos cianogênicos pela reação com etanol. Porém os mecanismos de produção do carbamato serão discutidos posteriormente.

Andrade-Sobrinho et al. (2002) ao avaliarem carbamato de etila em 126 amostras de cachaças (63 da região sudeste, 39 da nordeste, 22 da sul e 2 da centro-oeste), verificaram que 21 % das amostras analisadas apresentaram teores abaixo do permitido pela legislação internacional. Este resultado é semelhante ao encontrado por Baffa Júnior et al. (2007) que foi de 22,7 % de amostras analisadas dentro dos padrões internacionais em um total de 57 marcas comerciais de cachaças da região da Zona da Mata Mineira.

Os resultados encontrados reforçam a necessidade de avaliação e quantificação dos níveis de carbamato de etila durante as etapas do processo de produção, e conhecimento dos mecanismos de formação do composto, visando o desenvolvimento de métodos para a diminuição ou eliminação do contaminante,

Apresentaremos e discutiremos três mecanismos de formação para o carbamato de etila ao longo dos capítulos da tese.

- Durante a fermentação correlacionando o aminoácido nitrogenado (arginina) que atua como precursores da uréia durante a

fermentação. Essa por sua vez reage com etanol formando carbamato de etila (capítulo 2).

- A partir de compostos cianogênicos proveniente da cana que formam o carbamato de etila (em soluções hidroalcoólicas e durante fase gasosa) (capítulos 2 e 3).
- A partir das reações de mecanismo fotoquímico pós-destilação envolvendo luz ultravioleta, cobre e compostos glicocianogênicos, para formação do carbamato de etila (capítulo 3).

OBJETIVO GERAL

- Quantificação do carbamato de etila nas etapas de produção da cachaça (fermentação, destilação e armazenamento).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elucidar a via de formação do carbamato de etila, durante fermentação alcoólica proporcionada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, através dos principais precursores nitrogenados (Arginina e Uréia) e compostos cianogênicos;
- Avaliar o efeito do processo de destilação, na redução da concentração de carbamato de etila, quantificando-o nas frações (cabeça, coração e cauda);
- Determinar a concentração de cobre nas frações da destilação e sua possível relação com a formação do carbamato de etila;
- Verificar a formação de carbamato de etila após a destilação. A partir da reação da uréia com etanol sendo o cobre um catalisador;
- Elucidar um possível mecanismo fotoquímico após a destilação (armazenamento) que desencadeia a reação de formação do carbamato de etila, envolvendo cobre, luz e compostos cianogênicos;

- Avaliar a relação embalagens de diferentes cores no acondicionamento e na formação de carbamato de etila.

CAPÍTULO 1

QUANTIFICAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DURANTE AS ETAPAS DE PRODUÇÃO DE AGUARDENTE E DE SEUS PRODUTOS DISPONÍVEIS EM MERCADOS DA CIDADE DE VIÇOSA- MG

RESUMO

Durante o processo de produção de cachaça (fermentação, destilação e estocagem) inúmeros compostos nocivos à saúde podem ser formados. O carbamato de etila (CE) é um desses, conhecido por ser genotóxico e carcinogênico, tendo seu limite estabelecido para vários alimentos. O ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa Nº 13 de 21 de junho de 2005, propõe $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como limite máximo deste contaminante em cachaças. Assim, torna-se importante quantificar o CE durante as etapas de fabricação da cachaça. Este trabalho tem como objetivo verificar onde é produzido o carbamato de etila no processo de fabricação da cachaça. Com intuito de verificar a presença de CE, as frações cabeça, coração e cauda do destilado foram analisadas e durante às 24 horas de fermentação alíquotas foram retiradas para quantificação do composto. O teor de carbamato de etila após a fermentação foi de $122.076 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. As frações cabeça, coração e cauda apresentaram teor de $59.700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1.570 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CE respectivamente. Para o resíduo contido no alambique de cobre, o vinhoto, a concentração de carbamato de etila foi de $53.070 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Verifica-se que em todas as etapas analisadas houve a formação de CE, e os valores obtidos estão acima do limite máximo estabelecido pela legislação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CACHAÇA: HISTÓRICO E PRODUÇÃO.

A história da cachaça se confunde com a própria história do Brasil. Foi a primeira bebida destilada produzida na América Latina, descoberta entre os anos 1534 e 1549, durante o processo de produção do açúcar. Ali surgia a aguardente de cana genuinamente brasileira, denominada cachaça (ABRABE, 2010).

A industrialização da cana-de-açúcar no Brasil tem grande importância econômica, estimando-se que cerca de 15 milhões de pessoas, direta ou indiretamente empregadas, estejam envolvidas nas atividades de produção de cachaça, álcool, açúcar, melado e rapadura (SEBRAE, 2005).

Apesar da tradição e importância da cachaça, a cadeia produtiva do país não é tecnologicamente homogênea, havendo uma busca no desenvolvimento de tecnologias para aprimorar, controlar a qualidade e a padronização da bebida (MIRANDA, 2005). Estes dois fatores, qualidade e padronização, são essenciais para que a cachaça atinja patamares mais altos de consumo no mercado externo e interno. Em ambos os mercados se vêem aumentar as pressões para a melhoria da qualidade. No mercado externo percebe-se que as exigências relativas à especificação de produtos e insumos estão substituindo gradativamente as barreiras tarifárias, transformando-se em fator determinante do protecionismo comercial e do ganho de mercado (SEBRAE, 2005). Desta maneira, os produtos que atenderem ou superarem a qualidade exigida terão maiores chances de conquistar o mercado, e aqueles que não chegarem a esta meta, apenas não serão aceitos, sendo retirados do mercado.

Da mesma maneira que no exterior, as exigências de qualidade se tornam mais intensas também no mercado interno. Os produtores buscam melhores equipamentos e serviços, enquanto os consumidores buscam por produtos que traduzam sua expectativa de satisfação, qualidade e status, determinando sua escolha.

Legalmente a cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose (BRASIL, 2003). As aguardentes de cana-de-açúcar, que abrangem as cachaças, podem ter graduação alcoólica de até 54° GL.

Devido à dinâmica do setor produtivo da cachaça, sua alta informalidade e a extensão territorial da Federação, torna complexa a atualização dos dados sobre a produção em cada Estado. Tendo uma economia mais dinâmica, o Estado líder na produção de cachaça é São Paulo, respondendo por cerca de 44 %. Em seguida vêm Minas Gerais, com cerca de 13 - 15 %; Pernambuco, 12 %; Ceará, 12 %; Goiás e Rio de Janeiro, 11 - 12%, em proporção similar; Paraná, 4 %; Paraíba 2 % e Bahia 1,5 % (GONTIJO, 2002; JANZANTTI, 2004; FOLHA ON LINE, 2008; COOCACHAÇA, 2009). Com mais de 5 mil marcas e 30 mil produtores no Brasil, gerando 400.000 empregos (ABRABE, 2010), estimativas atuais mais otimistas apontam para uma produção anual de 1,8 bilhão de litros (CAMPILLO, 2005; ELVAS e RIZZO, 2008). Deste volume, 1,3 bilhão de litros são produzidos em colunas de destilação, por processo contínuo, e 500 milhões de litros em alambiques, por processo em batelada (CAMPILLO, 2005).

No Brasil a cachaça pode ser informalmente dividida em três segmentos: as industriais, as artesanais e as informais, sendo que as últimas não têm qualquer tipo de registro.

Denominam-se cachaças industriais aquelas produzidas em larga escala, utilizando-se de colunas contínuas de destilação, leveduras prensadas no processo de fermentação e outros processos não convencionais em um sistema artesanal, como a queima da cana antes da colheita. As empresas produtoras concentram-se nos estados de São Paulo, Ceará, Pernambuco e Rio de

Janeiro, e respondem pela maior parte da produção nacional, chegando a mais de 70 % do total produzido (ABRABE, 2010) .

As cachaças denominadas artesanais ou de alambique são aquelas indústria de pequeno porte, onde normalmente se emprega mão-de-obra familiar. A produção da cachaça é feita utilizando-se fermento caipira ou selvagem, destilado em alambiques de cobre, com separação das frações do destilado, entre outros procedimentos. Estes procedimentos caracterizam a cachaça artesanal como de melhor qualidade sensorial do que as industriais. A produção chega a 400 milhões de litros anuais, segundo o Ministério da Agricultura (OLIVEIRA et al., 2005).

As colunas de destilação, geralmente, são capazes de produzir anualmente, em média, cerca de 30 vezes ou mais que os alambiques, o que explica a menor produção em certos Estados com grande dimensão territorial, como é o caso da Bahia, onde, praticamente, toda a cachaça é proveniente de alambiques (CACHAÇA a, 2008).

O Estado de Minas Gerais possui tradição como produtor de boa cachaça. A crença de que a maior parte de sua produção é elaborada de forma artesanal também é geral, embora sejam usadas várias colunas de destilação em algumas regiões. Entretanto, Minas Gerais tem o problema de possuir áreas com bolsões de isolamento técnico-científico, econômico e cultural, que geram um número de produtos de qualidade inferior, fato comprovado pelo seu alto índice de não conformidades (LABANCA, 2004). São Paulo, Pernambuco, Ceará e Rio de Janeiro produzem um considerável volume de cachaça usando colunas de destilação, que coexiste com uma produção bem inferior em alambiques.

O processo de produção da cachaça artesanal baseia-se nas etapas; colheita- Transporte-extração do caldo- limpeza do caldo- preparo do mosto-; fermentação; destilação e estocagem e envelhecimento (Figura 01).

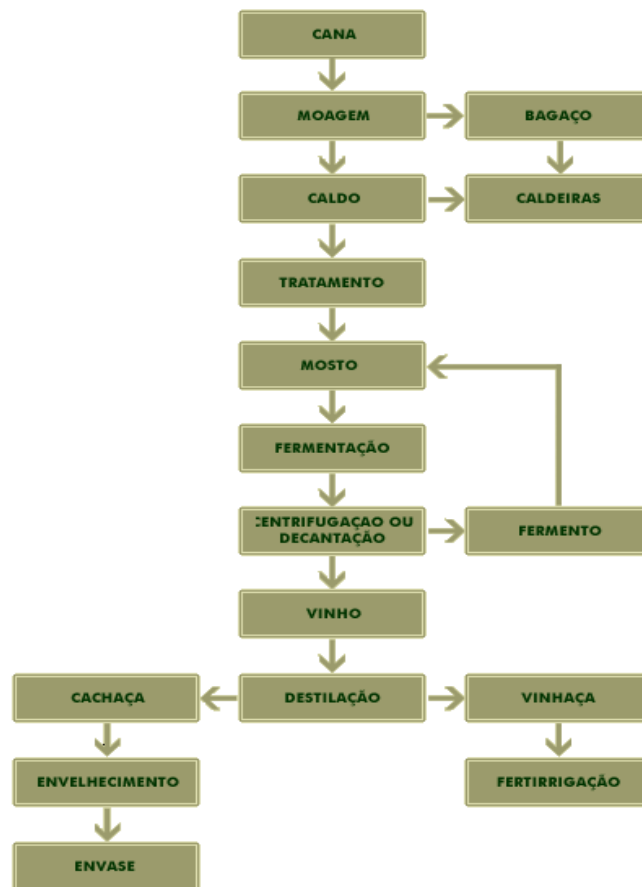


Figura 01: Fluxograma do processo de produção de cachaça.

A cana usada na produção do destilado artesanal é colhida manualmente e não é queimada, prática que precipita sua deterioração. Depois de cortada, a cana madura, fresca e limpa deve ser moída num prazo máximo de 36 horas. As moendas separam o caldo do bagaço, que será usado para aquecer as fornalhas do alambique. O caldo da cana é decantado e filtrado para, em seguida, ser preparado com a adição de nutrientes e levado às dornas de fermentação. Algumas moendas são movidas por motor elétrico, outras por rodas d'água, e têm a função de espremerem a cana, para dela extraírem o suco (ABRABE, 2010).

1.2. FERMENTAÇÃO

As leveduras são organismos unicelulares de interesse industrial pertencentes à classe dos Ascomicetos, sendo a *Saccharomyces cerevisiae*, sob o ponto de vista industrial, uma das espécies mais importantes e utilizada nos diversos processos fermentativos de indústrias de alimentos e bebidas

Nas regiões onde se desenvolvem processos fermentativos a presença de leveduras nativas ou selvagens é comum. Elas sobrevivem nas superfícies dos colmos da cana, nas folhas, no solo, nos maquinários e equipamentos utilizados durante o preparo do mosto e até no ar (ROSA, 2000; MUTTON e MUTTON, 2005). Por estarem ecologicamente adaptadas, são capazes de fermentar naturalmente. Entretanto, esta fermentação não controlada é inadequada, lenta e de baixo rendimento (MUTTON e MUTTON, 2005).

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico anaeróbico que consiste de reações em que o açúcar e outros compostos presentes no mosto (mosto fermentado) são transformados em etanol, CO₂ e outras substâncias que serão decisivas para a qualidade da bebida. É um processo exotérmico em que são produzidas apenas 2 moléculas de ATP por molécula de glicose. Portanto, não é eficaz para a multiplicação celular, mas essencial para a produção de etanol. No final do processo ocorre redução da atividade fermentativa, pela deficiência de açúcares, com conseqüente diminuição da temperatura (FARIA et al., 2003; JANZANTTI et al., 2004; NOGUEIRA et al., FILHO, 2005).

Além formação do etanol, a fermentação é a maior responsável pelo elevado número de componentes presentes na cachaça. Por isso, além dos cuidados com seu controle, esta é a principal etapa do processo de produção da cachaça e de outras bebidas destiladas (JANZANTTI et al., 2004).

Durante o processo conhecido como “artesanal”, os produtores preparam receitas próprias do fermento (natural) iniciador ou “pé-de-cuba”, principalmente adicionando ao caldo de cana, fubá de milho, farelo de arroz e caldo de limão ou laranja, de modo a acidificar o substrato. Essa mistura é deixada fermentar

por 5 a 20 dias em recipientes separados, ou na própria dorna, com posterior adição do caldo de cana (14 a 16° Brix) para o desenvolvimento da microbiota fermentadora (ROSA et al., 2000; PATARO et al., 2003). O processo fermentativo normalmente ocorre entre 20 e 36 h. Após este período, as leveduras sedimentam no fundo da dorna e o vinho é recolhido e destilado (PATARO et al., 2003).

1.3. DESTILAÇÃO

Destilação é a técnica utilizada para separar, selecionar e concentrar, pelo aquecimento, componentes voláteis específicos de uma “mistura líquida” (BOZA e HORII, 1988; LÉAUTÉ et al., 1990). Depois da fermentação, a destilação é o ponto determinante de maior importância na qualidade da bebida destilada (BOZA e HORII, 1988; JANZANTTI et al. 2004).

A destilação também promove algumas reações químicas induzidas pelo calor (BOZA e HORII, 1988), como a formação de acroleína (NYKÄNEN et al. 1991) e outros compostos aromáticos heterocíclicos provenientes da reação de Maillard, como os furanos (furfural, etc.), pirazinas e piridinas (LÉAUTÉ et al., 1990; JANZANTTI et al. 2004). Além disso, a destilação provoca a extração de certos ésteres de cadeia longa retidos nas células das leveduras ao final da fermentação, transferindo-os aos destilados (NYKÄNEN et al., 1991).

Coexistem na produção de cachaça dois sistemas bem diferenciados: “contínuo” e “por bateladas”. No sistema contínuo tradicional emprega-se uma coluna de destilação, alimentada pelo “vinho” de forma ininterrupta. No sistema “por bateladas”, típico dos alambiques, todo o volume do “vinho” a ser destilado é transferido para a panela antes de ser iniciada a destilação (MAIA et al., 2000).

Os distintos sistemas de destilação são, freqüentemente, utilizados para diferenciar o tipo de cachaça e sua forma de produção. Assim, a cachaça industrial seria aquela produzida a partir de colunas de destilação, de qualquer porte, por processo contínuo, e a cachaça de alambique a elaborada em

alambiques em cobre, com volume limitado. Dentre as práticas não “enquadradas” nesse último processo, podem ser citadas a queima da cana-de-açúcar e a utilização de coadjuvantes químicos na fermentação (AMPAQ, 2006).

O alambique simples emprega apenas uma panela, geralmente em cobre ou aço inox, onde o mosto fermentado é aquecido até ebulição do seu destilado. Esse equipamento, também denominado aparelho de destilação, comporta inúmeras variações quanto às características geométricas externas e retificadoras internas (existência de pratos, borbulhadores, etc.) da coluna, da alonga e do sistema de resfriamento (PINTO, 1986; MAIA, 2000). O destilado apresenta elevada graduação alcoólica (65 a 70) % em volume no início da operação, sendo recomendada a separação de (5 a 10) % do volume teórico total da aguardente a ser obtida pela destilação inicial. Esta é conhecida como destilado de cabeça, rica em aldeídos, acetato de etila, ácidos graxos, caprato e caprilato de etila (LÉAUTÉ et al. 1990; ; MAIA et al. 2000; MUTTON e MUTTON, 2002), e outros compostos voláteis que tenham maior afinidade pelo etanol do que a água, fator de maior relevância que as temperaturas de ebulição individuais (MAIA et al. 2000). Depois, separa-se a fração conhecida como destilado de coração, contendo menor proporção dos componentes da cabeça, como os ésteres, aldeídos, alcoóis superiores, além do lactato de etila e da fração dos ácidos voláteis de cadeia longa e demais produtos secundários indesejáveis em concentrações mais elevadas que as preconizadas, formados na fermentação ou dentro do próprio alambique (LÉAUTÉ et al. 1990; JANZANTTI et al. 2004; MUTTON e MUTTON, 2005). O “coração” representa cerca de 80 % do volume do destilado. Por apresentar menor quantidade de substâncias indesejáveis, constitui-se na sua melhor fração.

Na prática, costuma-se controlar a graduação em torno de (45 a 50) % vol na caixa de recepção, quando então se a coleta é interrompida. Por último, são retirados os componentes com ponto de ebulição mais alto e maior afinidade pela água. Esta fração (cauda) possui altos teores de furfural e de outros menos desejados como o ácido acético e a fração mais “pesada” dos

álcoois superiores, conhecida como “óleo fúsel” (NYKÄNEN et al. 1991MUTTON e MUTTON, 2005,). A “cauda”, também denominada de “água-fracca”, corresponde a 10 % do volume total do destilado, sendo coletada desde a graduação alcoólica de 38 % vol até, aproximadamente, 10 % vol.

O aquecimento da caldeira (ou panela) de destilação pode ser realizado de modo direto ou a vapor. Esta operação deverá ser lenta e gradual, pois o aquecimento brusco do caldo fermentado poderá fazer com que o aparelho “vomite”, ou seja transborde.

