

Carlos Alexandre Galinaro

Da formação e controle de carbamato de etila em aguardentes

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: prof. Dr Douglas Wagner Franco

São Carlos

2011

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos e Creuza, minha avó Anazinha, meus irmãos Rodrigo e Luis Alexandre, e a Bia, por serem de extrema importância na minha vida.

Agradecimentos

Para a conclusão deste trabalho, a valiosa ajuda de várias pessoas, das mais diversas formas foi fundamental, e eu não poderia deixar de registrar os meus sinceros agradecimentos.

A Deus, Nossa Senhora Aparecida, Santa Rita de Cássia e Santo Expedito por me protegerem, iluminar e abençoar a minha vida.

Aos meus pais Carlos e Creuza, meus grandes ídolos, pelo amor, carinho, educação, incentivo, ajuda e ensinamentos para enfrentar os desafios.

A vó Anazinha, cujo carinho e preces foram e são de extrema importância.

Ao meu irmão Luis, pela amizade, confiança, dedicação e ajuda em casa, o que me deu a tranquilidade enquanto estive longe.

Ao meu irmão Rodrigo e sua esposa Roberta, pela amizade, credibilidade, auxílio e apoio para que eu realizasse os meus sonhos.

A Bia, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo e por me dar a alegria de estar sempre ao meu lado, acreditando e apoiando.

A dona Regina, o “seo” Emilson (*in memorian*), dona Encarnação, Daniela e Débora, por ser minha família em São Carlos.

Aos meus tios(as), Ayrton, Aurélio, Cláudio (*in memorian*), Claudete, Dirce, Elvira, Gorete, Ilda, Marcos, Manoel, Mercedes, Roberto (*in memorian*) e Sonia, pelo incentivo, interesse e apoio durante meus estudos.

Aos meus primos(as), Ana Giulia, Ana Paula, Carol, Claudia, Fábio, Giovanna, João, Luis Carlos, Leonardo, Marcos Eduardo, Mariana, Nenzão, Patrícia, Rita, Vinício e Vinicinho, pela confiança.

Ao prof. Douglas, por me dar a honra e a oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

Aos amigos que fizeram ou fazem parte do meu ambiente de trabalho, Aline, Ana, Eduardo Balinha, prof. Daniel, Fernanda, Felipe, Leandro (Boi), Luis Gualberto, Luciana, Mario Shultz, Manassés, Pedro, Renatinha, Regina, Roni, Tiago Papa, Silmara, Olívia e em especial desde o início, ao Alexandre (Itapira), a Ivonte e ao Francisco Wendel, pela colaboração, discussão, descontração durante execução deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Inorgânica, André Barbie, Camila, Clayston Daniela, Daniela Truzzi, Evânia, Gustavo, Henrique, Maikon, Magão, Antonio (Naná), Natália, Sílvia e Zé Luis que muitas vezes deixaram os seus afazeres para me auxiliar.

As secretarias Claudia, Gislei e em especial a Veroneide pela atenção dispensada durante a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr Sebastião C. da Silva e do mestrando Augusto C. S. da Silva da UFMS pelo auxílio na realização dos cálculos quânticos.

A Dra Maria Cecilíla H. T. Cavalheiro (IQSC) pela ajuda nos experimentos de destilação.

As amizades construídas dentro IQSC, Adriano, Alexandre Cruz, Andréia, Chicão, Edivan, Flávio (Baixinho), Leandro, Malu, Rita, Tati, Ulisses e Willian pelos momentos acadêmicos e de descontração.

A Andréia e a Silvia, do serviço de pós-graduação, pelo atendimento atencioso.

Ao pessoal da informática Ângelo, Eduardo, Flávio, Irineu e Oscar que muitas vezes salvaram o meu computador.

Ao IQSC, especialmente a Bernadete e Eliana (Biblioteca), Cidinha (ensino), Douglas (GEI) Paulo e Carlinhos (CAQUI), João Tiengo e Marcelo (GMEME), Ronaldo, Roberto e Sidnei (motoristas), Tiago Abrahão (Inorgânica), profa. Eny e Vanessa pela atenção dispensada.

Aos meus amigos (família), tia Cida (professora), Divinão (*in memória*), Diva, “seo” Dário (*in memória*), Felipe, Jorge, Vó Conceição, Homerão, Lurdinha, tia Lourdes, Norma, Paulão, Sandro e a Táta que muitas vezes se interessaram pelos meus estudos.

Ao Carlinhos, Dinoel, Osvaldir e “seo” Sebastião por ajudarem ao meu pai e irmãos.

Aos meus eternos amigos de graduação Leticia, Luis Gustavo, Tiago Moda, Wellington e Ygor pelos momentos de alegria e descontração.

As pessoas que por ventura não foram citadas aqui, mas que não deixaram de ser importantes nesta caminhada.

A Universidade de São Paulo e a UFSCar.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

*“Devia ter complicado menos
Trabalhado menos
Ter visto o sol se pôr
Devia ter me importado menos
Com problemas pequenos
Ter morrido de amor...”*

*Queria ter aceitado
A vida como ela é
A cada um cabe alegrias
E a tristeza que vier ...”*

Epitáfio (Titãs)

*“O saber se aprende com os mestres.
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.”*

Cora Coralina

*“Se queremos progredir, não devemos repetir
a história, mas fazer uma história nova.”*

Mahatma Gandhi

Resumo

A legislação brasileira estabelece o limite de 150 µg/L para os teores de carbamato de etila (CE ou uretana) em aguardentes. O presente trabalho indica que os teores de carbamato de etila em aguardentes podem ser reduzidos em até 92% do teor original após as aguardentes serem submetidas a uma nova destilação. Para amostras de aguardente recém destiladas (coletadas *in loco*) foi possível constatar que o CE também se forma após a destilação, e que a formação completa-se após 10 dias. A luz difusa não influenciou, quer na constante de velocidade quer na concentração de CE final. Esta, entretanto demonstrou-se dependente da temperatura. Observou-se que a reação ocorre com k_{obs} de $(6,4 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ /s, a 25°C e pH 4,5, sendo este valor independente da origem da aguardente e da radiação luminosa. Os parâmetros de ativação para esta reação foram ΔH^\ddagger 34 kcal/mol, ΔS^\ddagger - 69 cal/K e ΔG^\ddagger 54 kcal/mol. Foi possível estimar que o teor de uretana formado no interior do destilador foi inferior a 60% do CE total. Estudos com aguardente nas quais foi adicionado KOCN, indicaram que ocorre a formação de uretana com k_{obs} $(8,60 \pm 0,4) \times 10^{-5}$ /s, a 25°C, pH 4,5, com ΔH^\ddagger 20,6 kcal/mol, ΔS^\ddagger - 96,1 cal/K e ΔG^\ddagger 48,7 kcal/mol. Esta reação não foi influenciada pela radiação luminosa (250 a 500 nm), bem como pelo teor alcoólico da aguardente (0,29 a 15,7 mol/L). O rendimento no teor de CE aumentou em função do teor alcoólico do meio, atingindo um valor máximo a 60% v/v. Cálculos quânticos sugeriram que o HNCO é a molécula reativa. Os resultados experimentais colhidos até o momento sugerem a existência de uma reação paralela consumindo parte do HNCO e, portanto limitando k_{obs} e a relação $[CE]_{teórico} / [CE]_{experimental}$. A adição de NaCN à aguardente também conduz a formação de uretana, mas com constante de velocidade inferior a observada para o KOCN.

Palavras-chave: Aguardente, carbamato de etila.

Abstract

Brazilian law establishes the limit of 150 µg/L for ethyl carbamate (EC, urethane) contents in sugar cane spirits. The present work indicates that the levels of ethyl carbamate in spirits may be reduced up to 92% of the original content after undergoing a new distillation. It was observed that EC is also formed after distillation in recent distilled samples collected in loco and that the EC formation is completed after 10 days. The light did not influence either the rate constant or the final EC concentration. However, the rate constant proved to be temperature dependent. It was observed that the reaction occurs with k_{obs} $(6.4 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ /s at 25°C and pH 4.5, which value is independent of the spirits origin and light radiation. The activation parameters for this reaction were ΔH^\ddagger 34 kcal/mol, ΔS^\ddagger - 69 cal/K and ΔG^\ddagger 54 kcal/mol. It was estimated that the concentration of urethane formed inside the distiller was less than 60% of total EC. Studies adding KOCN in sugar cane spirits indicated that the formation of urethane occurs with k_{obs} $(8.60 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ /s at 25°C, pH 4.5, with ΔH^\ddagger 20.6 kcal/mol, ΔS^\ddagger - 96.1 cal/K and ΔG^\ddagger 48.7 kcal/mol. This reaction was not influenced by light radiation (250 to 500 nm), as well as the alcohol content of spirits (0.29 to 15.7 mol/L). The yield on EC content increased according to the alcohol content of the medium; reaching a maximum value of 60% v/v. Quantum calculations have suggested that HNCO is the reactive molecule. The experimental results collected so far suggest the existence of a parallel reaction which consumes part of HNCO and therefore limits k_{obs} and the relationship $[CE]_{theoretical} / [EC]_{experimental}$. The addition of NaCN to sugar cane spirits also leads to urethane formation, although with lower rate constant compared to the one observed for KOCN.

Keywords: sugar cane spirit, ethyl carbamate.

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma geral da produção da aguardente de cana-de-açúcar.....	4
Figura 2. Estruturas dos isômeros conformacionais I e II para o carbamato de etila.....	8
Figura 3. Exemplos de alguns glicosídeos cianogênicos.....	15
Figura 4. Variação da mediana de concentração de carbamato de etila ao longo da última década.....	28
Figura 5. Diagrama de fases para mistura etanol/água e o número de estágios calculados da coluna tipo <i>Vigreux</i> , utilizada na destilação das aguardentes.....	37
Figura 6. Sobreposição de dois cromatogramas típicos de uma aguardente, monitorando-se o pico de m/z 62, analisada quanto ao teor de CE antes (—, original) e após ter sido redestilada (—). Pico do carbamato de propila (CP), utilizado como padrão interno.....	49
Figura 7. Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo (horas) em uma amostra de aguardente coletada <i>in loco</i> , analisada na presença (■) e na ausência de luz difusa (●) a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$).....	54
Figura 8. Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo (horas) em aguardentes coletadas <i>in loco</i> , oriundas de um mesmo produtor (mesmo vinho) destiladas em alambique de cobre (●) e em coluna de aço inox (■), a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$).....	55
Figura 9. Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo (horas) em aguardentes oriundas de três diferentes produtores coletadas <i>in loco</i> , a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$): produtor 1 (■) 54% v/v etanol; produtor 2 (●) 51% v/v; produtor 3 (▲) 46% v/v.....	58
Figura 10. Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo (horas) analisado nas temperaturas de 15°C (■), 25°C (●) e 35°C (▲) para aguardentes coletadas <i>in loco</i> , oriundas de um mesmo produtor e mesmo vinho.....	59
Figura 11. Evolução dos teores de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (minutos) para aguardente adicionada com $1,12 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ de uréia, que foi mantida sob refluxo a temperatura de $\approx 84^\circ\text{C}$, durante 7316 minutos.....	64
Figura 12. Decaimento das concentrações de KOCN adicionado em soluções modelo de aguardente a 25°C , em $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ e com $\epsilon = 412 \text{ L / mol cm}$	68

Figura 13. Absorbância em função do tempo (segundos) para uma solução modelo de aguardente (48% v/v) adicionada com $4,10 \times 10^{-4}$ mol/L de KOCN, a 25°C em pH 4,5. <i>Insert</i> do gráfico de $\ln (A_{\infty} - A_t)$ versus o tempo (segundos).....	69
Figura 14. Formação de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) para uma solução modelo de aguardente (48% v/v) adicionada com $2,12 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C em pH 4,5.....	70
Figura 15. Decaimento dos íons cianato (mol/L) e formação de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) para duas diferentes soluções modelo de aguardente adicionadas de $4,10 \times 10^{-4}$ mol/L de KOCN (decaimentos do íon OCN ⁻) e $2,12 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN (formação de CE), a 25°C e pH 4,5.....	71
Figura 16. Formação de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) em soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionadas com $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 15°C (■), 25°C (●) e a 35°C (▲) em pH 4,5.....	76
Figura 17. Dependência da formação do carbamato de etila em função do teor alcoólico, para soluções modelo de aguardente adicionadas com $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN com diferentes teores alcoólicos (1,70 a 91,5% v/v etanol) a <u>35°C</u> em pH 4,5.....	80
Figura 18. Variação na concentração de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) para uma solução modelo de aguardente (48% v/v) adicionada de $1,22 \times 10^{-5}$ mol/L de NaCN, a <u>30°C</u> em pH 4,5. <i>Insert</i> do gráfico de $\ln ([CE]_{\infty} - [CE]_t)$ versus o tempo (segundos).....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Teores máximos dos contaminantes orgânicos e inorgânicos estabelecidos pelo MAPA para a aguardente de cana-de-açúcar.....	7
Tabela 2.	Teores do carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida.....	12
Tabela 3.	Variação dos teores de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em bebidas alcoólicas.....	13
Tabela 4.	Teores médios de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em aguardentes (alambique e coluna) produzidas em diferentes estados Brasileiros.....	25
Tabela 5.	Variação da concentração de CE em amostras de aguardente no período de 2006 a 2010, considerando-se um mesmo produtor.....	26
Tabela 6.	Número de amostras, mediana, concentração mínima e máxima de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em aguardentes analisadas no período de 2001 a 2010.....	27
Tabela 7.	Teores médios dos componentes analisados na aguardente de referência.....	36
Tabela 8.	Teores alcoólicos (% v/v) na fração vapor e na fração líquido.....	38
Tabela 9.	Teor alcoólico (% v/v), concentração de carbamato de etila ([CE]) nas amostras de aguardente antes (original) e após serem redestiladas (redestilada) em $\mu\text{g}/100\text{ mL A.A.}$, e a porcentagem (%) de redução de CE após nova destilação.....	50
Tabela 10.	Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em aguardentes comerciais após irradiação em bancada fotoquímica em diferentes comprimentos de onda, durante três horas.....	52
Tabela 11.	Concentração mediana, média, mínima e máxima de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$), para aguardentes oriundas de vinhos iguais e vinhos diferentes, destiladas em coluna e alambique.....	56
Tabela 12.	Concentração de carbamato de etila para aguardentes oriundas de um mesmo vinho destiladas em alambique (cabeça, coração e cauda) e em coluna.....	57
Tabela 13.	Concentração média de carbamato de etila inicial $[\text{CE}]_{\text{inicial}}$, final $[\text{CE}]_{\text{final}}$, no tempo zero $[\text{CE}]_0$, porcentagem média (% CE) e a porcentagem média total de carbamato de etila formado durante a destilação.....	60

