



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

VIRGÍNIA MADEIRA BARROS DE QUEIROZ

**VERIFICAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CARBAMATO DE
ETILA EM AGUARDENTES ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)**

FORTALEZA – CE

2017

VIRGÍNIA MADEIRA BARROS DE QUEIROZ

**VERIFICAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CARMABATO DE
ETILA EM AGUARDENTES ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de graduada em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elisane Longhinotti.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Q48v Queiroz, Virgínia Madeira Barros de.
Verificação de metodologia para quantificação de carbamato de etila em aguardentes através de cromatografia acoplada a espectrometria de massas (GC - MS) / Virgínia Madeira Barros de Queiroz. – 2017.
51 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Elisante Longhinotti.
1. Carbamato de etila. 2. Aguardentes. 3. Cromatografia Gasosa. 4. Espectrometria de Massas. I. Título.
CDD 660
-

VIRGÍNIA MADEIRA BARROS DE QUEIROZ

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CARMABATO DE
ETILA EM AGUARDENTES ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A
ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Engenharia Química da
Universidade Federal do Ceará, como parte dos
requisitos para obtenção do título de graduada em
Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elisane Longhinotti.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Elisane Longhinotti (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Carlla Lorena Façanha
Técnica Química

Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, parentes, professores e amigos.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desse trabalho foi possível graças à colaboração e apoio de várias pessoas, das mais diversas formas.

Agradeço inicialmente à Nádja Maria, mulher mãe solteira, trabalhadora e íntegra, que lutou contra todas as dificuldades para dar as melhores condições de vida possível para seus filhos com uma alegria e força imbatível. Mãe, obrigada por me ensinar que a base do meu sucesso é meu amor próprio e que meu lugar é onde eu acredito que eu deva estar. O infinito está contido dentro do meu intervalo de alcance.

Ao meu pai Mário, minha avó Laís, meus tios Marcello e Ana Célia e a minha “amiga-vó” Ana Maria pelo apoio para realização dos meus sonhos durante toda a minha vida.

Ao meu irmão Duan, por estar sempre tentando amarrar meus pés ao chão, minha irmã Giovana, por estar sempre com a tesoura à postos para me libertar: divina combinação.

À Carlla Lorena, professora, amiga, conselheira, parceira de trabalho e motivadora: acreditar no meu potencial ficou bem mais fácil com a nossa convivência.

Aos meus amigos Sofia, José Vitor, Larissa, Jamille, Jéssyca, Silvia e David pelos ouvidos pacientes e incansáveis e pela inspiração.

Aos amigos que fizeram parte do meu ambiente de trabalho, Ana Lúcia, Leila, Juliana, Gleycilene, Nathália, Victor, Vandemberg, Simone e Leonice, pela colaboração e descontração durante a execução deste trabalho.

À professora Elisane pelo suporte e direcionamento para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro Acadêmico da Engenharia Química pelo acolhimento e por energizar esse momento da minha vida

À professora Rílvia pela motivação e pela paciência.

À professora Valderez pelo empenho em me ajudar, me tranquilizar e me fazer acreditar que eu sou vencedora.

A presença de seres como vocês em minha vida foi combustível não só para a finalização deste trabalho como também para um processo interno de revisão de valores e crescimento pessoal.

“All in all, it's just another brick in the wall.”

(Roger Waters)

RESUMO

O processo de produção de aguardentes (bebidas com graduação alcoólica de 38% a 54% v/v) consiste da fermentação do caldo de cana-de-açúcar através de leveduras seguido de destilação do caldo produzido. O CE é um composto secundário no processo de fabricação de bebidas, cuja a rota de reação entre a ureia e etanol em meio ácido é a de maior ocorrência para formação deste composto em destilados de cana. A operação unitária de destilação do vinho volante apresenta-se como etapa crítica para esse processo de fabricação devido facilidade de formação deste associado ao alto teor de etanol em conjunto com a elevada temperatura de processo e a presença de catalizadores (Cu^{2+}) de reação.

O CE é um composto tóxico e cancerígeno cujo seu controle percentual em bebidas é determinado pelo Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA) através da Instrução Normativa no 13, de 29 de junho de 2005, que propõe 150 $\mu\text{g/L}$ como limite máximo deste contaminante.

Neste trabalho foi realizado a verificação da metodologia analítica quantificação do CE usando um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). A análise dos padrões de concentração foi procedida em triplicata, onde as curvas de calibração apresentaram regressão média (R^2) aproximadamente igual à 0,9993. O teste de T de Student apresentou ausência de erros sistemáticos, sendo comprovado a eficácia do método quando analisado a homogeneidade do coeficiente de variação para os diferentes experimentos.

O método de análise foi submetido ao teste de proficiência do MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento), apresentando resultados satisfatórios para as uma das amostras enviadas pelo órgão (BEB.016.001) e questionável para outra (BEB.016.002), apresentando z-score de respectivamente, -0,12 e 2,24.

Palavras-chave: Carbamato de etila. Cachaça. Aguardentes. Espectrometria. Cromatografia

ABSTRACT

The manufacturing process of spirits (drinks that contains between 38 and 54 percent alcohol by volume), also called as distilled liquor, consist in distillation of sugarcane fermentation formed wine. Ethyl carbamate (EC) is a secondary compound of the spirits production process, whose reaction route between urea and ethanol under acid condition is the most frequent one. The distillation of sugarcane wine is a spirits manufacturing critical step due ease formation of EC associated to ethanol high content, high process temperature and catalysts presence (Cu^{2+}).

EC is a genotoxic carcinogen and its content control on distillate drinks is determined by Ministry of Agriculture, Livestock and Provisioning (MAPA) through June 29th, 2005, 13th Brazilian Ministry of Agriculture Normative Instruction, which $150\mu\text{g/L}$ is the upper limit allowed. EC quantification was proceed by analytical method using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) in selected ion monitoring (SIM) mode for the quantification.

The analysis of eight concentration patterns was performed in triplicate and the resulting calibration curve presented average regression (R^2) of 0,9993. Student T test showed no systematic errors, being the effectiveness of the method proven by the homogeneous coefficient of variation (CV) analyzed of different experiments.

The method was submitted to MAPA's proficiency test, whose the analysis was satisfactory for the BEB.016.001 sample and questionable for the BEB.016.002, resulting in a z-score distribution of -0,12 e 2,24, respectively.

Keywords: Ethyl Carbamate. Brazillian Spirits. Sugar Cane Distillate. Spectrotometry. Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Composição do setor de bebidas, segundo valor das vendas e volume produzido – Brasil, acumulado 2005-2011 (em %)	19
Figura 2 – Produção de cachaça por Estado	20
Figura 3 - Fluxograma do processo de produção da cachaça artesanal	22
Figura 4 – Diagrama de Cobenze	25
Figura 5 – Sequência das reações enzimáticas na fermentação alcoólica	27
Figura 6 – Proposta para a formação de carbamato de etila a partir da uréia, do carbamil fosfato, de glicosídeos cianogênicos e azodicarbamida.	31
Figura 7 – Rotas de formação de Ácido Cianídrico	32
Figura 8– Reações de formação de CE via Oxidação de Cianeto de Hidrogênio.	32
Figura 9 – Reações de formação de CE via Dissociação da Uréia.	33
Figura 10 – Limites mínimos e máximos para componentes secundários em aguardentes de cana-de-açúcar	35
Figura 11 – Limites máximos de contaminantes orgânicos e inorgânicos permitidos em aguardente de cana-de-açúcar	35
Figura 12 – Cromatograma padrão de 30ppb.	40
Figura 13 – Dados analíticos de concentração de CE (ppb) e área correspondente ao pico detectado.	41
Figura 14 – Cálculo da média, variância, desvio padrão, coeficiente de variação e Tcalc do Método de T de Student aplicados para a população de cada concentração padrão analisada.	41
Figura 15 – Curva de quantificação carbamato de etila.	42
Figura 16 – Cromatograma padrão de 600ppb.	43
Figura 17 – Plotagem de probabilidade normal para cachaça fortificada com CE – BEB.016.001, teste de Anderson Darling.	46

Figura 18 – Análise ANOVA da avaliação da homogeneidade do material de Cachaça fortificada com CE – BEB.016.001.	46
Figura 19 – Valores de Desvio padrão alvo dos materiais BEB.016.001 e BEB.016.002.....	47
Figura 20 – Avaliação da homogeneidade do material de Cachaça fortificado com CE – BEB.016.002, ISO 13528/2015.....	47
Figura 21 – Resultados de Análise de CE do laboratório 010 e análise Z-score.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 AGUARDENTE DE CANA E CACHAÇA	15
1.1.1 História da Cachaça Brasileira	15
1.1.2 A cachaça no Estado do Ceará	17
1.2 MERCADO	18
1.3 PRODUÇÃO DE CACHAÇA.....	20
1.3.1 Produção da cana de açúcar	23
1.3.2 Obtenção do caldo de açúcar.....	24
1.3.3 Fermentação	24
1.3.4 Destilação	27
1.3.5 Envelhecimento e Armazenamento.....	29
1.4 FORMAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM AGUARDENTES DE CANA	30
1.4.1 Carbamato de Etila	30
1.4.2 Formação de Carbamato de Etila em Destilados de Cana	31
1.5 ESPECIFICAÇÕES SEGUNDO A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 METODOLOGIA.....	36
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO	36
3.1.1 Quantificação de CE através da técnica de espectrofotometria de massa.....	36
3.2 MATERIAL E INSTRUMENTAÇÃO	37
3.2.1 Reagentes e padrões	37
3.2.2 Insumos e equipamentos	37
3.3 PREPARO DE SOLUÇÕES	38
3.4 MÉTODO DE INSTRUMENTAÇÃO.....	38
3.5 MÉTODO DE ANÁLISE.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1 Determinação da Linearidade e limites de detecção.....	39
4.2. Resultados	43

4.3 Resultados do Teste de Proficiência Interlaboratorial (MAPA).....	44
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	55
ANEXO A – METODO T DE STUDENT	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGUARDENTE DE CANA E CACHAÇA

1.1.1 História da Cachaça Brasileira

O alto valor comercial do açúcar serviu de estímulo inicial para o cultivo de cana-de-açúcar na América Latina período colonial. A planta, oriunda da Ásia e da Oceania, foi trazida ao Brasil por colonizadores Portugueses em meados dos anos 1533 com o objetivo de colonizar, defender e explorar as riquezas do “novo território” e encontrou no solo de massapê e no clima tropical brasileiro ótimas condições de cultivo. (RODRIGUES, 2010)

A cana-de-açúcar, descrita por Linneu, em 1753, como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum*, apresentam cultivo intimamente ligado à própria história e ao desenvolvimento do Brasil. Primeiramente é transformada em açúcar, seguido em álcool carburante, a cana de açúcar ocupa papel de destaque na economia mundial, sendo o Brasil líder na produção desses derivados (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

As plantações se espalharam rapidamente por todo o litoral brasileiro (Zona da Mata) e no ano de 1550 o país era o maior produtor mundial de açúcar, sendo a Capitania de Pernambuco o primeiro centro açucareiro de que se teve notícia. O Nordeste apresentava ótimas condições de clima e solo para o plantio de cana-de-açúcar. (VIEIRA, 2007).

No contexto inicial da colonização, onde alimentos e bebidas eram importados para o Brasil, os senhores de engenho encontraram no vinho de cana-de-açúcar - resultado do caldo de cana fermentado e subprodutos da produção do açúcar (principalmente o melaço), uma nova utilidade: a Garapa, como era chamado o caldo de cana de açúcar fermentado, foi utilizado como alimento para animais e escravos. (SILVEIRA, 2010)

Simultaneamente a introdução de práticas de cultivo de cana de açúcar, as técnicas de destilação também foram difundidas na nova colônia portuguesa. A princípio focada na produção de vinhos e Bagaça (aguardente de bagaço de uva), a destilação passa em seguida a ser empregada por escravos para destilar a Garapa Azeda – mistura obtida através da separação da espuma da segunda fervura do caldo de cana e armazenamento em potes para azedar e perder a doçura, produzindo, assim, a cachaça brasileira. (BARBOSA, J., 2014).

“A segunda espuma da fervura do caldo de cana, mais pura, servia como complemento alimentar, combinada com farinha, aipim, feijão, para os escravos (espécie de mata-fome de senzala), ou era utilizada como bebida, após algum tempo de fermentação e que os escravos davam o nome de garapa; denominação legitimamente africana que significa vinho” (CASCUDO, 1983).