O carbamato de etila é um dos compostos nocivos à saúde produzido em baixos níveis (ng/L a mg/L) em bebidas destiladas como a cachaça.

Para o Brasil, o maior produtor mundial de cachaça, é muito importante conhecer os níveis de carbamato de etila presentes, não somente por ser um problema de saúde pública, quando encontrado em concentrações superiores a $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mas também por representar uma barreira à exportação da cachaça para a Europa e América do Norte (LIMA-NETO et al., 2003), devido a legislação daqueles países.

Portanto o objetivo deste trabalho é quantificar o teor de carbamato de etila nas etapas de produção da cachaça (fermentação, destilação) e em cachaças comercializadas; Identificar os pontos de produção do CE; Definir os possíveis precursores do carbamato de etila durante o processo de produção da cachaça.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma fábrica de cachaça, no município de Cajuri, Minas Gerais, Brasil. Durante o processo, 600 litros de caldo de cana de açúcar (16° Brix) foram adicionados a 200 litros de fermento; conhecido por pé de cuba e obtido pela fermentação previa do caldo de cana-de-açúcar. A fermentação foi conduzida sem nenhuma adição de nutrientes ao caldo de cana a 28° C em dorna de inox. Após 24 horas, os 600 litros do fermentado (chamando de vinho) foi destilado em alambique de cobre utilizando o próprio bagaço de cana como fonte de energia para o aquecimento. Foram adquiridas 82 amostras de cachaças dos mercados do município de Viçosa, todas elas permitidas pelo MAPA.

2.1. Preparo das amostras para cromatografia

2.1.1 Coleta das amostras na fermentação

A amostras foram coletadas durante as 24 horas de fermentação em intervalos de 6 horas e imediatamente congeladas.

Em laboratório as amostras foram centrifugadas a 5000 x g para retirada de células e impurezas. Depois filtradas em filtros Millipore® 0,22 µm e armazenadas a - 4 °C para análises cromatográficas.

2.1.2 Coleta das amostras na destilação

Durante o processo de destilação amostras foram coletadas das frações cabeça, coração e cauda. Sendo os volumes acumulados 4 e 8 L (cabeça), 10, 28, 48, 68, 88, 108, 128 L, (coração) e 133, 138, 143, 148 L (cauda). As amostras filtradas (filtros Millipore® 0,22 µm) e armazenadas a - 4 °C para as análises cromatográficas.

2.2. Quantificação de carbamato de etila

Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, com detector de massas Shimadzu QP-5050A tendo como fonte de ionização o impacto eletrônico com 70 eV. Foi utilizada coluna cromatográfica capilar de fase polar (polietilenoglicol), DB-WAX (60 m x 0,25 mm x 0,50 μm). As temperaturas do injetor e da interface do detector foram ambas de 220 °C. Empregou-se a seguinte programação de temperatura para o forno: início com 90 °C (2 min), elevação a 150 °C a uma taxa de 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$, seguido de um aquecimento para 230 °C a uma taxa de 40 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ permanecendo por 10 min. O volume injetado foi de 2,0 μL “splitless”. Gás de arraste hélio (5.0) com fluxo de 1,5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. Modo de aquisição SIM, monitorando os íons de m/z 62, 74 e 89.

A quantificação foi realizada através da comparação dos resultados cromatográficos das amostras com uma curva analítica obtida a partir de uma solução estoque de carbamato de etila da New Química[®] 99 % 2,0 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ em etanol:água (40:60 v/v). Diluições foram realizadas abrangendo a faixa de concentração de 0,005 – 1,0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ ($y = 229,9x - 5399$, $R^2 = 0,9987$).

2.3. Determinação do Teor alcoólico

O picnômetro foi previamente lavado com água e depois com álcool; posteriormente colocado em uma estufa e pesado. Depois de preenchido com água, o picnômetro foi pesado a 20 °C. O procedimento de lavagem foi repetido e feita a secagem em estufa. Após resfriamento, o picnômetro foi preenchido com amostra até o seu transbordamento e pesado a 20 °C.

Foi realizado o seguinte cálculo de densidade a 20 °C. $D_{20} = (P_{am} - P_p) / (PH_2O - P_p)$, em que P_p = peso do picnômetro vazio, P_{am} = peso do picnômetro com amostra e PH_2O = peso do picnômetro com água.

Os valores obtidos foram comparados com uma tabela (densidade x

grau alcoólico) e foram determinados os teores alcoólicos em GL das amostras (A.O.A.C, 1995).

2.3.Determinação do teor de cobre nas cachaças

O teor de cobre foi analisado por digestão nitro-perclórica, seguido de diluição em água milli-Q e analisado por espectrometria de plasma com medida quantitativa de emissão óptica com plasma indutivelmente acoplado em espectrofotômetro (Perkin Elmer 3300 DV), com 40 MHz de frequência e rede de difração dupla de 374 linhas /mm, sob as seguintes condições de operação: Força do gerador: 1300 W, Vazão do gás plasma 15 L·min⁻¹, Pressão do nebulizador: 60 psi, Nebulizador: Conespray, Modo de integração: área de pico com três pontos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Concentração de carbamato de etila durante as etapas de produção da aguardente

3.1.1 Fermentação

Durante a fermentação do mosto do caldo de cana a formação de carbamato de etila é crescente, tal como pode ser observado na Figura 02. A concentração de CE no mosto fermentado alcança níveis de até $159,9 \times 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ após as 24 horas de fermentação, sendo o valor médio das repetições de $122,08 \times 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. (Figura 02).

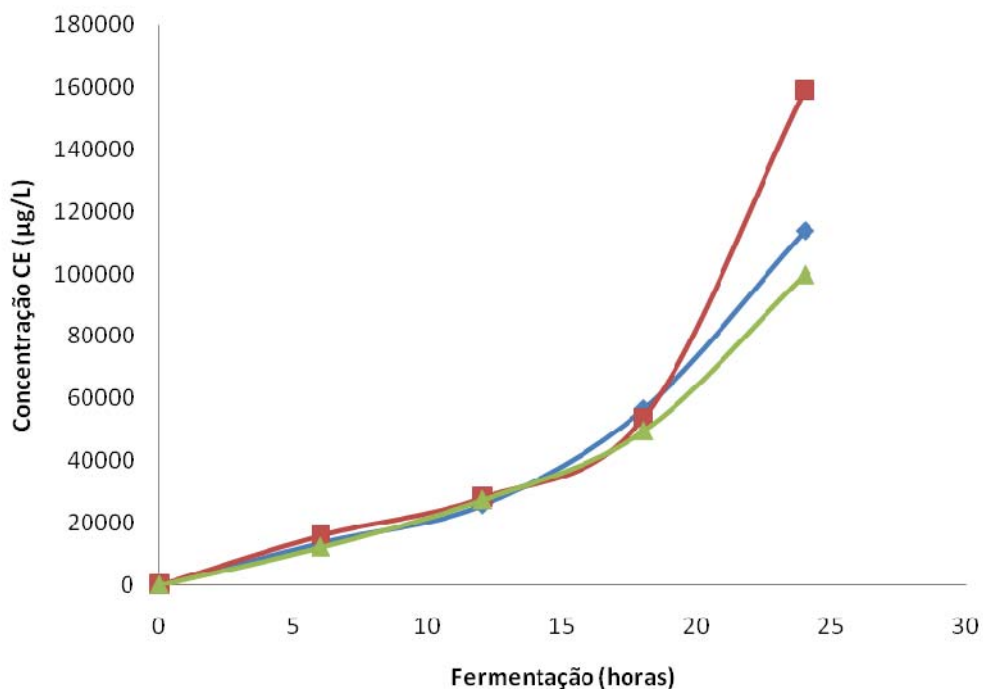


Figura 02: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de CE durante a fermentação mosto do caldo de cana-de-açúcar no processo de produção de cachaça (■ Repetição 1, ▲ Repetição 2, ■ Repetição 3).

Pode se observar na Figura 02 que até as 18 horas de fermentação os níveis de CE no mosto fermentado são em média de $38,4 \times 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Porém após as 18h de fermentação ocorre um aumento considerável.

Nota-se um comportamento quase exponencial da concentração média de CE sugerindo mais de um mecanismo de formação durante a etapa de fermentação. As vias de formação podem variar em função da composição do material a ser fermentado e de possíveis precursores presentes no mosto em fermentação. A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*), matéria-prima para a produção da cachaça, é classificada como uma planta cianogênica. Esses compostos cianogênicos podem servir de precursores para a formação do carbamato de etila, porém a fonte de cianeto ainda não é conhecida (BEATTIE & POLYBLANK, 1995).

Três vias são propostas para formação do carbamato de etila durante a fermentação do suco de uva. A primeira envolve compostos que possuem cianeto (CN) em sua composição, sofrem oxidação e formam o cianato que pode reagir com álcool e formar o carbamato de etila (GUERAIN & LEBLOND, 1992). A segunda via é baseada na auto-oxidação sob influência da luz UV em compostos insaturados presentes nas bebidas alcoólicas, a qual produz radicais livres que catalisam a oxidação dos compostos a cianeto (GUERAIN & LEBLOND, 1992). Os fatores que influenciam a formação do carbamato de etila a partir do cianeto são o pH, luz, teor alcoólico, temperatura e concentração de cobre (BATTAGLIA et al., 1990; RIFFIKIN et al., 1989). A reação de proteínas com etanol catalisada por cobre é proposta como alternativa para formação de CE, em vez da via cianeto, em bebidas destiladas (RIFFIKIN et al., 1989). A terceira via é a simples reação da ureia proveniente do metabolismo das leveduras com a molécula de álcool, tendo o cobre como catalisador.

3.1.2. Destilação

Após a fermentação o mosto foi submetido à operação de destilação. Na primeira fração coletada a cabeça (8L) a concentração de CE foi de $59,7 \times 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, confirmando que a cabeça não é apropriada para o consumo e nem para uso em destilações posteriores (uma prática costumeira de produtores da

cachaça artesanal). Os resultados mostram a importância de uma boa separação das frações cabeça e coração. Em alambiques de fogo direto (alimentação direta) a temperatura de destilação fica em torno de 100 °C e o vapor alcoólico existente a menos de 90 °C, temperaturas bem abaixo do ponto de ebulição do carbamato de etila, que é de 186 °C (NEVES et al., 2007). Apesar das condições de temperatura, o CE é arrastado durante a etapa de destilação. O CE presente na cabeça pode ser devido a interações moleculares entre o etanol e os compostos químicos presentes como aldeídos, álcoois superiores, ésteres, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas e ácidos orgânicos, dentre outros.

Em contrapartida, a cauda apresentou valores bem menores do que a cabeça quanto a concentração de carbamato de etila ($1,57 \times 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) porém, em níveis bem acima dos estabelecidos pela legislação brasileira e legislação internacional para bebidas destiladas.

A Figura 03 apresenta o comportamento do nível de carbamato nas frações coração e cauda. Pode se verificar que em determinados pontos da fração coração o nível de CE é superior a $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mas a concentração final está abaixo do limite estabelecido (Figura 04). Essa oscilação pode ser explicada pelo sistema de aquecimento do alambique, queima do bagaço, o qual não promove uma taxa constante de transferência de calor. A taxa de transferência depende da frequência de alimentação do bagaço de cana na fomalha.

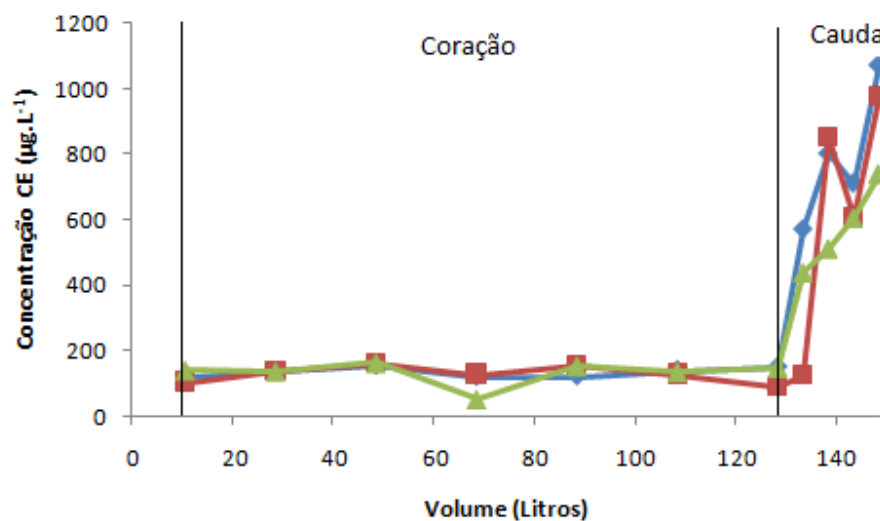


Figura 03: Concentração de carbamato de etila durante a etapa de destilação (volumes acumulados) coração e cauda. (■Repetição 1, ▲Repetição 2, ■Repetição 3)

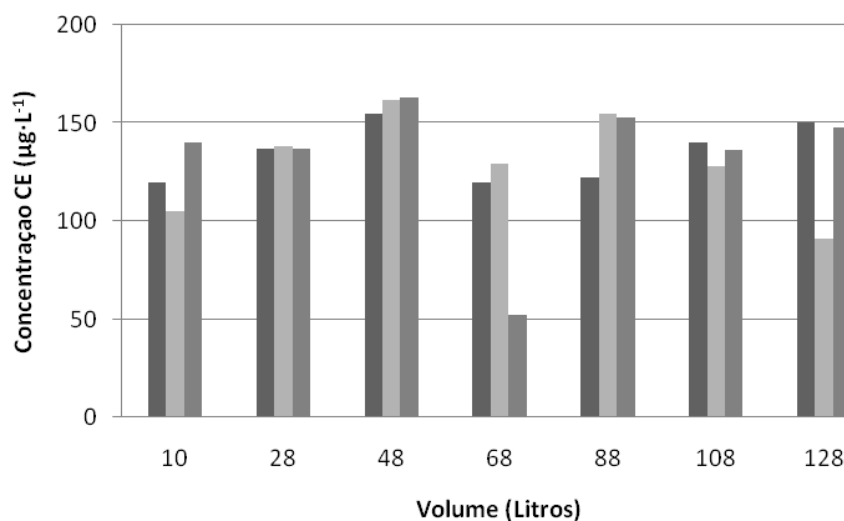


Figura 04: Gráfico em barras da concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de carbamato de etila na fração coração(■Repetição 1, ■Repetição 2, ■Repetição 3).

Por fim, foi analisado o teor de carbamato para o resíduo contido no alambique de cobre, vinhoto, que foi de $53070 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Era de se esperar uma alta concentração de CE no vinhoto devido ao alto ponto de ebulição do

carbamato de etila e por apenas parte desse composto ser arrastado durante a destilação.

Quanto ao teor alcoólico, podemos observar na figura 05 que as amostras analisadas possuem uma regularidade nas repetições; na porção da cabeça (até 8 L) o teor era de aproximadamente 65 % (v/v), na fração coração (dos 10 L até 128 L) esse valor caiu para 35 % e finalmente na cauda (133 a 148 L) o teor alcoólico estava abaixo de 20 % quando a destilação foi finalizada. Após a mistura das frações do coração, o produto final (Cachaça), apresentou o teor alcoólico próximo a 44 % (v/v), em acordo com a legislação brasileira.

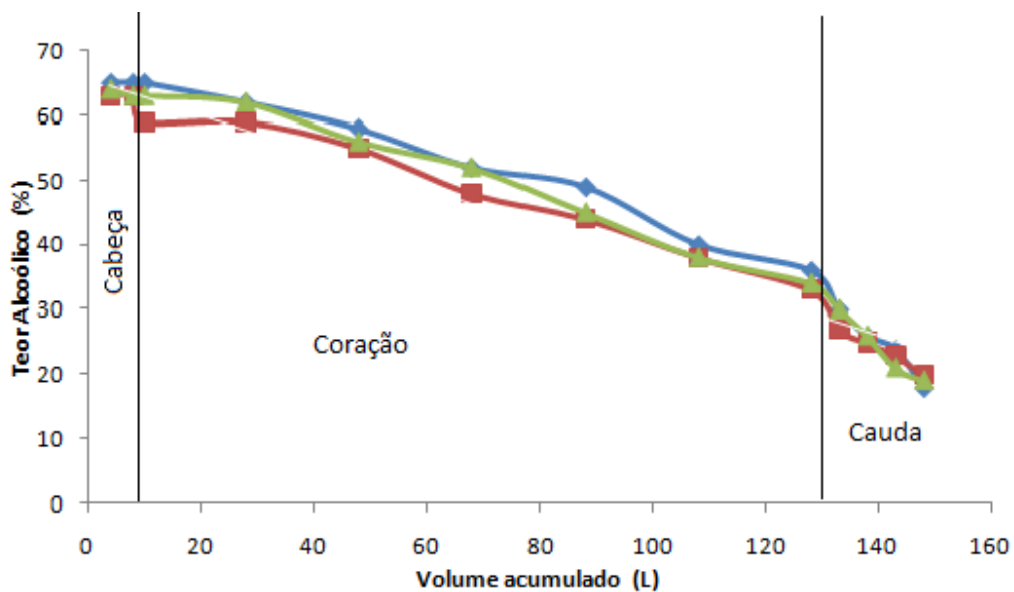


Figura 05: Teor alcoólico (%) das frações do destilado; cabeça, coração e cauda. (■ Repetição 1, ▲ Repetição 2 e ■ Repetição 3)

A tabela 02 apresenta os resultados das análises de cobre (Cu^{++}) nas frações (cabeça, coração e cauda). A legislação brasileira exige que o teor de cobre seja inferior a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$, e pode ser observado que a fração coração está de acordo com a legislação. A cabeça possui altos níveis de cobre,

indicando que dever ser feita a separação correta das frações durante o processo de destilação para garantir a qualidade da cachaça.