Tabela 14.	Concentração de carbamato de etila formado e tempo de refluxo para aguardentes de referência,* adicionadas ou não de uréia e de íons amônio (sulfato de amônio), que foram mantidas sob refluxo.....	63
Tabela 15.	Concentração de carbamato de etila formado na aguardente de referência,* tamponada e não tamponada, adicionada de uréia após atingir a temperatura de refluxo e os respectivos pHs observados.....	65
Tabela 16.	Concentração de carbamato de etila formado na aguardente de referência,* tamponada e não tamponada, adicionada de uréia após atingir a temperatura de refluxo e os respectivos pHs observados.....	65
Tabela 17.	Concentração de KOCN adicionado, carbamato de etila formado $[CE]_{\text{formado}}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ para soluções modelo de aguardente (48% v/v) a 25°C em pH 4,5.....	70
Tabela 18.	pH, concentração de carbamato de etila formado $[CE]_{\text{formado}}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ para soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionada com $2,07 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C.....	72
Tabela 19.	. Efeito da adição de cobre (II), ferro (II) e EDTA na formação de carbamato de etila em soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionadas com $2,06 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C e pH 4,5.....	73
Tabela 20.	Comprimento de onda (λ , nm) da fonte luminosa, concentração de carbamato de etila formado $[CE]_{\text{formado}}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ para soluções modelo de aguardente (48% v/v) contendo $2,08 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C e pH 4,5.....	74
Tabela 21.	Temperatura das soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionadas com $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, concentração de carbamato de etila formado $[CE]_{\text{formado}}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ em pH 4,5.....	76
Tabela 22	Parâmetros de ativação para a formação de carbamato de etila deste e de trabalhos anteriores.....	77
Tabela 23.	Teor alcoólico das soluções modelo de aguardente adicionadas com $(2,10 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, carbamato de etila formado $[CE]_{\text{formado}}$, k_{obs} e $t_{1/2}$, a <u>25°C</u> e a <u>35°C</u> , em pH 4,5.....	78
Tabela 24.	Constantes de velocidade (k_{obs}) para o íon CN^- experimental e teórica para o íon OCN^- para soluções modelo de de aguardente (48% v/v), a temperatura de 25, 30, 35 e 37°C, em pH 4,5.....	84

Lista de Esquemas

Esquema 1.	Metabolismo do carbamato de etila em camundongos.....	10
Esquema 2.	Propostas para a formação do carbamato de etila a partir da uréia, do carbamil fosfato, de glicosídeos cianogênicos e da azodicarbamida.....	14
Esquema 3.	Proposta para a formação de carbamato de etila envolvendo o íon cianeto e tendo o cobre (II) como catalisador.....	18
Esquema 4.	Proposta para a formação de carbamato de etila através do ataque da molécula de água ao ciano complexo de cobre em solução alcoólica...	18
Esquema 5.	Proposta para a formação de carbamato de etila através do ataque do ciano complexo de cobre ao etanol.....	18
Esquema 6.	Proposta para a formação de carbamato de etila a partir do HNCO e do HOCN durante a destilação.....	21
Esquema 7.	Reação de ciclização do ácido 2-aminobenzóico na presença de íons cianato em meio ácido.....	43
Esquema 8.	Precursor de carbamato de etila convertendo-se em uma forma reativa.....	60
Esquema 9.	Formação do carbamato de etila por meio do seu precursor (PCE) em meio alcoólico.....	61
Esquema 10.	Reações propostas para a decomposição da uréia.....	62
Esquema 11.	Proposta de formação do carbamato de etila como intermediário durante a síntese do dietil carbonato.....	62
Esquema 12.	Proposta de degradação da uréia formando HNCO e NH ₃	66
Esquema 13.	Proposta de degradação da uréia formando HOCN e NH ₃	67
Esquema 14.	Equilíbrio do ácido ciânico e isociânico.....	81
Esquema 15.	Proposta de reação paralela entre o HNCO e a água.....	81
Esquema 16.	Proposta de formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HNCO e o etanol.....	82
Esquema 17.	Proposta de formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HOCN e o etanol.....	82
Esquema 18.	Proposta para a formação de carbamato de etila via ácido ciânico/isociânico.....	83

Lista de Reações

Reação 1. HCN em fase gasosa, na presença de Cu originando ácido isociânico (HNCO) ácido cianico (HOCN)..... 21

Lista de Siglas e Abreviaturas

A.A. – Álcool anidro

BMDL 10 – Benchmark Dose Lower Limit

CE – carbamato de etila

CN⁻ – íon cianeto

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization World Health Organization

IARC – International Agency for Research on Cancer

INT – intermediário de reação

NCO⁻ – íons isocianato

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OCN⁻ – íon cianato

PCM – *Polarizable Continuum Model*

PC – produto complexo ou complexo ativado

RC – complexo reagente

TS – estado de transição

TSI – estado de transição da primeira etapa

TSII – estado de transição da segunda etapa

US EPA – United States Environmental Agency Protection

[CE] – concentração de carbamato de etila

[CN⁻] – concentração do íon cianeto

[H⁺] – concentração hidrogeniônica

[NCO⁻] – concentração do íon isocianato

[OCN⁻] – concentração do íon cianato

Lista de Anexos

Anexo I.	Modelo do questionário respondido pelos produtores de aguardente.....	100
Anexo II.	Medidas pH, média, valor mínimo e valor máximo de aguardentes comerciais analisadas no LDQA - USP.....	102
Anexo III.	Energias relativas ΔG para a degradação da uréia a ácido isociânico (HNCO).....	103
Anexo IV.	Energias relativas ΔG para a degradação da uréia a ácido ciânico (HOCN).....	104
Anexo V.	Energias relativas ΔG para reação paralela entre o HNCO e a água.....	105
Anexo VI.	Energias relativas ΔG para a formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HNCO e o etanol.....	106
Anexo VII.	Energias relativas ΔG para a formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HOCN e o etanol.....	107

Sumário

Lista de Figuras	<i>i</i>
Lista de Tabelas	<i>iii</i>
Lista de Esquemas	<i>v</i>
Lista de Reações	<i>vi</i>
Lista de Siglas e Abreviaturas	<i>vii</i>
Lista de Anexos	<i>viii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Produção de Cana-de-açúcar no Brasil.....	1
1.2 A Aguardente de Cana-de-açúcar.....	1
1.2.1 Definição e mercado.....	1
1.2.2 Aguardente: sistema de produção.....	3
1.2.3 Legislação da aguardente: composição química e requisitos de qualidade.....	6
1.3 Carbamato de Etila (CE).....	7
1.3.1 Propriedades físico-químicas e isômeros (conformacionais) do carbamato do etila	7
1.3.2 Aspectos toxicológicos e classificação do carbamato de etila	8
1.3.3 Legislações e limites para o carbamato de etila em bebidas.....	11
1.3.4 Ocorrências naturais e reações envolvidas na formação de carbamato de etila.....	13
1.3.5 Precursores de carbamato de etila em vinhos.....	15
1.3.6 Formação de carbamato de etila em meio hidroalcoólico.....	17
1.3.7 Precursores de carbamato de etila em bebidas destiladas.....	19
1.3.8 Formação de carbamato de etila durante a destilação.....	21
1.3.9 Propostas para a eliminação dos precursores do carbamato de etila em vinhos e destilados.....	22
1.3.10 Perfil dos teores de carbamato de etila em bebidas alcoólicas.....	23
1.4 Técnicas Instrumentais para a Análise de Carbamato de Etila.....	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Reagentes.....	31
3.2 Análise de Carbamato de Etila.....	31
3.3 Análise dos íons Cobre e de Ferro.....	32

3.4	Determinação de pH.....	33
3.5	Amostras.....	33
3.5.1	Aguardentes comerciais.....	33
3.5.2	Aguardentes recém destiladas coletadas <i>in loco</i>	34
3.5.3	Aguardente utilizada no preparo das soluções modelo.....	35
3.6	Procedimento Experimental.....	36
3.6.1	Sistema de redistilação das aguardentes comerciais.....	36
3.6.1.2	Cálculo do número de pratos teóricos (n).....	36
3.6.2	Bancada fotoquímica.....	38
3.6.2.1	Irradiação das aguardentes comerciais.....	39
3.7	Experimentos Cinéticos com as Aguardentes Coletadas <i>in loco</i>	39
3.8	Experimentos em Refluxo.....	40
3.9	Experimentos com Solução Modelo de Aguardente Adicionada com Cianato de Potássio.....	42
3.9.1	Preparo das soluções estoque de cianato de potássio.....	42
3.9.2	Preparo, armazenamento e análise das soluções modelo de aguardente adicionada com cianato de potássio.....	42
3.9.3	Decaimento do íon cianato (OCN ⁻) por UV-vis.....	43
3.9.4	Avaliação do íon cianato na formação do carbamato de etila.....	44
3.9.5	Avaliação da influência do pH na formação do carbamato de etila.....	44
3.9.6	Avaliação da adição de íons de cobre e ferro, e tampão EDTA na formação do carbamato de etila.....	45
3.9.7	Avaliação da influência da luz na formação do carbamato de etila.....	45
3.9.8	Avaliação da variação da temperatura na formação do carbamato de etila.....	45
3.9.9	Preparo soluções modelo de aguardentes utilizadas na avaliação da influência do teor alcoólico na formação do carbamato de etila.....	46
3.10	Preparo das Soluções Estoque de Cianeto (CN ⁻).....	46
3.10.1	Avaliação do íon cianeto (CN ⁻) na formação do carbamato de etila...	47
3.11	Cálculos de Estruturas e Energias Moleculares.....	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Redistilação das Aguardentes Comerciais.....	48
4.2	Aguardentes Comerciais Irradiadas em Bancada Fotoquímica.....	51
4.3	Experimentos com Aguardentes Coletadas <i>in loco</i>	53
4.4	Experimentos Realizados com Uréia sob Refluxo.....	61
4.4.1	A degradação da uréia.....	66
4.5	Experimentos com Soluções Modelo de Aguardente.....	67

4.5.1 Soluções modelo de aguardente adicionada com íons cianato (OCN ⁻).....	67
4.6 Estudos teóricos sobre a formação de carbamato de etila.....	80
4.7 Soluções modelo de aguardente adicionada de íons cianeto (CN ⁻).....	83
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Produção de Cana-de-açúcar no Brasil

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar.^[1] A produtividade média brasileira de cana aumentou 50% nos últimos 20 anos, de 44 para 67 toneladas de cana por hectare. O estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro, com uma produtividade média de 78 toneladas de cana por hectare, possuindo diversas unidades produtoras que ultrapassaram a marca de 90 a 95 toneladas de cana por hectare.^[2,3] A cana quando submetida ao simples processo de esmagamento, fornece de 60 a 75% de suco doce e potável (garapa ou caldo de cana), que é rico em sais minerais e açúcares vegetais, como glicose e sacarose.^[2,3] Assim, a cada 1 tonelada de cana-de-açúcar produz-se aproximadamente: 56 kg de açúcar, 17 litros de álcool anidro e 49 litros de álcool ou 120 litros de aguardente.^{4,5}

1.2 A Aguardente de Cana-de-açúcar

1.2.1 Definição e mercado

A aguardente de cana-de-açúcar é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v a 20°C,^[6] obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L (seis gramas por litro). Cachaça^[6] é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% v/v a 20°C, e com características sensoriais peculiares.^[a]

^[a] Como toda cachaça é uma aguardente de cana, no transcorrer deste texto, a bebida destilada do caldo de cana fermentado será tratada como aguardente de cana-de-açúcar, ou simplesmente aguardente, visando facilitar a leitura.

A aguardente de cana brasileira é a terceira^[7] bebida alcoólica destilada mais consumida no mundo, superada apenas pela vodca e pelo *soju*.^[b] No entanto, o seu consumo está basicamente restrito ao território brasileiro. A produção nacional é estimada em 1,3 bilhão de litros por ano,^[7,8] e pelo menos 90% desse total é proveniente da fabricação industrial.

No Brasil existem mais de 4 mil marcas de aguardente registradas e cerca de 40 mil produtores,^[8,9] sendo que as micro empresas correspondem a 99% do número total de produtores. O setor produtor de aguardente tem se tornado importante na economia brasileira, gerando uma receita de aproximadamente US\$ 500 milhões e mais de 450 mil postos de trabalho.^[8,9]

A aguardente é produzida em todo Brasil, mesmo em estados onde o cultivo da cana-de-açúcar não é favorável. Os maiores estados produtores de aguardente são: São Paulo (45%), Pernambuco (12%), Ceará (11%), Rio de Janeiro (8%), Minas Gerais (8%), Goiás (8%), Paraná (4%), Paraíba (2%) e Bahia (2%), sendo os três primeiros responsáveis por quase toda produção de aguardente industrial.^[7-11]

A produção de aguardente artesanal ou de alambique está concentrada nos estados de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Bahia (BA) e São Paulo (SP), sendo que os estados de MG e RJ contribuem com quase 50% de toda a produção nacional de aguardente de alambique.^[7]

Apesar de a aguardente brasileira ser conhecida internacionalmente, a sua comercialização encontra-se praticamente restrita ao mercado doméstico. Menos de 2% da produção chega ao mercado internacional (\approx 2,5 milhões de litros).^[7-11] Atualmente, a aguardente é exportada para mais de 60 países. Em 2010 a base exportadora foi composta por 98 empresas, que exportaram cerca de 10,44 milhões de litros o que gerou uma receita de US\$ 16 milhões.^[8] Os principais países importadores de aguardente brasileira em 2010, em

^[b] Soju é um destilado alcoólico de origem Coreana, a base de arroz e batata doce.

volume, foram a Alemanha, com 27% do total, Paraguai (12%), Bolívia (9%), Portugal (7%), França (6%), Estados Unidos (5%) e Espanha (5%).^[8,9]

1.2.2 Aguardente: sistema de produção

A produção da aguardente de cana-de-açúcar pode ser dividida nas seguintes etapas: colheita da cana, obtenção e preparo do mosto, fermentação, destilação do vinho e envelhecimento (etapa não obrigatória).^[10-13] A Figura 1 apresenta o fluxograma geral da produção de aguardente.^[14]

Inicialmente a cana-de-açúcar é colhida e posteriormente é levada para a moenda para a extração do caldo. Este é filtrado e posteriormente levado para a dorna de decantação com o objetivo de separar impurezas, como o bagacilho, terra e impurezas insolúveis. A moagem da cana deve ocorrer no menor intervalo de tempo após a colheita da mesma, a fim de evitar deteriorações que ocasionam perdas de rendimento e da qualidade do produto final.^[10-13]

O caldo de cana estará apto a ser fermentado após os seguintes procedimentos: diluição para atingir o teor de sólidos solúveis entre 14 e 16 graus Brix,^[c] opcionalmente a correção do pH ($\approx 4,5$), adição de nutrientes (normalmente sais de potássio, fósforo e nitrogênio) e ocasionalmente a adição de anti-sépticos (para evitar a proliferação de bactérias). Assim, origina-se o mosto fermentado de cana-de-açúcar.^[10-13,15]

^[c] No caldo de cana-de-açúcar, 1 °Brix equivale a aproximadamente 1g de sacarose por 100 mL de caldo de cana.