Outrora vilipendiosamente considerada como bebida dos negros e desprivilegiados, a cachaça popularizou-se nos engenhos devido ao seu baixo custo de produção e por ser utilizada como moeda de compra para o tráfico de escravos na África - sendo o último fato o grande motivador para que em meados do século XVII grande parte dos engenhos estivessem divididos quase igualmente para a produção de açúcar e de cachaça. Com o aumento do número de produtores de cachaça, o aprimoramento do processo produtivo tornou-se essencial, e o produto, que antes era desvalorizado, passa a ter grande importância econômica para o Brasil. (FEITOSA, 2005)

Com a propagação do consumo de cachaça da "mesa dos desprovidos" até a dos povos abastados, o produto desperta a hostilidade dos produtores de vinho e Bagaça portuguesa. Segundo Cascudo (1968, p. 27), “A Companhia de Comércio, então monopolizadora dos transportes entre as colônias, a Metrópole, e a Europa, recorreu à ciência do Conselho da Coroa. O meio encontrado pelo Conselho para superar o problema na queda das exportações foi desastrosa para a cachaça brasileira: por meio da Carta Real, de 13 de setembro de 1694, proibiu-se a fabricação da aguardente em todo o Brasil.”

Apesar do dispendioso esforço pela Coroa Portuguesa em extinguir a produção da aguardente brasileira, a crise do mercado açucareiro estimulou o mercado clandestino. O impedimento legal para a produção e comercialização da cachaça perdurou por 12 anos, (CASCUDO, 1968). O fracasso na tentativa de extinguir a produção de cachaça no Brasil colônia forçou a mudança na tática de proibição: o produto passa a receber tributação altíssima, tornando expressiva a participação do mercado de cachaça para arrecadações da Coroa Portuguesa iniciando-se em meados de 1650 até aproximadamente de 1874. Durante esses anos, a cachaça tornou-se símbolo da insatisfação do colônia em relação a Portugal. Segundo BORIS, 2002, a consciência nacional foi-se definindo, à medida que os setores da sociedade colonial passaram a ter interesses distintos dos interesses da metrópole, ou a identificar nela a fonte de seus problemas.

Apesar da “democratização” do consumo, o contexto da produção de cachaça pouco se alterou desde o surgimento dos Engenhos até o fim da Segunda Guerra Mundial (1939-1945). Período que motivou tanto o mercado armamentista e arsenais militares, quanto o mercado tabagista e de bebidas alcoólicas. “A partir da metade do século XX, se observa um aumento na produção de cachaça no Brasil, com o crescimento das grandes destilarias e da expansão do mercado para a cachaça industrial”. (MUTTON; MUTTON, 2005).

Atualmente, segundo informações do BNDES ([s/d], p. 93-130), a composição do setor de bebidas, segundo valor das vendas e volume produzido no Brasil de 2005-2011, reporta que aguardente de cana-de-açúcar (cachaça ou caninha); rum ou tafiá representam 79% do volume produzido de bebidas destiladas.

1.1.2 A cachaça no Estado do Ceará

No Ceará, durante o período colonial, a produção de cachaça assumiu característica artesanal e era concentrada em algumas regiões do Cariri, Ibiapaba e Maciço de Baturité.

Segundos dados do relatório de pesquisa do SINDIBEBIDAS, 1992, constatou-se que o município de Viçosa do Ceará possui o maior número de produtores artesanais de aguardente de cana do Estado do Ceará (PINHEIRO, 1999).

No Ceará, há um polo produtor na Serra de Guaramiranga e um outro na Serra da Ibiapaba, onde localizam-se cerca de 70 pequenos e micro alambiques, com exceção de um maior, arrendado pela Ypióca, uma outra empresa de grande porte no setor. Além disso, há produção no Maciço de Baturité, no litoral, no Vale do Curu-Paraipaba e no Cariri Cearense, que também concentra produtores de cachaça, localizados nos municípios do Crato, Barbalha e Juazeiro do Norte (MONTEIRO; SANTOS JÚNIOR, 2001).

O Ceará entre os estados com maior volume de exportação de cachaça. Em 2012, o mercado local ocupou a 5ª posição entre os maiores exportadores brasileiros do produto, de acordo com um levantamento realizado pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) (TRIBUNA DO CEARÁ. 2014). O estado já possuiu mais de 200 marcas diferentes, nos anos entre 60 e 70, mas atualmente existem apenas 169 marcas registradas.

A cachaça cearense possui notoriedade em relação ao seu aspecto e sabor diferenciado, inclusive recebendo prêmio de competições internacionais em 2016: “*New York World Wine and*

Spirits Competition 2016” e o “*Spirits Selection* no Concurso Mundial de Bruxelas”. Pinheiro (1999) cita que um dos principais motivos para esse aspecto singular da cachaça do estado do Ceará deve-se tanto ao hábito dos produtores de cana de açúcar de não realizarem a queimada dos canaviais após a safra, o que influencia no processo de fermentação, quanto a tradição dos produtores de aguardentes e cachaças cearenses de armazenagem e estocagem do produto em tonéis de bálsamo.

1.2 MERCADO

A agroindústria sucroalcooleira do Brasil teve sua modernização impulsionada desde a crise no comércio açucareiro resultante do grande investimento realizado na cafeicultura brasileira até final do período colonial até os dias de hoje. Essa atualização progressiva permitiu a qualificação e melhoria do potencial de produção com baixos custos de processo, tornando a produção de cana-de-açúcar uma das mais substanciais agriculturas do Brasil, com participação de aproximadamente 1,76% do PIB nacional entre 2008 e 2009 segundo o PROCANA (Programa da Cana-de-açúcar), 2009 (FREITAS VIANA, 2009). Os baixos custos de manufatura e mais facilidade de distribuição do produto permitiu a produção de aguardentes e cachaças industriais a preços mais convidativos do que destilados de outros países, como o whisky.

Por possuir as suas raízes históricas de produção, consumo e popularização nas senzalas, o destilado brasileiro ainda continua tendo como principais pontos de venda os botecos e mercadinhos (FEITOSA, 2005). Esse preconceito persistente tornou necessário alto investimento em estratégias de marketing, em novas embalagens e rotulagens e, principalmente, no controle de qualidade físico-química, analítica e sensorial do líquido para os produtores de aguardente. Investiu-se também na produção de cachaças *Premium*, originadas de *blends* de cachaças para uma sofisticação ainda maior do produto.

A atualização do produto despertou nos últimos dez anos o interesse dos consumidores das classes mais abastadas, que passaram a assimilar a cachaça como um produto de qualidade, tornando a cachaça o destilado mais consumido no território nacional (figura 1), ocupando o segundo lugar entre as bebidas alcoólicas, embora a cerveja seja ainda a mais preferida: enquanto são consumidos 11,5 litros de destilado por ano, estima-se que são consumidos em torno de 117 litros, ambos valores mensurados para 1 habitante, na faixa de idade entre 19 a 57 anos.

Figura 1 – Composição do setor de bebidas, segundo valor das vendas e volume produzido – Brasil, acumulado 2005-2011 (em %)

Segmento	Participação			
	Na classe		No setor	
	Valor	Volume	Valor	Volume
Aguardentes e outras bebidas destiladas	100,0	100,0	6,6	5,0
Aguardente de cana-de-açúcar (cachaça ou caninha); rum ou tafiá	48,8	79,0	3,2	3,9
Bebidas alcoólicas destiladas, de outros tipos (aguardente de frutas, gim, genebra etc.)	24,8	10,6	1,6	0,5
Uisques	11,2	1,7	0,3	0,1
Vodca	10,7	6,3	0,7	0,3
Aguardente de vinho ou de bagaço de uva (conhaque, brande etc.)	4,5	2,5	0,7	0,1

Fonte: IBGE – PIA-Produto.

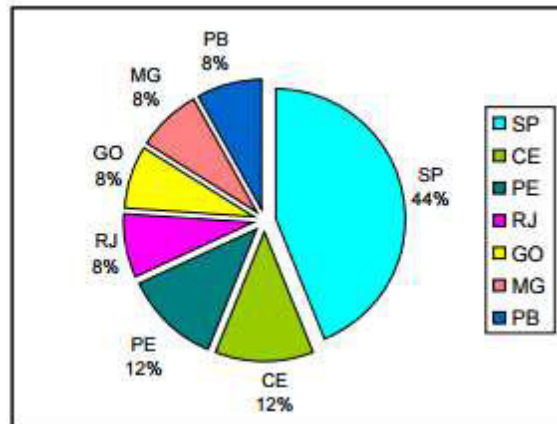
A renovação da estratégia de mercado também chamou a atenção do mercado internacional: segundo dados do Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC-2009), a exportação de aguardente de cana e da cachaça, bebidas reconhecida como produtos tipicamente brasileiros, em 2008 aumentou 20% em volume e 18% em valor, comparado com 2007. A aguardente de cana e a cachaça são considerados o terceiro destilado mais consumido no mundo e no mercado nacional tem 86% do *market share* do mercado de destilados (ABRABE, 2009).

O grande volume de produção nacional da aguardente de cana e da cachaça impacta diretamente na posição socioeconômica desse produto. Cerca de 1,3 bilhões de litros são produzidos anualmente (ABRABE, 2009) porém somente 1% é exportado. Estima-se a atividade de cerca de 40 mil produtores de cachaça, os quais geram em torno de 600 mil empregos diretos e indiretos e 70% da produção está relacionada à cachaça de coluna ou industrial.

Nacionalmente, o maior produtor de cachaça de coluna é o estado de São Paulo, enquanto o maior produtor de cachaça de alambique é Minas Gerais. Outros estados que se destacam na produção nacional de cachaça são Rio de Janeiro, Pernambuco, Ceará e Paraíba

(SENAI MERCADOS, 2014). A distribuição da produção de cachaça nos Estados brasileiros encontra-se representado na figura 2.

Figura 2 – Produção de cachaça por Estado



Fonte: Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana, Caninha e Cachaça (PNDAC).

Em 2003 e 2004, somados, foram negociados 17 milhões de litros com o exterior gerando uma renda de aproximadamente U\$ 20 milhões. Apenas nos oito primeiros meses de 2005 o volume de negócios chegou a aproximadamente 7 milhões de litros (PINHEIRO, S. 2010). O Brasil exporta este produto para 45 países, mas essas vendas não atingem 1% da produção nacional que varia de 1,3 a 2 bilhões de litros. Apesar desses números, o Brasil exporta pouco e de forma inadequada, pois estima-se que um terço do produto é vendido a granel, o que torna difícil o controle de origem e a agregação de valor ao produto (GAZETA, 2017).

Os principais clientes destas bebidas no mercado internacional são: Alemanha, Paraguai, Uruguai, Portugal, Angola, Estados Unidos, Argentina, Itália, Bélgica, Espanha, Chile, França e Holanda (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2006). As maiores exportações foram feitas para a Europa, em especial para a Alemanha, maior mercado da bebida no exterior, ficando com 30% das exportações da bebida. (OLIVEIRA et al, 2006).