Tabela 02: Teor de cobre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) nas frações do destilado e do caldo de cana

Amostras	Concentração de Cobre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	1*	2*	3*
Caldo de cana	0,049	0,058	0,055
Cabeça	8,680	8,850	8,750
Coração	2,970	3,330	3,110
Cauda	5,280	5,150	5,116

* repetições

Os efeitos tóxicos das altas concentrações de cobre são investigados, assim como a determinação desse elemento em bebidas destiladas, devido a sua capacidade de causar danos a saúde (GOYER & CHERIAN, 2007). Os produtores consideram que a destilação em alambiques de cobre é necessária para garantir a boa qualidade sensorial do produto, devido o efeito catalítico na formação do aroma (NEVES et al., 2007). A troca de cobre por aço inoxidável nos reatores, para eliminação da contaminação por cobre, se mostrou eficiente, porém houve perda na qualidade sensorial do produto (FARIA et al., 1989; FARIA et al., 1993; FARIA, et al., 2004). Muitos estudos demonstram a perda da qualidade da cachaça em ausência de cobre devido a presença de compostos sulfurados (FARIA et al., 1998). Um estudo comparativo dos voláteis das amostras destiladas na presença e ausência de cobre revelou algumas diferenças, mas os compostos presentes não possuíam relação sobre a qualidade sensorial da cachaça (FARIA et al., 2004). Faria et al. (2003) relataram que o cobre, quando presente no processo de destilação, reduz os níveis de dimetilsulfeto (DMS), o maior responsável pela perda da qualidade sensorial da cachaça. Entretanto sabe se que o cobre funciona como catalisador da formação do carbamato de etila em produtos destilados

Possuindo todos esses dados, podemos extrapolar algumas hipóteses sobre a quantidade de carbamato presente nas frações do destilado. A cabeça possui maior concentração de CE ($59.727 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) devido à maior presença de cobre ($8,80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), atuando como catalisador da reação e maior presença de álcool (65 %), envolvido na reação com ureia. Na fração coração, o teor de CE é inferior a $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ o que pode estar relacionado ao baixo teor de cobre ($3,10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e a graduação alcoólica em torno de 44 %. Na fração cauda, a concentração de carbamato de etila volta a ser maior que o limite estabelecido, $1.570 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e o teor de cobre volta a ser maior que o permitido $5,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mas apresentam um teor alcoólico de 35 %. Podemos concluir que quanto maior a concentração alcoólica e de cobre maior a concentração final de carbamato de etila. Portanto o cobre pode estar envolvido em uma reação de formação do CE que não depende da concentração de etanol.

3.2. Análise de carbamato em cachacas de mercado

O valor médio de carbamato de etila encontrado nas 82 amostras de cachaça analisadas foi de $1.206 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ variando de 5 a $12376 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Apenas 22,7 % das amostras analisadas apresentaram teores abaixo de $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, valor considerado internacionalmente aceitável (Figura 06). Sendo 10,2 % acima de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

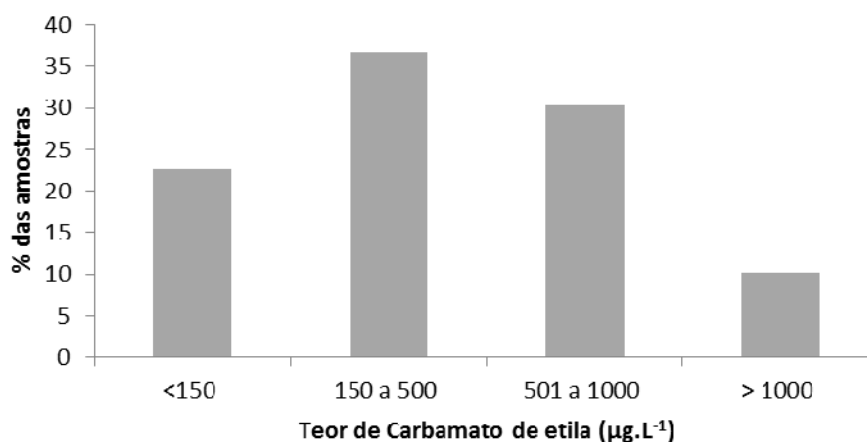


Figura 06: Distribuição das 82 amostras de cachaças em faixas de concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de carbamato de etila

Andrade-Sobrinho e colaboradores ao avaliarem carbamato de etila em 188 amostras de bebidas alcoólicas, sendo 126 cachaças (63 da região sudeste, 39 da nordeste, 22 da sul e 2 da centro-oeste), 37 tiquiras, 6 grapas (1 brasileira e 5 italianas) e 19 de uísque importados (6 americanos e 13 escoceses), verificaram que 21% das amostras analisadas apresentaram teores abaixo do permitido pela legislação internacional. Este resultado é semelhante ao encontrado nesta pesquisa, que foi de 22, 72 % de amostras aceitáveis para padrões internacionais.

Barcelos et al. (2007) avaliaram carbamato de etila em cachaças de diferentes marcas comercializadas nas diferentes regiões de Minas Gerais. Os autores observaram que as cachaças da região do Vale do Jequitinhonha apresentaram teores acima daqueles permitidos pela legislação e relacionou esta ocorrência com fatores como a má fermentação do mosto ou ainda devido ao uso de destiladores. Ao verificar o perfil de 66 cachaças de alambique e 9 aguardentes de cana industrial em relação ao teor de carbamato de etila, foi observado que houve uma variação entre 20 a 948 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, onde somente 13,5 % destas bebidas apresentaram teores dentro do permitido pela legislação.

Os resultados encontrados reforçam a necessidade de avaliação e quantificação dos níveis de carbamato de etila durante as etapas do processo de produção, visando melhorar o conhecimento dos fatores responsáveis pela formação do carbamato de etila bebidas destiladas, como cachaça.

4. CONCLUSÃO

Por ser o carbamato de etila uma substância de potencial carcinogênico, os resultados encontrados durante o processo de produção de cachaça e das amostras comerciais analisadas disponíveis no mercado, indicam a necessidade de alterações no processo de fabricação de cachaça, visando eliminar este problema de saúde pública, bem como, para o enquadramento do produto nos padrões internacionais de comercialização e consumo.

Portanto, merece estudos mais aprofundados durante os processos de fermentação do caldo de cana e destilação do vinho, e estocagem do destilado a fim de relacionar os possíveis precursores do carbamato de etila. Por exemplo, no processo de fermentação correlacionar com os níveis de ureia e arginina, na destilação correlação com teores de cobre, compostos cianogênicos. Durante a estocagem correlacionar algum tipo de interação do produto com a luz UV.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRABE. A cachaça. Texto disponível <http://www.abrabe.org.br/cachaca.php> acesso em 27/05/2010.

AMPAQ. Etapas para produção da cachaça de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.ampaq.com.br/arquivos/etapas_para_producao.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2006.

ANDRADE E SOBRINHO, L.G. (2002) Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1074-1077.

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

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

BOZA, Y.; HORII, J. (2000). Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.20, n.3, Campinas. p.279 -284.

BRASIL (2005). Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, instrução normativa N° 13 de 29 de junho de 2005. Brasília: **Diário Oficial da União**, N° 124, pp. 3-4.

CACHAÇA a. (2008) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. FURG. Disponível em: <<http://www.furg.br/portaldeembalagens/quatro/cachaca.htm>>. Acesso em 12 mar. 2008.

COOCACHAÇA.(2009) Cooperativa da Cachaça de Minas Gerais. Mercado Atual. Disponível em: <http://www.coocachaca.com/artesanal_mercado.html>. Acesso em: 07 jul. 2009

ELVAS, I.; RIZZO, D. 2002. Bendita Cachaça. GULA, Abril. Edição114.

FARIA, J. B., FRANCO, D. W. & PIGGOTT, J. R. (2004). The quality challenge: Cachaça for export in the 21st century. **Journal Institute Brewing & Distilling**. . v.4, p.215-221.

FARIA, J.B.; DELIZA, R.; ROSSI, E.A. (1993). Compostos sulfurados e a qualidade das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.13, n.1, p.(89-93).

FARIA, J.B.; POURCHET CAMPOS, M.A. (1989). Eliminação do cobre contaminante das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum* L.) brasileiras. **Alimentos e Nutrição**, v.1, p.117-126.

FOLHA ON LINE. Bebida é a segunda mais consumida no país. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/fof/brasil500/comida13.htm>>. Acesso 12 janeiro 2008.

GONTIJO, M. (2002). A branquinha em números . In: Boletim Informativo UFMG Nº 1348 - Ano 28 - 09.05.2002

GOYER, R. A.; CHERIAN, M. G. (2007). Toxicology of metals: Biochemical aspects/contributors, **Springer**, New York.

GUERAIN, J.; LEBLOND, N. (1992). Formation du carbamate d'ethyle et elimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits à noyaux. In Elaboration et Connaissance des Spiriteux; Cantagrel, R., Editor; Tec&Doc: Paris, France, (pp. 330–338).

GUTIERREZ, L. E. (1993). Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.50, n.3, p.464-472.

JANZANTTI, N.S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. 2004. 179 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

LAWRENCE, J. F.; PAGE, B. D.; CONACHER, H. B. S.; (1990). Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage **Advances in Environment Science and Technology**, v.23, p.457-478.

LÉAUTÉ, R. (1990). Distillation in alambic. **Am. Journal of Enology Viticulture**. v.41, n.1, p.90-103.

LIMA-NETO, B.S. FRANCO, D.W. (2003). Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. **Química Nova**, v.26, n.2, p.735-739.

MAIA, A. B. (2000). Destilação da cachaça. In: PRODUÇÃO E QUALIDADE DA CACHAÇA (curso), Centro de Tecnologia para Produtos Alimentares, CETEC / SENAI, Vassouras - RJ, p. 18-22,

MIRANDA, M.B.; (2005) **Avaliação Físico-Química de Cachaças Comerciais e Estudo da Influência da Irradiação Sobre a Qualidade da Bebida em Tonéis de Carvalho.**, tese (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.134p

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. (2005) **Aguardente**. In: TECNOLOGIA DE BEBIDAS. MATÉRIA-PRIMA, PROCESSAMENTO. BPF/APPCC, Legislação e Mercado. São Paulo: Edgar Blücher, 1. p.485-524.

NETTLESHIP, A.; HENSHAW, P. S.; MEYER, H.L. Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate. (1943). **Journal National Cancer Institute**, v.4, p.309-331.

- NEVES, E.A, OLIVEIRA, A, FERNADES, A.P AND NOBREGA, J.A. (2007). Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, v.101, p.33-36.
- NOGUEIRA, M.P; VENTURINI FILHO, W.G. (2005). Aguardente de cana. UNESP, Botucatu, SP,. Disponível: <<http://www.fca.unesp.br/intranet/arquivos/waldemar/Aguardente%20de%20Cana%20-Completo.pdf>>.
- NYKÄNEN, L., NYKÄNEN, I. (1991). Distilled beverages. In: **Volatile compounds in foods and beverages**. p.548-576.
- OLIVEIRA, A. J. ; GALLO, C. R. ; ALCARDE, V. E. ; GODOY, A. ; AMORIM, H.V. In:AMORIN, H. V. (1996). Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. Piracicaba: ESALQ/USP. p 22-24.
- PATARO (2003). Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. In: EXPOCACHAÇA 2003, Programação Técnico Científica e Resumo dos Trabalhos, Belo Horizonte, MG, p. 46.
- PINTO, G. L. Fabricação de aguardente. Informe Técnico. Ano 7, n. 57, Universidade Federal de Viçosa, nov.1986
- RIFFIKIN, H. L; WILSON, R.; BRINGHURST, T. A. (1989). The possible involvement of Cu^{II} peptide/protein complexes in the formation of ethyl carbamate. **Journal Institute Brewing & Distilling** v. 95, p.121–122.
- RIFFIKIN, H. L; WILSON, R; HOWIE, D.; MÜLLER, S. (1986). Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **Journal Institute Brewing & Distilling**, v.95, p.115–119.
- SEBRAE. (2005). Estudo de Viabilidade Econômica. □ Simulação da Produção de 60 Mil Litros de Cachaça por Safra. Belo Horizonte,
- VILELA, F. J.; CARDOSO, M. G.; MASSON, J. E. ANJOS, J. P. (2007). Determinação das composições físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência Agrotecnologia**, 31, p.1089–1094.

CAPÍTULO 2

FORMAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILA DURANTE A FERMENTAÇÃO E SEUS PRINCIPAIS PRECURSORES

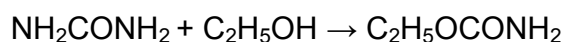
RESUMO

Existem várias formas de produção de carbamato de etila durante a produção da cachaça. A principal via de formação ocorre através da reação da ureia com o etanol durante a fermentação. O aminoácido, arginina, presente na cana de açúcar é degradado a ureia e ornitina pela enzima arginase através do ciclo da uréia. Certa quantidade da ureia é metabolizada pela própria levedura, o excesso é liberado para o meio de fermentação. Alguns fatores podem agravar esse quadro, como a adição de farelo de milho ou fubá para aumentar a eficiência da fermentação. Uma via secundária seria via anion cianeto (CN). Existem mais de 2600 espécies de plantas que produzem cianoglicosídeos, compostos capazes de liberar ácido cianídrico ao meio. Durante a fermentação algumas enzimas provenientes da cana promovem essa hidrólise desencadeando uma série de reações onde o cianeto irá proporcionar a formação do carbamato de etila. Portanto neste capítulo foram apresentados os dados de o teor de ureia e compostos cianoglicosídicos durante a fermentação (ensaio com 400 mL de caldo de cana e 100 mL de fermento) e a possível relação na formação de CE, efetuando uma fermentação normal que apresentou teor de carbamato ao final de 24 horas de 130,19 mg.L⁻¹. Também foram adicionados ureia e arginina em duas concentrações ao caldo durante a fermentação e os resultados foram de 200,90 mg.L⁻¹ de CE no caldo fortificado de ureia 1 (CFU 1) (4mM) e 251,61 mg.L⁻¹ de CE no caldo fortificado de ureia 2 (CFU 2) (6mM) . Para adição de arginina com 2 mM (CFA 1) e 4mM (CFA 2) a concentração final de carbamato de etila foi de 149,45 mg.L⁻¹ e 169,72 mg.L⁻¹, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

1.1. UREIA, ARGININA e ETANOL.

Existem muitas vias de formação natural do carbamato de etila, sendo a mais comum a sua produção em meio ácido pela reação da ureia com etanol (DELLEDONNE, 2001; WAN, 2007).



A ureia é encontrada em vários alimentos fermentados como iogurte, queijos, pão, em bebidas alcoólicas e não-alcoólicas (FRANCIS et al., 2002). A ureia está presente em alguns alimentos em algumas centenas de miligramas por litro ou pode ser formada através do metabolismo da arginina durante a fermentação, mas em uma cinética de formação lenta a temperatura ambiente (MATSUDO et al., 1993; ARESTA et al., 2001). A arginina é degradada a ureia e ornitina pela enzima arginase (EC 3.5.3.1) através do ciclo da ureia (Figura 01). Certa quantidade da ureia é metabolizada pela própria levedura. Mas caso a arginina esteja em excesso, ocorre à liberação de ureia para o meio de fermentação (UTHURRY et al., 2006).

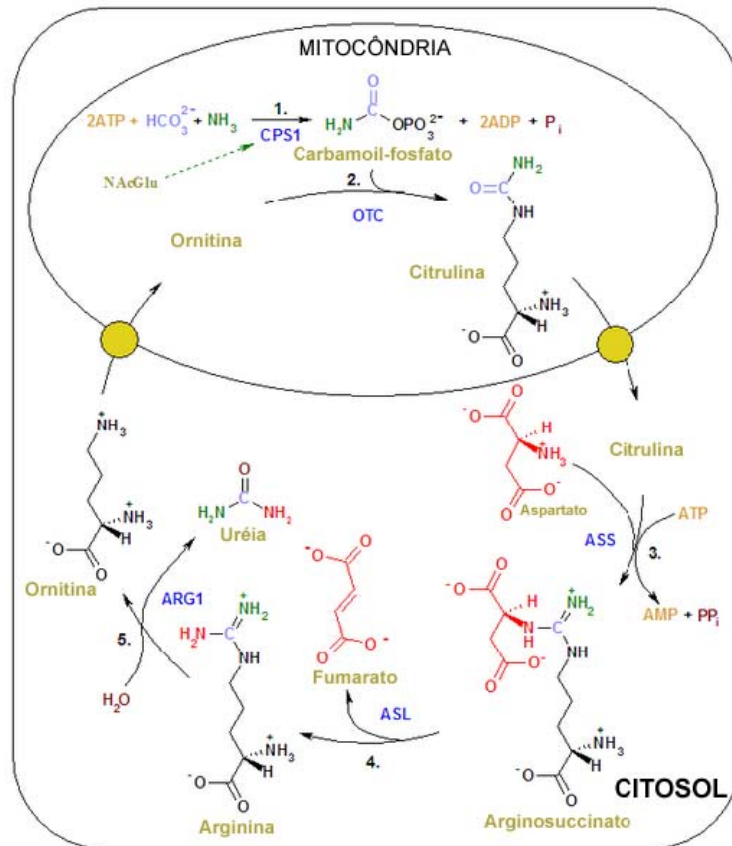
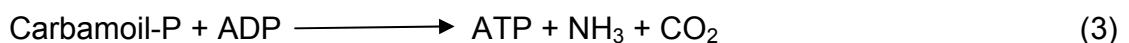
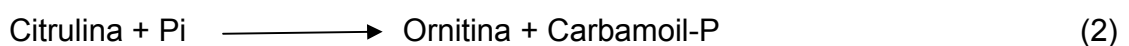
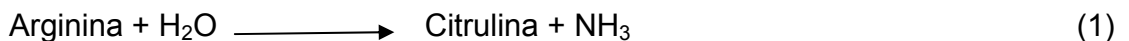


Figura 01: Metabolismo da Arginina. Produção da ureia a partir do esqueleto da arginina como pode ser observado pelo carbono (em azul) e os nitrogênios (verde e vermelho). Fonte: VOET & VOET, 2000.

Outra maneira de degradação da arginina foi proposta por Cassiano-Collón (1988) que pode ser realizada pela via da arginina deaminase (ADI). Durante a via, a arginina é convertida a ornitina, CO_2 e NH_3 , envolvendo três reações enzimáticas. As reações da via da arginina deaminase (ADI), são conduzidas pelas enzimas arginina deaminase (equação 1), ornitina transcarbamilase (eq. 2) e carbamato kinase (eq. 3)



Observa-se que os intermediários formados pela via da arginase deaminase são: citrulina, ornitina e carbamoil-P e todos estão presentes no ciclo da ureia. Portanto a formação da ureia também está correlacionada com a ADI.

Além dos precursores naturais, alguns parâmetros como temperatura e teor de álcool na fermentação são decisivos para a formação do composto cancerígeno, carbamato de etila.

Nota-se que todos os trabalhos existentes até o momento estão relacionados à fermentação para obtenção de vinhos ou wisky. Para cachaça não existe nenhum trabalho que correlacione os parâmetros temperatura, concentração de ureia e arginina na formação de carbamato de etila ao final do processo. É necessário um estudo com carbono marcado durante a fermentação do caldo de cana para poder afirmar se a arginina é um dos principais precursores da ureia, e se a própria ureia reage com etanol para formação de carbamato de etila ao final do processo.

Após esses estudos, podemos adotar esses parâmetros (concentração de arginina e ureia, temperatura da fermentação e teor de álcool) como pontos para Análise de Perigos e Pontos Críticos e Controle (APPCC).