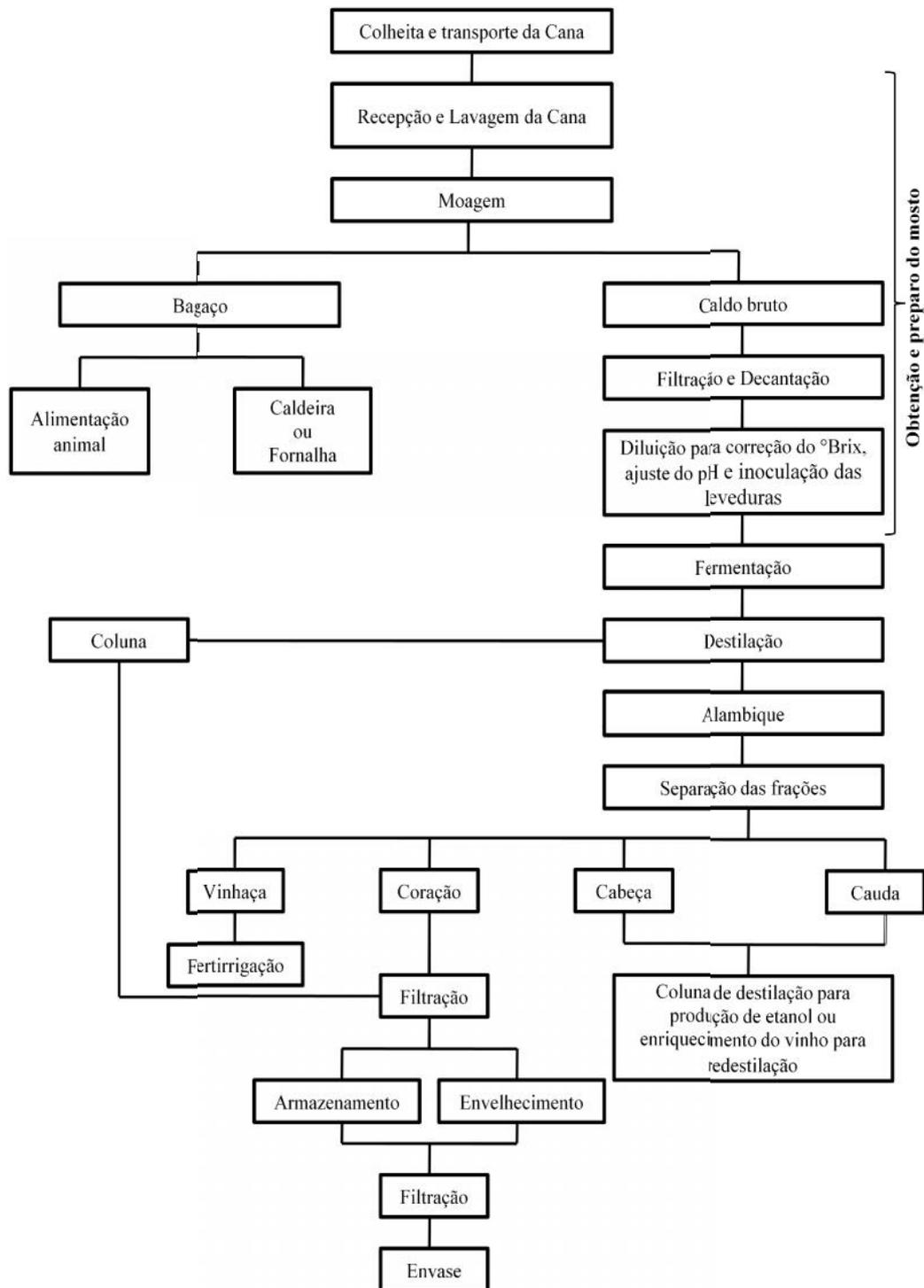


Figura 1. Fluxograma geral da produção da aguardente de cana-de-açúcar.^[14]

A fermentação alcoólica, que deve ser realizada em dornas apropriadas, é uma das principais etapas do processo de produção da aguardente. Neste momento, a levedura metaboliza a glicose produzindo majoritariamente etanol e gás carbônico. A fermentação deve ser conduzida em condições adequadas de concentração de açúcares e temperatura (entre 26 e

32°C). Além disto, deve se controlar o pH bem como a higiene, que são essenciais para assegurar os melhores rendimentos fermentativos e evitar a proliferação de bactérias contaminantes (formação de ácido acético, ácido butírico, alcoóis e dextranas).^[10-24] Independente do fermento utilizado ser natural (selvagem), prensado, misto ou seco (granulado), o processo fermentativo, com ou sem a adição de nutrientes, ocorre entre 8 e 32 horas,^[10-24] de forma que as fermentações em unidades industriais apresentam ciclos mais curtos.

O produto resultante da fermentação alcoólica do mosto recebe o nome de vinho. Este é composto principalmente por água (89 a 94% v/v), etanol (5 a 8% v/v) e por uma fração minoritária (menos de 1% v/v) formada por um grande número de substâncias (ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas e alcoóis).^[16,20-22] O vinho é normalmente retirado por gravidade das dornas de fermentação e levado diretamente para a destilação em alambique (cobre, aço inox ou misto) ou em colunas de aço inox (alto ou baixo grau).^[10,11,17,18,20-22]

A destilação do vinho pode ser conduzida de forma descontínua ou contínua, que são realizadas em alambique ou em coluna, respectivamente. Dependendo do aparelho em que a destilação é realizada, a qualidade dos produtos obtidos não só dependera das variáveis relativas ao projeto dos sistemas de destilação, mas também das condições em que estes equipamentos são operados, tais como: intensidade de calor aplicado, teor alcoólico do vinho, cortes (correta separação entre cabeça, coração e cauda), pressão de trabalho, vazões de vinho e vapor. Desta forma, obtêm-se a aguardente que pode ser engarrafada ou ir para tonéis de madeira para ser envelhecida. Em tempo, quando a destilação ocorre em alambiques, apenas a fração coração é comercializada.^[7-12,17,18,20-22]

1.2.3 Legislação da aguardente: composição química e requisitos de qualidade

Os padrões de identidade e qualidade da aguardente brasileira são determinados e controlados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)^[6] que estabelece limites para os seus contaminantes e para o “coeficiente de congêneres”. Este coeficiente é definido como a soma total da acidez volátil (expressa em ácido acético), aldeídos (em acetaldeído), ésteres totais (em acetato de etila), alcoóis superiores (pela soma do álcool n-propílico, álcool iso-butílico e álcool isoamílico), somando-se a isto os teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural. A somatória das concentrações de todos estes compostos (conteúdo total) deve estar entre 200 e 650 mg/100 mL de álcool anidro.^[6]

Alguns compostos secundários, como o metanol, carbamato de etila, acroleína, 2-butanol e o 1-butanol, são classificados como contaminantes orgânicos, enquanto que o cobre, o chumbo e o arsênio são classificados como contaminantes inorgânicos. Em ambos os grupos de contaminantes, os seus teores são controlados pela legislação.^[6] Os seus limites estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores máximos dos contaminantes orgânicos e inorgânicos estabelecidos pelo MAPA para a aguardente de cana-de-açúcar.^[6]

Contaminante	Teor máximo	Unidade
Metanol	20,0	mg/100 mL A.A.*
Carbamato de etila	150	150 µg/L**
Acroleína	5,0	mg/100 mL A.A.*
2-butanol	100	mg/100 mL A.A.*
1-butanol	100	mg/100 mL A.A.*
Cobre	5,0	mg/L***
Chumbo	200	µg/L**
Arsênio	100	µg/L**

* miligramas por cem mililitros de álcool anidro; ** microgramas por litro; *** miligramas por litro.

O MAPA^[6] estabeleceu o prazo de 3 anos, contados a partir de 2005, para a adequação dos teores destes contaminantes. A exceção foi o carbamato de etila, cujo prazo estabelecido foi de 5 anos. Assim, o limite de 150 µg/L deveria ser implantado em junho de 2010. No entanto, recentemente este prazo foi prorrogado em 2 anos, devendo passar a vigorar a partir de junho 2012.^[25]

1.3 Carbamato de Etila (CE)

1.3.1 Propriedades físico-químicas e isômeros (conformacionais) do carbamato do etila

Carbamato de etila ($\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, CE), também conhecido como uretana, é o éster do ácido carbâmico (NH_2COOH).^[26-28] Possui peso molecular de 89,09 g/mol, temperatura de ebulição entre 182 - 184°C, e temperatura de fusão de 49°C.^[25-29] Apresenta-se na forma de cristais incolores e inodoros, sendo solúvel em água (100 mg/mL), produzindo

uma solução transparente e incolor. É também solúvel em clorofórmio (1,1 g/mL), etanol (1,2 g/mL), óleo de oliva (31 mg/mL), glicerol (400 mg/mL) e éter (666 mg/mL).^[30]

Cálculos quânticos^[31] para o CE demonstraram a existência de dois isômeros conformacionais na fase gasosa (Figura 2). Foi estimado que o confôrmero I é ligeiramente mais estável que o II em cerca de + 0,33 kJ/mol.

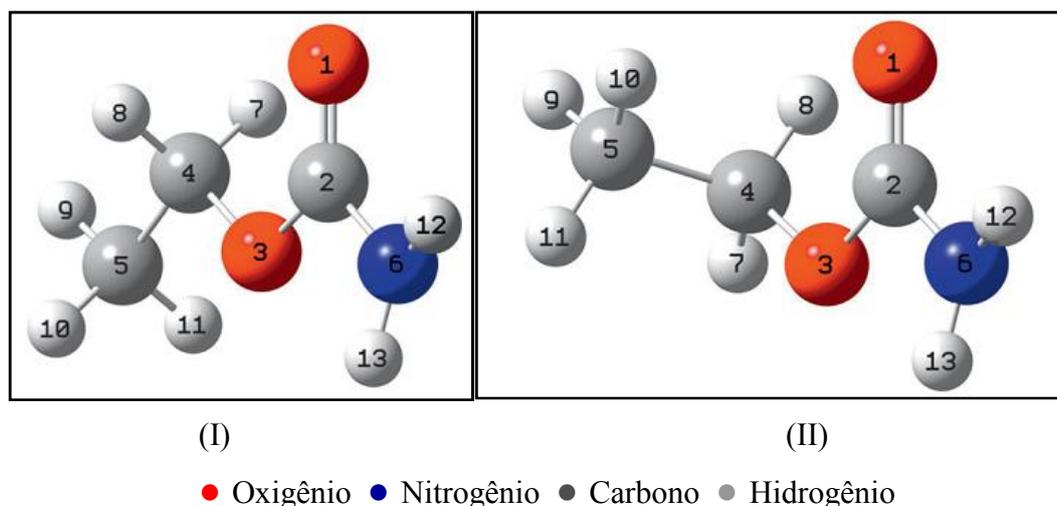


Figura 2. Estruturas dos isômeros conformacionais I e II para o carbamato de etila.^[31]

1.3.2 Aspectos toxicológicos e classificação do carbamato de etila

O carbamato de etila foi utilizado no início da década de 1940,^[26-28] como hipnótico em seres humano e como anestésico em animais. Descobriu-se posteriormente (1943) que o mesmo era carcinogênico^[d] em animais. Três anos depois, foi descrita a sua atividade contra leucemia em humanos.^[26] Desde 1948,^[26-29] em *Drosophila melanogaster*,^[e] sabe-se que este composto possui caráter mutagênico.^[f]

^[d] Carcinogênico ou carcinógeno é qualquer substância, isótopo, radiação ou outro agente físico ou biológico que provoque, agrave ou sensibilize o organismo para o surgimento de um câncer.

^[e] *Drosophila melanogaster*: inseto díptero que apresenta um par de cromossomos “gigantes” que facilita a observação em microscópio. Mutagênico é qualquer substância que induza a mutações genéticas.

^[f] Mutagênico é qualquer substância que induza a mutações genéticas.

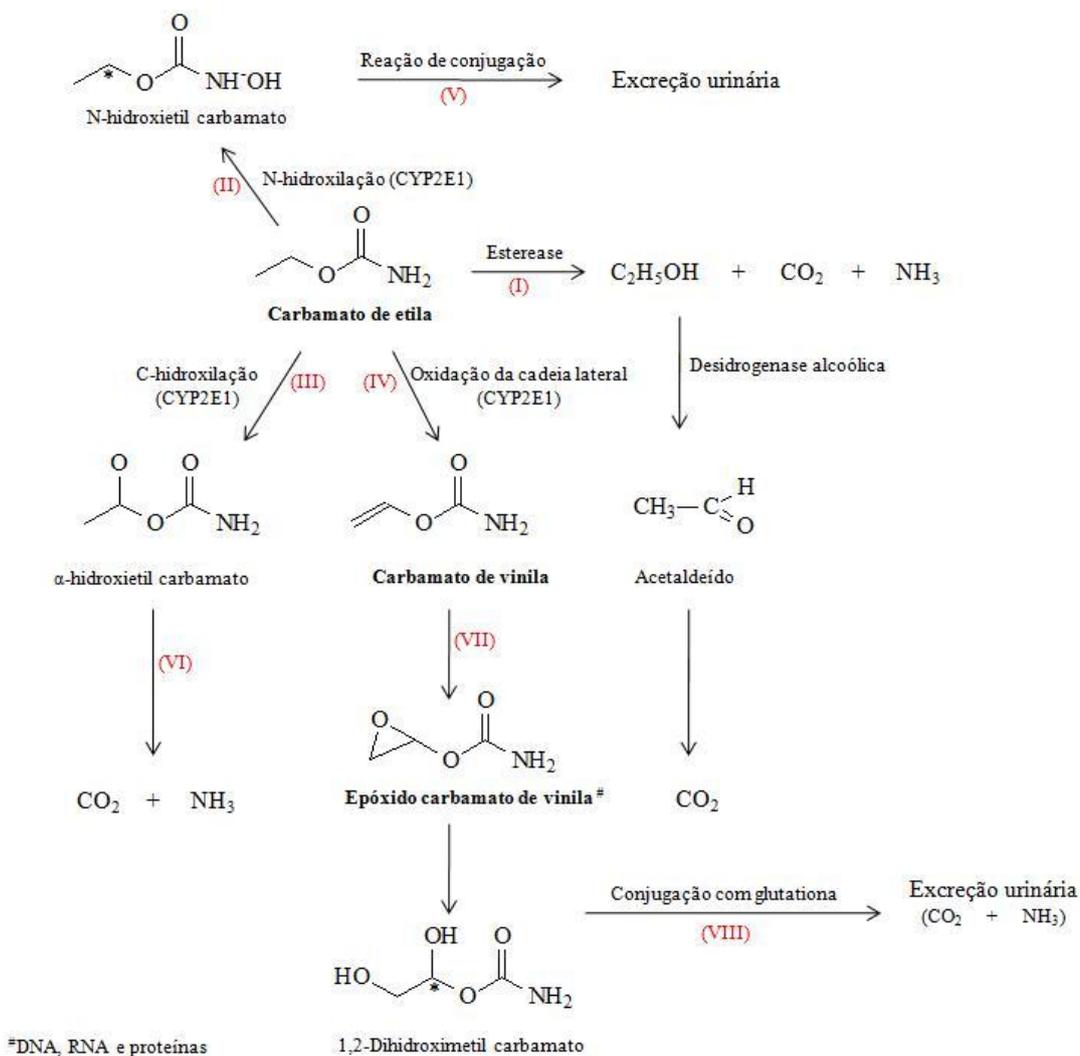
O carbamato de etila também foi utilizado comercialmente na preparação e modificação de resinas contendo o grupo amino, como co-solvente em sínteses (fármacos, pesticidas e cosméticos), intermediário químico em síntese orgânica e também na indústria têxtil.^[25-28] Atualmente, a uretana e outros carbamatos (fenil, metil e butil) são utilizados apenas para fins de pesquisa.^[26-29]