1.3 PRODUÇÃO DE CACHAÇA

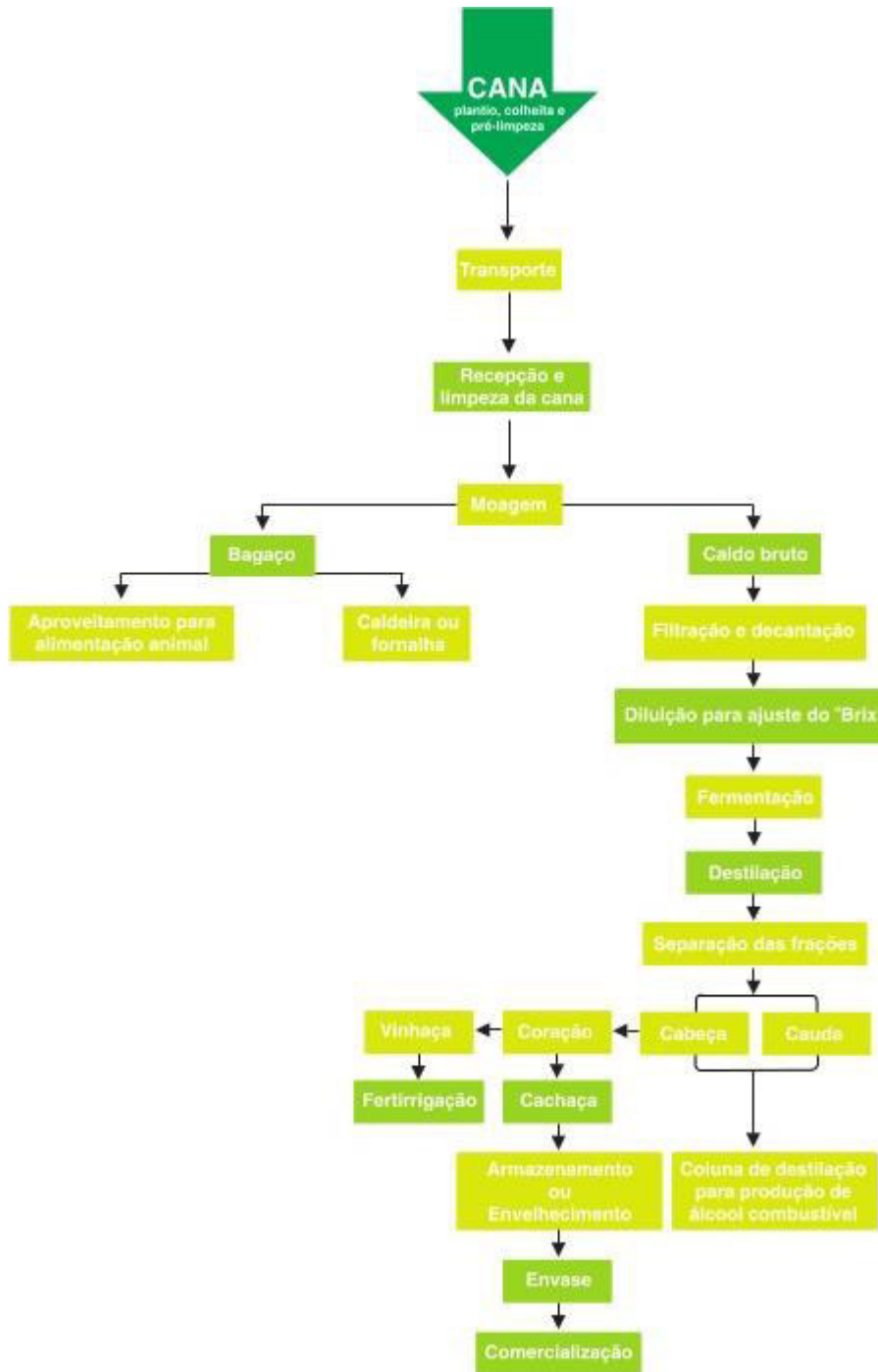
A produção de cachaça pode ser procedida artesanal e industrialmente. Considera-se produção artesanal a produção de cachaça em menor escala onde a destilação ocorre em alambiques

ou em engenhos de cobre, e durante este processo ocorre a separação da parte nobre da bebida. A fermentação é geralmente feita naturalmente, e é comum a utilização do fubá de milho, arroz, soja ou até mandioca durante o este processo. Já a produção industrial de aguardentes e cachaça se dá na produção em larga escala com destilação procedida normalmente em colunas de destilação e toneis de aço inox. A fermentação é realizada com a adição de produtos químicos na fermentação e não se separa a parte nobre do destilado (CLUBE DO ALAMBIQUE).

A cadeia produtiva de cachaça e aguardentes engloba desde as etapas de plantio e colheita da cana de açúcar até a entrega do produto final para o consumidor (DE OLIVEIRA, 2010). Cada etapa tem suas particularidades e todas são importantíssimas para assegurar a qualidade e o padrão do produto a ser produzido. Devido ao grande volume de cachaças e aguardentes industriais no mercado, este será o processo produtivo alvo de estudo.

A produção industrial de aguardentes e cachaças pode ser dividida em sete etapas básicas: produção da cana de açúcar, obtenção do caldo de açúcar, fermentação do mosto, destilação do vinho volante, armazenamento da cachaça, envase e rotulagem e distribuição do produto (Sebrae Mercados, 2014), representado na figura 3.

Figura 3 - Fluxograma do processo de produção da cachaça artesanal



Fonte: Produção de Cachaça de Qualidade - Casa do Produtor Rural/ESALQ/USP

1.3.1 Produção da cana de açúcar

Nessa primeira etapa temos o plantio, a colheita e a pré-limpeza da matéria prima. A boa qualidade da cana de açúcar depende principalmente das especificações de seu plantio - qualidade do solo (pH e a disponibilidade de nutrientes e minerais), clima e disponibilidade de água - e da etapa de maturação em que é realizada sua colheita. Segundo Netafim (2016), o plantio de cana de açúcar pode ser realizado em diversos tipos de solo, variando de solos arenosos, argilosos e argilosos pesados, sendo o pH ideal em torno de 6.5, sendo possível encontrar também cultivo em solos com pH entre 5 e 8.5.

A cana de açúcar é considerada madura, ou seja, pronta para a colheita, quando atinge o máximo de armazenamento de açúcar em seu colmo: mesmo teores de açúcar no meio e na base da cana – teor de Brix (taxa de concentração de açúcar) superior ou igual a 16°. Deuber (1986) cita que a cana apresenta condições de ser industrializada a partir do momento em que apresentar um teor mínimo de sacarose acima de 13%. É muito importante, para maior eficiência do processo de produção, que a recepção da cana seja acompanhada e seguida de análise dos teores de açúcar para assegurar a qualidade da matéria prima.

A pré-limpeza da cana de açúcar é crucial para a produção de aguardente de qualidade: impurezas, sujidades e microrganismos indesejáveis são fatores críticos na análise sensorial do produto por acarretarem em alterações no sabor e aroma da bebida.

As principais exigências da Portaria nº 126, de 2005 - INMETRO para esta primeira etapa do processo produtivo são o controle do uso de fertilizantes e defensivos agrícolas, obediência às leis trabalhistas e uso de equipamentos de proteção individual (EPI) para os trabalhadores da cadeia produtiva, inclusive da lavoura e maturação da cana-de-açúcar não induzida, com o tempo máximo entre a colheita e a moagem de 48 horas.

O tempo máximo é exigido estimando garantir a qualidade da matéria prima, pois após esse prazo o teor de açúcar começa a decair devido aos processos de respiração e transpiração (SOARES, A. A.; DE SOUZA, C. F. 2010) e a cana de açúcar torna-se passível a infestação de fungos e bactérias, o que é extremamente prejudicial para o processo de fermentação.

1.3.2 Obtenção do caldo de açúcar

Após a colheita, a cana de açúcar passa pela etapa de obtenção do caldo e recuperação do açúcar dissolvido nos seus tecidos e células. Este processo pode ser realizado tanto pelo de desfibramento e pela moagem da cana de açúcar, onde é necessário a embebição da cana - lavagem feita com caldo e água para reprocessamento da cana que já passou visando aproveitamento maior da matéria prima e maior eficiência na extração.

A embebição tem por finalidade diluir a sacarose contida no bagaço, aumentando a extração do açúcar nos ternos de moagem. Sem a embebição, a eficiência situa-se em torno de 50 a 60%, com a mesma, pode alcançar de 80% a 92%. Esta operação também possibilita a qualificação do °Brix do caldo de acordo com a viabilidade das leveduras (MAIA; RIBEIRO; SILVEIRA, 1995).

A utilização do desfibrador é a prática mais difundida na produção industrial ao promover a desintegração da cana através da ruptura dos colmos, e conseqüentemente do feixes fibrovasculares, onde encontram-se as células armazenadores de açúcar, tornando a etapa de moagem mais eficaz e com menos perda de açúcar.

Após a moagem é realizado a coagem e decantação do caldo, onde as impurezas grosseiras são removidas através de peneiras fixas, rotativas ou vibratórias. Uma coagem mal realizada pode causar sérios riscos ao processo e qualidade do produto final. Nogueira e Filho (2005, p. 32) cita:

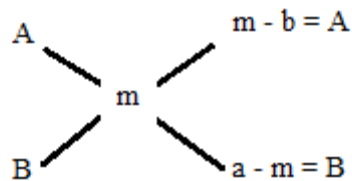
O bagacilho [...] constitui-se num sério foco de infecção, provoca o entupimento das canalizações e dos bicos da turbina de separação de fermento nos processos em que é empregada. Quando na destilaria, provoca a formação do furfural, substância indesejável para a qualidade da aguardente. A terra é um sério veículo dos microorganismos do solo, sendo um constante inoculador de contaminantes.

1.3.3 Fermentação

A etapa seguinte a coagem e decantação é da de preparação do mosto: líquido açucarado (caldo de cana diluído) apto a fermentar. Durante preparo da solução de caldo e água deve-se garantir que as concentrações de sólidos solúveis e açúcar totais sejam satisfatórias para uma fermentação de qualidade. O cálculo da diluição/concentração ideal compatível com o tipo de

levedura utilizado é realizado através do Diagrama de Cobenze (Figura 4), onde **A** representa peso do caldo (kg), **B** o peso do diluente (kg), **a** o brix do caldo (°Bx), **b** o brix do diluente (°Bx) e **m** o brix do mosto desejado (°Bx). Os melhores resultados fermentativos são obtidos com mostos de concentração variável de 14 a 16 °Bx.

Figura 4 – Diagrama de Cobenze



Fonte: a autora.

A diluição do caldo facilita a fermentação a medida que a água adicional permite maior transferência e absorção de oxigênio pelas células dos microrganismos, aumentando a taxa de respiração e favorecendo o crescimento celular, o que acarreta numa maior velocidade de reação, além de diminuir a ocorrência de formação de CE. Mostos concentrados acarretam fermentação mais lenta e, muitas vezes, incompletas, além de dificultarem a multiplicação do fermento e tornarem os problemas relacionados às incrustações mais frequentes (NOGUEIRA, A; FILHO, W. 2005).

O contraponto da diluição do mosto seria a redução do teor alcoólico, que facilita a infestação por outros micro-organismos, podendo gerar desde menor rendimento de reação (competição por produto ou substrato ou ambas) até a contaminação do líquido, resultando em danos à saúde do consumidor. No tocante aos custos do processo, a utilização do mosto diluído requer dornas ou tanques de fermentação maiores quando comparado aos utilizados no processo de fermentação de mosto concentrado (SEAD).

A acidez da solução também deve ser controlada juntamente com o pH visando o favorecimento da respiração celular e o pH mínimo e máximo de sobrevivência das leveduras, sendo o pH ótimo em torno de 4 – 6.

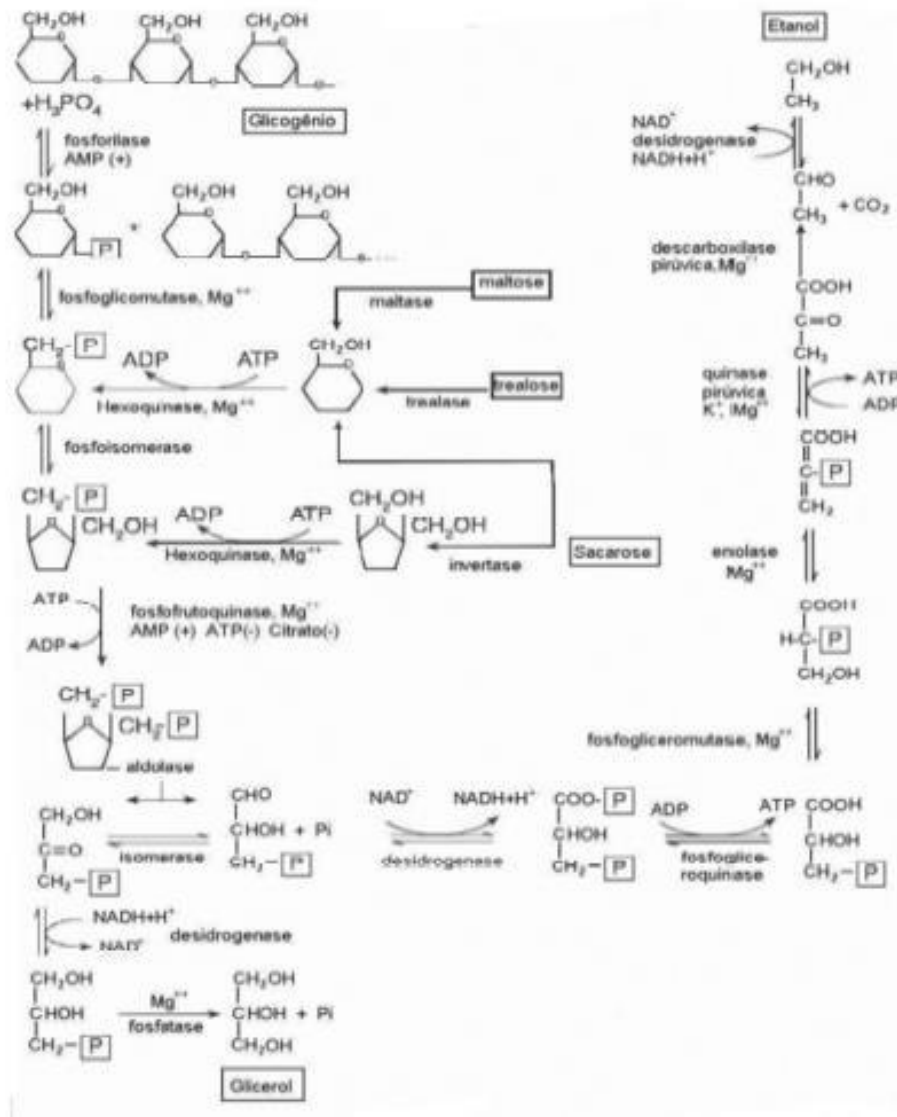
O processo de fermentação do mosto é a principal diferença entre as cachaças produzidas artesanalmente e industrialmente: na produção em grande escala, catalizadores químicos são utilizados para diminuir o tempo de fermentação, uma redução de dois à três dias