1.2. Compostos cianoglicosídeos e formação do carbamato

Outra via natural de formação do carbamato de etila ocorre via anion cianeto. Existem mais de 2600 espécies de plantas que produzem cianoglicosídeos ou cianogênicos ou glicocianogênicos (Figura 02). São produzidos como proteções para as plantas em decorrência de algum estresse climático ou simplesmente fazem parte da composição dos alimentos, como a mandioca (Cooke, 1978).

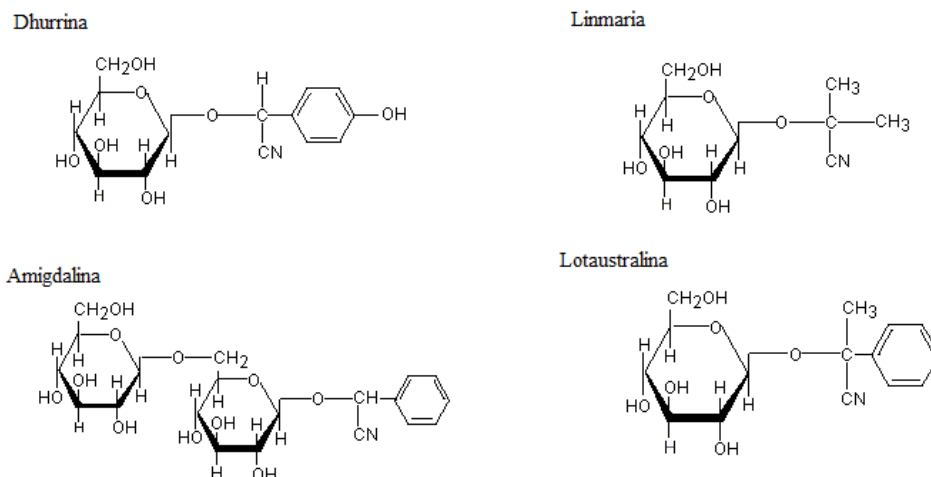


Figura 02: Exemplos de compostos cianoglicosídeos. Possuem uma porção açúcar e uma porção com o grupamento CN (não-açúcar)

A sua hidrólise enzimática (β -glicosidase e Hidroxinitrilo liase) promove a formação de um açúcar e um cianidrina que rapidamente é transformado em cetona ou aldeído e em ácido cianídrico (HOSEL et al., 1981; MOLLER & SEIGLER, 1999) (Figura 03).

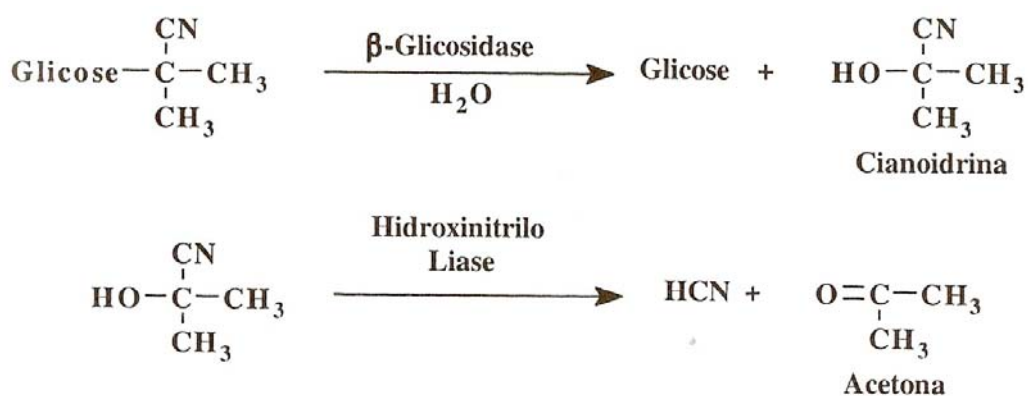
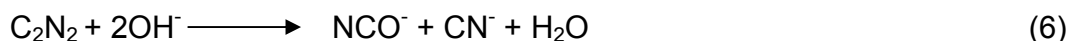
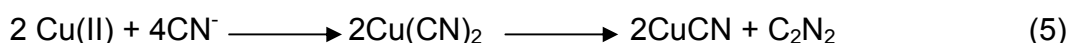
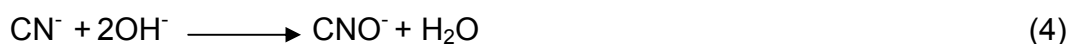


Figura 03: Reações de formação de ácido cianídrico a partir dos compostos cianoglicosídeos.

O mecanismo da produção de CE a partir do cianeto em vinhos já é bem estudado (JONES et al. 1998; MOLLER & SEIGLER, 1999).

Porém, para a cachaça, existem apenas sugestões de formação de carbamato de etila via cianeto durante o processo de destilação. O nível de carbamato aumenta com o superaquecimento na destilação associado à matéria prima da fermentação rica em cianoglicosídeos, como a amigdalina (HESFORD & SCHNEIDER, 2001; SCHEHL et al., 2005).

As reações propostas durante a destilação envolvem a oxidação do cianeto (CN⁻) a cianato (NCO⁻) catalisada pelo cobre (Cu) presente na estrutura do destilador, conforme o esquema de reações (ARESTA et al., 2001; BEATTIE & POLYBLANK, 1995; MACKENZIE et al., 1990). Ao final do processo o íon cianato reage com álcool em meio ácido para formação do carbamato de etila. A conversão direta do íon cianeto a cianato (eq. 4) em sistema aquoso e água-etanol é possível, porém o processo é bem lento em pH baixo e sem catalisador (ARESTA et al., 2001). A principal via de formação do carbamato utiliza o cobre como catalisador aumentando de forma exponencial a concentração de CE ao final do processo de fermentação (eq. 5 a 7) (FISCHER et al., 2002).

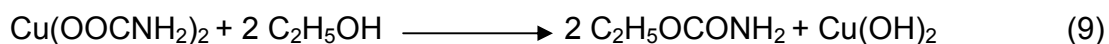


Vários estudos correlacionam a concentração de cianeto (CN) e a formação de carbamato de etila (EFSA, 2007). No estudo realizado pela Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos em 260 diferentes bebidas alcoólicas, exceto cachaça, a concentração de compostos glicocianogênicos variou de 1 a 40 (mg·L⁻¹). A correlação positiva entre CE e CN foi encontrada em 82% dessas amostras, ou seja o aumento na concentração dos compostos (CN) ocorreu de forma exponencial a concentração do carbamato. Neste estudo 89,4% das amostras com teor de CE acima dos níveis aceitáveis pelos padrões internacionais possuem um teor de compostos CN acima de 20 mg/L e 63% das

amostras abaixo do limite estabelecido de carbamato de etila apresentaram teor de compostos cianogênicos abaixo de 5 mg/L.

Balcereck et al. (2006) confirmaram a correlação entre os níveis de HCN e carbamato de etila. Os autores demonstraram que as condições da fermentação e destilação (temperatura, pH e concentração de Cu) são cruciais para evitar as reações de oxidação do cianeto e conversão do cianato e etanol a carbamato de etila.

Em solução, o complexo cianato-cobre (II) é formado e a orientação dos anions cianato ocorre pelo átomo de nitrogênio. De tal forma que o carbono tende a ser mais positivo, favorecendo um ataque nucleofílico ao etanol promovendo a formação de CE (eq. 8 e 9) (ARESTA et al., 2001).



Aresta et al. (2001) observaram que o melhor catalisador para formação do carbamato de etila a partir das reações dos compostos glicocianogênicos, entre os sais de cobre, é o acetato de cobre (CH_3COOCu).

Vale ressaltar que a primeira preocupação é com os níveis de cianeto em alimentos, podendo ocasionar sérios danos à saúde a curto, médio e longo prazo. Não desfazendo da possibilidade desses compostos serem os precursores do carbamato de etila (CARDOSO et al., 2005).

Os produtores de alimentos utilizam da enzima rodanase, uma tiosulfato sulfotransferase, para evitar a formação de compostos cianogênicos. A enzima converte cianeto a tiocianeto em duas etapas conforme mostrado na Figura 04. No primeiro passo o grupo tiol da cisteína reage com tiosulfato formando um dissulfeto (etapa 01). Depois o dissulfeto reage com cianeto formando tiosulfato regenerando o grupo tiol da cisteína (etapa 02) (SAIDU, 2004; CIPOLLONE et al., 2006).

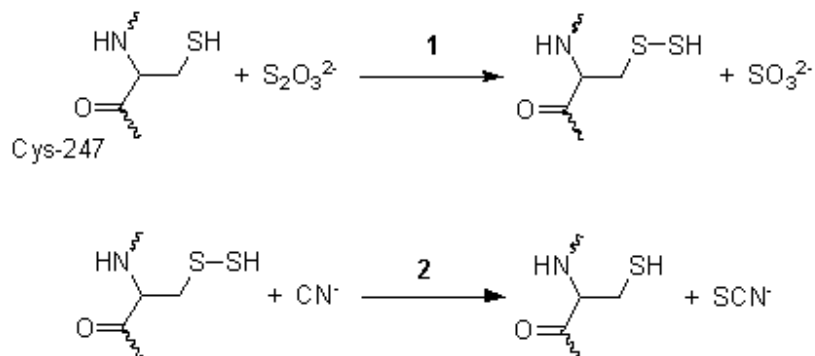


Figura 04: Reações promovidas pela enzima rodanase.

Esse conhecimento sobre o processo enzimático poderia ser melhor explorado pelos produtores de bebidas destiladas com a intenção de reduzir os níveis de CN e com isso eliminar ou reduzir o teor de carbamato de etila no produto final, cachaça.

As possíveis hipóteses de eliminação ou redução do CE durante a fase aquosa e hidroalcoólica seriam as seguintes;

- Eliminação química de compostos glicocianogênicos antes e durante a etapa de destilação;
- Mudanças no processo de destilação;
- Eliminação do cobre (Cu), pois é o catalisador da reação.

Uma das maneiras encontradas por produtores de vinhos para eliminação dos compostos cianogênicos no mosto, antes da destilação, seria pela formação de complexos insolúveis de sais de cianeto, como a prata (SCHLIESSMANN, 2006). Em experimentos, esses sais foram capazes de reduzir em até 90% a concentração de CN em meio alcoólico (LAUGEL & BLINDER, 1993). Porém os autores relataram que existe uma controvérsia na relação existente entre propriedades organolépticas e a eliminação do composto. Alguns relatam a perda de algumas características do vinho após a eliminação dos cianoglicosídeos (CHRISTOPH et al., 1998).

Os compostos precursores do carbamato, cianeto e cianato (CNO^-), compostos cianogênicos, podem ser eliminados por duas simples

modificações: Em primeiro lugar o condensador de cobre pode ser alterado para um de aço inoxidável, em segundo os precursores gasosos podem ser fixados em resinas antes da coluna a fim de evitar a produção de CE (GUERAIN & LEBLOND, 1993).

Algumas dessas medidas são efetuadas no caso da produção de vinho, onde a uva é a matéria prima. Para cachaça onde a matéria prima é a cana de açúcar não existe estudos para redução de níveis de compostos cianogênicos.

A cana de açúcar é uma planta cianogênica, porém os compostos cianoglicosídeos ainda não foram determinados como na mandioca (linamarina e lotaustralina), maçã (amigdalina e prunasina), uva (dhurrina e epilotaustralina) e soja (dhurrina) que já possuem os compostos identificados (JONES, 1998).

Com isso o objetivo do estudo descrito nesse capítulo foi definir quais os principais precursores da formação do carbamato de etila, através da fortificação do caldo de cana com arginina e ureia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

2.1. Condução da Fermentação

No preparo do mosto foi utilizado o mosto de caldo de cana-de-açúcar, recém cortada, submetida à moagem, filtrado e diluído com água destilada até um teor de sólidos solúveis de 14 °Brix.

O caldo de cana normal apresentou concentração de ureia de 2 mM e de arginina de 1 mM antes da fermentação. A determinação de ureia e arginina foi feita conforme item 2.2.1 e 2.2.3, respectivamente. A partir desses dados foi efetuado o experimento com concentrações maiores de ureia e arginina.

A fermentação foi conduzida com 400 mL de caldo de cana de açúcar e 100 mL de fermentação (previamente ativado), gerando a proporção de 20 % do total. A Temperatura foi controlada de 28 °C e alíquotas foram retiradas de 4 em 4 horas durante às 24 horas de fermentação. Os caldos foram fortificados com duas concentrações diferentes de ureia, CFU1 (4 mM ou 0,24 g·L⁻¹ de ureia) e CFU2 (6 mM ou 0,36 g·L⁻¹ de ureia) e duas diferentes de arginina, CFA1 (2 mM ou 0,62 g·L⁻¹ de arginina) e CFA2 (4 mM ou 1,24 g·L⁻¹ de arginina) (Figura 05). Todos os dados foram comparados a uma fermentação sem adição de nutrientes denominada de caldo normal (CN).

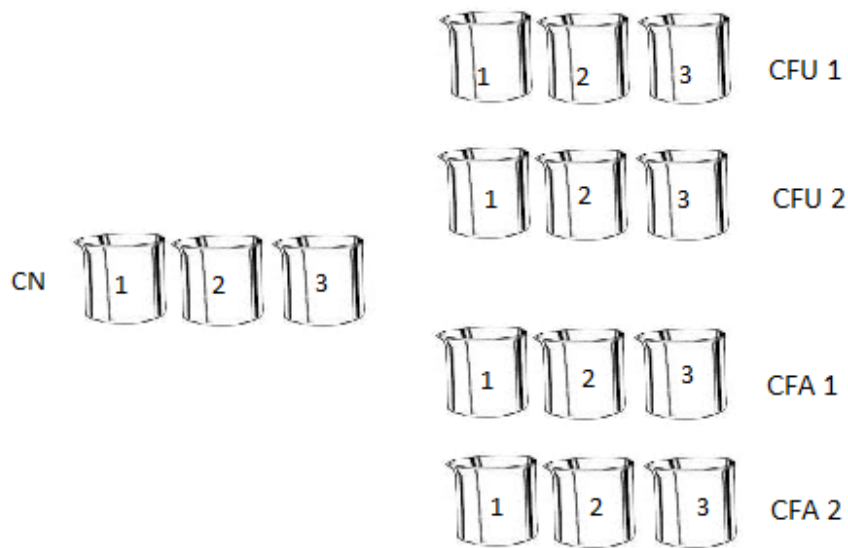


Figura 05: Esquema do experimento da fermentação, com as 3 repetições (1, 2, e 3). CN (Caldo normal). CFU 1 Caldo fortificado de 4 mM de ureia, CFU 2 Caldo fortificado de 6 mM de ureia. CFA 1 Caldo fortificado de 2 mM de arginina e CFA 2 Caldo fortificado de 4 mM de arginina.

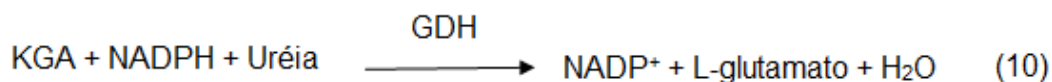
2.2. Coleta e preparo das amostras na fermentação.

As alíquotas de 5 mL foram retiradas durante a fermentação e centrifugadas a 5000x g, depois filtradas em filtros de 0,22 μm . Após esse condicionamento as amostras foram congeladas para posterior quantificação de ureia, arginina, cianeto e carbamato de etila.

2.2.1. Determinação de ureia

A ureia foi determinada conforme o Kit para ensaio de ureia (Sigma Aldrich). A identificação é baseada na reação da ureia com ácido α -cetoglutarato (KGA) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) na presença da L - glutamato desidrogenase (GDH) formando L -

glutamato e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado (NADP⁺) como demonstrado na equação 10.



A queda no valor de absorvância a 340 nm é devido a oxidação do NADPH, que é proporcional a concentração de ureia na solução. Os cálculos foram efetuados conforme a equação 11.

$$\mu\text{g de ureia/ mL} = \left[\frac{(A) (VT) (F)}{(VA)} \right] \times 0,00273 \quad (11)$$

Onde A= absorvância, VT= volume total do ensaio (mL), F= fator de diluição e VA = volume da amostra (mL).

2.2.2 Determinação de Cianeto

Das amostras filtradas foram retiradas alíquotas de 0,15 mL e adicionadas 0,05 mL de solução de extrato da enzima β -glicosidase e incubados a 30 °C por 1h. Após esse período foram adicionados 0,8 mL de solução A e a mistura deixada em repouso por 10 min. Após o tempo, foi adicionado 1,5 mL de água e fervido em banho maria por 12 minutos. Após o resfriamento, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 530 nm (Figura 6).

A solução A foi uma solução de proporção 1:1 (v/v) de ácido pícrico saturado (1,4 g/ 100 mL) e de carbonato de sódio (5 g/ 100 mL).

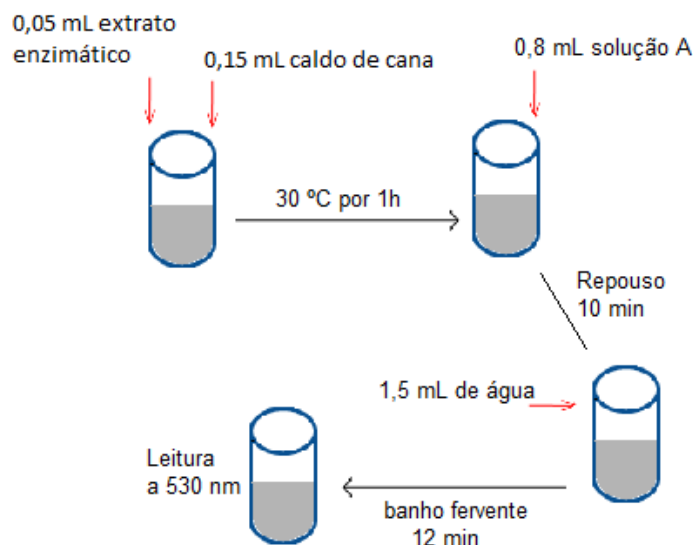


Figura 06: Procedimento para determinação de cianeto

Os resultados obtidos foram comparados com uma curva analítica previamente preparada com solução de cianeto de potássio (0 a 150 mg.mL⁻¹)

2.2.3 Determinação de Arginina

A quantificação dos aminoácidos do caldo de cana foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência.

A solução de derivatização foi preparada com 50 mg de o-phthaldialdeído (OPA) dissolvido em 4,5 mL de metanol, 50 µL de 2 mercaptoetanol (2-ME) e 0,5 mL de tampão bromato de potássio 0,40M. Após mistura, a solução foi armazenada no escuro por 24 horas a 4 °C. (Gomis et al., 1990; Paramas et al., 2006; Pripis-Nicolau et al., 2001). A cada 48 horas 10,0 µL de 2-ME foi adicionado para manter a eficiência do reagente durante o prazo de validade de 3 meses (Gomis et al., 1990).