Em testes de toxicidade em animais (camundongos, ratos, *hamster* e macacos), foi comprovado ser causador de edemas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos, hepatomas, carcinomas mamários, tumores de ovário, hemangiomas^[g] hepáticos, tumores melanóticos de pele e de íris, entre tantos outros.^[26-29,32-36] Estudos em camundongos, demonstraram que a combinação de diferentes concentrações do carbamato de etila (0, 10, 30 e 90 mg/L) com o etanol (0, 2,5 e 5%) levam a formação de tumores nos pulmões.^[29,35]

Em camundongos, demonstrou-se que o CE pode ser absorvido rapidamente e quase completamente no trato gastro-intestinal e também pela pele. Foi observado que a uretana distribui-se uniformemente pelo corpo, sendo mais de 90% eliminado rapidamente (dentro de 6 horas) na forma de dióxido de carbono.^[26-29,32,33,37-40]

O metabolismo^[27] do CE em camundongos envolve três vias principais (Esquema 1): a hidrólise, a N-hidroxilação ou C-hidroxilação e a oxidação da cadeia lateral. A hidrólise (Esquema 1, reação I) é catalisada pela enzima esterase, produzindo etanol, dióxido de carbono e amônia. Já a N-hidroxilação (Esquema 1, reação II), C-hidroxilação (Esquema 1, reação III) e a oxidação da cadeia lateral (Esquema 1, reação IV) são catalisadas pelo citocromo P-450 2E1 (CYP2E1), levando a formação de N-hidroxietil carbamato, α -hidroxietil carbamato e carbamato de vinila, respectivamente.^[26]

^[g] Hemangiomas são alterações vasculares na pele.



Esquema 1. Metabolismo do carbamato de etila em camundongos.^[27]

O N-hidroxi-etil carbamato sofre reação de conjugação e é excretado juntamente com a urina (Esquema 1, reação V). O α -hidroxi-etil carbamato é metabolizado a dióxido de carbono e amônia (Esquema 1, reação VI), enquanto que o carbamato de vinila é oxidado a epóxido carbamato de vinila (Esquema 1, reação VII). O epóxido carbamato de vinila é metabolizado por de uma reação de conjugação com glutathiona,^[h] a dióxido de carbono e amônia, sendo eliminado na urina (Esquema 1, reação VIII).^[27]

^[h] Glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel.

O epóxido carbamato de vinila é reconhecido como o principal metabólito responsável pela carcinogenicidade^[i] do carbamato de etila, uma vez que este pode ligar-se covalentemente a ácidos nucleicos (*DNA* e *RNA*) e a proteínas (Esquema 1).^[26-29,32,33,37-40]

Baseados em dados epidemiológicos, o CE foi classificado inicialmente como um possível carcinógeno^[d] humano (Grupo 2B) pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, e como um provável carcinógeno humano pela *United States Environmental Agency Protection (US EPA)*.^[26-29,34]

A *IARC* reclassificou o CE em 2007 como pertencente ao Grupo 2A (provável cancerígeno para seres humanos). Outros compostos cancerígenos do Grupo 2A incluem a acrilamida, o arsênio, o chumbo, o mercúrio e o gás mostarda ($C_4H_8Cl_2S$).^[26-29,34]

Nenhum problema a saúde humana foi atribuído a exposição direta ao carbamato de etila. A dose limite (*Benchmark Dose Lower Limit - BMDL 10*) estabelecida durante o encontro da *FAO/WHO Food Standards Programme (Food and Agriculture Organization World Health Organization)* para a uretana é de 0,3 mg/kg de massa corporal por dia. Já o consumo médio do CE, quando presente em alimentos, deve ser aproximadamente de 15 ng/kg de massa corporal por dia. Estes valores foram baseados em alimentos fermentados, incluindo pães, produtos lácteos e molho de soja. Para bebidas alcoólicas o consumo médio estimado é de no máximo 80 ng/kg de massa corporal por dia.^[27-28]

1.3.3 Legislações e limites para o carbamato de etila em bebidas

O Canadá foi o primeiro país a introduzir (1986) limites máximos para a presença do carbamato de etila em bebidas alcoólicas, como medida de proteção a saúde humana. Outros países como os Estados Unidos, República Tcheca, França, Alemanha e a Suíça, também resolveram controlar a presença de CE. Assim cada país passou a estabelecer seus próprios

^[i] Carcinogenicidade refere-se à possibilidade de uma substância ser capaz de induzir a um carcinoma.

regulamentos, estabelecendo limites para este contaminante, quando da produção e importação de bebidas alcoólicas.^[27-28]

No Brasil, a presença do carbamato de etila em aguardente de cana é mencionada na Legislação desde 2005.^[6] No entanto, como já citado anteriormente (seção 1.2.3), o limite 150 µg/L estabelecido para a aguardente passará a vigorar a partir de junho 2012.^[25] A Tabela 2 apresenta os limites para a uretana estabelecidos por alguns países para cada tipo de destilado. Pode ser observado que o teor máximo de uretana depende do tipo de bebida.

Tabela 2. Teores do carbamato de etila (µg/L) estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida.^[6,27,28]

País	Vinho	Vinho fortificado*	Uísque	Saque	Brandy	Aguardente
Canadá	30	100	150	200	400	-
EUA	15	60	-	-	-	-
República Tcheca	30	100	150	200	400	-
França	-	-	150	-	1000	-
Alemanha	-	-	-	-	800	-
Suíça	-	-	-	-	1000	-
Brasil	-	-	-	-	-	150

* Vinho que teve seu teor alcoólico aumentado por meio da adição de etanol.

A literatura relata os teores de uretana em uísque, vinhos, rum, destilados de origem coreana, saque, grapa, gim, tequila, mescal, cerveja, aguardente, entre outras bebidas. A Tabela 3 apresenta a variação dos teores de uretana quantificados para algumas destas bebidas, onde os teores variaram de não detectado a 7300 µg/L.^[41-55] Observa-se que os teores de uretana são bem diferentes, dependendo do tipo de bebida analisada. Para um mesmo tipo de bebida, também é verificado uma diferença significativa nos teores de CE.

55] **Tabela 3.** Variação dos teores de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em bebidas alcoólicas.^{[41-}

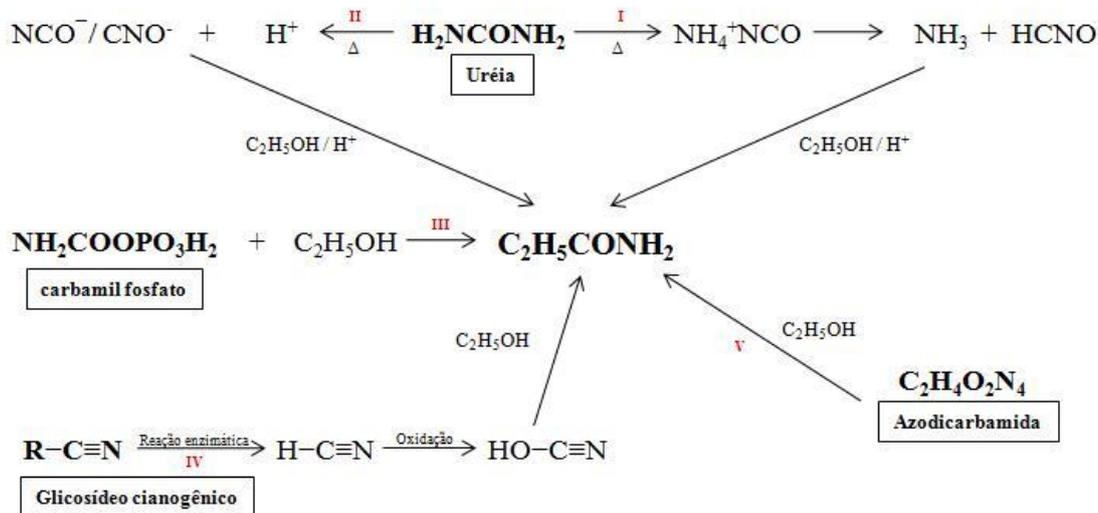
Bebida	Variação dos teores de CE ($\mu\text{g/L}$)
Aguardentes em 2005 ^[54]	32 – 936
Aguardentes em 2006 ^[54]	12 – 546
Aguardentes em 2008 ^[54]	45 – 752
Aguardentes em 2010 ^[54]	30 – 308
Cerveja ^[52]	10 – 150
Destilados Coreanos ^[48]	*N.D. – 15,4
Destilados de frutas com caroço (<i>stone-fruit brandie</i>) ^[51]	0 – 7300
Gin ^[52]	*N.D. – 100
Grapa ^[42]	*N. D. – 68
Uísque ^[42]	64 – 400
Sidras ^[43]	< 1,6 – 67
** <i>Pálinka</i> ^[47]	30 – 2006
Rum ^[53]	< 5 – 25
Saque ^[52]	81 – 164
Tequila e mescal ^[53]	< 10 – 300
Tiquira ^[41]	44 – 6130
Vinho (branco e tinto) ^[44]	*N.D. – 125
Vinho (branco, tinto, Porto e Madeira) ^[50]	3,2 – 132
Vinho (branco, tinto e fortificado) ^[45]	*N.D. – 56
Vinhos espanhóis ^[49]	*N.D. – 24,7
Vinho de arroz chinês ^[46]	< 73 – 242

* N.D. = não detectado; ** Destilado de fruta, de origem húngara ou austríaca.

1.3.4 Ocorrências naturais e reações envolvidas na formação de carbamato de etila

Uma das rotas propostas para a formação do carbamato de etila envolve a uréia (H_2NCONH_2) em meio ácido, na presença de etanol (Esquema 2, reação I). A uréia decompõe-se termicamente em amônia (NH_3) e ácido isociânico (HCNO), e este reage com o etanol levando a formação de CE.^[26-28,56,60-62] A decomposição da uréia em isocianato e

cianato em solução de etanol/água, a temperaturas entre 60 e 100°C, também pode produzir a uretana (Esquema 2, reação II).^[26-28,56-59]



Esquema 2. Propostas para a formação do carbamato de etila a partir da uréia, do carbamil fosfato, de glicosídeos cianogênicos e da azodicarbamida.^[26-28,56-65]

Diferentes precursores do CE (citrulina e carbamil fosfato) são gerados naturalmente durante a fermentação, principalmente durante a fermentação malolática.^[j] A etanólise destes compostos, como por exemplo, a do carbamil fosfato ($\text{NH}_2\text{COOPO}_3\text{H}_2$), conduz a formação de uretana em vinhos (Esquema 2, reação III).^[26-28,56-59,63,64,66]

Outra fonte natural de formação de uretana ocorre via o íon cianeto (CN^-).^[26-28,60,67,68] Existem mais de 2000 espécies vegetais que produzem glicosídeos cianogênicos (Figura 3), presentes na cevada, arroz, maçã, manga, malte, mandioca e cana-de-açúcar. Estes glicosídeos são degradados enzimaticamente, gerando açúcar e cianoidrina [$\text{R}_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$], que se decompõe rapidamente a íons CN^- . Os íons cianeto podem ser oxidados a íons cianato (OCN^-) e estes reagem com o etanol para formar o CE (Esquema 2, reação IV).^[26-28,60,67-69]

^[j] Fermentação malolática é a transformação do ácido málico em ácido lático pelas leveduras e/ou bactérias, a partir das proteínas.

A formação de carbamato de etila foi estudada^[75] durante a fermentação de sucos de uva (*Chardonnay*) adicionados de arginina ($C_6H_{14}N_4O_2$), ácido glutâmico ($C_5H_9NO_4$), uréia e amônia (NH_3). Observou-se que a adição de arginina durante a fermentação favoreceu o rápido crescimento intracelular da levedura, levando a conversão de arginina a ornitina ($C_5H_{12}N_2O_2$) e em uréia, e conseqüentemente a uretana. A adição de arginina associada ao ácido glutâmico, amônia e a uréia durante a fermentação, também aumentou a concentração final de uretana. A formação do CE foi descrita como sendo de ordem zero tanto para a uréia como para a citrulina,^[75] com energias de ativação (20% v/v etanol e pH 3,2) estimadas em 107 kJ/mol e 113 kJ/mol, respectivamente.

Experimentos realizados^[72] com soluções modelo de vinho, adicionadas de uréia demonstraram que a concentração final de carbamato de etila depende da concentração de uréia adicionada e que diferentes teores alcoólicos levam a concentrações finais diferentes. A concentração final de uretana foi proporcional ao teor alcoólico e a concentração de uréia adicionada ao vinho. A taxa de formação calculada para o CE a 80°C nas soluções de vinho (20% v/v de etanol) fortificados com uréia foi 3,1 nmol/L/h.

O teor de carbamato de etila e de possíveis precursores (uréia e citrulina) de CE foi monitorado^[73] em vinhos (tinto, branco e fortificados), considerando-se tempo de estocagem e a temperatura. A energia de ativação calculada para a formação do CE a partir da uréia e da citrulina foram, respectivamente, 127 kJ/mol e 108 kJ/mol. A reação foi considerada de primeira ordem em relação à uréia e a citrulina, com constantes de velocidade de formação a 25°C de $4,3 \times 10^{-3}$ /s e $6,4 \times 10^{-4}$ /s, respectivamente.

Foram estudados^[76] os teores de carbamato de etila em vinhos (adicionadas e não adicionadas com enzima urease), que posteriormente foram armazenados a 40°C, durante seis meses. Verificou-se que os teores de CE foram menores para os vinhos tratados com a enzima. A energia de ativação calculada para a formação do CE a partir da uréia foi 26 kcal/mol.