para em entre 8 e 10 horas, e aumentar a taxa de conversão, ou seja, a eficiência da reação. Na produção industrial também é comum a adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 10% até o limite de 250 ml para cada 100L de caldo para maior controle do pH e de antissépticos. Para produção de etanol, a indústria utiliza alguns produtos para reduzir a carga microbiana, como antibióticos e ácido sulfúrico, previamente à fermentação (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

A fermentação é o processo bioquímico de alimentação celular onde açúcares como frutose, glicose e sacarose são consumidos para a produção de etanol e dióxido de carbono sem a participação de oxigênio, ou seja, é um processo anaeróbico onde ocorre a oxidação parcial de açúcares. Para a catalise do caldo é necessária a participação de agentes de fermentação, tendo em vista que o caldo não fermenta espontaneamente (LIMA, 2001).

A etapa de fermentação alcoólica é um ponto crítico do processo de fabricação da cachaça, onde os compostos responsáveis pela graduação alcoólica e formadores do aroma que caracterizam a bebida são formados. A figura 5 representa a rota de fermentação alcoólica

Figura 5 – Sequência das reações enzimáticas na fermentação alcoólica.



Fonte: LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. 2001

A levedura *Saccharomyces*, em especial, é empregada para a produção de uma variedade de produtos: vinhos, cerveja, pão e outras bebidas que depois serão destiladas (cachaça e aguardente, rum, uísque), além de produtos com finalidade não alimentar como gás carbônico e álcool não potável (LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. 2001).

1.3.4 Destilação

O processo de destilação é a etapa seguinte ao processo de fermentação. Este processo baseia-se na distinção entre os pontos de ebulição de cada componente presente na mistura, de modo que os componentes com menores pontos de ebulição irão evaporar primeiro. Por meio dessa operação unitária é possível realizar tanto a separação líquido-líquido quanto a separação de componentes não voláteis (NOGUEIRA, A; FILHO, W., 2005).

O processo pode ser conduzido continuamente, por meio de colunas de destilação, ou descontinuamente, em destiladores tipo alambiques. O processo contínuo aproveita todas as frações do vinho destilado, enquanto o processo descontínuo aproveita apenas uma porcentagem (JERÔNIMO, E.; SILVA, M., 2005). Outra desvantagem para o processo descontínuo é o elevado tempo de produção, associado com maior gasto com combustível, maior consumo de água e baixo rendimento.

A mistura hidroalcoólica apresenta ponto de ebulição variando proporcionalmente de acordo com o teor alcoólico da mistura, geralmente intermediário entre aquele da água (100°C) e do etanol (78,4°C). Devido a concentração da mistura não ser constante a temperatura de ebulição vai aumentando durante a evaporação. A temperatura de ebulição da solução em torno de 94,5 e 96°C (EMBRAPA, 2008).

Na destilação de aguardentes o vinho resultante da etapa de fermentação, composto basicamente 89 a 94% v/v de água e 5 à 10% v/v de etanol, é fervido com o intuito de separar os compostos voláteis e não voláteis, formando o flegma – mistura água-etanol impura, e a vinhaça, que consiste nos resíduos da destilação formado basicamente de água leveduras, bactérias, sais minerais, sólidos em suspensão e açúcares não fermentescíveis (BECKER, C.; TREML, D.; MAUS, E.M., 2009).

Segundo dados do Embrapa (2008), o processo de obtenção de destilado de cana é procedido por duas destilações consecutivas. A primeira destilação consiste apenas na extração de álcool e água presente no vinho dos compostos não voláteis, resultando num destilado com apenas 30% do volume inicial, de graduação alcoólica entre 27% e 32%. Para proceder uma segunda destilação que será responsável por concentrar a mistura hidroalcoólica é necessário que três destilações primárias sejam realizadas e que seus destilados sejam redestilados juntos.

A redestilação dos destilados primários/correntes deve ser procedida de maneira lenta e gradual para possibilitar a formação e separação de compostos aromáticos no destilador. O produto obtido nesse reprocessamento é dividido em três frações, chamadas de cabeça, coração e

calda, onde tanto a primeira quanto a última fração possuem alta concentração de compostos indesejados. A fração denominada de cabeça consiste nos 2% à 4% do volume inicial de destilado produzido, possuindo teor alcoólico entre 70% e 75% v/v e é rico em aldeído acético e o acetato de etila. A segunda fração, o coração, representa de 70% à 80% do destilado com graduação alcoólica de 40% à 70% v/v, e apresenta menor quantidades de componentes secundários. (ESPINOZA, L. J. S.).

A formação desses compostos secundários presentes tanto na primeira e na terceira fração é propiciada devido à má condição de higiene/sanitização do equipamento de destilação ou da matéria prima, características do próprio vinho, como pH e acidez, a temperatura de processo e o tempo de destilação.

Dos congêneres resultantes do processo de produção de destilados de cana, o Carbamato de Etila vem preocupado os órgãos de segurança alimentícia devido à sua formação ocorrer até 72 horas após o processo de destilação.

1.3.5 Envelhecimento e Armazenamento

Após a destilação, o líquido hidroalcoólico precisa ser armazenado. O armazenamento consiste em reservar o destilado em recipientes de grande volume (maiores que 700L), confeccionados preferivelmente de madeira, aço inoxidável ou aço carbono isolado internamente com madeira, com o intuito tanto de evitar as perdas por evaporação quanto de permitir o fluxo contínuo do processo de destilação.

Já o envelhecimento é o armazenamento do produto de destilação em tonéis de madeira com volume inferior à 700L, realizado com vistas a aprimorar a qualidade sensorial das bebidas. Esse processo ocorre devido a um conjunto de reações de oxidação e esterificação entre o líquido destilado e os componentes da madeira o qual resultam na alteração da cor e do aroma do destilado. Os compostos aromáticos resultantes dessas reações lentas e conferirão a boa qualidade sensorial a este destilado. As alterações na coloração do líquido devem-se à incorporação de extratos da madeira pelo destilado (ESPINOZA, L. J. S.).

A utilização dos tonéis de madeira para a realização desse tipo de processo deve-se à porosidade e à semi-permeabilidade deste material, permitindo o líquido realizar trocar gasosas

com o ambiente externo. Para uma troca mais eficiente, é importante não preencher completamente o tonel de envelhecimento. No Brasil, as madeiras mais utilizadas para esse processo são Carvalho, Amburana, Ararubá, Bálsamo, Cabreúva, Cedro, Cerejeira, Freijó, Ipê, Jequitibá e Peroba (MAPA DA CACHAÇA, 2012).

O processo de envelhecimento deve obedecer ao regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para cachaça, aprovado pela Instrução Normativa nº 13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

1.4 FORMAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILA EM AGUARDENTES DE CANA

Como citado anteriormente, CE é um composto secundário na fabricação de bebidas, resultante da reação entre etanol e compostos nitrogenados (uréia) em meio ácido. A formação de CE depende diretamente da natureza da matéria prima utilizado no processo de destilação e a disponibilidade dos precursores no meio de reação.

Todas as etapas do processo de obtenção de destilados de cana de açúcar podem ser consideradas como importantes pontos de atenção quando se trata da formação CE. Mesmo com a limpeza e escolha da matéria prima de qualidade, não se pode descartar a formação de CE durante processo produtivo. Tanto a disponibilização de uréia quando uma limpeza é ineficiente quanto a presença de glicosídeos cianogênicos da própria cana de açúcar - via íon cianeto (CN^-), facilitam a formação de CE (FURTADO, J. L. B, 2007).

Podemos citar que a destilação é o ponto crítico de processo quando se trata da de produtos destilados. Isso é justificado devido ao elevado ponto de ebulição do composto orgânico em questão: apresentando ebulição entre 185°C, muito pouco do CE em fase líquida já formado nos processos anteriores à destilação se volatilizam à temperatura usual do processo de destilação integrando o produto destilado (ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W., 2001).

É durante o processo de destilação do vinho volante, onde o elevado teor de etanol associado a altas temperaturas de processo e a presença de catalizadores, ocorre com maior frequência a formação de CE.

1.4.1 Carbamato de Etila

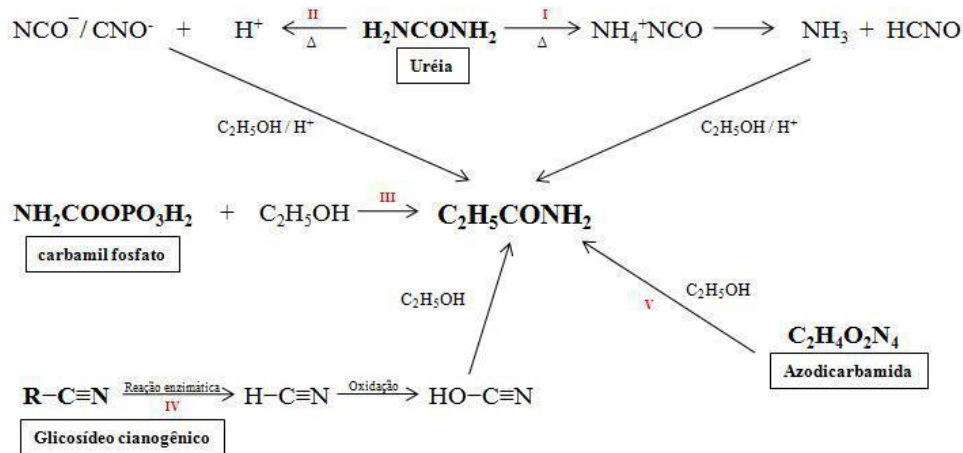
A uretana, conhecida mais comumente como carbamato de etila, é um éster do ácido carbâmico de peso molecular igual à 89,09g/mol. É comercializado na forma de cristais incolores e solúveis em água, clorofórmio, etanol, éter, glicerol e óleo de oliva. Sua temperatura de ebulição se apresenta entre 182-185°C, e ponto de fusão igual à 49°C.

Devido ao seu caráter carcinogênico, esse composto é utilizado apenas para estudos controlado por órgãos regulamentadores.

1.4.2 Formação de Carbamato de Etila em Destilados de Cana

Saber os caminhos de reação para a formação do CE é crucial para conseguir identificar os pontos do processo que estão propiciando o seu surgimento. Das diversas rotas de formação de CE (figura 6), a rota de reação entre a uréia (H_2NCONH_2) e etanol em meio ácido é a de maior ocorrência para formação deste composto em destilados de cana.

Figura 6 – Proposta para a formação de carbamato de etila a partir da uréia, do carbamil fosfato, de glicosídeos cianogênicos e azodicarbamida.