Amostras foram pré concentradas da seguinte maneira: aos 60 mL do caldo de cana foi adicionado 0,50 mL de ácido clorídrico 0,10 mol.L⁻¹ e após 5

minutos a solução foi concentrada por evaporação em rotavapor até secagem total. Em seguida foi adicionado mais 0,50 mL de ácido clorídrico 0,10 mol·L⁻¹ e a solução foi agitada. Após agitação 1,0 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e etanol (70-30 v/v) foi adicionado á solução. Após esses procedimentos as amostras foram purificadas em colunas de extração em fase sólida (SEP PACK C₁₈ da WATERS). Foi eluído com TFA 0,1% em água metanol (70:30 v/v). O primeiro 1,0 mL do eluato foi descartado e os 2,0 mL subseqüentes foram coletados. As amostras foram armazenadas em frasco âmbar a -10 °C para posterior análise.

O sistema CLAE consiste de duas bombas de alta pressão (modelo LC-10AD), com detector de fluorescência RF 10 AxL, interface SCL-10Avp e o programa Class-VP Shimadzu versão 6.12, para cálculo das áreas.

As condições cromatográficas foram fluxo de 1,0 mL·min⁻¹, coluna VP-ODS (C₁₈). Os solventes para eluição em gradiente foram metanol grau HPLC (solvente A) e acetato de sódio 4,2 mol·L⁻¹ pH 6,2 (solvente B). Os comprimentos de onda para fluorescência foram 340 nm e 440 nm para excitação e emissão, respectivamente. O gradiente efetuado pode ser observado na tabela 01.

Tabela 01: Gradiente de eluição da arginina no HPLC

Fluxo	Tempo (min)	% Solvente B
1mL·min ⁻¹	0	5
	65	70
	70	90
	75	90
	85	5

2.2.4 Determinação de carbamato de etila

Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, com detector de massas Shimadzu QP-5050A tendo como fonte de ionização o impacto eletrônico com

70 eV. Foi utilizada coluna cromatográfica capilar de fase polar (polietilenoglicol), DB-WAX (60 m x 0,25 mm x 0,50 μm). Temperaturas do injetor e da interface do detector ambas de 220 $^{\circ}\text{C}$. Empregou-se a seguinte programação de temperatura para o forno: temperatura inicial 90 $^{\circ}\text{C}$ (2 min), elevada a 150 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, seguido de um aquecimento para 230 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 40 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ permanecendo por 10 min. Volume de amostra injetado foi de 2,0 μL "splitless". Gás de arraste hélio (5.0) com fluxo de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Modo de aquisição SIM, monitorando os íons de m/z 62, 74 e 89.

A quantificação foi realizada através da comparação dos resultados cromatográficos das amostras com uma curva analítica obtida a partir de uma solução estoque de carbamato de etila (New Química[®] 99 %) 2,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em etanol:água (40:60 v/v). Diluições foram realizadas abrangendo a faixa de concentração de 0,005 – 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($y = 229,9x - 5399$, $R^2 = 0,9987$).

2.3. Análise estatística dos resultados

Os ensaios experimentais da fermentação foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, composto por 2 concentrações de ureia CUF 1 (4 mM ou 0,24 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e CFU 2 (6 mM ou 0,36 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); 2 concentrações de arginina e comparados ao caldo normal com concentração de 2 mM de ureia e 1 mM de arginina. Todos realizados em 3 repetições.

As análises estatísticas foram realizadas valendo-se do pacote estatístico SAS[®] 9.1 (Licenciado pela Universidade Federal de Viçosa).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação Ureia, Cianeto, Arginina e Carbamato de etila.

Durante a fermentação houve um aumento da concentração de ureia no período de 8 a 20 horas seguido de uma queda nas últimas 4 horas de processo. Nota se que em todos os tratamentos CN, CFU 1, CFU 2, CFA 1 e CFA 2 a quantidade final de ureia foi praticamente a mesma (Figura 07).

Vale ressaltar que os caldos que foram fortificados com ureia (CFU 1 e CFU 2) apresentaram valores maiores no início da fermentação, porém após 24 horas a média era de $4,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

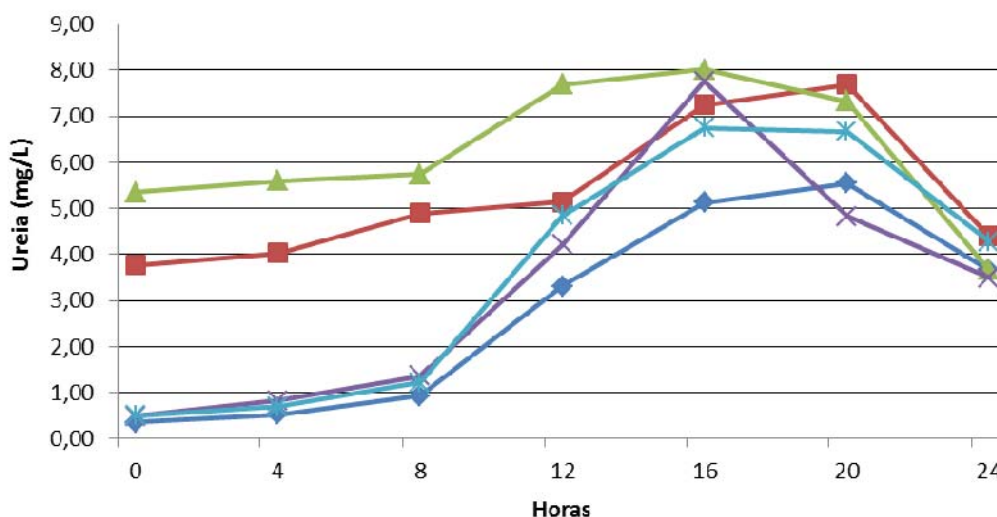


Figura 07: Concentração média de ureia ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante a fermentação. —●— Caldo normal, —■— CFU 1, —▲— CFU 2, —x— CFA 1 e —*— CFA 2

Polastro et al. (2001) e Battaglia et al. (1990) associaram positivamente a presença de ureia e a formação de carbamato de etila em produto, porém observaram que mesmo na ausência da ureia ocorreu sua formação.

Segundo Battaglia et al. (1990), a ureia, obtida da degradação da arginina, é responsável por 40 a 50 % do carbamato de etila formado durante a fermentação do suco de uva “Chardonnay”.

Na determinação de compostos cianogênicos durante a fermentação pode se observar um comportamento semelhante dos caldos fortificados com ureia (CFU 1 e CFU 2) com uma queda na concentração durante o período de 12 a 16 horas. Para os caldos fortificados com arginina essa redução ocorreu no intervalo de 16 a 20 horas. Sendo que o caldo normal apresentou uma redução da sua concentração a partir das 8 horas de fermentação. Porém ao final do processo todos os caldos apresentaram concentrações semelhantes (Figura 08).

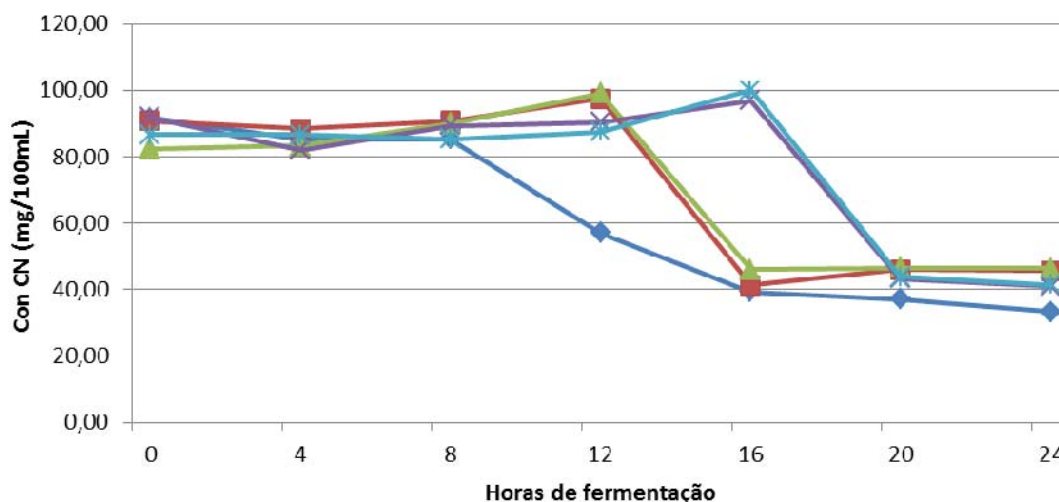


Figura 08: Concentração média de composto cianogênicos. — Caldo normal, — CFU 1, — CFU 2, — CFA 1 e — CFA 2

Cianato e sua forma de isocianato tautomérica têm sido apontados como intermediários da formação do carbamato de etila na reação de etanol com ureia e cianeto (TAKY et al., 1992). No entanto, uma cinética de primeira ordem foi relatada para a decomposição de isocianato e cinética de ordem zero para a formação do carbamato de etila, indicando uma reação intermediária para a conversão em cianato de carbamato de etila (BOULTON, 1992). Uma outra via

é baseada na complexação de cianeto e Cu^{II} seguido da oxidação a cianogênio, com posterior desproporcionamento a cianato e cianeto (BEATTIE E POLYBANK, 1995). Porém a análise feita para teor de cobre durante o experimento relatou uma quantidade de $0,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Certamente um teor muito baixo para que possa ocorrer a formação de CE pela complexação do cobre ao cianeto.

Vários fatores ainda devem ser estudados para elucidar a reação que gera carbamato de etila a partir de precursores nitrogenados em aguardentes e o papel dos íons metálicos (Cu e outros) (ARESTA, 2001).

Não existe na literatura pesquisas que possam correlacionar a concentração de ureia e arginina com a concentração de compostos cianogênicos. Podemos sugerir que um maior aumento desses nutrientes pode acarretar uma mudança no metabolismo das leveduras proporcionando alterações na forma de utilização dos compostos cianogênicos.

Durante a fermentação dos tratamentos a concentração de arginina apresentou comportamento semelhante, onde até às 12 horas se manteve estável e depois houve redução da concentração até o final do processo. Apenas os caldos fortificados com arginina apresentaram valores iniciais maiores, CFA 1 ($38,48 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e CFA 2 ($59,76 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Os caldos CN, CFU 1 e CFU 2 apresentaram em média valores de $19,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $20,16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $20,85 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente (Figura 09).

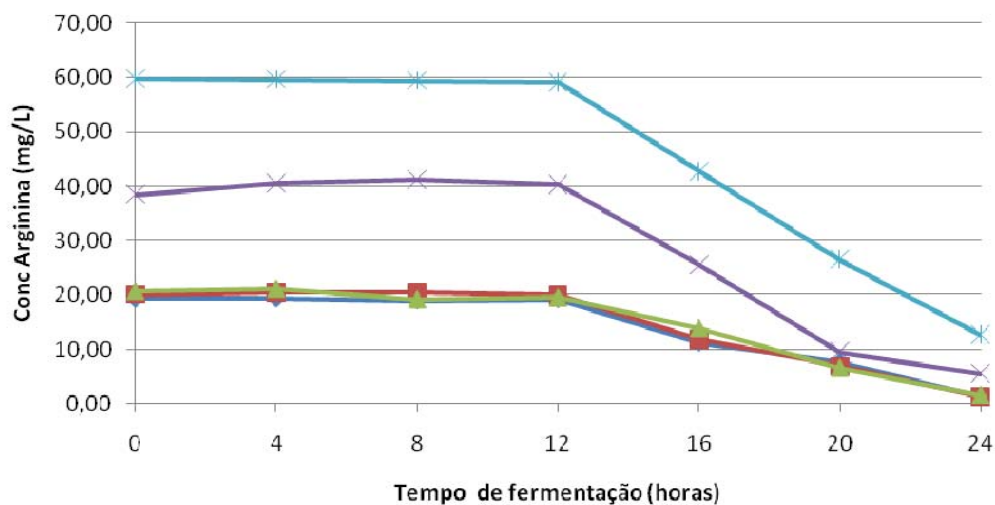


Figura 09: Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de arginina durante a fermentação. —◆— Caldo normal, —■— CFU 1, —▲— CFU 2, —×— CFA 1 e —*— CFA 2

Os valores de arginina durante a fermentação do caldo de cana estão bem abaixo daqueles relatados por Kliewer (2001) que encontrou um valor médio de arginina em uva cv. Cabernet Sauvignon de $209 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e Daudt et al. (1995), que encontraram $320 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de arginina para a cv. Cabernet Sauvignon cultivada em Garibaldi, região diferente de Viçosa e onde normalmente o solo tem maior teor de matéria orgânica que o solo de Santana do Livramento de onde se originaram as uvas utilizadas neste trabalho.

O teor de carbamato de etila durante o processo de fermentação sofre influência direta dos nutrientes adicionados ao caldo. O caldo normal apresentou concentração média de CE após as 24 horas de $130,19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os caldos fortificados CFU 1, CFU 2, CFA 1 e CFA 2 apresentaram as concentrações de $200,90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $251,61 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $149,45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $169,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente (Figura 10).

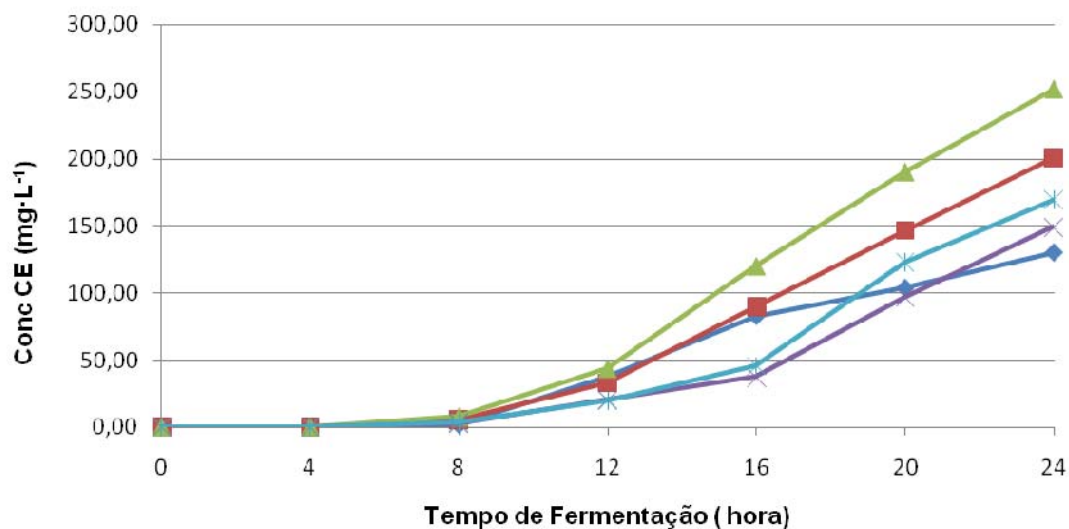


Figura 10: Concentração carbamato de etila ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante a fermentação.

—●— Caldo normal, —■— CFU 1, —▲— CFU 2, —×— CFA 1 e —*— CFA 2

Podemos observar que o caldo normal apresentou menor teor de carbamato de etila e os caldos fortificados com ureia apresentaram as maiores concentrações ao final do processo. Isso pode ser explicado pelo metabolismo da levedura onde a ureia em maiores concentrações é excretada para o meio e reage com etanol para formação de CE. Os tratamentos fortificados com ureia apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparados com o caldo normal (Tabela 02 e Tabela 03).

Tabela 02: Análise de variância dos caldos fortificados com ureia.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	2	22292,4	11146,5	1337,38	<0,0001
Resíduo	6	50,01	8,33		
Total	8	22342,4			

Tabela 03: Teor ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de carbamato de etila ao final da fermentação acrescentada de ureia (CFU1 e CFU 2)

Tratamentos	Teor de CE ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
CN	130,19 ^a
CFU 1	200,90 ^b
CFU 2	251,61 ^c

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Ao analisarmos a Tabela 04 concluímos que pelos menos um dos tratamentos difere entre si (CN, CFA 1 e CFA 2). Os tratamentos fortificados com arginina também apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparados com o caldo normal (Tabela 05).

Tabela 04: Análise de variância dos caldos fortificados com ureia.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	2	2395,4	1197,6	92	<0,0001
Resíduo	6	78,1	13,0		
Total	8	2473,2			

Tabela 05: Teor ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de carbamato de etila ao final da fermentação acrescentada de arginina

Tratamentos	Teor de CE ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
CN	130,19 ^a
CFA 1	142,90 ^b
CFA 2	169,62 ^c

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade

Nos tratamentos CFU 1 e CFU 2 a ureia adicionada já esta presente no caldo portanto depende da produção de álcool para que ocorra a reação de

formação do CE. Por isso somente a partir das 12 horas de fermentação começa a produção de CE. Para os caldos fortificados com arginina a concentração menor de carbamato é explicada, pois o aminoácido deve ser metabolizado e só depois a ureia formada reage com álcool.

A presença de carbamato de etila aumenta consideravelmente com o aumento da temperatura durante o processo de fermentação. Parâmetro que foi controlado no experimento, portanto não afetaria a formação de carbamato durante os tratamentos. Para evitar essa contaminação tivemos que conservar a fermentação em temperaturas abaixo de 28 °C (STEVENS e OUGH, 1993). Alguns trabalhos em vinhos relatam que durante a fermentação a mudança de temperatura na casa de 20 °C pode acarretar em uma mudança na ordem de 11 vezes na formação de carbamato de etila. Na temperatura de 40 °C, ao final do processo de fermentação, a concentração de CE foi de 610 mg·L⁻¹, se a temperatura for mantida a 60 °C sobe para 1230 mg·L⁻¹ (MONTEIRO et al., 1989).

Monteiro et al. (1989) investigaram a relação entre ureia e carbamato de etila pela utilização de carbono marcado radioativamente. Os autores utilizaram concentrações diferentes de ureia (¹⁴C) e observaram que existe uma relação diretamente proporcional, isto é, quanto maior a concentração de ureia na fermentação do vinho maior a concentração de carbamato ao final do processo. Os mesmos autores também estudaram o metabolismo e a biossíntese da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando arginina (¹⁴C) e concluíram que o carbamato de etila formado possuía atividade radioativa, o que indica a formação de ureia pela enzima arginase, e o composto reagindo com etanol para formação do CE.

Ainda Monteiro et al. (1989) relataram que quanto maior a concentração de álcool no mosto maior é a taxa de formação da ureia, sendo solução com 20 % v/v de álcool a taxa fica em torno de 0,75 mg·h⁻¹ já em solução com 10 % essa taxa cai para 0,32 mg·h⁻¹.