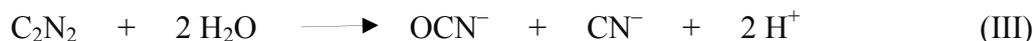
O efeito da temperatura de armazenamento (22 a 43°C), do tempo (3 a 12 meses) e das condições de iluminação (ausência de luz, luz fluorescente e luz verde) foram avaliadas^[77] em vinhos (branco e tinto). Foi verificado que a concentração de CE aumenta linearmente em função do tempo e da temperatura, a diferentes taxas. A iluminação não exerceu influência significativa na velocidade e na concentração final de uretana.

A utilização de fungicidas como conservantes em vinhos, como o dimetil dicarbonato (C₄H₆O₅) e o dietil dicarbonato (C₆H₁₀O₅) foi comum na indústria de vinhos até 1972, após o que foi demonstrado^[72] que a adição de dietil dicarbonato leva a formação de CE em vinhos.

1.3.6 Formação de carbamato de etila em meio hidroalcoólico

O íon cianato (OCN⁻) e o seu isômero isocianato (NCO⁻) são descritos como os principais precursores que levam a formação do carbamato de etila em bebidas destiladas.^[59-61,71,78-80] A formação dos íons CNO⁻ e NCO⁻, oriundos do íon cianeto (CN⁻), ainda não está devidamente esclarecida, uma vez que a oxidação do íon CN⁻ a CNO⁻ necessita de oxidantes, como H₂O₂ ou de íons hipoclorito.^[17,18,28,59,61]

É proposto^[59] que a reação envolvendo o íon cianeto pode ocorrer principalmente na presença dos íons de cobre (Cu II) e/ou de ferro (Fe II), que atuam como catalisadores (Esquema 3). Em solução, os íons de cobre (II) complexam-se com os íons cianeto (Esquema 3, reação I), podendo ocorrer a oxidação a cianogênio (Esquema 3, reação II), e uma reação de desproporcionamento de cianogênio a cianato e a cianeto (Esquema 3, reação III). O cianato, em meio ácido, pode reagir com o etanol formando o CE (Esquema 3, reação IV).^[17,18,28,59,61]



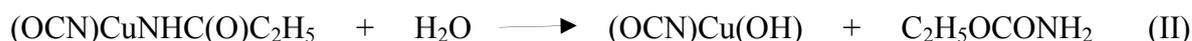
Esquema 3. Proposta para a formação de carbamato de etila envolvendo o íon cianeto e tendo o cobre (II) como catalisador.^[17,18,28,59,61]

Via alternativa considerada seria a formação de um ciano complexo de cobre (II) em solução aquosa (Esquema 4, reações I e II), por meio da coordenação do ânion cianato com o centro metálico com o átomo de nitrogênio (Esquema 4, reação I). 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 (Esquema 4, reação II).^[17,18,28,59]



Esquema 4. Proposta para a formação de carbamato de etila através do ataque da molécula de água ao ciano complexo de cobre em solução alcoólica.^[28,59]

Outra possibilidade envolveria o ataque do ciano complexo de cobre ao etanol formando uma unidade carbâmica (Esquema 5, reação I), que posteriormente sofreria o ataque de uma molécula de água para formar o CE (Esquema 5, reação II).^[28,59]



Esquema 5. Proposta para a formação de carbamato de etila através do ataque do ciano complexo de cobre ao etanol.^[28,59]

Estudos realizados^[61] em saque, licor e soluções modelo de etanol que foram adicionadas de sais de cianeto [KCN, Ni(CN)₂.2KCN, CuCN], cianato (KCNO) e tiocianato (KCNS), conduziram a formação do carbamato de etila. Foi observado que a concentração final de CE depende do teor alcoólico e da concentração do sal adicionado.

1.3.7 Precusores de carbamato de etila em bebidas destiladas

A formação do carbamato de etila em amostras de uísque, produzidas por meio da destilação em aparatos confeccionados de cobre e de vidro foi investigada.^[60] Segundo os autores, a concentração de CE foi cerca de doze vezes maior para o uísque destilado em coluna de cobre em comparação ao uísque destilado em coluna de vidro. Foi observado que o teor de uretana estabilizou cerca de 48 horas após o final da destilação. Além disto, o aquecimento (50°C) das amostras de uísque recém destiladas promoveu a diminuição deste período (< 4 horas). Outra observação foi que a adição de sal de EDTA a amostras recém destiladas que continham 10 µg/L de íons de cobre, inibiu a formação de uretana.

Estudos realizados^[81] em resíduos de corrosão, depositados sobre uma coluna retificadora de um alambique de cobre (Aparelho *Coffey* de destilação)^[n] permitiu identificar a presença de diversos íons (CN⁻, S⁻, CNO⁻, CNS⁻, Cu⁺, CuCN⁻, CuCNO⁺, Cu(CN)₂⁻, CUCNS⁻, Cu(CN)₂S⁻, Cu₂(CN)₃⁻, Cu₃(CN)₄⁻) que podem ser considerados como possíveis catalisadores/precusores de carbamato de etila em bebidas.

A influência do cobre e do ferro na oxidação do cianeto a cianato, bem como a conversão do cianato e da uréia em carbamato de etila foi estudado^[59] utilizando-se soluções de etanol (30% v/v). Verificou-se que ocorre a formação de CE em soluções alcoólicas fortificadas com KOCN (adicionada de sais de Cu II, Fe II e Fe III) e de uréia (com sais de Cu

^[n] O aparelho *Coffey* de destilação é um dispositivo de destilação constituído de duas colunas. A primeira é coluna é utilizada para a obtenção de etanol do mosto fermentado. Já a segunda, chamada de coluna retificadora, concentra o etanol em 94% v/v. Este posteriormente é diluído com água a 64% v/v, originando o uísque.

II). Além disto, foi demonstrado que a oxidação do cianeto a cianato ocorre independentemente da concentração de oxigênio dissolvido na solução alcoólica.

A influencia da luz no teor de carbamato de etila foi investigada em amostras de uísque recém destilado.^[78] Observou-se que as amostras que foram expostas a luz fluorescente, atingiram a concentração final de CE em um tempo menor do que as mantidas no escuro. O aumento no teor de uretana foi associado à redução dos íons de cianeto e cianato, presente nas amostras de uísque, íons estes cujas concentrações foram monitoradas simultaneamente com o CE. Segundo estes mesmos autores,^[78] os uísques que foram armazenados em tonéis de carvalho, a temperatura ambiente, apresentaram comportamento semelhante ao observado para os uísques expostos a luz.

A formação de carbamato de etila foi investigada em soluções modelo com etanol (12% v/v, pH 5) na presença de isocianato de potássio.^[79] Verificou-se a formação de CE em soluções adicionadas de isocianato, com constante de velocidade k_1 de $2,0 \times 10^{-5}$ a 40°C . A reação de formação do CE foi considerada de ordem zero para o isocianato, com energia de ativação de 76,2 kJ/mol e de ordem 1 para o etanol.

Foi observado um aumento nos teores de uretana em vinhos após terem sido destilados (grapa),^[80] os quais estabilizaram-se em 16 horas após a sua destilação. A constante de formação do CE foi favorecida pela presença de cobre e de luz, em comparação com amostras isentas de cobre a mantidas no escuro.

Foi demonstrado^[74] que n-carbamil compostos reagem com o etanol (pH 3,2) levando a formação de uretana. Para uma mesma concentração de uréia adicionada a soluções com diferentes teores alcoólicos (5, 12,5 e 20 % v/v de etanol) foi observado concentrações finais diferentes de uretana, concentrações estas que aumentaram com o aumento do teor alcoólico.

1.3.8 Formação de carbamato de etila durante a destilação

Por apresentar um elevado ponto de ebulição (182 - 184°C), acredita-se que apenas uma pequena parte do carbamato de etila em solução (fase líquida) é arrastada durante um processo de destilação, onde a temperatura não ultrapassa a 92°C. Acredita-se que a uretana pode ser transportada em uma nuvem de aerossol através do condensador durante a destilação.^[27,28,59,60]

Em função dos seu baixo ponto de ebulição (< 30°C) o ácido cianídrico (HCN) seria destilado e reagiria com o etanol na coluna produzindo o CE em fase gasosa ou por reações heterogêneas. Este processo ocorreria preferencialmente em aparelhos de destilação confeccionados em cobre (Reação 1).^[27,28,59,60]



Reação 1. HCN em fase gasosa, na presença de Cu originando ácido isociânico (HNCO) ácido cianico (HOCN).^[27,28,59,60]

O ácido isociânico (HNCO) (Esquema 6, reação I e II) e o ácido cianico (HOCN) (Esquema 6, 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 (Esquema 6, reações III e IV). Em ambos os casos ocorreria a formação de carbamato de etila no destilado.^[79]



Esquema 6. Proposta para a formação de carbamato de etila a partir do HNCO e do HOCN durante a destilação.^[79]

1.3.9 Propostas para a eliminação dos precursores do carbamato de etila em vinhos e destilados

Em função dos vários precursores (uréia, arginina, citrulina e n-carbamil fosfatos, cianeto, cianato e glicosídeos cianogênicos), dos diferentes e complexos mecanismos envolvidos na sua formação e de fatores (temperatura, pH e iluminação) que podem influenciar a sua formação, não existe uma metodologia adotada universalmente para prevenir e/ou reduzir os teores de uretana em alimentos e bebidas.^[26-28] A seguir são relacionados trabalhos que destacam algumas medidas preventivas com respeito ao CE.

Em alimentos fermentados uma solução para a redução nos teores de CE encontrada foi diminuir a concentração dos seus possíveis precursores (citrulina, arginina, entre outros), por meio da utilização de cepas de leveduras selecionadas que produziriam baixas concentrações de uréia durante a fermentação.^[28,82-83]

Outra estratégia é a utilização da enzima urease para limitar a concentração de uréia. Sabe-se entretanto que a maioria das ureases são inativas em meio ácido.^[28,83-85] Atualmente, para superar este problema, existe no mercado ureases de *Lactobacillus fermentum* resistentes ao meio ácido e que são utilizados na produção de vinhos e bebidas fermentadas.^[28,83-85] Observou-se que a adição de urease ácida em extrato bruto de saque japonês (20% v/v de etanol), que continha inicialmente cerca de 35 mg/L de uréia, reduziu em mais de 95% esta concentração.^[61] Infelizmente a utilização da enzima urease ácida tem se mostrado desfavorável, em função dos custos envolvidos na sua obtenção.^[85]

Em geral, para vinhos, boas práticas agrícolas, o monitoramento da adubação nitrogenada, a seleção das leveduras comerciais, o controle da temperatura durante o armazenamento e o transporte reduzem os teores de carbamato no produto final. Ações preventivas são importantes considerando-se que a uréia não é o único precursor de uretana.^[26-28]

Em bebidas destiladas, é descrito que uma das maneiras de se prevenir a formação de carbamato de etila seria a eliminação de íons cianeto presentes na matéria prima antes da etapa de destilação e também a eliminação e/ou diminuição dos teores de cobre presente nos sistemas de destilação.^[26-28]

A eliminação dos íons cianeto pode ocorrer utilizando a enzima rodanase (tiosulfato-cianeto sulfotransferase)^[51] Neste caso pode ser utilizada para a detoxificação^[0] de íons cianeto, originando compostos menos tóxicos como sulfito e o tiocianato.^[28,61,86] Dados da literatura apontam que a utilização da enzima rodonase em soluções modelo ($\approx 30\%$ v/v de etanol) fortificadas com o íon cianeto, apresentaram uma redução de 80% do teor de CE formado após o tratamento destas soluções com a enzima.^[61]

Como o cobre (II) é considerado^[17,18,28,59-61,78] um possível catalisador na formação do carbamato de etila, existem diversas propostas para a sua remoção em bebidas após a destilação. A utilização de procedimentos, como a percolação do destilado por resinas de troca iônica,^[87-88] carvão ativado,^[89] carvão vegetal,^[60,90] quitosana,^[91] pela bidestilação (dupla destilação)^[92,93] ou por meio do tratamento com CaCO_3 ou MgCO_3 ,^[88] tem sido descritos. Entretanto estes procedimentos podem extrair outros compostos além do cobre (alcoóis superiores, aldeídos, e ésteres) que são indispensáveis à qualidade sensorial da aguardente.^[17,18,87,93,94] Apesar disto, em estudos recentes não foi possível estabelecer uma clara relação entre os teores de cobre e os teores de carbamato de etila em guardentes.^[41,95]

1.3.10 Perfil dos teores de carbamato de etila em bebidas alcoólicas

Pouco existe sobre a gênese e o controle de carbamato de etila em aguardente de cana. A literatura em sua maioria limita-se a reportar os seus teores em diferentes amostras de aguardente.^[17,18,21,24,42,96-98]

^[0] Detoxificação é a eliminação de substâncias consideradas tóxicas ao organismo.

A Tabela 4 apresenta um resumo dos teores médios, os teores máximos e a porcentagem de amostras com teores carbamato de etila acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (150 µg/L).^[6] Tratam-se de aguardentes produzidas em diferentes estados brasileiros.^[17,18,21,24,41,42,96-98] Observa-se também que os teores médios bem como a porcentagem de amostras de aguardente com concentração de uretana acima de 150 µg/L, independem do estado de origem ou do tipo e configuração do sistema de destilação utilizado na sua produção.

Tabela 4. Teores médios de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em aguardentes (alambique e coluna) produzidas em diferentes estados Brasileiros.

Bebida	Estado	Tipo de destilação	Número amostras	Teores médios ($\mu\text{g/L}$)	Teor máximo	% [CE] > 150 $\mu\text{g/L}$
Aguardente ^[97]	SP	Alambique e coluna	13	330	1200	69
Aguardente ^[42]	MG, RJ, SP, ES, AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, PR, RS, SC, GO	Alambique e coluna	126	770 (alambique: 630; coluna: 930)	5700	79
Aguardente ^[98]	MG	Comerciais	22	1200	12380	77
Aguardente ^[17,18]	RJ	Alambique e coluna	34	170 (alambique: 110; coluna: 310)	710	44
Aguardente ^[95]	MG	Alambique	69	890	2610	93
Aguardente ^[41]	SP	Alambique e coluna	108	140	1390	27
Aguardente ^[96]	PB	Coluna	25	220	700	68
Aguardente ^[24]	SP, CE, MG, PE, PR, RJ	Alambique e coluna	42	270 (alambique: 150; coluna: 370)	1540	56
Aguardente ^[36]	PE	Alambique e coluna	33	180 (alambique: 60; coluna: 30)	530	55
Aguardente ^[21]	SP	Alambique	73	110	1290	15
Aguardente ^[21]	SP	Coluna	42	420	3370	83

A Tabela 5 apresenta uma comparação entre os teores de carbamato de etila em aguardentes oriundas de um mesmo produtor, mas de diferentes tipos de vinho de cana-de-açúcar (safras diferentes).^[54] Observa-se que o teor de carbamato de etila variou consideravelmente para amostras diferentes oriundas de um mesmo produtor.

Tabela 5. Variação da concentração de CE em amostras de aguardente no período de 2006 a 2010,^[54] considerando-se um mesmo produtor.