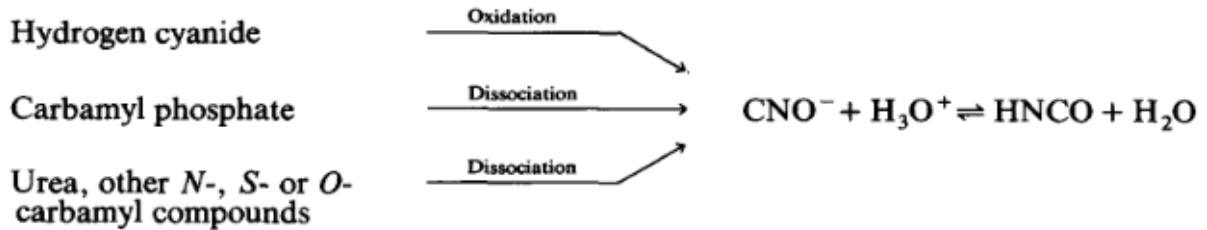
Fonte: Galinaro (2011).

Durante o processo de destilação, a alta temperatura propicia a decomposição da uréia tanto em amônia (NH_3) e ácido isocianico (HNCO) quanto em isocianato (NCO^-) e cianato (OCN^-) na presença de solução de etanol/água, e estes compostos nitrogenados resultantes reagem com o etanol e água levando a formação de CE.

Devido à alta concentração de etanol do destilado de cana (de 53-78% v/v), a reação mais comum postulada para a formação de CE é a do ácido ciânico reagindo com etanol. Existem

três diferentes rotas de formação de ácido ciânico: oxidação do Cianeto de Hidrogênio, dissociação da uréia e dissociação de carbamil fosfato (figura 7). As duas primeira rotas são as de maior ocorrência.

Figura 7 – Rotas de formação de Ácido Ciânico.



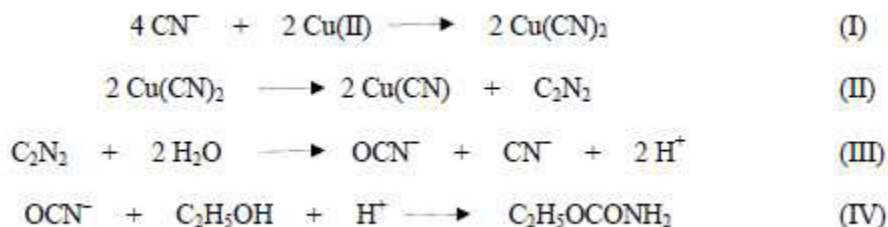
Fonte: Zimmerli e Schlatter (1991).

i) Oxidação do Cianeto de Hidrogênio:

Em destilações recém realizadas, quase todo o cianeto de hidrogênio do líquido destilado encontra-se na sua forma livre e dissociada, e com o tempo é convertido em cianoidrinas, que apesar de serem compostos estáveis quando oriundos de aldeídos alifáticos, considerando a constante de dissociação de cianoidrinas em meio aquoso (5.1×10^{-3} mol/L), é esperado que em destilarias onde ocorre a formação tanto de benzaldeído e como de acetoaldeídos, seja encontrado cianeto de hidrogênio em sua forma livre. (ZIMMERLI; SCHLATTER, 1991).

Para a reação de oxidação do cianeto de hidrogênio em HCN-, Brotherton and Lynn, 1959, propôs que seria necessário a ação do íon cobre(II) como catalizador, originando o ânion isocianato (OCN^-) com o centro metálico com o átomo de nitrogênio (Figura 8, reação I, II e III). Uma vez que o átomo de carbono encontra-se mais eletropositivo, devido à coordenação ao centro metálico, este favoreceria o ataque nucleofílico do etanol, levando a formação do CE (Figura 8, reação IV). (GALINARO, 2011).

Figura 8– Reações de formação de CE via Oxidação de Cianeto de Hidrogênio.



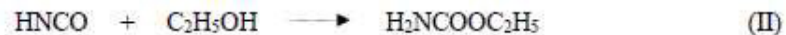
Fonte: GALINARO, 2011.

ii) Dissociação da Uréia:

Em temperaturas próximas à 100°C a uréia em soluções aquosas possui grau de dissociação entre 50 à 90%, o que indica alta concentração de íons NH_4^+ e NCO^- na solução. Essa dissociação possibilita o ataque nucleofílico pela molécula de água no NCO^- , formando o ácido cianico HNCO e seu isômetro ácido isociânico HOCN .

O ácido isociânico (HNCO) (figura 9 reação I e II) e o ácido cianico (HOCN) (figura 9, reações III e IV), gerados durante a destilação, poderiam reagir com o etanol ou permanecer em fase gasosa produzindo ou não intermediários como o ácido carbâmico (Esquema 6, reação I) e o cianato de etila (Figura 6, reações III e IV). Em ambos os casos ocorreria a formação de carbamato de etila no destilado. (GALINARO, 2011).

Figura 9 – Reações de formação de CE via Dissociação da Uréia.



Fonte: GALINARO, 2011

1.5 ESPECIFICAÇÕES SEGUNDO A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Na legislação brasileira, a indústria de bebidas é fiscalizada como indústria alimentícia, necessitando, assim, de controle sanitário, este supervisionado pelos órgãos INMETRO, Ministério de Minas e Energia, PROCON e DECON e entidades de administração pública Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA e o **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA** (FOOD SAFETY BRAZIL, 2015).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é responsável pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor de agronegócios, que contempla pequeno, médio e grande produtor rural e reúne atividades de fornecimento de bens e serviços à agricultura, produção agropecuária, processamento, transformação e distribuição de produtos de origem agropecuária até

o consumidor final. É também de sua incumbência a padronização, classificação e fiscalização dos aspectos tanto sanitários quanto tecnológicos de bebidas.

No Decreto no 6.871, de 4 de Junho de 2009, a Seção IV – Bebidas alcóolicas destiladas trata da padronização, da classificação, do registro, da inspeção, da produção e da fiscalização de bebidas destiladas (BRASIL, 2009, [s/p]):

Art. 51. Aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% vol a 20 °C, obtida de destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar.

§ 2º A aguardente que contiver açúcares em quantidade superior a 6 g/L e 30g/L, expressos em sacarose será denominada de aguardente adoçada.

§ 3º Será considerada aguardente envelhecida a bebida que contiver no mínimo 50% aguardente envelhecida por período não inferior a um ano, podendo ser adicionada de caramelo para a correção da cor.

Art. 53. Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume, a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro.

§ 1º A cachaça que contiver açúcares em quantidade superior a seis gramas por litro e inferior a trinta gramas por litro será denominada de cachaça adoçada.

§ 2º Será denominada de cachaça envelhecida a bebida que contiver, no mínimo, cinquenta por cento de aguardente de cana envelhecida por período não inferior a um ano, podendo ser adicionada de caramelo para a correção da cor.

Caso a bebida não se enquadre nesta definição de cachaça, não poderá ser comercializada como cachaça e receberá então a denominação de aguardente. (MAPA DA CACHAÇA, 2012).

A legislação brasileira referente a contaminantes secundários em aguardentes e cachaça, Instrução Normativa n. 13 de 29/06/2005 – MAPA – apresenta Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. No tópico, 3. Composição Química e Requisitos de Qualidade, é descrito: “3.1.3. Os componentes do Coeficiente de Congêneres para os produtos previstos no subitem 2.2 do presente Regulamento Técnico devem observar os seguintes limites” (figuras 10 e 11).

Figura 10 – Limites mínimos e máximos para componentes secundários em aguardentes de cana-de-açúcar.

Componentes Secundários (para 100mL de Álcool Anidro)	Máximo	Mínimo
Acidez volátil, expressa em ácido acético	150	-
Ésteres totais, expressos em acetato de etila	200	-
Aldeídos totais, em acetaldeído	30	-
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural	5	-
Soma dos álcoois isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil -1- 360 -butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1- propanol)	350	-

Fonte: A autora

Figura 11 – Limites máximos de contaminantes orgânicos e inorgânicos permitidos em aguardente de cana-de-açúcar.

Contaminantes	Máximo
Orgânicos	
Carbamato de Etila ($\mu\text{g/L}$)	150
Álcool sec-butílico (mg/mL álcool anidro)	10
Álcool metílico (mg/mL álcool anidro)	200
Álcool n-butílico (mg/mL álcool anidro)	3
Inorgânicos	
Cobre (mg/L)	5
Chumbo (mg/L)	0.2
Arsênio (mg/L)	0.1

Fonte: A autora

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Esse trabalho tem como objetivo geral verificar a metodologia analítica desenvolvida em laboratório para analisar CE utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Exibir o desenvolvimento da curva de calibração para análise do composto CE via CG-MS.
- Explicitar pontos críticos na produção de aguardentes e destilados para a formação de CE.
- Verificar a presença de erros de amostragem ou de análise no processo de desenvolvimento da curva de calibração.
- Verificar a precisão do método desenvolvido para análise de CE analisando as curvas e áreas de pico de resposta de CE para 8 diferentes padrões de concentrações.
- Expor a precisão do método desenvolvido para análise de CE através dos resultados do teste de proficiência interlaboratorial proposto pelo MAPA.

3 METODOLOGIA

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1.1 Quantificação de CE através da técnica de espectrofotometria de massa

A técnica analítica de espectrometria de massa tem como objetivo a detecção e identificação das moléculas em estudo através da medição da sua massa e da caracterização de sua estrutura química. A técnica consiste em formar íons de compostos orgânicos em fase gasosa e separá-los de acordo com sua taxa massa/carga.

O equipamento consiste em uma fonte de íons, seguido por um analisador de massa que separa os íons de acordo com a taxa m/z e um detector, responsável por transformar a corrente de íons em sinais elétricos. O resultado é representado através de um espectro de massa que quantifica a intensidade do sinal versus a taxa massa/carga.

Após a ionização e gaseificação das moléculas da amostra injetada os íons gerados são separados com sua razão carga e massa (m/z). Na metodologia empregada para análise de CE, essa separação ocorre pelo método de captura tridimensional de íons (Ion Trap). Neste método, íons são capturados através da ação de três eletrodos que aplicam voltagens na região gerando uma cavidade onde os íons oscilam em uma trajetória estável (CATALANI, L. H. 2011). Em seguida é realizada uma série de alterações dos potenciais elétricos visando desestabilizar a trajetória dos íons,

resultando em sua ejeção através do endcap de saída, em ordem crescente de m/z (é feita a varredura de massas) (CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F., 2008).

Para a quantificação de carbamato de etila utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) utilizando o monitoramento seletivo dos íons (modo MSI ou SIM) do espectro de massa para este composto (m/e 62) visando a plotagem da curva de calibração de análise seguida da verificação do método desenvolvido (RYU *et al.*, 2015).

3.2 MATERIAL E INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1 Reagentes e padrões

Foram utilizados etanol P.A (SIGMA – ALDRICH, pureza $\geq 99,8\%$), uretana P.A (Carbamato de Etila, SIGMA – ALDRICH, pureza $\geq 99\%$), acetona (FISHER CHEMICAL, pureza $\geq 99,5\%$) e água ultrapura (Milli-Q).

3.2.2 Insumos e equipamentos

As análises de CG/EM foram baseadas na descrição do MAPA, Instrução de Trabalho LAB-377. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Thermo Fisher Scientific TRACE 1310, Estados Unidos), equipado com amostrador automático (Thermo Fisher Scientific AS 1310, Estados Unidos) e agulha para injeção automática, acoplado a um espectrômetro de massas (Thermo Fisher Scientific ITQ 900, Estados Unidos), equipado com coluna capilar fase polar de polietilenoglicol (60 m x 0.53 mm i.d. modelo TG-WAXMS Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com espessura de filme de 0.25 μm . A escolha de colunas capilares tem como premissa a separação de misturas com alta resolução, que permite analisar misturas complexas em curto intervalo de tempo (AZEVEDO, D. A., 2004).

Um filtro de acetato de celulose (descartável) foi utilizado para impedir passagem de contaminantes físicos na amostra. O liner de injeção utilizado para homogeneizar a amostra misturada com o gás de arraste foi do tipo splitless, e o septo foi de 11mm com resistência a altas temperaturas. A pesagem do analito foi procedida em balança analítica de precisão de $\pm 0,0001$.

3.3 PREPARO DE SOLUÇÕES

Foram necessárias a produção de três soluções padrões de estoque, com validade de 3 meses após a data de finalização de preparo: 1000 mL de solução de etanol 40%, 250 mL de solução padrão 1000 mg/L de CE e 500 mL de solução padrão 1000 µg/L de CE. As soluções foram todas preparadas em quantidades superiores ao que seria necessário para o ensaio devido a possibilidade de utilização das soluções preparadas nas análises rotineiras quantificação de carbamato de etila demandadas no laboratório.