Ao analisarmos os gráficos do comportamento de ureia, arginina e cianeto e correlacionarmos com o gráfico de formação de carbamato de etila ao

longo da fermentação podemos afirmar que CFU 2 e CFU 1 possuem maior teor de CE devido:

- uma presença de maior quantidade da ureia do que CFA 1 e CFA 2 durante todo processo possibilitando uma reação com etanol que esta sendo formado;
- durante as 24 horas os compostos cianogênicos nos tratamentos CFU 1 e CFU 2 são metabolizados primeiro (em torno das 12 horas) enquanto os tratamentos CFA 1 e CFA 2 só depois das 18 horas que são metabolizados.

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir que existe mais de um mecanismo de formação do carbamato de etila durante o processo de fermentação. O primeiro está relacionado com a concentração da ureia e sua reação com etanol para formação de CE, que foi confirmado ao aumentar a concentração de ureia no caldo e conseqüentemente promoveu uma maior formação de carbamato. O segundo mecanismo está relacionado ao teor de compostos cianogênicos que sofre oxidação liberando o cianeto e com isso reagindo com etanol para formação de CE. Por fim um terceiro mecanismo estaria correlacionado a concentração do aminoácido arginina, que por sua vez em pequena concentração entraria no ciclo da ureia proporcionando uma maior formação de ureia e com isso maior formação do carbamato de etila.

A fermentação é a etapa que mais produz o carbamato de etila, em teores de mg.L^{-1} , bem acima do permitido pela legislação brasileira. Essa alta concentração ao final das 24 horas pode estar correlacionada a combinação dessas 3 vias de formação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-SOBRINHO, L.G; BOSCOLO, M; LIMA-NETO, B.S. e FRANCO, D.W. (2002). Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, 25(6B), 1074-1077.

ARESTA, M., BOSCOLO, M., & FRANCO, D. W. (2001). Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 2819–2824.

BALCEREK M, SZOPA J. S. (2006) Ethyl carbamate content in fruit distillates, **Technologia Jakosc** 1(46):91–101

BATTAGLIA, R.; CONACHER, R.B.S.; PAGE, B.D. (1990) Ethyl carbamate (urethana) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Addit. Contam.*, London, v. 7, n. 4, p. 477-496.

BEATTIE, J. K., & POLYBLANK, G. A. (1995). Copper-catalyzed oxidation of cyanide by peroxide in alkaline aqueous solution. *Australian Journal of Chemistry*, 48, 861–868.

BELAND, F. A; BENSON, W. R; MELLICK, P. W; KOVATCH, R. M; ROBERTS, D. W; FANG, J; DOERGE, D. R. (2005) Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. **Food Chem Technol** 43:1–19.

BERTRAND A (1993) Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin in Roger Cantagrel Editor, *Evaluation et Connaissance des Spiritueux*, **Recherche de la qualité, tradition et innovation** 5, 278–289.

BOULTON R (1993) The formation of ethyl carbamate from isocyanate and ethanol at elevated temperature. *Evaluation et Connaissance des Spiritueux*, 4, 479-492

BRASIL.(2005). Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 13, **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça**. Diário Oficial da União, Brasil.

BRUNO S. N. F; VAITSMAN, D. S; KUNIGAMI, C. N; (2007) Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chem** 104(4):1345–1352

CARDOSO, A. P; MIRIONE, E; ERNESTO, M; MASSAZA, F; CLIFF, J; REZAUL, HAQUE; MAND BRADBURY, J. H (2005) Processing of cassava roots to remove cyanogens. **Journal Food Compost Anal** 18(5):451–460

CARLEY, A. F; CHINN, M; PARKINSON, C. (2003) Adsorption and reaction of CN + O = OCN on Cu(100) surface: a density functional theory study. **Surf Sci** 537:64–74.

CASIANO-COLON, A., MARQUIS, R.E., (1988). Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. **Appl. Environ. Microbiol.** 54, 1318-1324

- CHA, S. W; GU, H. K; LEE, K. P; LEE, M. H; HAN, S. S; JEONG, T.C; (2000) Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. **Toxicol Lett** 115(3):173–181
- CHRISTOPH, N; SCHMITT, A; HILLENBRAND, K. (1988) Ethylcarbamate in Obstbranntwein. **Alkohol Ind** 16:369–374
- CIPOLLONE, R; ASCENZI, P; FRANGIPANI, E; VISCA, P. (2006). Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. **Chemosphere** 63:942–949
- COOKE, R.D., 1979. Enzymatic assay for determining the cyanide content of cassava and cassava products. In: Brekelbaum, T., Gomez, G. (Eds.), Cassava Information Centre **Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)**. Cali, Columbia Series
- DAUDT, C. E., BOEIRA, L. S., PEREIRA, C. N. (1995) Influência da adubação nitrogenada e de linhagens de leveduras nos teores de vinhos de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 166-169..
- DELLEDONE, D.; RIVETTI, F. ROMANO, U. (2001) Developments in the production and application of dimethylcarbonate. **Applied Catalysis A: General**. 221, 1-2, 241-251.
- EFSA (2007) Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific opinion of the panel on contaminants. **EFSA Journal** 551:1–44
- FISCHER G, GEITH J, KLAPO"TKE T. M, KRUMM B (2002). Synthesis, properties and dimerization study of isocyanic acid. **Z Naturforsch** 57b:19–24
- FRANCIS, P. S.; LEWIS, S. W.; LIM, K. F (2002). Analytical methodology for the determination of urea; current practice and future trends. **Trends Anal. Chem**, 21(5): 389-400.
- GOMIS, D.B; LOBO, A.M.P; A;VARES, M.D.G; ALONSO, J.J.M. (1990) Determination of amino acids in apple extracts by high performance liquid chromatography. **Chromatographia**, 29(3), 155-160.
- GUERAIN J; LEBLOND, N. (1993) Formation du carbamate d'éthyle et élimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits **Recherche de la qualité, tradition et innovation**, 330–338
- HESFORD, F., & SCHNEIDER, K. (2001). Validation of a simple method for the determination of ethyl carbamate in stone fruit brandies by GC–MS. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, 92, 250–259.
- HOSEL, W. (1981) The enzymatic hydrolysis of cyanogenic glucosides. In B. Vennesland, E. E. Conn, C. J. Knowles, J. Westley, & F. Wissing (Eds.), Cyanide in biology, 217-232.
- JONES D. A. (1998) Why are so many food plants cyanogenic? **Phytochemistry** 47 (2), 155-162.

- KLIEWER, W. M. (2001). Methods for determining the nitrogen status of vineyard **The American Society for Enology and Viticulture** 323p.
- KOGYO, K. H. (2002). Mixed fruit juice alcoholic beverage production—including removing copper by treating with substance binding with copper or absorbing copper, Patent number: JP3310382-B2.
- LAUGEL, P; BINDLER, F.(1993) Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de fruits à noyaux, in Roger Cantagrel Editor, E'laboration et Connaissance des Spiritueux, Recherche de la qualite', pp 290– 295
- MACKENZIE, W. M., CLYNE, A. H., & MCDONALD, L. S. (1990). Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II. The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, 96, 223–232.
- MATSUDO, T. (1993). Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. **J. Agric Food Chem**,41(3): 352-356.
- MOLLER, B. L; SEIGLER, D. S. (1999). Biosynthesis of cyanogenic glucosides, cyanolipids, and related compounds. **Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology**. 563–609
- MONTEIRO, F. F; TROUSDALE, E. K; BISSON, L. F. (1989). Ethyl carbamate formation in Wine: use a radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. **American J. Enol. Vitic.** 40(1);1-8
- PARAMAS, A. M. G., BAREZ, J. A. G., MARCOS, C. C., GARCIA-VILLANOVA, R. J., & SANCHEZ, J. S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). **Food Chemistry**, 95(1), 148–156.
- POLASTRO, L.R.; BOSO, L.M.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. (2001). Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 21(1): 78-81,
- PRIPIS-NICOLAU, L., REVEL, G., MARCHAND, S., BELOQUI, A. A., & BERTRAND, A. (2001). Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in musts and wines; first applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81(8), 731–738
- SAIDU, Y (2004) Physicochemical features of rhodanese: a review. **Afr J Biotechnol** 3(4):370–374
- SCHEHL, B. (2005). **Development of a genetically defined diploid yeast strain for the application in spirit production**. Doctor Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart
- SCHLISSMANN K. (2006) Kurzbeschreibung des CYANUREX_ Verfahrens, stand 03/2007.
- TAKY, N.; IMAMURA, L.; TAKEBE, S.; KOBASHI, K. (1992) Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Jpn. J. Toxicol. Environ. Health**. 38 (6), 498–505.

UTHURRY C A, SUÁREZ LEPE J A, LOMBARDERO J, GARCÍA DEL HIERRO J R. (2006). Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. **Food Chemistry**, 94, 262- 270.

WANG, D.; YANG, B.; ZHAI, X.; ZHOU, L. (2007) Synthesis of dimethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea. **Fuel Process Technology**, 88: 807-812.

YANG, H; WHITTEN, J. L. (1998) Reaction and adsorption energetics of $CN+O=OCN$ on nickel. **J Mol Struct** 458(1–2):131–142.

CAPÍTULO 3

EFEITO DA COR DA EMBALAGEM, TEOR DE COBRE E GRAU ALCOÓLICO NA FORMAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA DURANTE A ESTOCAGEM DA AGUARDENTE

RESUMO

Durante a estocagem de cachaça pode ocorrer a formação de carbamato de etila (CE). Essa via de formação do carbamato de etila está vinculada a reações induzidas pela luz envolvendo o cianeto de hidrogênio, um glicosídeo cianogênico, por ação da enzima β -glicosidase e compostos dicarbonílicos. A presença de sais metálicos e luz são importantes parâmetros para a produção de CE, podendo haver também sinergismo entre ambos. Este trabalho tem como objetivo verificar se durante a estocagem das amostras de cachaças em vidros de diferentes cores ocorre formação do carbamato de etila e proporcionar uma resposta a hipótese de indução da reação a luz ultravioleta. Após 90 dias de estocagem, verificou-se que o cobre é o catalisador da reação, pois os tratamentos sem cobre obtiveram uma média menor na concentração de carbamato de etila ao final ($62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Já os tratamentos com $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre tiveram em média $164 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $228 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de teor de CE respectivamente. Também podemos afirmar que nas condições experimentais quanto maior o teor alcoólico maior a concentração de carbamato formado. Os teores foram de 40° GL , 45° GL e 50° GL e a média de CE foi de $115,98 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $131,65 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $150,67 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. E por fim a interferência da luz, especificamente a ultravioleta onde as garrafas âmbar apresentaram em média um teor de carbamato $91,32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ abaixo dos valores encontrados nas garrafas verdes $155,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, azuis $156,82 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e transparentes $158,32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao final dos 90 dias de estocagem. Quanto ao teor de compostos cianogênicos o destilado na ausência de luz ultravioleta teve uma redução de apenas 12,3 %, 13,8 % e 16,4 % sem cobre, cobre no limite ($5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e cobre 2 vezes o limite ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) respectivamente. Porém na presença da luz ultravioleta a redução de compostos cianogênicos foi de 17,3 %, 20,0 % e 33,1 % sem cobre, cobre no limite ($5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e cobre 2 vezes o limite ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), respectivamente. Podemos então concluir que o processo de oxidação dos compostos cianogênicos através da luz ultravioleta e a sua conversão em carbamato de etila pela reação com etanol existe. E que os fatores teor de cobre, luz ultravioleta e graduação alcoólica não são independentes, possuem algum tipo de interação.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os altos níveis de carbamato de etila (CE) encontrados em bebidas destiladas (0,1 a 12 mg·L⁻¹) leva a considerar as bebidas como a principal fonte de ingestão de CE (CARLEY et al., 2003) . Devido às altas concentrações podemos sugerir que não existe uma única via de formação do composto e sim um complexo de mecanismos que promovem a sua formação em bebidas destiladas.

Outra hipótese seria que um terceiro mecanismo de formação ocorreria durante a fase gasosa da destilação. Pode se supor que menor parte de CE presente na fase líquida é vaporizado e encontrado em destilados devido ao seu alto ponto de ebulição próximo de 184 °C (LURTON et al., 1993). Entretanto, o carbamato de etila pode ser transportado como aerossol ao condensador do alambique (BRUNO et al., 2007; CARLEY et al., 2003). Além disso, estima-se que 80 % do CE formado ocorreria durante a etapa de destilação e, ou nas primeiras 48 horas pós destilação (ARESTA et al., 2001; RIFFIKIN et al., 1989; BRUNO et al., 2007; BOULTON 1993; FOX & STACHOWIAK, 2007).

Alguns estudos relatam que em bebidas destiladas mais de 80 % do carbamato é formado durante as 48 h após a destilação (BERTRAND, 1993). Os autores relatam que é necessária a presença de dois importantes parâmetros para a produção de CE; sais metálicos (de cobre ou ferro) e luz (principalmente ultravioleta). Além disso, um sinergismo entre os sais e a luz pode ser observado (GUERRIAN, 1993).

Segundo Mackenzie et al. (1990), a posterior formação do carbamato de etila em destilados foi, primeiramente, observada em licores de frutas e atribuída a reações induzidas pela luz envolvendo o cianeto de hidrogênio, derivado da degradação da amigdalina, um glicosídeo cianogênico, por ação da enzima β -glicosidase e compostos dicarbonílicos, como o diacetil e o metil glioxal (Figura 01).

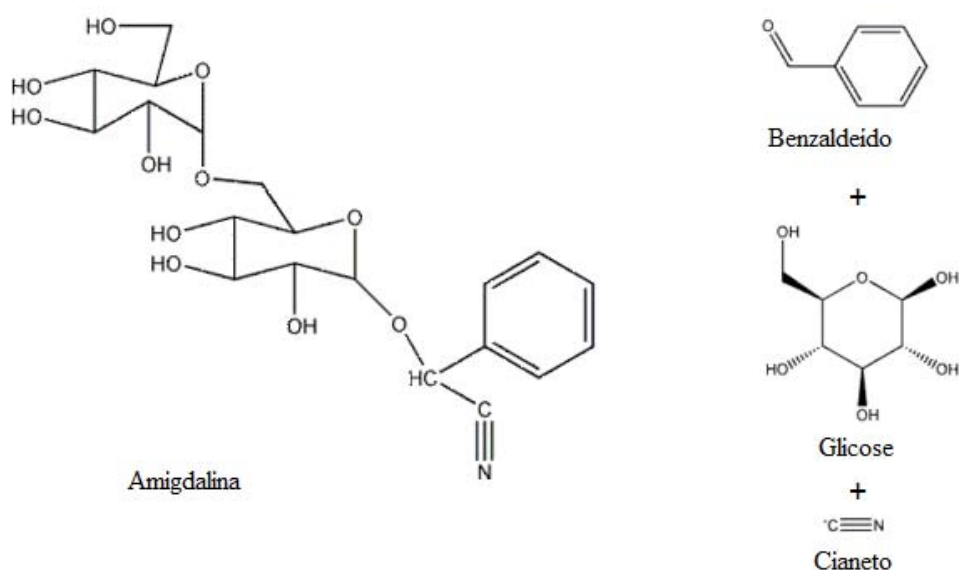


Figura 01. Formação do cianeto, glicose e benzaldeído a partir da amigdalina (Fonte: IPCS, 2004).

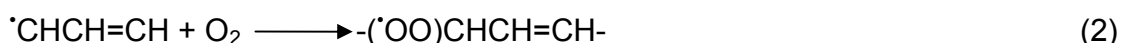
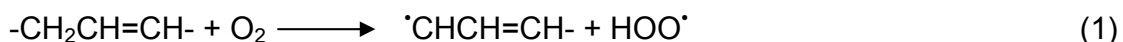
Contudo Riffkin et al. (1989), utilizando pequenos alambiques experimentais, um deles totalmente em cobre, mostraram que a formação do carbamato de etila em recém-destilados só ocorria na presença do cobre, numa reação tempo dependente, que se completa após cerca de 48h. Em temperaturas elevadas sua formação era independente do tempo.

O papel do cianeto como um importante precursor do carbamato de etila foi também demonstrado através da adição de 10 ppm de cianeto a um *Scotch Whisky* (40 % vol), em seguida armazenado por 8 semanas em laboratório. Os resultados mostraram que o cianeto adicionado foi, parcialmente, convertido a carbamato de etila e íon amônio, com o prosseguimento da reação sob influência da luz e calor. Foi, então, postulado que o cianeto era, primeiramente, convertido a cianato, que então reagiria com água para formar o íon amônio, e etanol para formar o carbamato de etila (AYLOTT et al., 1990).

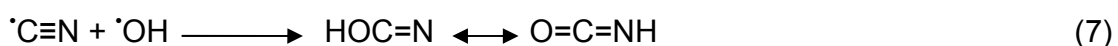
As reações fotoquímicas envolvem a produção do radical hidroxil (OH^\bullet) pela auto oxidação dos compostos insaturados presente em destilados na presença de luz. Possui período de iniciação (eq.1), seguido por período de

propagação (eq.2) e finalmente a produção do radical pela auto oxidação (eq.3) (GUERRIAN, 1993).

Esquema 01



Após a formação do radical hidroxil ocorre sua interação com os compostos glicocianogênicos que catalisa a reação de oxidação do ácido cianídrico a cianato (eq. 4 a 7). Num primeiro momento ocorre a interação dos radicais (peróxidos e hidroperóxidos) com o ácido cianídrico (eq. 4 e 5). O composto formado $\cdot\text{C}\equiv\text{N}$, reage com radical peróxido e forma o cianato (eq. 6), e por fim a interação final do cianato com etanol para formação do carbamato de etila (eq. 8) (FOX & STACHOWIAK, 2007).



O mecanismo fotoquímico também é catalisado por cobre ou sais de cobre. E o mecanismo também não se limita apenas a fase pós-destilação, existem autores que relatam esse mecanismo de formação de carbamato de etila na fase gasosa da destilação (PEDRAZA et al., 2008).

Aresta et al. (2001) reproduziram diferentes condições de oxigênio (O_2), nitrogênio (N_2) e gás carbônico (CO_2) para produção de CE a partir do ácido cianídrico na presença de cobre (Cu^{+2}). Os autores concluíram que a reação de oxidação do ácido não possui relação com aumento do teor de oxigênio dissolvido, portanto não contribui para formação do carbamato. Confirmando

que a equação de oxidação é como demonstrada na eq. 11, e não como proposta na eq. 10.



Os autores concluíram que a presença de cobre é necessária para conversão de etanol e cianato à carbamato de etila. Foi verificada uma correlação positiva, ou seja, quanto maior a concentração de cobre maior o teor de carbamato de etila na solução. Dependendo do tipo de sal, a taxa de formação aumenta em até quatro vezes. Sem catalisador o teor é de $83,0 \pm 2,9$ ppm, na presença de CuClN_2 é de 321 ± 16 ppm, na presença do catalisador o $\text{Cu}(\text{OOCCH}_3)_2$ o teor é de 342 ± 23 ppm.