	Concentração de carbamato de etila (µg/L)		
	2006	2008	2010
Produtor A	23	68	170
Produtor B	80	136	190
Produtor C	80	< 5	81
Produtor D	150	< 5	< 5
Produtor E	39	45	77
Produtor F	85	94	109
Produtor G	371	181	1500
Produtor H	105	< 5	57
Produtor I	84	94	116

A variação na concentração de carbamato de etila em aguardentes, ao longo do período de 2001 a 2010 (Tabela 6), foi avaliada em 487 amostras de aguardentes comerciais produzidas por pequenos produtores (até 20.000 L/ano).^[54]

A Tabela 6 apresenta a concentração média, mediana, máxima e mínima dos teores de uretana para amostras de aguardente, observados no período de 2001 a 2010. A Figura 4 apresenta a curva de variação da concentração de CE para o mesmo período.^[54]

Tabela 6. Número de amostras, mediana, concentração mínima e máxima de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em aguardentes analisadas no período de 2001 a 2010.^[54]

	2001	2002	2004	2005	2006	2008	2010
Nº de amostras	126	108	36	43	56	50	67
Mediana da concentração	479	90	108	157	130	65	87
Concentração mínima	13	10	30	32	10	44	30
Concentração máxima	5690	2180	460	1162	1667	752	1500
% de amostras com [CE] >150 $\mu\text{g/L}$	79	31	33	47	24	20	23

Considerando-se os resultados apresentados na Tabela 6 e na Figura 4.^[54] Foi observado uma tendência na diminuição nos teores de carbamato de etila, em termos de sua mediana. Em 2001, 79% das amostras encontravam-se fora do limite permitido, sendo que este valor decaiu para 47% em 2005 e para 23% em 2010.^[54]

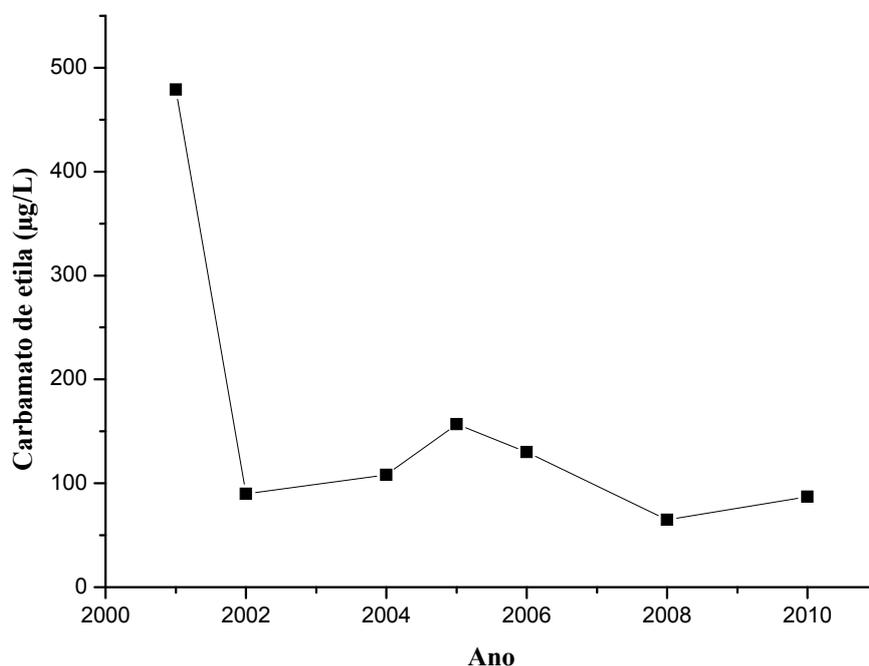


Figura 4. Variação da mediana de concentração de carbamato de etila ao longo da última década.^[54]

1.4 Técnicas Instrumentais para a Análise de Carbamato de Etila

Em termos instrumentais, a determinação de CE em bebidas e alimentos, é limitada em função dos baixos teores deste analito e também pelos possíveis interferentes presentes na matriz.^[94] Assim, a uretana pode ser determinada diretamente ou após pré-tratamento (*clean up* e/ou concentração) via extração com solvente, extração em fase sólida (*solid phase extraction – SPE*) ou por micro extração em fase sólida (*solid phase micro-extraction – SPME*).^[26-28,100]

Dentre as técnicas instrumentais mais utilizadas para a determinação de CE destaca-se a cromatografia gasosa (*gas chromatography - GC*), utilizando-se o detector por espectrometria de massa (*mass spectrometry - MS*). Existem ainda metodologias que

empregam o detector por condutividade térmica (*thermal conductivity detector - TCD*) ou o detector de ionização em chama (*flame ionization detector - FID*).^[26-28,41,42,64,99]

Adicionalmente, também podem ser empregadas a análise via cromatografia líquida utilizando-se detector de fluorescência (*high-performance liquid chromatography with fluorescence, HPLC - FLD*) por meio da derivatização com 9-xantidrol ou por cromatografia em camada delgada (*thin-layer chromatography - TLC*) após a derivatização com cinamaldeído.^[43,99,100,101]

O emprego da cromatografia gasosa, utilizando detector de espectrometria de massas (*GC – MS*) apresenta^[41,42] limite de quantificação adequado ao controle de qualidade (30 µg/L), é rápido e pode ser conduzido por injeção direta da amostra.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram verificar a possibilidade de eliminar ou reduzir os teores de carbamato de etila em aguardente de cana-de-açúcar e verificar a influência dos íons cianato na formação de CE. Para tanto, decidiu-se acompanhar a formação de CE ao longo de um processo produtivo, buscando-se identificar quais as etapas e os fatores mais importantes que levam a formação de uretana em aguardentes. Além dos experimentos com aguardente recém destiladas (coletadas *in loco*), soluções hidroalcoólicas (aguardente) fortificadas com cianato de potássio foram utilizadas para avaliar a influência deste íon na formação da uretana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram sempre de grau analítico ou cromatográfico *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Germany), *Mallinckrodt Baker* (Paris, KY), *Fluka* (United Kingdom) e *Carlo Erba* (Milano, Italy). O acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, pureza de 99%), ácido acético glacial (CH_3COOH), ácido clorídrico (HCl, 37%), ácido 2-aminobenzóico [$C_7H_7NO_2$, $\geq 98\%$], ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, $C_{10}H_{16}N_2O_8$, 99,99%), carbamato de etila ($C_3H_7NO_2$, $\geq 99\%$), carbamato de propila ($C_4H_9NO_2$, $\geq 98\%$), cianato de potássio (KOCN, $\geq 97\%$), cianeto de sódio (NaCN, 98%), cloreto de ferro (II) ($FeCl_2 \cdot 4 H_2O$, $\geq 99\%$), cobre (1000 mg/L), ferro (1000 mg/L), hidróxido de sódio (NaOH, $\geq 98\%$), sulfato de amônio [$(NH_4)_2SO_4$, $\geq 98\%$], sulfato de cobre (II) ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 98%) e uréia [$(NH_2)_2CO$] foram adquiridos da *Sigma-Aldrich Co.*

Os solventes acetona (CH_3COCH_3 , $\geq 99,9\%$) e etanol (C_2H_5COOH , $\geq 99,5\%$), todos de pureza cromatográfica, foram adquiridos respectivamente, da *J.T. Backer* e *Tedia - Phillipsburg, NJ*. A água utilizada foi previamente destilada e, a seguir deionizada por um sistema *Milli-Q* (*Millipore, Bedford, MA, USA*).

Para os estudos cinéticos de formação de carbamato de etila, optou-se por utilizar uma aguardente (“aguardente de referência”) como solvente ao invés de etanol PA. Isto por considerar que um *blend* de aguardentes seria mais representante para simular uma situação real.

3.2 Análise de Carbamato de Etila

As análises de carbamato de etila foram efetuadas seguindo metodologia descrita na literatura.^[41,42] Utilizou-se um cromatógrafo para fase gasosa (*GC/MS Shimadzu*, modelo 17-

A, com detector de massas *Shimadzu* QP-5050, usando impacto eletrônico de 70 eV como modo de ionização e operando no modo *SIM* (monitoramento de íon seletivo com razão m/z 62).

Os padrões de carbamato de etila e carbamato de propila (padrão interno) foram diluídos em solução de acetona e água deionizada (*Milli-Q*) na proporção de 1:1, para a preparação da solução estoque 4,30 mg/L.

As aguardentes foram quantificadas por meio de uma curva analítica (30 - 1000 µg/L) com coeficiente de correlação de 0,996, por meio da injeção de 1 µL de amostra. Os limites de detecção (L.D.) e quantificação (L.Q.) para o CE foram de 10 µg/L e 30 µg/L, respectivamente, calculados com base na razão sinal/ruído.^[100]

3.3 Análise dos íons Cobre e de Ferro

A análise de cobre e ferro na aguardente de referência, utilizada nos experimentos com solução modelo, foi realizada utilizando-se metodologia descrita na literatura.^[103] Utilizou-se um espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (*ICP-OES*, *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) Perkin Elmer, modelo Optima 3000 *dual view*, com nebulizador do tipo pneumático concêntrico.

Utilizaram-se as seguintes condições experimentais: detecção na configuração coaxial, potência de radiofrequência de 1300W, fluxo de argônio no nebulizador de 0,80 L/min., fluxo de argônio no plasma de 15 L/min., fluxo de argônio no resfriamento de 0,50 L/min., fluxo da amostra de 1,0 mL/min.. A aguardente de referência foi quantificada por meio de padrão externo de cobre (0,5 a 8,0 mg/L) e de ferro (0,5 a 5,0 mg/L).

3.4 Determinação de pH

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se um pHmetro, *Ion Analyser Radiometer Analytical* modelo PHM250 Meter Lab, equipado com um eletrodo de vidro, combinado com um eletrodo de referência Ag/AgCl, em KCl 3 mol/L. Para a calibração deste equipamento foram utilizados os seguintes padrões de pH (IsoSol[®] – Quimlab): pH 4,00 tipo biftalato, pH 7,00 tipo fosfato, pH 10,00 tipo carbonato todos rastreados junto ao *National Institute of Standards and Technology (NIST)*.

A fim de minimizar os desvios nas medidas de pH, em função do potencial de junção líquida, as soluções modelo de aguardente foram diluídas em dez vezes do seu teor alcoólico original utilizando-se água deionizada (*Milli-Q*) antes da medida. Os valores de pH foram corrigidos considerando-se a diluição efetuada. Não foi observado variação do pH após a realização dos experimentos cinéticos.

3.5 Amostras

3.5.1 Aguardentes comerciais

Foram analisadas as concentrações de carbamato de etila em 14 amostras de aguardentes originais,^[P] adquiridas no mercado com teores alcoólicos entre 48 e 59% v/v em etanol. No intuito de se avaliar a eficiência de uma segunda destilação na redução do teor de uretana, estas aguardentes (500 mL) foram novamente destiladas em laboratório, obtendo-se novas frações alcoólicas (coração), que também foram analisados quanto à concentração de CE.

Com o objetivo de verificar a influência do teor alcoólico (% v/v) nos teores de carbamato que acompanham o destilado, foram obtidos por diluições sucessivas de uma

^[P] Neste trabalho, aguardente original refere-se às aguardentes comerciais cujo teor de carbamato de etila encontrava-se estabilizado.

aguardente com água deionizada (*Miliq-Q Millipore*) amostras com diferentes teores alcoólicos.

A amostra diluída foi à aguardente O (seção 4.1), que possuía inicialmente 47% v/v em etanol. A sua diluição originou seis novas amostras de aguardente com 8,0; 24; 28; 33; 38 e 42% v/v em etanol. Estas novas aguardentes foram novamente destiladas e posteriormente analisadas quanto ao teor de carbamato de etila.

3.5.2 Aguardentes recém destiladas coletadas *in loco*

Foram utilizadas 15 amostras de aguardente ($\approx 4,0$ L) coletadas *in loco* em diferentes destilarias. Destas, 6 amostras foram destiladas em alambique de cobre e 9 em coluna de aço inox. As aguardentes foram produzidas no estado de São Paulo, sendo cedidas pelas seguintes destilarias: Bandeirantes (Porto Feliz), Bellucci (Cerquilha), Campanari (Monte alegre do Sul), Gramático (São Carlos), Java (Guariba), Lambedor (Monte Alegre do Sul), Montanhim (Cerquilha), Pansonato (Elias Fausto), Pignata (Sertãozinho) e Santa Clara (Jaboticabal).

Durante a coleta, um questionário (Anexo I) contendo as informações sobre a origem da cana-de-açúcar, o tipo de colheita, o sistema de destilação, a condução da fermentação (adição ou não de nutrientes), entre outras informações, foi respondido pelos produtores.

No momento das coletas, as aguardentes foram colocadas em garrafas de vidro, envoltas em papel alumínio e armazenadas em banho de gelo ($\approx 2,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Estas foram transportadas em recipiente térmico para o laboratório, mantidas a baixa temperatura em geladeira e prontamente utilizada.

Algumas aguardentes foram analisadas quanto ao teor de CE na presença e na ausência de luz difusa (luz solar), em função do tempo e da temperatura.

Foram feitas análises a temperatura ambiente^[q] ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) e a temperaturas de $15 \pm 0,2^\circ\text{C}$, $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ e $35 \pm 0,2^\circ\text{C}$. O controle da temperatura a 15°C , foi efetuado utilizando-se um banho termostatizado da marca Tecnal, modelo TE 184. Para as temperaturas a 25 e a 35°C , utilizou-se um banho seco (*Dry Bath*) da marca LGC Biotecnologia, modelo DB-100.

3.5.3 Aguardente utilizada no preparo das soluções modelo

Uma aguardente comercial não envelhecida (200L), fornecida e certificada por um grande produtor, foi utilizada para a realização dos experimentos com soluções modelo. Esta foi utilizada como **aguardente de referência** (solução modelo de aguardente) durante a realização dos experimentos.

Alguns parâmetros foram avaliados em função das concentrações iniciais desta matriz (Tabela 7). Esta aguardente foi adicionada de cianato de potássio e analisada quanto ao teor de carbamato de etila, variando-se os seguintes parâmetros:

- Adição de diferentes concentrações de KOCN;
- Variação do pH;
- Adição de íons de cobre, de ferro e de tampão EDTA;
- Influência da luz (irradiação em bancada fotoquímica);
- Variação da temperatura;
- Variação do teor alcoólico.

A Tabela 7 apresenta as concentrações médias de carbamato de etila, cobre, ferro, teor alcoólico e o pH desta aguardente de referência, utilizada como solução modelo.

^[q] A temperatura ambiente refere-se à temperatura do laboratório utilizando-se ar condicionado.

Tabela 7. Teores médios dos componentes analisados na aguardente de referência.