A preparação da solução de 1000 mL de etanol 40% foi procedida realizando a diluição de 400mL etanol grau cromatográfico em 600 mL de água ultra-pura.

A preparação da solução padrão 1000 mg/L de CE foi procedida realizando a diluição de 252,5 mg de uretana P.A (peso corrigido para o grau de pureza do reagente) em etanol 40%, completando um volume de 250 mL.

A preparação da solução padrão 1000 µg/L de CE foi procedida diluindo-se 0,5 mL da solução padrão 1000 mg/L de CE em etanol 40% em um balão de 500 mL até completar o volume.

Em seguida foram preparados 8 diluições padrão de CE num range entre 10 µg/L até 1000 µg/L, utilizando a solução padrão 1000 µg/L de CE.

3.4 MÉTODO DE INSTRUMENTAÇÃO

O método de instrumentação consiste na definição das condições de funcionamento utilizado para cada equipamento utilizado na metodologia a ser desenvolvida.

i) Programação do forno: a temperatura inicial de 90°C, com hold time de 2 min. A taxa de aumento de temperatura utilizada foi de 20°C/min, até que a temperatura atinja a temperatura de 220°C (temperatura escolhida por ser 10°C abaixo da temperatura máxima de trabalho da coluna). O hold time para essa temperatura foi de 3min.

ii) Programação de auto-injetor: O volume coletado de amostra foi de 1µL, com o seguinte modelo de injeção: realiza-se primeiramente uma pré-injeção da solução etanol 40% como solvente (dois ciclos), em seguida procedeu-se com a rinsagem da agulha de injeção com a própria amostra (realiza-se esse procedimento 3 vezes). Em seguida a amostra foi injetada e iniciou-se a corrida. Finalizou-se com a pós injeção de acetona como solvente (2 ciclos).

iii) Programação de injeção: A injeção foi procedida na temperatura de 200°C no modelo splitless. A taxa de mistura (split flow) utilizada foi de 50mL/min, utilizando Hélio como gás de arraste numa pressão de aproximadamente 100psi e fluxo constante de 4mL/min. O tempo total da corrida foi de 11,50 minutos.

3.5 MÉTODO DE ANÁLISE

O tipo de metodologia de análise no Espectrofotômetro de Massas empregado foi o monitoramento seletivo de íons (SIM), utilizando ionização positiva por impacto eletrônico a 70eV. A taxa de carga de detecção escolhida para a análise foi de 62 m/z, taxa de maior incidência de fragmentos de íons de CE (RYU *et al.*, 2015). O sinal captado pelo espectrômetro é transformado em sinal cromatográfico pelo software Xcalibur™. O tempo de retenção utilizado foi de 2,94 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE E LIMITES DE DETECÇÃO

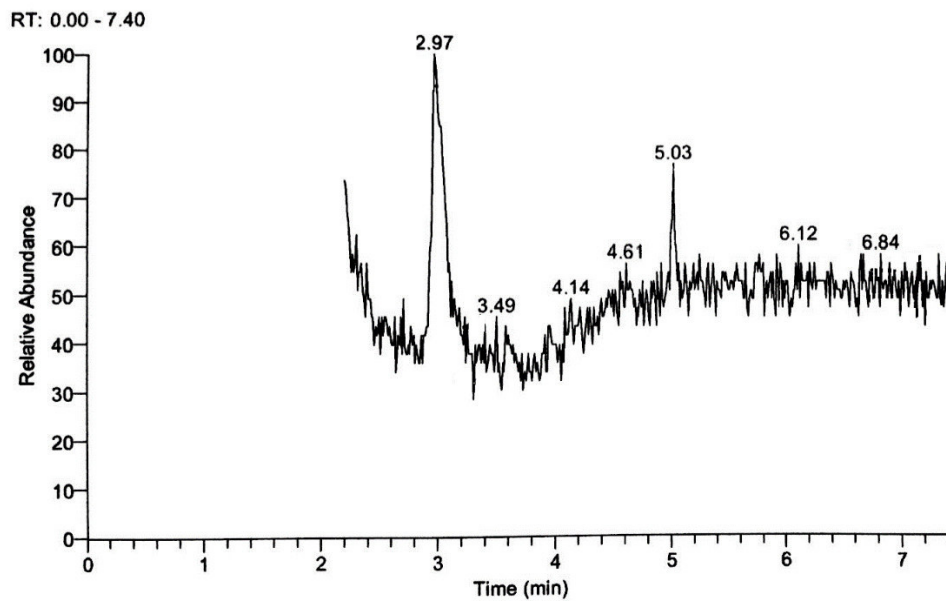
Análise foi procedida em triplicada para cada padrão de concentração de CE: 30ppb, 90 ppb, 150ppb, 210 ppb, 300ppb, 390ppb, 480 ppb, 600ppb. A análise é realizada em partes por bilhão (ppb) ao passo que o limite máximo de concentração definido pelo órgão regulamentador (MAPA) ser inferior à 150 ppb. As concentrações acima foram escolhidas de forma que o valor definido pela legislação se encontrasse no ponto médio da curva.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento (INMETRO, 2007).

A partir de um cromatograma o composto CE foi identificado e a razão entre sinal e ruído (SNR) foi calculado para cada concentração, afim de definir o limite inferior de detecção e quantificação (LDE_{inferior}). O SNR é um indicador de desempenho empregado para verificar a sensibilidade do método. Foi empregada a metodologia de análise visual, onde a variação de altura dos picos e declives é medida em relação a linha base, definida pela análise do branco (0ppb de CE). Quanto maior o valor do S/N melhor é o equipamento (AZEVEDO, D. A., 2004).

Para uma detecção ser válida, o valor de S/N deve ser maior que 3, e para uma quantificação ser aceita o valor de S/N deve ser maior que 9 (AMARAL, P. O., OLIVEIRA, J. P. R., BUSTILLOS, J. O. V., 2011). Pelo método visual (figura 12), o LDE_{inferior} obteve relação sinal ruído média de aproximadamente 4,83 cm/cm, significando um pico de probabilidade de 99% (GROB; BARRY, 2004).

Figura 12 – Cromatograma padrão de 30ppb.



Fonte: A autora.

Foi também calculado o LDE pelo método baseado em parâmetros da curva analítica. Calculado segundo a eq.1, onde s é estimativa do desvio padrão da resposta de análise para o composto CE em determinada concentração e S a inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI, Marcelo et al, 2004). O desvio padrão da concentração de 30ppb (cromatograma com maior percepção visual de ruído) foi de 3,38 (figura 14) e o coeficiente angular da curva analítica foi de 141,34 (figura 15), obtendo-se um LDE de 0,07891 ppb, validando o valor mínimo de detecção empregado para construção da curva analítica.

$$\text{LDE} = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Eq. 1

Figura 13 – Dados analíticos de concentração de CE (ppb) e área correspondente ao pico detectado.

Padrão de Leitura	I (ppb)	Area I	II (ppb)	Area II	III (ppb)	Area III	\bar{X}	\bar{A}
30 ppb	31.92	6450	36.60	6548	30.05	6411	32.86	6470
90 ppb	81.98	13632	87.98	13491	94.24	13345	88.07	13489
150 ppb	151.72	23637	151.39	23835	155.13	21602	152.75	23025
210 ppb	211.40	32198	205.73	27564	207.87	29309	208.33	29690
300 ppb	311.81	46602	296.92	40685	299.72	41796	302.82	43028
390 ppb	388.98	57673	388.52	58309	391.98	53547	389.83	56510
480 ppb	466.25	68756	476.14	71507	464.74	66505	469.04	68923
600 ppb	605.95	88797	606.70	88033	611.75	82940	608.13	86590

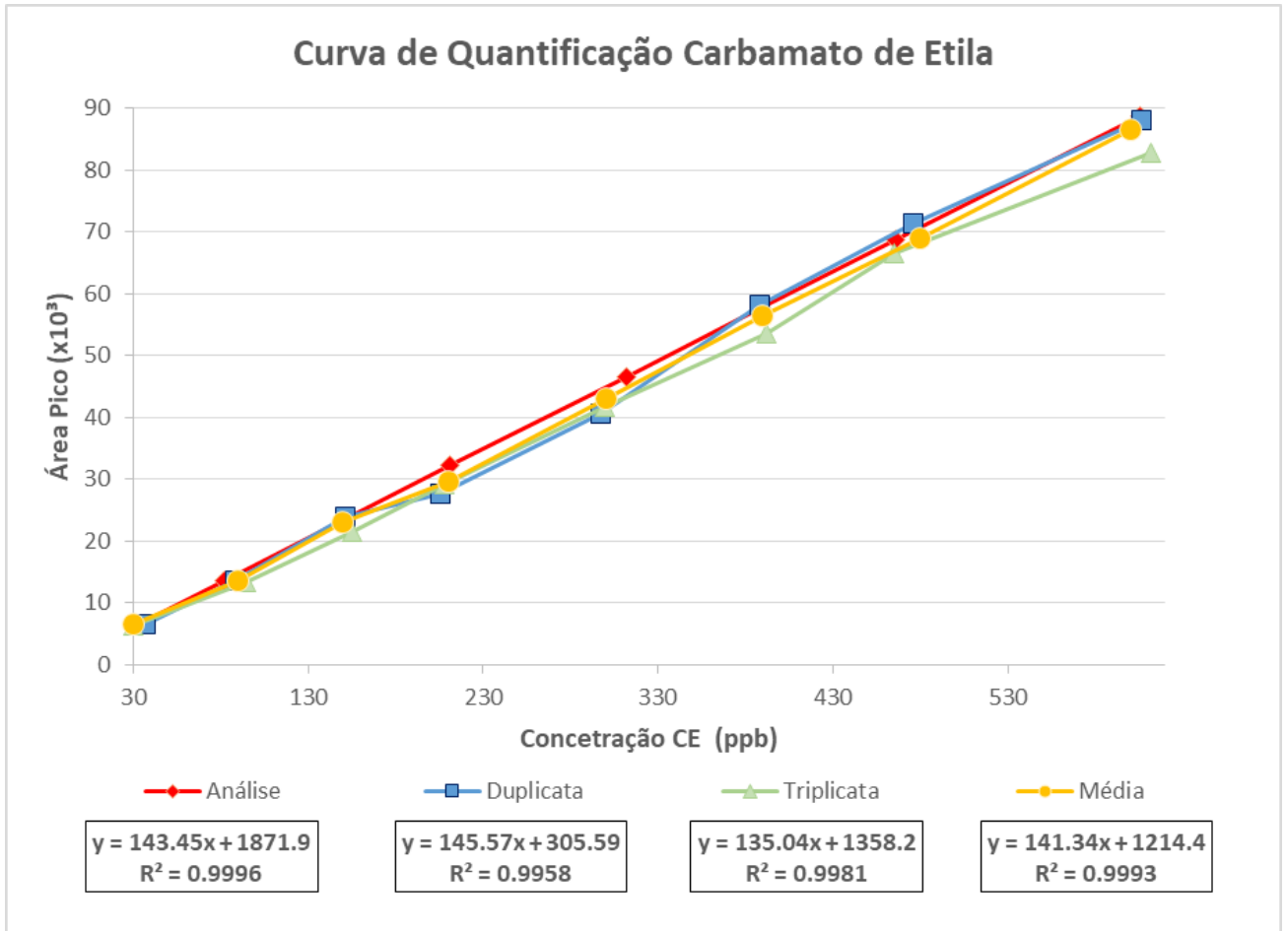
Fonte: A autora.

Figura 14 – Cálculo da média, variância, desvio padrão, coeficiente de variação e Tcalc do Método de T de Student aplicados para a população de cada concentração padrão analisada.

Padrão de Leitura	\bar{X} (ppb)	Variância	Desvio Padrão	Coef. de Variação (%)	 Tcalc
30 ppb	32.856	11.40	3.38	10.28	0.488
90 ppb	88.065	37.58	6.13	6.96	0.182
150 ppb	152.750	4.28	2.07	1.36	0.767
210 ppb	208.334	8.19	2.86	1.37	0.336
300 ppb	302.817	62.57	7.91	2.61	0.206
390 ppb	389.828	3.53	1.88	0.48	0.053
480 ppb	469.041	38.38	6.19	1.32	1.021
600 ppb	608.133	9.94	3.15	0.52	1.490

Fonte: A autora.