Aresta et al. (2001) propuseram 2 vias para a equação final de reação com etanol para obtenção de carbamato de etila. Na primeira, o isocianato sofre ataque do etanol formando uma unidade carbâmica (eq. 11) que por sua vez reage com uma molécula de água para formar o CE (eq. 12). Na segunda via, ocorre ataque da água e depois do etanol pelo isocianato gerando o carbamato (eq. 13 e 14).



Na verdade o cobre proveniente de alambiques (sais de cobres) são encontrados em concentrações acima de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em algumas bebidas destiladas. Esses sais são os possíveis catalisadores da formação do carbamato de etila pós-destilação. Portanto, para que a inibição da formação de CE seja realizada deve-se eliminar a presença desses compostos que possuem o cobre. Diferentes maneiras estão sendo estudadas; a primeira é o uso de

agentes quelantes insolúveis ou resinas trocadoras de cátions. Existem poucos estudos e patentes sobre a remoção de cobre em bebidas destiladas baseados em agentes quelantes ou usando resinas quelantes (KOGYO, 2002; SHUGUANG & GIBB, 2008). Esses métodos dependem de variáveis como pH, tempo de contato com a resina, temperatura e tamanho da partícula da resina.

Existem estudos para remoção dos precursores do CE, cianetos voláteis, nas bebidas destiladas durante o processo pelo uso de resina trocadora de anions tanto em escala laboratorial e industrial (WUCHERPFENNING et al., 1992; GUERRIAN e LEBLOND, 1993). Os autores observaram uma grande redução de íons cianetos ($<0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e surpreendentemente de íons cobre em destilados de cereja (45° GL) ou destilados de ameixas (65° GL). Os cátions de cobre foram imobilizados nas resinas. Os autores também observaram uma enorme redução do teor de carbamato de etila (abaixo de $140 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) associado à eliminação do cobre e cianetos voláteis. Porém foi observado modificações significativas nas propriedades organolépticas das bebidas como odor desagradável e ganho de “sabor de terra” as bebidas.

Recentemente, Neves et al. (2007) descreveram um eficiente método para remoção de íons cobre em destilados alcoólicos (cachaça) sem mudanças significativas nas propriedades organolépticas. O método é baseado no tratamento das bebidas com carbonato de cálcio (CaCO_3) ou carbonato de magnésio (MgCO_3) o qual se comporta como trocador catiônico (eq. 15 a 18). Os autores observaram, em amostras recém destiladas que o nível de cobre foi menor que $0,01 \text{ mg/L}$ para ambos carbonatos. Existe associado a esse processo um aumento do pH devido a neutralização dos ácidos orgânicos.



Foi observado que para amostras envelhecidas em barril de madeira o processo é menos efetivo, a explicação estaria nos compostos aromáticos responsáveis pelo sabor e aroma formado durante o envelhecimento. Pois o cobre não estaria em uma forma acessível para a reação com carbonato de cálcio ou magnésio. Porém a agitação do carbonato sólido formado pode promover a formação de compostos que afetam significativamente as propriedades organolépticas da cachaça. Entretanto esse método de redução do nível de cobre ainda deve ser adaptado para escala industrial.

Portanto o objetivo desse capítulo foi confirmar a existência do mecanismo fotoquímico em que existe a autooxidação dos compostos cianogênicos tendo o cobre como catalisador durante a estocagem da cachaça. Foram 90 dias de estocagem em 4 tipos de vidros (âmbar, azul, verde e transparente).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. A cachaça obtida recém destilada com 61 °GL foi corrigida com água desmineralizada para obter a graduação alcoólica de interesse.

2.1. Remoção de cobre da cachaça

O cobre foi retirado conforme metodologia de Neves et al. (2007), pela adição de carbonato de cálcio (CaCO_3), o qual se comporta como trocador catiônico, depois centrifugado a 5000x g e retirado o sobrenadante. A concentração final de cobre foi de $0,21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

2.2. Efeito do teor de cobre, graduação alcoólica e cores das embalagens de vidro na formação de carbamato de etila

O experimento foi montado da seguinte maneira; uma parcela contendo o cobre no teor de $0,21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, outra com $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (limite permitido pela legislação) e outra com $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2 vezes a concentração permitida pela legislação). Para a graduação alcoólica utilizou os valores de 40, 45 e 50° GL. Já as garrafas (50 mL) utilizadas foram: transparente, verde, azul e âmbar conforme quadro 01. O tempo de estocagem foi de 90 dias.

Para obtenção do teor de cobre de $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ uma solução de sulfato de cobre concentrada foi preparada e adicionado um volume específico para obter as respectivas concentrações em 50 mL (volume das garrafas).

Quadro 01: Croqui do experimento

[] Cu ⁺⁺	40° GL	45° GL	50° GL
0,21 mg·L ⁻¹ de Cu ⁺⁺	Âmbar	Âmbar	Âmbar
	Azul	Azul	Azul
	Verde	Verde	Verde
	Transparente	Transparente	Transparente
5,00 mg·L ⁻¹ de Cu ⁺⁺	Âmbar	Âmbar	Âmbar
	Azul	Azul	Azul
	Verde	Verde	Verde
	Transparente	Transparente	Transparente
10,0 mg·L ⁻¹ de Cu ⁺⁺	Âmbar	Âmbar	Âmbar
	Azul	Azul	Azul
	Verde	Verde	Verde
	Transparente	Transparente	Transparente

2.3 Efeito do teor de ureia e formação de carbamato de etila no período de estocagem em garrafas transparentes.

Para correlacionar a concentração de ureia e formação de CE, foi estabelecido um experimento com garrafas transparentes de 50 mL com intuito de verificar se a variação no teor de ureia pode ocasionar uma maior formação do carbamato durante 90 dias. O experimento foi montado conforme o quadro 2. O teor de cobre nas amostras foi de 0,21 mg·L⁻¹.

Quadro 02: Esquema do experimento

[] Ureia	40° GL	45° GL	50° GL
Ureia 1 (2 mM)	Transparente	Transparente	Transparente
Ureia 2 (4 mM)	Transparente	Transparente	Transparente
Ureia 3 (6 mM)	Transparente	Transparente	Transparente

2.4. Quantificação do carbamato de etila.

Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, com detector de massas Shimadzu QP-5050A tendo como fonte de ionização o impacto eletrônico com 70 eV. Foi utilizada coluna cromatográfica capilar de fase polar (polietilenoglicol), DB-WAX (60 m x 0,25 mm x 0,50 μ m). Temperaturas do injetor e da interface do detector ambas de 220 °C. Empregou-se a seguinte programação de temperatura para o forno: teve início com 90 °C (2 min), elevada a 150 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹, seguido de um aquecimento para 230 °C a uma taxa de 40 °C min⁻¹ permanecendo por 10 min. Volume injetado foi de 2,0 μ L “splitless”. Gás de arraste hélio (5.0) com fluxo de 1,5 mL·min⁻¹. Modo de aquisição SIM, monitorando os íons de m/z 62, 74 e 89.

A quantificação foi realizada através da comparação dos resultados cromatográficos das amostras com uma curva analítica obtida a partir de uma solução estoque de carbamato de etila (New Química[®]) 99 % 2,0 mg·mL⁻¹ em etanol:água (40:60 v/v). Diluições foram realizadas abrangendo a faixa de concentração de 0,005 – 1,0 mg·L⁻¹. ($y = 229,9x - 5399$, $R^2 = 0,9987$).

2.5. Análise estatística dos resultados

Os ensaios experimentais da estocagem foram conduzidos segundo esquema fatorial (3x4x3), disposto em delineamento inteiramente casualizado,

composto por 3 concentrações de cobre ($0,21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e 4 tipos de vidros (âmbar, azul, verde e transparente) e 3 concentrações de álcool em volume a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($40 \text{ }^\circ\text{GL}$, $45 \text{ }^\circ\text{GL}$ e $50 \text{ }^\circ\text{GL}$) em 3 repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional MINITAB® 13.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do teor de ureia e formação do carbamato de etila durante estocagem

Após 90 dias de estocagem, pode se observar que não existe diferença da concentração de CE em função do teor alcóolico para um mesmo tratamento de concentração de uréia.

(Figura 02 e 03).

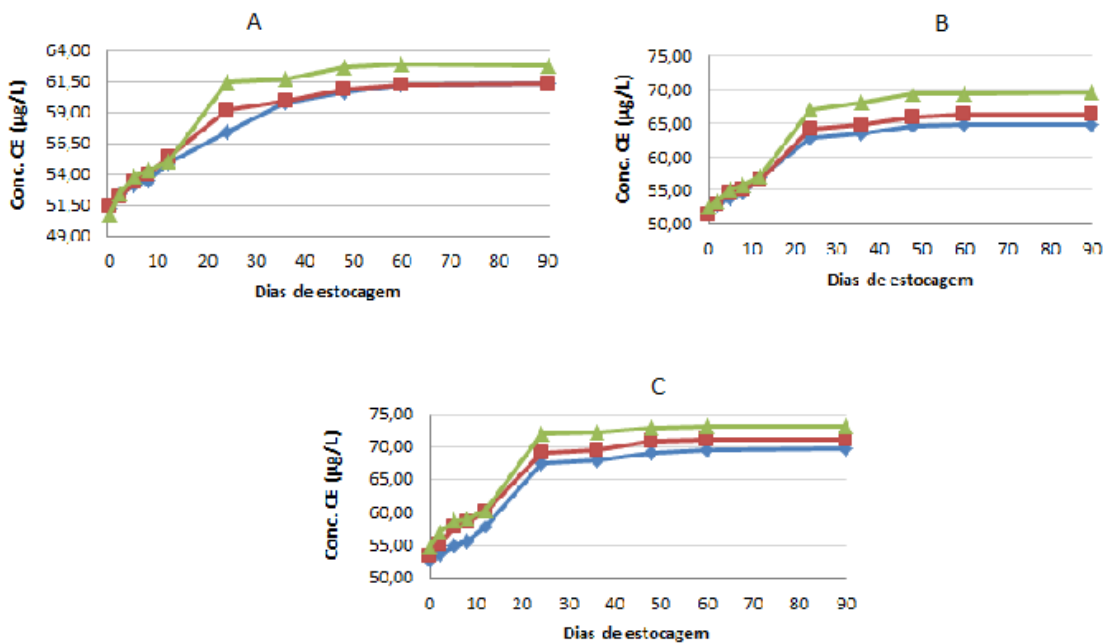


Figura 02: Gráficos do teor ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de carbamato de durante os 90 dias de estocagem. A (gráfico da Ureia 1) , B (gráfico da Ureia 2) e C (gráfico da Ureia 3). \blacklozenge 40° GL , \blacksquare 45° GL e \blacktriangle 50° GL.

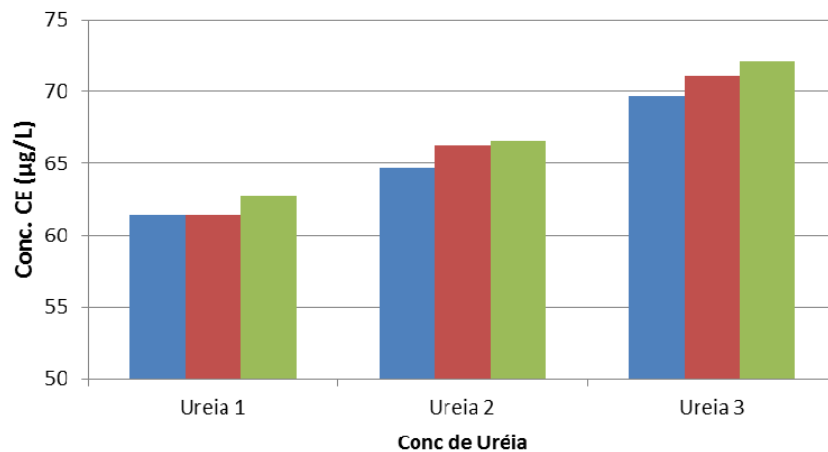


Figura 03: Gráficos do teor ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de carbamato de etila ao final dos os 90 dias de estocagem. ■ 40° GL, ■ 45° GL e ■ 50° GL.

Ao analisarmos pela concentração de ureia dentro do mesmo teor alcoólico existe diferença ($p < 0,05$) quanto à formação do carbamato de etila como demonstrado na figura 04 e tabela 01.

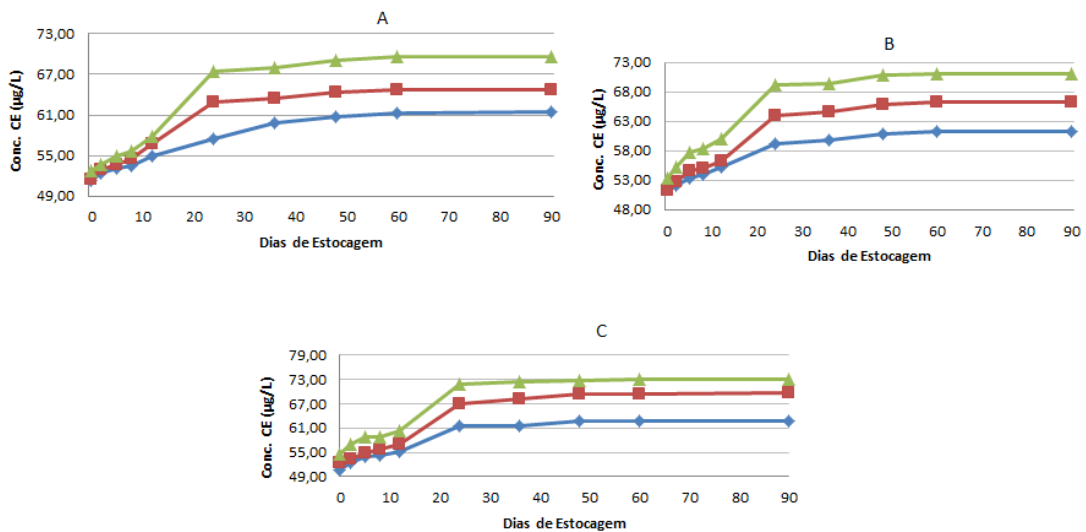


Figura 04: Gráficos do teor ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de carbamato de etila durante os 90 dias de estocagem. A (40° GL), B (45° GL) e C (50° GL). ◆ Ureia 1, ■ Ureia 2 e ▲ Ureia 3.

Tabela 01: Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) médio de carbamato de etila em cachaça ao final dos 90 dias de estocagem

	Tratamento	Teor CE ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [*]
40° GL	Ureia 1	61,4 ± 2,31 ^a
	Ureia 2	64,3 ± 1,63 ^b
	Ureia 3	71,2 ± 0,84 ^c
45° GL	Ureia 1	61,6 ± 1,45 ^a
	Ureia 2	65,1 ± 0,31 ^b
	Ureia 3	72,4 ± 1,83 ^c
50° GL	Ureia 1	62,0 ± 0,47 ^a
	Ureia 2	64,8 ± 0,55 ^b
	Ureia 3	72,8 ± 1,28 ^c

*Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade

Na ausência de cobre e presença de luz o teor alcoólico não possui influência na formação do carbamato de etila, enquanto a ureia possui efeito significativo. Tendo uma maior formação de CE para uma maior concentração de ureia. Mas vale ressaltar que nenhum dos tratamentos extrapolou os limites da legislação brasileira, $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A ureia está presente no destilado devido ao seu baixo ponto de ebulição e com isso é transferida para a fração coração durante a destilação.

Estes resultados divergem dos encontrados na literatura (ARESTA et al., 2001; MONTEIRO ET AL, 1990), uma vez que vários autores relatam que quanto maior o teor alcoólico do destilado maior a concentração de carbamato de etila no período de estocagem.

3.2. Efeito do teor de cobre, grau alcoólico e tipo de embalagem

Após os 90 dias de estocagem, analisamos cada parâmetro em função dos outros fatores para concluir a sua contribuição na formação do carbamato de etila (Tabela 02). Podemos observar que os parâmetros grau alcoólico, teor

de cobre e luz ultravioleta são responsáveis pela formação do carbamato de etila durante o período de estocagem.

Ao analisarmos a tabela 02 notamos que as interações duplas (Embalagem X Cobre; Embalagem X Grau alcoólico e Cobre X Grau alcoólico) são significativas ($p < 0,05$). O mesmo acontece para a interação tripla (Embalagem X Cobre X Grau alcoólico).

Tabela 02: Análise de variância fatorial 4x3x3

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Embalagem	3	45873,7	15291,2	5038,08	<0,001
Cobre	2	227058	113529,	37405,18	<0,001
Grau alcoólico	2	22420,0	11210,0	3693,42	<0,001
Embalagem X Cobre	6	17748,8	2958,1	974,63	<0,001
Embalagem X Grau alcoólico	6	1488,7	248,1	81,75	<0,001
Cobre X Grau alcoólico	4	7592,7	1898,2	625,40	<0,001
Embalagem X Cobre X GL	12	1404,5	117,0	38,56	<0,001
Resíduo	72	218,5	3,0351		
Total	107	323805			

Assim para melhor visualização fixou-se 2 parâmetros e variou um terceiro aplicando teste de média. Assim através da tabela 03 observamos que em um dado teor de cobre e dado grau alcoólico a garrafa âmbar difere das demais garrafas (azul, verde e transparente).

Tabela 03: Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em cachaça após 90 dias de estocagem em função do tipo de embalagem.

		Concentração média de Carbamato de etila ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*		
Embalagem		40° GL	45° GL	50° GL
0,21 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu^{++}	Âmbar	60,07 ± 1,37 ^a	64,47 ± 1,71 ^a	66,87 ± 0,55 ^a
	Azul	68,36 ± 1,32 ^b	76,81 ± 0,49 ^b	83,53 ± 2,13 ^b
	Verde	66,47 ± 0,34 ^b	76,16 ± 1,51 ^b	86,02 ± 1,28 ^b
	Transparente	67,70 ± 0,20 ^b	75,92 ± 1,48 ^b	86,05 ± 1,01 ^b
5,00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu^{++}	Âmbar	84,42 ± 0,64 ^a	91,25 ± 0,96 ^a	109,25 ± 2,51 ^a
	Azul	127,11 ± 0,99 ^b	137,95 ± 0,60 ^b	155,70 ± 0,91 ^b
	Verde	127,42 ± 0,86 ^b	137,24 ± 2,25 ^b	156,60 ± 2,21 ^b
	Transparente	126,66 ± 1,11 ^b	138,58 ± 0,90 ^b	155,72 ± 1,05 ^b
10,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu^{++}	Âmbar	108,91 ± 1,46 ^a	120,58 ± 2,42 ^a	135,95 ± 0,91 ^a
	Azul	175,62 ± 1,21 ^b	193,80 ± 1,34 ^b	249,37 ± 1,4 ^b
	Verde	176,54 ± 0,67 ^b	193,15 ± 2,23 ^b	248,87 ± 2,3 ^b
	Transparente	177,94 ± 1,01 ^b	194,78 ± 0,52 ^b	248,78 ± 3,9 ^b

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

Todos os destilados contidos em garrafas âmbar apresentaram teores menores de carbamato de etila (figura 05). Os destilados em garrafas verdes, transparente e azuis não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$).