Componentes analisados	Concentração \pm desvio padrão (concentração em mol)
Carbamato de etila	$90 \pm 15 \mu\text{g/L}$ ($\approx 1,0 \times 10^{-6}$ mol/L de CE)
Cobre	$1730 \pm 270,0 \mu\text{g/L}$ ($2,7 \times 10^{-5}$ mol/L de Cu II)
Ferro	$44 \pm 8,0 \mu\text{g/L}$ ($8,0 \times 10^{-7}$ mol/L de Fe II)
Teor alcoólico	$48,0 \pm 2,0 \%$ v/v (8,23 mol/L de etanol)
pH	$4,4 \pm 0,1$

Todas as soluções modelo de aguardente preparadas foram tamponadas com ácido acético (0,0064 mol/L) e acetato de etila (0,0036 mol/L).

3.6 Procedimento Experimental

3.6.1 Sistema de redestilação das aguardentes comerciais

A nova destilação das aguardentes (originais e diluídas) foi efetuada utilizando-se uma manta aquecedora com controle de temperatura (Quimis, modelo Q321A26), um balão de fundo redondo de 2,0 L, termômetro (Icoter), pedras de ebulição e uma coluna tipo *Vigreux* (31 centímetros de comprimento, 1,5 cm de diâmetro interno). A média da taxa de destilação calculada foi $1,7 \pm 0,3$ mL/minuto.

3.6.1.2 Cálculo do número de pratos teóricos (n)

O número de pratos teóricos (n) da coluna de vidro tipo *Vigreux* foi calculado segundo o método de *McCabe-Thiele*.^[104] O método é aplicado utilizando-se as curvas de equilíbrio líquido-vapor de um diagrama de fases (Figura 5) para determinar o número de estágios teóricos requeridos para efetuar a separação de uma mistura binária. Considera-se que o

líquido que preenche um prato (ou bandeja) e o vapor que coexiste com esse líquido está em equilíbrio.^[104]

Sabendo-se disto, preparou-se uma solução etanol/água (50% v/v), que foi submetida à destilação, utilizando-se o sistema de destilação descrito na seção 3.6.1. Os primeiros volumes (≈ 12 mL) da fração destilada (fase vapor) foram coletados. O sistema de destilação foi desligado, coletando-se uma nova alíquota (≈ 12 mL) da solução etanol/água que não foi destilada (fase líquido).

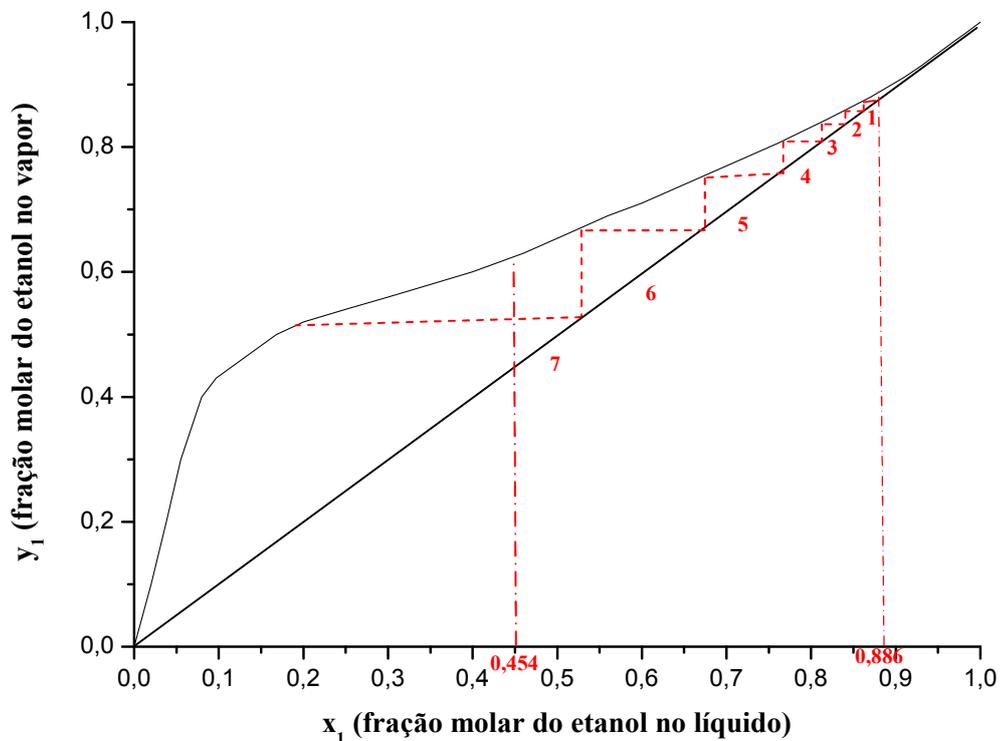


Figura 5. Diagrama de fases para mistura etanol/água e o número de estágios calculados da coluna tipo *Vigreux*, utilizada na destilação das aguardentes.

Posteriormente, o teor alcoólico destas duas frações foi determinado utilizando-se um picnômetro^[r] (5 mL), por meio da densidade relativa em relação a água, a 25°C. Este procedimento foi realizado em triplicata, com alíquotas de três destilações diferentes. A

^[r] Picnômetro: pequeno frasco de vidro construído de maneira que o volume do fluido nele contido seja invariável.

Tabela 8 apresenta os teores alcoólicos obtidos para as frações molares na fase líquida e na fase vapor.

Tabela 8. Teores alcoólicos (% v/v) na fração vapor e na fração líquido.

	% v/v na fração líquida	% v/v na fração vapor
Destilação 1	46,0	89,4
Destilação 2	44,6	87,5
Destilação 3	45,5	88,8
Média	45,4 (0,454)	88,6 (0,886)

Os teores alcoólicos médios do líquido na base (45,4% v/v, 0,454) e no topo da coluna (88,6% v/v, 0,886) foram anotados na curva de equilíbrio líquido-vapor do etanol (Figura 5). O número de pratos teóricos foi obtido traçando-se linhas horizontais e verticais entre as linhas de operação e de equilíbrio do diagrama de fases para o etanol (Figura 5).^[104] Cada “degrau” corresponde a 1 estágio de destilação, assim a coluna tipo *Vigreux* utilizada apresentou 7 pratos teóricos para a mistura etanol/água.

3.6.2 Bancada fotoquímica

As irradiações das aguardentes comerciais e das soluções modelo de aguardente foram realizadas em uma bancada fotoquímica da marca *Oriel*, modelo 68805 Universal, com lâmpada de xenônio de 200W, com filtros de interferências também fabricados pela *Oriel*. O cálculo da intensidade de radiação incidente pelo uso do actinômetro químico ($K_3[Fe(C_2O_4)_3]$, tris(oxalato) ferrato(III) de potássio, 0,15 mol/L), foi realizado segundo os parâmetros da literatura, calculado em $1,30 \times 10^{-7}$ Einstein/min.^[105]

3.6.2.1 Irradiação das aguardentes comerciais

Duas das amostras de aguardente comerciais (não envelhecida e envelhecida), utilizadas nos experimentos da seção 3.5.1, foram escolhidas aleatoriamente. Estas foram submetidas à irradiação em bancada fotoquímica em diferentes comprimentos de onda (250, 280, 310, 330, 410, 440 e 500 nm) utilizando-se filtros de interferência apropriados, durante 3 horas.

Após a irradiação separadamente de cada aguardente, as mesmas foram analisadas quanto ao teor de CE, na tentativa de se observar alguma variação na concentração final deste contaminante. O teor de uretana determinado foi comparado com a amostra idêntica (não irradiada) ao abrigo da luz.

3.7 Experimentos Cinéticos com as Aguardentes Coletadas *in loco*

Os valores de $t_{1/2}$, tempo de meia-vida do processo, foram calculados a partir de gráficos da concentração de carbamato de etila ($[CE]$) em função do tempo de reação. Considerou-se $t_{1/2}$ como o tempo correspondente a formação de metade da concentração máxima de uretana ($[CE]_{\infty}$).^[106,107]

As constantes k_{obs} (constante de velocidade observada em determinada temperatura) foram calculadas por meio de gráficos $\ln ([CE]_{\infty} - [CE]_t)$ versus tempo, os quais se demonstraram lineares por pelo menos $2\frac{1}{2}$ meia-vidas. Para o cálculo dos parâmetros cinéticos as temperaturas foram controladas em $0,2^{\circ}\text{C}$, utilizando-se uma graduação alcoólica constante.

Os parâmetros de ativação (ΔH^{\ddagger} , ΔS^{\ddagger} e ΔG^{\ddagger}) foram calculados resolvendo-se graficamente as seguintes Equações 1, 2 e 3.^[106,107]

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A \quad \text{Equação 1}$$

$$\ln k = \ln \frac{k_B}{k_h} + \ln T - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad \text{Equação 2}$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger + T\Delta S^\ddagger \quad \text{Equação 3}$$

onde, k_B a constante de Boltzmann ($1,38065 \times 10^{-23} \text{ J/K}$), k_h a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$), T é a temperatura (Kelvin), ΔH^\ddagger variação de entalpia, ΔS^\ddagger é a variação de entropia, ΔG^\ddagger é a energia livre de Gibbs e R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal/K mol}$).^[106,107]

3.8 Experimentos em Refluxo

O refluxo da aguardente de referência foi efetuado utilizando-se uma manta aquecedora com controle de temperatura (Quimis, modelo Q321A26), um balão de destilação de 3 saídas de 2L, pedras de ebulição e uma coluna 8 bolas (51 cm de comprimento e 3,6 cm de diâmetro interno), refrigerada a 3°C por um banho termostatizado da Tecnal (modelo TE 184). Um termômetro de vidro (*Icoterm*), um tubo de *taygon* e uma seringa de vidro, foram utilizados respectivamente, para monitorar a temperatura durante o refluxo ($\approx 84^\circ\text{C}$) e coletar alíquotas da aguardente sob refluxo, respectivamente.

Alíquotas da aguardente submetidas ao refluxo foram coletadas em intervalos de tempo preestabelecidos e analisadas quanto ao teor de carbamato de etila. A seguir são descritos os experimentos realizados.

- Refluxo da aguardente de referência durante 4590 minutos ($2,75 \times 10^5 \text{ s}$), sem a adição de uréia. Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e posteriormente analisadas quanto ao teor de CE.

- Refluxo da aguardente de referência adicionada de $1,02 \times 10^{-1}$ mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, durante 4175 minutos ($2,50 \times 10^5$ s). Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e posteriormente analisadas quanto ao teor de CE.
- Refluxo da aguardente de referência adicionada de uréia $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$ nas concentrações de $1,05 \times 10^{-3}$ mol/L, $5,17 \times 10^{-2}$ mol/L e $1,12 \times 10^{-1}$ mol/L. Estas foram analisadas quanto ao teor de uretana, durante 8800 minutos ($5,28 \times 10^5$ s), 8600 min. ($5,16 \times 10^5$ s) e 7316 min. ($3,65 \times 10^5$ s), respectivamente. Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos.
- Refluxo da aguardente de referência, tamponada (ácido acético 0,0064 mol/L / acetato de sódio 0,0036 mol/L). A uréia, nas concentrações de $1,02 \times 10^{-2}$ mol/L e $1,10 \times 10^{-1}$ mol/L, foi adicionada logo após a aguardente atingir a temperatura de refluxo. Alíquotas foram coletadas a cada 30 minutos após a adição da uréia, durante 150 minutos e analisadas quanto ao teor de CE. Foram efetuadas mediadas de pH em cada alíquota coletada.
- Refluxo da aguardente de referência, não tamponada, adicionada de uréia. A adição de uréia ocorreu logo após a aguardente entrar em refluxo, nas concentrações de $1,01 \times 10^{-2}$ mol/L e $1,12 \times 10^{-1}$ mol/L. Alíquotas foram coletadas a cada 30 minutos após a adição da uréia, durante 150 minutos e analisadas quanto ao teor de CE. Foram efetuadas mediadas de pH em cada alíquota coletada.

3.9 Experimentos com Solução Modelo de Aguardente Adicionada com Cianato de

Potássio

3.9.1 Preparo das soluções estoque de cianato de potássio

As soluções estoque de cianato de potássio, com concentração entre $2,6 \times 10^{-2}$ e $3,2 \times 10^{-2}$ mol/L, foram preparadas por meio da dissolução de cianato de potássio (KOCN) sólido em água deionizada (*Milli-Q Millipore*). Objetivando-se evitar a hidrólise^[108,109] do íon cianato (OCN^-), cada experimento teve uma solução estoque preparada separadamente, que foi prontamente utilizada.

3.9.2 Preparo, armazenamento e análise das soluções modelo de aguardente adicionada com cianato de potássio

Todas as soluções modelo de aguardente foram obtidas utilizando-se a aguardente de referência (seção 3.5.3), tamponada com ácido acético 0,0064 mol/L e acetato de sódio 0,0036 mol/L. Estas soluções foram adicionadas com solução estoque cianato de potássio (seção 3.9.1) e posteriormente armazenadas em frascos de vidro (*vials*) de 28 mL, lacrados com septos de borracha e alumínio, e mantidas ao abrigo da luz (envoltas em papel alumínio).

Durante os experimentos cinéticos o pH, o teor de cobre (II), de ferro (II), o teor alcoólico das soluções modelo de aguardente (seção 3.5.3, Tabela 7), além da temperatura (25°C), foram mantidos constantes, a exceção de quando um destes parâmetros foi avaliado separadamente.

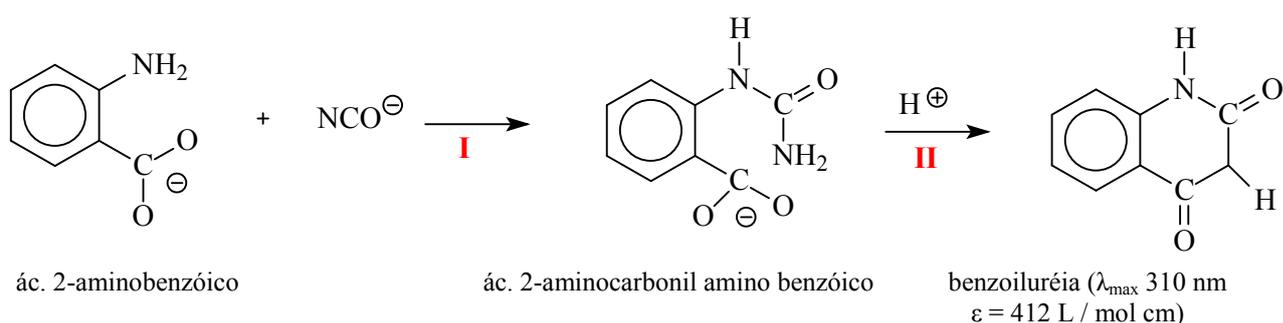
Durante os experimentos, alíquotas da solução modelo de aguardente foram coletadas com o auxílio de uma seringa de vidro e transferidas para tubos de *ependorf* (2 mL). Estas foram adicionadas de carbamato de propila (padrão interno) e posteriormente 1 μL desta solução foi injetada no cromatógrafo. A concentração inicial de CE de cada experimento

cinético (ponto 1) foi obtida aproximadamente 2 minutos após a adição do KOCN a solução modelo de aguardente.