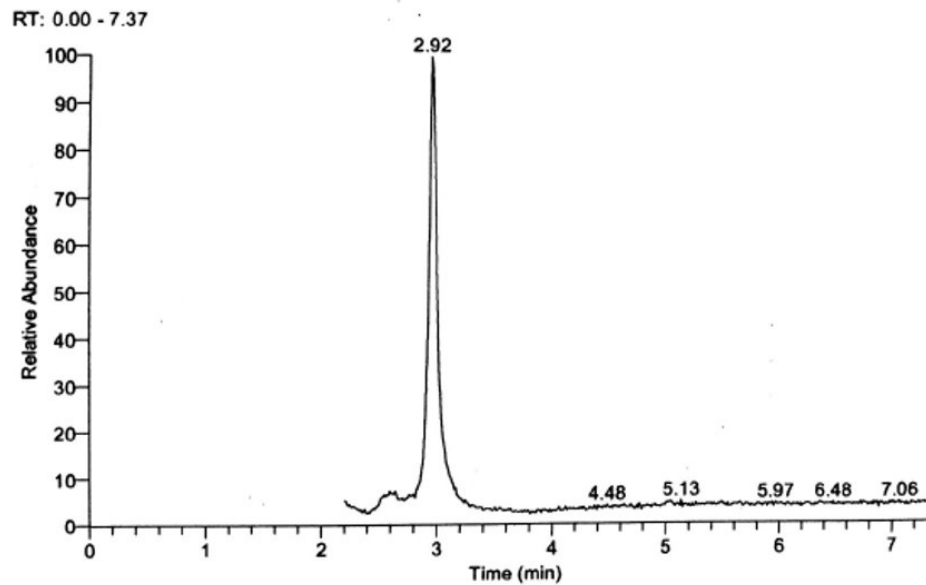
Figura 15 – Curva de quantificação carbamato de etila.



Fonte: A autora.

Para a determinação do limite superior de detecção ($LDE_{superior}$) foi cálculo considerando até 4 vezes o limite imposto pela I.N. nº13 do MAPA, 600ppb de CE. O cromatograma resultante apresentou sinal muito elevado (figura 16) devido à alta concentração CE. A escolha concentração de 600ppb de CE foi motivada pela sensibilidade do equipamento, visando não expor o maquinário a carga máxima de trabalho e também pelas dificuldades e custos de retrabalho do destilado gerado no processo de destilação, sendo mais aplicável a redestilação.

Figura 16 – Cromatograma padrão de 600ppb.



Fonte: A autora.

4.2. Resultados

Para o cálculo da concentração resultante da análise foi realizada a comparação entre as áreas dos picos de detecção (PD) entre as áreas obtidas para concentração padrão feita no laboratório com a área referente a mesma concentração do padrão externo.

O padrão externo utilizado para validação da metodologia foi preparado sob as mesmas condições da metodologia empregada nesta análise, e 500mL de cada uma dos 8 padrões de concentração de CE foram enviados para análise no laboratório analítico do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP), laboratório certificado pelo MAPA.

O cálculo da concentração detectada na análise segue a seguinte relação:

$$A_{PE} \cdot C_{PE} = A_1 \cdot C_1 \quad \text{Eq. 2}$$

Nas figuras 12 e 13 encontram-se os resultados da análise realizada para os padrões utilizados no estudo. Os picos apresentaram reprodutibilidade de tempo de retenção para todos as concentrações padrões analisados, tempo de aproximadamente 2,94 min.

A calibração é um processo de comparação de um variável com uma variável padrão. A curva de calibração é a relação funcional do sinal observado dada uma certa quantidade de analito (PORTAL ACTION). Foram plotados quatro curvas de calibração: uma para cada triplicata e uma para a média. As quatro análises apresentaram regressão da curva de calibração de CE superior a 0,9950, indicando qualidade de ajuste no modelo adotado. Para verificação desse resultado empregou-se o teste de t de Student (Eq. 3), onde o valor de t calculado deve ser menor do que o valor de t tabulado (anexo A) $|t_{\text{calc}}| < |t_{\text{tab}}|$.

$$|t_{\text{calc}}| = \frac{(\bar{x} - \hat{x})}{\sigma \sqrt{n}} \quad \text{Eq.3}$$

Onde \bar{x} é a média dos valores analíticos obtidos, \hat{x} o valor do padrão analítico, σ o desvio padrão dos resultados analíticos e n o número de repetições para o resultado analítico.

O valor de t_{tab} para uma amostra com 2 de grau de liberdade (replicatas) e com valor de confiança igual à 99% é de 6.965. É possível verificar na tabela 14 o valor $|t_{\text{calc}}|$ para cada população de padrão de concentração de CE estudada, e todos apresentam $|t_{\text{calc}}| < |t_{\text{tab}}|$, indicando a ausência de evidências de erros sistemáticos para o modelo. Porém, quanto maior o desvio-padrão, menor o valor de T_{cal} , o que indica maior dispersão dos valores obtidos e menor precisão do modelo analítico (BRENDOLAN, G., 2000).

O coeficiente de variação (CV) é um indicador utilizado para expressar a precisão e a repetitividade de um ensaio e é calculado como garantia de qualidade para o ensaio, comparando a precisão de diferentes experimentos, consideram-se aceitáveis valores de CV até 10%. Verificou-se proximidades entre os valores de CV de quase todos os padrões de concentração, salvo o padrão de 30 ppb. A conformidade entre os coeficientes de variação indicam qualidade e coerência nos resultados obtidos. A variação encontrada no primeiro ponto pode ser justificada devido a quantidade de ruído apresentado na amostra e o sinal baixo (mesmo que acima do $LDE_{\text{inferior}} = 4,38$).

4.3 Resultados do Teste de Proficiência Interlaboratorial (MAPA)

Visando a validação da metodologia de análise de carbamato de etila em aguardentes, submeteu-se um exame de proficiência do MAPA realizada através da comparação

interlaboratorial (total de 19 laboratórios) em relação a quantificação de teor de CE em cachaças, comparando os resultados, avaliando o desempenho, confiabilidade dos resultados analíticos e identificar eventuais erros na análise procedida. Foi requisitado ao laboratório em questão (código: laboratório 10) as análises em duplicatas para cada amostra (BEB.016.001 e BEB.016.002).

O produto foi recebido em duplicada em frascos de vidro âmbar, com capacidade de 150 ml, com tampa batoque e de rosca, contendo aproximadamente 120 ml de destilado. Todos os procedimentos de segurança de armazenamento e distribuição foram garantidos pelo órgão avaliador. Os resultados dos testes de homogeneidade e de desempenho foram retirados do Relatório Final da Comparação Interlaboratorial de Carbamato de Etila em Cachaça (REL/EP/PRIMAR/014 - V.1).

Primeiramente foi verificado pelo órgão regulador (MAPA) a homogeneidade dos resultados coletados entre todos os laboratórios participantes utilizando o métodos estatísticos: ANOVA e o método estabelecido pela norma ISO 13528 (2015).

O método ANOVA consiste na análise de variância, considerando que os dados empregados demonstraram seguir distribuição normal no teste de Anderson Darling, que visa medir o quão bem os dados seguem uma distribuição específica. Esse foi o método aplicado para as amostras do lote **BEB.016.001** devido a variância nula entre os resultados obtidos numa dentre as vinte análises de replicata para esse lote, gerando resultado inconclusivo para o método determinado pela ISO 13528.

A determinação da homogeneidade consiste na análise do valor calculado de F (eq. 4, em que M_{Se} é a variância entre amostras e M_{Sd} é a variância dentro das amostras.), que analisa a possibilidade de generalização do modelo para a amostragem. Para F igual ou superior ao p-valor de um teste de hipótese pode-se considerar o modelo com representação significativa, considerando grau de liberdade de 5%, típico da distribuição normal. Realizando a comparação dos resultados contidos nas figuras 18 e 19 para os valores de p-value = 0,15332, $F=0,428$ entre as amostras e $F=3,02$ dentro das amostras, pode-se dizer que os resultados são suficientemente homogêneos para ser utilizado na comparação interlaboratorial, à medida que p-value < F tanto para entre as 20 amostras como dentro das amostras (duplicatas).

$$F = \frac{M_{Se}}{M_{Sd}} \quad \text{Eq.4}$$

Figura 17 – Plotagem de probabilidade normal para cachaça fortificada com CE – BEB.016.001, teste de Anderson Darling.

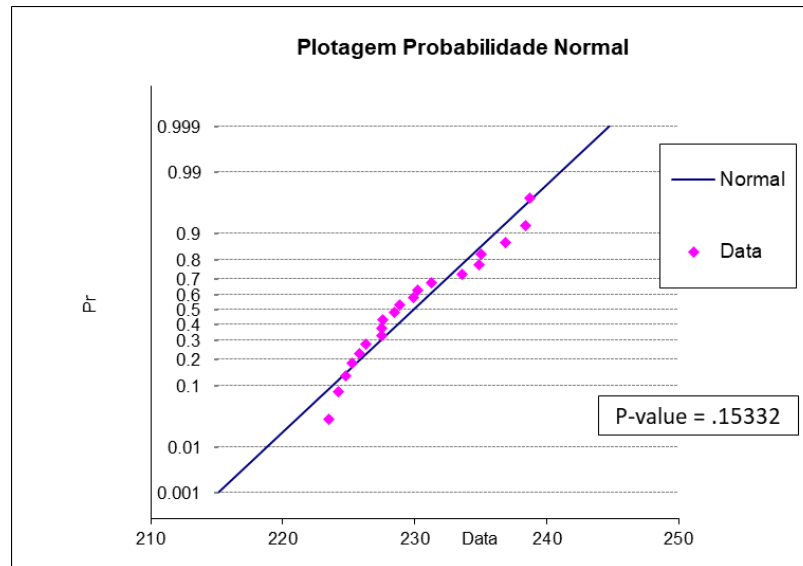


Figura 18 – Análise ANOVA da avaliação da homogeneidade do material de Cachaça fortificada com CE – BEB.016.001.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Valor de F
Entre amostras	121,058	9	0,427678
Dentro das amostras	314,51	10	3.020383
Total	435,568	19	-

Fonte: A autora.

O cálculo determinado pela ISO 13528 consiste na determinação da média entre duplicatas para cada amostra seguida da determinação da média geral de resultados. Com esses valores calcula-se o desvio padrão das médias das amostras, do desvio padrão dentro das amostras e o desvio padrão entre as amostras. O desvio padrão entre as amostras deve ser inferior ou igual a 0,3 do desvio padrão alvo (figura 20) para que o ensaio seja considerado homogêneo. Esse foi o método aplicado para as amostras do lote **BEB.016.002** (figura 21).

Figura 19 – Valores de Desvio padrão alvo dos materiais BEB.016.001 e BEB.016.002

	Média Análise MAPA (µg/L)	Desvio Padrão Alvo (σ)
BEB.016.001	242.4	24
BEB.016.002	513.5	45.41

Fonte: A autora

Figura 20 – Avaliação da homogeneidade do material de Cachaça fortificado com CE – BEB.016.002, ISO 13528/2015.

	Média (µg/L)	Desvio Padrão da Média (µg/L)	Desvio Padrão Entre Amostras - Ss (µg/L)	Valor 0,3 x σ
BEB.016.002	490,995	5,659	3,433	13.62

Fonte: A autora

Os resultados coletados (Figura 21) indicam resultados da bebida BEB.016.002 suficientemente homogêneos para comparação interlaboratorial de análise.

Em seguida foi procedida a análise de avaliação de desempenho dos resultados analíticos reportados. Comparou-se os resultados obtidos na análise oficial pelo órgão responsável (MAPA – tabela x) com os valores médios de cada laboratório participante.

Para quantificar o desempenho foi empregada análise da função *z-score* (eq.5) , conforme descrito na ISO 13528 (2015):

$$z = \frac{(\bar{x} - \hat{x})}{\sigma} \quad \text{Eq. 5}$$

Em que \bar{x} é o resultado analítico do laboratório, \hat{x} é o valor designado (concentração) e σ_p é o desvio padrão alvo.

É considerado desempenho satisfatório quando o valor calculado é inferior a 2, entre 2 e 3 o desempenho é considerado questionável e superior a 3 o desempenho é considerado insatisfatório. Os valores de Z-score calculado para as análises realizadas encontram-se na figura

21. Verificou-se que o laboratório 10 apresentou resultados satisfatórios para a análise do produto BEB.016.001 e questionável para o produto BEB.016.002. O resultado questionável para a concentração de 513,5 ppb de CE justifica-se devido à proximidade com o limite máximo de detecção do equipamento (600ppb).