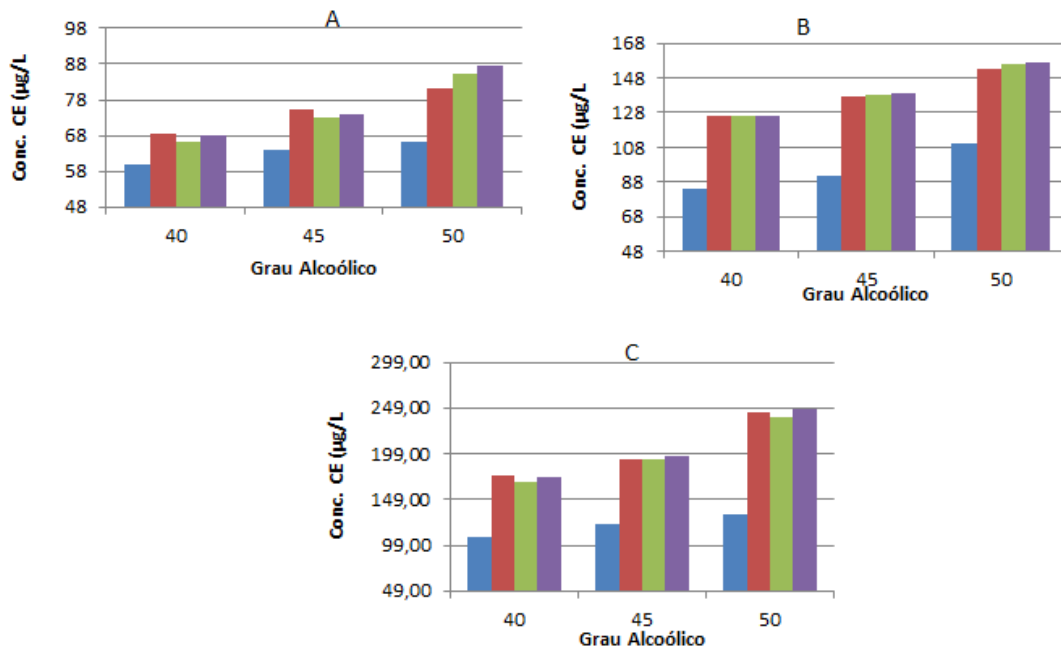


Figura 05: Teor de carbamato de etila após 90 dias de estocagem. (A) sem cobre, (B) cobre no limite ($5,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e (C) cobre 2x ($10,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). ■ Âmbar ■ Azul, ■ Verde e ■ Transparente.

Quando o parâmetro que varia é o grau alcoólico e tem fixado o tipo de garrafa e o teor de cobre pode se verificar que quanto maior a graduação alcoólica maior a formação do carbamato de etila após os 90 dias de estocagem (Tabela 04).

Tabela 04: Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em cachaça após 90 dias de estocagem em função da graduação alcoólica.

Cu ⁺⁺	°GL	Teor médio de Carbamato de etila ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*			
		Âmbar	Azul	Verde	Transparente
0,21 mg·L ⁻¹	40	60,07 ± 1,37 ^a	68,36 ± 1,32 ^a	66,47 ± 0,34 ^a	67,70 ± 0,20 ^a
	45	64,47 ± 1,71 ^b	76,81 ± 0,49 ^b	76,16 ± 1,51 ^b	75,92 ± 1,48 ^b
	50	66,87 ± 0,55 ^b	83,53 ± 2,13 ^c	86,02 ± 1,28 ^c	86,05 ± 1,01 ^c
5,00 mg·L ⁻¹	40	84,42 ± 0,64 ^a	127,11 ± 0,99 ^a	127,42 ± 0,86 ^a	126,66 ± 1,11 ^a
	45	91,25 ± 0,96 ^b	137,95 ± 0,60 ^b	137,24 ± 2,25 ^b	138,58 ± 0,90 ^b
	50	109,25 ± 2,51 ^c	155,70 ± 0,91 ^c	156,60 ± 2,21 ^c	155,72 ± 1,05 ^c
10,0 mg·L ⁻¹	40	108,91 ± 1,46 ^a	175,62 ± 1,21 ^a	176,54 ± 0,67 ^a	177,94 ± 1,01 ^a
	45	120,58 ± 2,42 ^b	193,80 ± 1,34 ^b	193,15 ± 2,23 ^b	194,78 ± 0,52 ^b
	50	135,95 ± 0,91 ^c	249,37 ± 1,4 ^c	248,87 ± 2,3 ^c	248,78 ± 3,9 ^c

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

Variando o parâmetro teor de cobre e fixado o tipo de garrafa e grau alcoólico observa se incremento na concentração de CE. Um aumento no teor de cobre no destilado aumenta a concentração final de carbamato de etila (tabela 05).

Tabela 05: Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em cachaça após 90 dias de estocagem em função do teor de cobre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Teor médio de Carbamato de etila ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*					
Embalagem de vidro					
$^{\circ}\text{GL}$	Cu^{++} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Âmbar	Azul	Verde	Transparente
40	0,21	$60,07 \pm 1,37^a$	$68,36 \pm 1,32^a$	$66,47 \pm 0,34^a$	$67,70 \pm 0,20^a$
	5,00	$84,42 \pm 0,64^b$	$127,11 \pm 0,99^b$	$127,42 \pm 0,86^b$	$126,66 \pm 1,11^b$
	10,00	$108,91 \pm 1,46^c$	$175,62 \pm 1,21^c$	$176,54 \pm 0,67^c$	$177,94 \pm 1,01^c$
45	0,21	$64,47 \pm 1,71^a$	$76,81 \pm 0,49^a$	$76,16 \pm 1,51^a$	$75,92 \pm 1,48^a$
	5,00	$91,25 \pm 0,96^b$	$137,95 \pm 0,60^b$	$137,24 \pm 2,25^b$	$138,58 \pm 0,90^b$
	10,00	$120,58 \pm 2,42^c$	$193,80 \pm 1,34^c$	$193,15 \pm 2,23^c$	$194,78 \pm 0,52^c$
50	0,21	$66,87 \pm 0,55^a$	$83,53 \pm 2,13^a$	$86,02 \pm 1,28^a$	$86,05 \pm 1,01^a$
	5,00	$109,25 \pm 2,51^b$	$155,70 \pm 0,91^b$	$156,60 \pm 2,21^b$	$155,72 \pm 1,05^b$
	10,00	$135,95 \pm 0,91^c$	$249,37 \pm 1,4^c$	$248,87 \pm 2,3^c$	$248,78 \pm 3,9^c$

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

Estudos de Aylott et al. (1990, 1987) mostraram a formação adicional (pós-destilação) de carbamato de etila em amostras de recém-destilados de *grain whisky* escocês, produzidos em quatro diferentes destilarias. Quando 36 amostras foram armazenadas em barris de madeira de 500 litros por um período de 3 meses, os níveis de carbamato de etila aumentaram, em média, de 10 ppb para 32 ppb, com um máximo de 80 ppb. As concentrações de carbamato de etila nas amostras armazenadas em ambientes escuros e analisadas num período de 24 h após a destilação, apresentaram, geralmente, menores teores (cerca de 100 ppb a menos) que aquelas maturadas..

A exposição em condições padronizadas de luz fluorescente intensa e aquecimento (43 °C), por 3 dias, resultou em teores de carbamato de etila acima de 160 ppb para algumas amostras, enquanto outras pouco aumentaram seus níveis iniciais (< 20 ppb). 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. Eles analisaram possíveis precursores que favorecem a formação do carbamato de etila, como cianetos, cianatos, cianidrina e complexos cobre-cianeto, verificaram que existe a necessidade da presença de traços destes compostos. Exposição à luz artificial fluorescente em laboratório, de amostras de destilados engarrafadas em vidros

transparente por 72 horas à 43 °C, apresentaram níveis crescentes de carbamato de etila sendo esta formação completada após 3 dias. Durante o estudo, níveis de carbamato de etila, aumentaram rapidamente nas 3 primeiras semanas de maturação e esses variaram de (45 a 65) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto a análise de compostos contendo cianeto decresceram e nenhuma amostra foi detectada a presença de ácido cianídrico (limite de detecção 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), e complexo cobre-cianeto no uísque maturado ou produto final acabado. Concluindo, a concentração final do carbamato de etila no produto destilado é dependente apenas da concentração inicial, medida após a destilação, mais a que é formada na presença destes precursores.

Tegmo-Larsson & Spitler (1990) pesquisaram o efeito do armazenamento em várias temperaturas e diferentes condições de exposição à luz na formação de carbamato de etila, em uma série de vinhos tintos e brancos de mesa e fortificados. Durante (3, 6 e 12) meses de estocagem, foram utilizadas temperaturas de (22, 32 e 43) °C na ausência de luz, à 22 °C em luz fluorescente, e em condições naturais de luz e temperatura, simulando o ponto de venda deste produtos. Os resultados mostraram que à temperatura de 43 °C, a concentração de carbamato de etila pode exceder níveis aceitáveis, mas a 22 °C, ou seja, em condições apropriadas de estocagem, estas concentrações não são alcançadas. A luz não teve influência significativa na formação do carbamato de etila. Exatamente o contrário ao encontrado nesse estudo, onde o vidro capaz de absorver a radiação ultravioleta apresentou um destilado com menor teor de carbamato.

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 & BISSON, 2003; ZIETMAN et al., 2003).

Alguns fatores que influenciam na formação do carbamato de etila em bebidas alcoólicas não são controláveis, contudo, outros podem ser manipulados, como, por exemplo, eliminar a prática de se adicionar ureia para estimular a fermentação, o que hoje já não ocorre mais (NAGATO et al., 2003).

Pesquisas com vinho e aguardentes de frutas fermentadas indicam que é possível reduzir o nível de carbamato de etila, reduzindo o nível dos agentes precursores, selecionando a força do fermento, controlando a condição de fermentação e ajustando o pH da massa fermentativa com sulfato de cobre (BUTKE & BISSON, 2003).

Podemos observar na figura 07 o comportamento dos compostos cianogênicos durante os 90 dias de estocagem concluindo que existe mesmo um mecanismo de auto-oxidação com luz ultravioleta de compostos insaturados presentes em bebidas alcoólicas, que produzem os radicais livres (orgânicos ou hidroperóxidos), que catalisam a oxidação de cianeto a cianato (ARESTA et al., 2001). Na presença de cobre ($10,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e luz ultravioleta a redução do teor de desses compostos foi de 33 % enquanto na ausência de cobre e ausência de UV a redução foi de apenas 12,3 %. A reprodução das condições de comercialização de uma cachaça seria na presença de cobre ($5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e presença de luz ultravioleta obteve uma redução do compostos CN de aproximadamente 20 %.

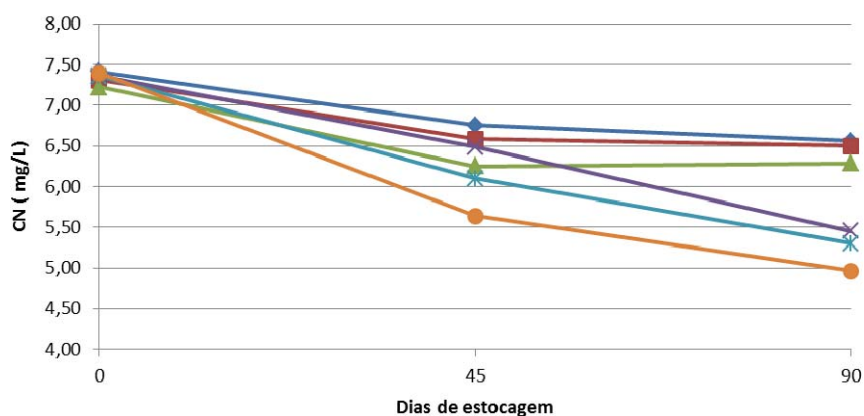


Figura 07: Teor de compostos cianogênicos CN ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante estocagem (dias). \blacklozenge sem Cobre (sem UV), \blacksquare Cobre Limite (sem UV), \blacktriangle Cobre 2x (Sem UV), \square Sem cobre (com UV), \square Cobre Limite (com UV) \bullet Cobre 2x (com UV).

Os fatores que influenciam a formação de carbamato de etila a partir de cianeto são pH, luz, teor de etanol, temperatura, proximidade de grupos carbonila em moléculas orgânicas, e concentração de íons Cu^{II} na bebida (BATTAGLIA et al.,1990; RIFFIKING et al., 1989).

4. CONCLUSÕES

Após os 90 dias de estocagem, podemos concluir que a embalagem com vidro âmbar apresentou destilados com menor teor de carbamato, pois possui a capacidade de absorver a luz ultravioleta evitando a oxidação do cianeto e bloqueando a formação do carbamato. Logo o vidro âmbar inibe esse mecanismo fotoquímico de produção de CE.

O teor de cobre também interfere na formação do carbamato, pois atua como catalisador da reação tanto no mecanismo do cianeto, como no da ureia. Com isso quanto maior a concentração do metal no destilado maior o teor de carbamato de etila formado.

O mesmo comportamento é observado na concentração alcoólica. As aguardentes que apresentaram maior concentração final de carbamato de etila possuíam maior graduação alcoólica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AYLOTT, R, COCHRANE, G. C., LEONARD, M. J., MACDONALD, L. S., MACKENZIE, W. M., MCNEISH, A. S., (1990). Ethyl carbamate in grain spirits. Part I : Post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky. **Journal Institute Brew.**, v. 96, p. 213-221.

AYLOTT, R.I.; MCNEISH, A.S.; WALKER, D.A. (1987) Determination of ethyl carbamate in distilled spirits using nitrogen specific and MS detection. **Journal. Institute Brew.**, England, v.4, p.382-386.

BATTAGLIA, R.; CONACHER, R.B.S.; PAGE, B.D. (1990) Ethyl carbamate (urethana) in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Addit. Contam.**, London, v. 7, n. 4, p. 477-496,.

BERTRAND A (1993). Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin in Roger Cantagrel Editor, *E' laboration et Connaissance des Spiritueux*, **Recherche de la qualite, tradition et innovation** v.5, p.278–289.

BOULTON R (1993). The formation of ethyl carbamate from isocyanate and ethanol at elevated temperature. **E' laboration et Connaissance des Spiritueux**, v.4, p.479-492

BRUNO S. N. F; VAITSMAN, D. S; KUNIGAMI, C. N;. (2007). Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethylcarbamate formation in brazilian sugar cane spirits. **Food Chem** v. 104(4), p.1345–1352

BUTZKE, C.E.; BISSON, L. F. Ethyl carbamate preventative action manual, Depart. of Viticulture & Enology, 1997. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~rfr/ecaction.html> >. Acesso em: 05 jan. 2008

CARLEY, A. F; CHINN, M; PARKINSON, C. (2003) Adsorption and reaction of CN + O = OCN on Cu(100) surface: a density functional theory study. **Surface Science** v.537, p.64–74

FOX ,N. J; STACHOWIAK, G. W. (2007) Vegetable oil-based lubricants—a review of oxidation. **Tribology Int** 40(7):1035–1046

GUERAIN J; LEBLOND, N. (1993) Formation du carbamate d'éthyle et élimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits **Recherche de la qualite', tradition et innovation**, 330–338

IPCS. International Programme on Chemical Safety. Hydrogen cyanide and cyanides: human health aspects, (2004). Disponível em: <<http://www.inchem.org/ documents/cicads/cicads/cicad61.htm>>.

KOGYO, K. H. (2002). Mixed fruit juice alcoholic beverage production—including removing copper by treating with substance binding with copper or absorbing copper, Patent number: JP3310382-B2.

- LURTON L, VIDAL JP, ESTREGUIL S, CANTAGREL R (1993) Comportement Du carbamate d'éthyle lors de la distillation des vins pour l'obtention des eaux-de-vie de Cognac in Roger Cantagrel Editor, pp 344–349
- NAGATO, L. A. A. F.; NOVAES, F. V.; PENTEADO, M. V. C. (2003). Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. **SBCTA**. Campinas, junho 2003
- NEVES, E. A.; OLIVEIRA, A FERNANDES, A. P.; NOBREGA, J. A. (2007). Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, v.101, p.33-36.
- PEDRAZA-AVELLA, J. A; ACEVEDO-PENA, P; PEDRAZA-ROSAS J, E. (2008). Photocatalytic oxidation of cyanide on TiO₂: an electrochemical approach. **Catal Today** v.133, p.611–618
- RIFFKIN, H. L.; WILSON, R.; HOWIE, D.; MULLER, S. B. (1989) .Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **Journal Institute Brew**, v. 95, p.115 -119.
- SHUGUANG, L; GIBB, S. W. (2008) Copper removal from wastewater using spent-grain as biosorbent. **Bioresource Technol** v. 99(6), p.1509–1517
- TEGMO-LARSSON I. M., SPITTLER, T. D. ¹, ROGRIGUEZ S. B. (1990). Effect of Malolactic Fermentation on Ethyl Carbamate Formation in Chardonnay Wine. **Am. Journal Enology Vitic.** v.40, p. 106-108.
- WUCHERPFENNING, K. (1992) Removing iron and copper ions out of beverages by means of selective complexing agents. Part 2 Factors affecting heavy-metal bonding to chelon resins. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau** v.88(10), p.313–31
- ZIETSMAN, A.; VILJOEN, M.; VAN VUUREN, H. (2000) Preventing Ethyl Carbamate Formation in Wine. **Wine Land South Africa**, v. 2, p.83–85

CONCLUSÃO GERAL

A fermentação é a etapa que mais produz o carbamato de etila, na ordem de mg, bem acima do permitido pela legislação brasileira. Porém uma destilação bem conduzida com a separação correta das frações cabeça, coração e cauda consegue eliminar quase por completo a contaminação proveniente da fermentação.

Porém uma estocagem do destilado na presença de luz ultravioleta e com teor de cobre $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, o permitido pela legislação, acarreta formação de carbamato de etila acima de $150 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ressaltando que temos no destilado apenas a fração coração sem contaminação das frações cabeça e cauda.

Medidas simples como uma separação correta da destilação, estocagem do destilado em ambiente sem luz ultravioleta e na ausência de cobre já seriam suficientes no controle do carbamato de etila.

Estudos devem ser conduzidos a fim de identificar os compostos cianogênicos presentes no caldo de cana de açúcar. E se possível promover a sua redução. Os compostos glicocianogênicos possuem uma grande parcela na formação final do carbamato de etila.