Figura 21 – Resultados de Análise de CE do laboratório 010 e análise Z-score.

BEB.016.001						
	Identificação do Frasco	Resultados de Análise (µg/L)	Recuperação (%)	Média (µg/L)	Desvio Padrão (σ)	Z-score
Laboratório 10	50	240	97,8	239.50	0,71	-0.12
		239	97,8			
BEB.016.002						
	Identificação do Frasco	Resultados de Análise (µg/L)	Recuperação (%)	Média (µg/L)	Desvio Padrão (σ)	Z-score
Laboratório 10	34	617	97,8	615	2.83	2.24
		613	97,8			

Fonte: A autora.

5 CONCLUSÃO

Devido a rigidez da legislação vigente para as concentrações máximas do composto carbamato de etila (CE) em aguardentes, a verificação constante da precisão da metodologia aplicada para sua quantificação é essencial.

A reprodutibilidade dos resultados coletados, tanto para as áreas dos picos de detecção quanto para o tempo de retenção (2,94 minutos) do composto CE, somada com confirmação de ausência de erros sistemáticos e precisão das análises obtida através da verificação estatística do teste de t de Student e do cálculo dos coeficientes de variação (CV), asseguraram qualidade no ensaio procedido, permitindo a conformidade dos produtos que utilizam destilados como base com a legislação e permitindo a sua quantificação um curto intervalo de tempo. A análise em estudo dá ao processo de produção de destilados maior controle de qualidade e maior efetividade e rapidez para correções de possíveis desvios no ciclo produtivo.

Os resultados obtidos em laboratório tiveram sua qualidade comprovada e reiterada através do teste de proficiência do MAPA, cujo os resultados de quantificação de desempenho de análise satisfatórios para as uma das amostras enviadas pelo órgão (BEB.016.001) e questionável para outra (BEB.016.002), com z-score de respectivamente de -0,12 e 2,24.

REFERÊNCIAS

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução normativa nº 13, de 29 de junho de 2005**. 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

_____. Secretaria Especial da Agricultura Familiar e do Desenvolvimento Agrário (Sead). **Memorial Econômico Sanitário Agroindústria De Cachaça- Alambique**. Disponível em: <http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/Memorial_econ%C3%B4mico_sanit%C3%A1rio_30.000_litros_ano_.doc>. Acesso em: 12 out. 2017.

_____. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) . **Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008 - Rev. 02. Jun. 2007.

ABRABE. Associação Brasileira de Bebidas. Disponível <<http://www.abrabe.org.br/cachaça>>. Acesso em: 15 fev. 2009.

AMARAL, P. O; OLIVEIRA, J.P. R; BUSTILLOS, JOSÉ OSCAR V. Diferentes Técnicas de Varredura de Íons no Espectrômetro de Massas Aplicadas à Análise de Organoclorados Via GC/MS. International Nuclear Atlantic Conference - INAC, 2011.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. **Copper(II) Catalysis in Cyanide Conversion into Ethyl Carbamate in Spirits and Relevant Reactions**. Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 49, No. 6, p.2820, 2001.

AZEVEDO, D. A. **Espectrometria de Massas**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004.

BARBOSA, J. (2014). Engenho de cana-de-açúcar na Paraíba. [S.l.]: SciELO Books - EDUEPB, pp.31-33.

BARBETTA, P. A. - Estatística aplicada às Ciências Sociais. 7 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010

BECKER, C., TREML, D. MAUS, E. M. et al. Produção de Cachaça. Florianópolis - SC: [s.n.], 2009. Disponível em: <<http://mundodacana.blogspot.com.br/2010/08/producao-de-cachaca.html>>. Acessado: 10 out. 2017.

BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **O setor de bebidas no Brasil**. [s/d]. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS%2040%20O%20setor%20de%20bebidas%20no%20Brasil_P.pdf>. Acesso em: 14 set. 2017.

BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009.** Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em: 01 ago. 2017.

BRENDOLAN, G. **Validação de Métodos Cromatográficos.** Pedreira: SGB Consultoria Química S/C. p. 47–61, 2000.

CASCUDO, L. C. **História da Alimentação no Brasil.** vols 1 e 2, 1983 - Editora: Edusp. Itatiaia – SP.

CASCUDO, C. **Prelúdio da cachaça: etnografia, história e sociologia da aguardente no Brasil.** Rio de Janeiro: IAA, 1968.

CATALANI, L. H. **Espectrometria de massa.** 2011. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/lhc/disciplinas/qf15922-2011/2011_massa_-_bloco_1_-_lique.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2017.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CLUBE DO ALAMBIQUE. **Perfil da qualidade da cachaça do Ceará.** 2011. Disponível em: <<http://www.clubedoalambique.com.br/voce-sabia/a-diferenca-entre-a-cachaca-industrial-e-a-cachaca-artesanal>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. D. M. S. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – Lactobacillus - na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol.** p. 1–177, 2009.

DE OLIVEIRA, Ana Márcia Lara. **O Processo da Produção da cachaça Artesanal e sua Importância Comercial.** Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

DEUBER, R. **Florescimento e maturação da cana-de-açúcar.** Seminário de Tecnologia Copersucar, 3, 1986. p. 585-593.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de produção de destilado de vinho.** 2008. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoDestiladoVinho/destilacao.htm>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

ESPINOZA, L. J. S. **Técnica de Produção de Cachaça: Princípios do Processo de Produção de Cachaça de Qualidade.** Conselho Regional de Química IV Região (BP/MB).

FEITOSA, P. C. L. **A cachaça como identidade cultural**. 2005. 70 f. Monografia (Especialização em Turismo, Cultura e Lazer). Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

FREITAS VIANA, C. (2009). **Árvore do Conhecimento da Cana: Mercado**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica - Mercado. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_68_711200516719.html>. Acessado em: 16 nov. 2017.

FURTADO, Jomar Livramento Barros et al. Cianeto em tiquiras: riscos e metodologia analítica. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 27, n. 4, p. 694-700, Dec. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000400004&lng=en&nrm=iso>. Acessado: on 22 out. 2017.

FOOD SAFETY BRAZIL. **Competência pela inspeção e regulação de alimentos: MAPA ou ANVISA?** 2015. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/competencia-pela-inspecao-e-regulacao-de-alimentos-mapa-ou-anvisa/#ixzz4gpEZm5Bj>>. Acesso em: 02 set. 2017.

GALINARO, C. **Da formação e controle de carbamato de etila em aguardentes**. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de São Paulo (USP). São Paulo-SP, 2011.

GAZETA (2017). **Anuário brasileiro da cana-de-açúcar 2017** / Cleiton Evandro dos Santos... [et al.]. – Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta. Santa Cruz, 2017. Disponível em: http://www.editoragazeta.com.br/wp-content/uploads/2017/08/PDF-CANA-DE-A%C3%87%C3%9ACAR_2017_dupla.pdf. Acessado em: 09 set. 2017.

GROB, R. L.; BARRY, E. F. **Modern practice of gas chromatography**. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

JERÔNIMO, E.; SILVA, M. **Cachaça: Uma Bebida Brasileira**. Pesquisa & Tecnologia, vol. 2. 2. ed. [s.l.]: APTA; 2005, p. 2-4.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. 2001. **Biotecnologia Industrial. Vol. III**. São Paulo, Edgard Blücher LTDA, Cap. 1 “Produção de etanol”, p. 7-39.

MAIA, André B.; RIBEIRO, João C. G.; SILVEIRA, Lucimar C. I. **1º Curso AMPAQ de produção artesanal de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte: AMPAQ, 1995. 106p.

MAPA DA CACHAÇA. **Qual a diferença entre cachaça e aguardente?** 2012. Disponível em: <<http://www.mapadacachaca.com.br/artigos/os-diferentes-processos-de-producao-da-cachaca/>>. Acesso em: 02 set. 2017.

MONTEIRO, Â. M da C.; SANTO JÚNIOR, J. N. (Coords.). Estudo da competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar da Região do Cariri. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2001.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Cachaça: orientações técnicas para produção**. Treinamento empresarial. SEBRAE /Piauí, 2005. 150 p.

NOGUEIRA, A; FILHO, W. **Aguardente De Cana**. UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÔNOMAS. Botucatu, 2005. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Horticultura/aguardente-de-cana-2005.pdf>> Acessado em: 02 set. 2017

OLIVEIRA, A.F. et al. **Sistema agroindustrial da cachaça e potencialidades de expansão das exportações**. Fearp. Disponível em: <<http://www.fearp.usp.br/egna/resumos/Oliveira.pdf>> Acesso em: 22 de out. 2017.

PINHEIRO, S. H. M. **Perfil da qualidade da cachaça do Ceará**. 1999. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999. 110f.

PORTAL SÃO FRANCISCO. **Fermentação Alcoólica, Processo, O que é Fermentação Alcoólica**. Disponível em: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/quimica/fermentacao-alcoolica>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

PORTAL ACTION. **Curva de Calibração - Análise de Regressão**. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/analise-de-regressao/110-curva-de-calibracao>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, E. A. A. Q. de. **Expansão da exportação de cachaça brasileira: uma nova oportunidade de negócios internacionais**. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 7., 2006, São José dos Campos. [Anais...]. [São José dos Campos: Univap, 2007]

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, Oct. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500017&lng=en&nrm=iso>. acessado em: on 08 Nov. 2017.

RODRIGUES, Luciana Deotti. **A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação**. 2010. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Análise Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

RYU, D. *et al.* Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and fermented foods sold in Korea. **Toxicological Research**, v. 31, n. 3, p. 289-297, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.5487/TR.2015.31.3.289>>. Acesso em: 08 out. 2017.

Sebrae Mercados. (2014). **CACHAÇA BRASILEIRA, OS NÚMEROS DE UM MERCADO EM EXPANSÃO**. Disponível em: <<http://www.sebraemercados.com.br/cachaca-brasileira-os-numeros-de-um-mercado-em-expansao/>>. Acesso em: 09 set. 2017.

SILVEIRA, Evanildo. **Com 1,3 bilhão de litros produzidos ao ano, atrás apenas da cerveja, a cachaça é personagem do folclore, da música, da literatura, da civilização brasileira**. Disponível em <<http://www.unesp.br/aci/jornal/147/>> Acesso em: 12 set. 2017

SOARES, A. A.; DE SOUZA, C. F. **Produção da cachaça de alambique**. 2010. Disponível em: <<http://www.cachacadedodeprosa.com.br/dedodeprosa/Paginaf3ca.html?idSecao=70&>>. Acesso em: 10 out. 2017.

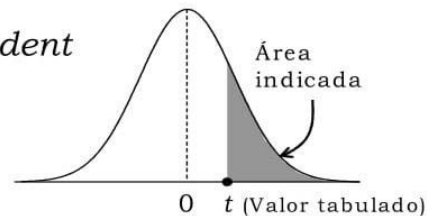
TRIBUNA DO CEARÁ. **Variedade de cachaças e marca de peso garantem ao Ceará lugar de destaque na exportação**. 2014. Disponível em: <<http://tribunadoceara.uol.com.br/diversao/check-in/variedade-de-cachacas-e-marca-de-peso-garantem-ao-ceara-lugar-de-destaque-em-exportacao/>>. Acesso em: 12 set. 2017.

VIEIRA, M. C. A. **Setor sucroalcooleiro brasileiro: evolução e perspectivas**. Rio de Janeiro, 2007. Disponível:
<https://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/liv_perspectivas/07.pdf>. Acesso em: 10 agosto 2017.

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, v. 259, p. 325-350, 1991.

ANEXOS

ANEXO A – METODO T DE STUDENT

Distribuição t de Student

gl	Área na cauda superior								
	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1	1,000	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	127,3	318,3	636,6
2	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,09	22,33	31,60
3	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,21	12,92
4	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,894	6,869
6	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408
8	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781
10	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318
13	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140
15	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922
19	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850
21	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,768
24	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725
26	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,689
28	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,396	3,660
30	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646
35	0,682	1,306	1,690	2,030	2,438	2,724	2,996	3,340	3,591
40	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551
45	0,680	1,301	1,679	2,014	2,412	2,690	2,952	3,281	3,520
50	0,679	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	2,937	3,261	3,496
z	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,090	3,291

Fonte: BARBETTA, P. A. - Estatística aplicada às Ciências Sociais.