3.9.3 Decaimento do íon cianato (OCN⁻) por UV-vis

Foram preparadas duas soluções modelo de aguardente (200 mL) com concentrações finais de íon cianato de $4,10 \times 10^{-4}$ mol/L, mantidas a 25°C (banho seco). A partir destas soluções, acompanhou-se o decaimento na concentração do íon OCN⁻ utilizando-se a metodologia de Guilloton e Karst.^[109] Esta metodologia é baseada na reação de ciclização do ácido 2-aminobenzóico. A solução de ácido 2-aminobenzóico foi preparada^[109] antes da realização de cada experimento, sendo armazenadas ao abrigo da luz (envoltas em papel alumínio).

Alíquotas das soluções modelo de aguardente (6 mL) foram misturadas com uma solução 0,01 mol/L de ácido 2-aminobenzóico (6 mL). A solução obtida foi acondicionada em frascos de vidro (envoltos por papel alumínio) e aquecidas a 37°C em banho seco por 10 minutos (Esquema 7, reação I).^[109]



Esquema 7. Reação de ciclização do ácido 2-aminobenzóico na presença de íons cianato em meio ácido.^[109]

Posteriormente, adicionou-se a solução anterior aproximadamente 4,1 mol/L de uma solução de ácido clorídrico (12 mL). A solução resultante foi aquecida a 65°C (banho seco) por 10 minutos (Esquema 7, reação II).^[109]

A benzoiluréia obtida foi resfriada a temperatura ambiente e analisada em um espectrofotômetro UV-visível Hitachi modelo U-3501, com uma cubeta cilíndrica de quartzo (*Hellma GmbH, Müllheim, Germany*) de 10 cm de caminho ótico, medindo-se a absorbância em 310 nm ($\epsilon = 412 \text{ L / mol cm}$).^[109]

3.9.4 Avaliação do íon cianato na formação do carbamato de etila

Foram preparadas quatro soluções modelo de aguardente (50 mL) com concentrações finais de íon cianato de $0,53 \times 10^{-5}$, $0,78 \times 10^{-5}$, $2,12 \times 10^{-5}$ e $4,48 \times 10^{-5}$ mol/L. Posteriormente avaliou-se a influência do íon OCN^- na formação e na evolução dos teores de carbamato de etila a 25° C.

Por meio dos resultados analíticos (linearidade, reprodutibilidade, repetibilidade)^[104] obtidos para os teores de CE nestes experimentos, optou-se por adicionar às futuras soluções modelo de aguardente aqui estudadas uma concentração de aproximadamente $(2,10 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN.

3.9.5 Avaliação da influência do pH na formação do carbamato de etila

Foram preparadas quatro novas soluções modelo de aguardente (50 mL) com os seguintes pHs: 3,0; 3,9; 5,3 e 6,0. A redução e o aumento do pH foi realizado com o auxílio de ácido clorídrico (0,01 mol/L) e de hidróxido de sódio (0,01 mol/L), respectivamente. Estas soluções foram fortificadas com aproximadamente $2,07 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN e posteriormente foram analisadas quanto ao teor de uretana a 25°C.

3.9.6 Avaliação da adição de íons de cobre e ferro, e tampão EDTA na formação do carbamato de etila

Foram preparadas três novas soluções modelo de aguardente (50 mL), onde se aumentou em aproximadamente dez vezes a concentração dos íons de cobre (II) e em vinte a concentração dos íons de ferro (II). Na terceira solução, adicionou-se sais de EDTA.

As concentrações finais das soluções modelo de aguardente para os íons de Cu II, Fe II e sais de EDTA foram, respectivamente: $3,0 \times 10^{-4}$ mol/L, $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Estas soluções foram fortificadas com aproximadamente $2,06 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN e posteriormente foram analisadas quanto ao teor de uretana a 25°C.

3.9.7 Avaliação da influência da luz na formação do carbamato de etila

Foram preparadas oito novas soluções modelo de aguardente (50 mL), com aproximadamente $2,08 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN. Uma destas soluções foi protegida da luz difusa (envolta em papel alumínio) e as demais foram expostas a radiação em bancada fotoquímica com filtros apropriados, nos seguintes comprimentos de onda: 250, 280, 310, 330, 410, 440 e 500 nm. Posteriormente, estas soluções foram analisadas quanto ao teor de uretana a 25°C.

3.9.8 Avaliação da variação da temperatura na formação do carbamato de etila

Foram preparadas três novas soluções modelo de aguardente (50 mL), com aproximadamente $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN. Estas soluções foram analisadas quanto ao teor de uretana a 15, 25 e 35°C.

3.9.9 Preparo soluções modelo de aguardentes utilizadas na avaliação da influência do teor alcoólico na formação do carbamato de etila

Por meio da diluição da solução aguardente de referência (seção 3.5.3), que apresentava teor alcoólico de 48% v/v (8,23 mol/L etanol), preparou-se duas novas soluções modelo de aguardente (50 mL). Os teores alcoólicos obtidos foram: 13,3% v/v (2,30 mol/L de etanol) e 24,4% v/v (4,18 mol/L). Estas soluções foram fortificadas com aproximadamente $2,02 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN e posteriormente analisadas quanto ao teor de uretana a 25°C.

Posteriormente, preparou-se 11 novas soluções modelo de aguardente (50 mL) com os seguintes teores alcoólicos: 1,70% v/v (0,29 mol/L de etanol), 2,00% v/v (0,34 mol/L), 4,54% v/v (0,78 mol/L), 5,26% v/v (0,90 mol/L), 10,6% v/v (1,81 mol/L), 22,4% v/v (3,83 mol/L), 35,0% v/v (6,00 mol/L), 57,5% v/v (9,85 mol/L), 70,0% v/v (12,0 mol/L), 83,1% v/v (14,2 mol/L) e 91,5% v/v (15,7 mol/L). Estas soluções foram fortificadas com aproximadamente $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN e posteriormente analisadas quanto ao teor de uretana a 25°C.

A redução e o aumento dos teores alcoólicos foram realizados utilizando-se água deionizada (*Milli-Q*) e etanol (99,5% v/v), respectivamente.

3.10 Preparo das Soluções Estoque de Cianeto (CN⁻)

Foram preparadas por meio da dissolução de cianeto de sódio sólido (NaCN) em água deionizada (*Milli-Q Millipore*) soluções estoque com aproximadamente $1,40 \times 10^{-2}$ mol/L de íons cianeto (CN⁻). Cada experimento teve uma solução estoque preparada separadamente que foi prontamente utilizada.

3.10.1 Avaliação do íon cianeto (CN⁻) na formação do carbamato de etila

Por meio da diluição da solução estoque de NaCN (seção 3.10) na aguardente de referência (seção 3.5.3) foram preparadas duas soluções modelo de aguardente (50 mL) com concentrações finais de íons cianeto de $(1,12 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ mol/L. Posteriormente avaliou-se a influência do íon CN⁻ na formação e na evolução dos teores de carbamato de etila a 25° C e a 37°C.

3.11 Cálculos de Estruturas e Energias Moleculares

Foram efetuados cálculos *ab-initio* DFT usando o método B3LYP com o conjunto de bases 6-31+G (d,p), por meio da utilização do programa Gaussian 09W (*Gaussian Inc*). Levou-se em consideração os constituintes do mecanismo em fase gasosa sob efeito do solvente (água) por meio do método do modelo contínuo polarizado (*PCM, Polarizable Continuum Model*).^[110-112] Para tanto, contamos com a colaboração do prof. Dr Sebastião C. da Silva e do mestrando Augusto C. S. da Silva do Departamento de Química, da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, – Mato Grosso.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Redestilação das Aguardentes Comerciais

Considerando-se o elevado ponto de ebulição do carbamato de etila (182 - 184°C), procurou-se verificar a porcentagem de uretana que é transferida para o destilado durante a realização de uma destilação simples. Para tanto, 15 amostras de aguardentes comerciais, foram submetidas a uma nova destilação. Os teores de CE foram determinados antes (aguardentes originais) e após a destilação.

A Figura 6 apresenta a sobreposição de dois cromatogramas típicos de uma aguardente analisada quanto ao teor de CE, antes (aguardente original) e após ter sido redestilada. A redução nos teores de uretana pode ser observada pela intensidade do pico do carbamato de etila (CE) nos cromatogramas. Observa-se a que intensidade do pico do CE na amostra de aguardente redestilada (—) esta praticamente na altura da linha de base do cromatograma (\approx 30 $\mu\text{g/L}$), quando comparado com o pico do CE da aguardente original (—).

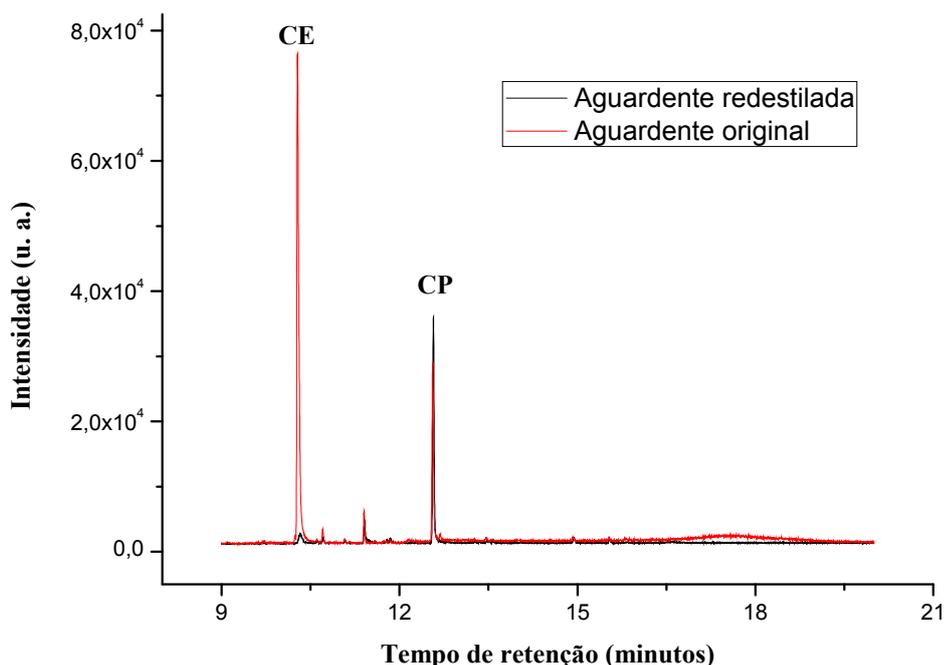


Figura 6. Sobreposição de dois cromatogramas típicos de uma aguardente, monitorando-se o pico de m/z 62, analisada quanto ao teor de CE antes (—, original) e após ter sido redestilada (—). Pico do carbamato de propila (CP), utilizado como padrão interno.

De acordo com a legislação,^[6] a concentração de CE em aguardentes deve ser expressa em microgramas por litro ($\mu\text{g/L}$), não importando o teor alcoólico (% v/v) da amostra. Entretanto para facilitar a comparação das concentrações de CE antes e após a destilação das aguardentes, optou-se por expressar os resultados (Tabela 9) aqui obtidos com a nova destilação das aguardentes em $\mu\text{g}/100 \text{ mL A.A.}$.

A Tabela 9 apresenta o teor alcoólico e as concentrações de uretana, expressas em $\mu\text{g}/100 \text{ mL A.A.}$, nas amostras de aguardente antes e após terem sido submetidas a uma nova destilação, bem como a porcentagem da concentração de CE reduzido.

Tabela 9. Teor alcoólico (% v/v), concentração de carbamato de etila ([CE]) nas amostras de aguardente antes (original) e após serem redestiladas (redestilada) em $\mu\text{g}/100\text{ mL A.A.}$,* e a porcentagem (%) de redução de CE após nova destilação.

Aguardente	Teor alcoólico (% v/v)	[CE] (original)** ($\mu\text{g}/100\text{mL A.A.}$)	[CE] (redestilada) ($\mu\text{g}/100\text{mL A.A.}$)	Redução de CE (%) após a redestilação
A	38	32,1	10,7	66,7
B	40	71,7	24,4	66,0
C	41	66,2	20,6	68,9
D	44	25,6	6,60	74,3
E	39	77,6	13,9	82,0
F	38	124	37,5	69,7
G	41	215	30,9	85,6
H	59	127	11,7	90,8
J	40	101	17,0	83,1
K	44	97,5	17,6	81,9
L	41	29,7	7,80	73,6
M	38	30,7	6,90	77,5
N	48	117	8,70	92,5
O***	47	120	4,70	82,3
O1	42	120	17,3	85,6
O2	38	120	22,9	80,9
O3	33	120	17,0	85,8
O4	28	120	18,4	84,7
O5	24	120	14,7	87,7
O6	8,0	120	23,6	80,3

* Concentração em $\mu\text{g}/100\text{ mL A.A.} = (10 \div \text{teor alcoólico em \%v/v}) \times \text{concentração de carbamato de etila em } \mu\text{g/L.}$; ** Carbamato de etila na aguardente comercial. *** Aguardente diluída, onde foi reduzido o grau alcoólico, obtendo-se as aguardentes O1, O2, O3, O4, O5 e O6, que foram redestiladas.

As amostras de aguardente ao serem redestiladas apresentaram uma redução de 66,0 a 92,5% do teor de CE (original). É interessante salientar que segundo a literatura,^[113,114] a redestilação não afeta significativamente as propriedades sensoriais da aguardente.

Também foi investigada a influência do teor alcoólico da aguardente na transferência de carbamato de etila para o novo destilado. Este experimento assemelha-se ao efetuado pela indústria quando utiliza cachaça industrial como “matéria-prima” para a produção de aguardente bidestilada.^[115]

A variação no grau alcoólico de uma aguardente (aguardente O, Tabela 9), não influenciou significativamente no teor final do CE da amostra submetida a uma nova destilação. Assim, quando o teor alcoólico foi variado de 8,0 a 42% v/v (amostras O1 a O6, Tabela 9) e estas novas frações foram redestiladas, a redução observada no teor de CE foi de 80,3 a 87,7%, com uma porcentagem média de 84%. Este resultado foi semelhante ao verificado para amostras de uísque (84%) duplamente destiladas,^[60] porém mais eficiente do que o observado para amostras de bebidas (cerveja, vinho e destilados) submetidas a filtração em carvão vegetal. Neste último caso informa-se ter ocorrido uma redução máxima da 47% da concentração inicial de uretana.^[90]

Estas observações, embora restritas a fração coração, dão suporte a proposta anterior^[92] envolvendo a dupla destilação de aguardentes, objetivando a redução dos teores de cobre e acidez total, agora aqui aplicadas para a redução no teor de CE em aguardentes.

4.2 Aguardentes Comerciais Irradiadas em Bancada Fotoquímica

A exposição de duas aguardentes comerciais (não envelhecida e envelhecida) a iluminação em diferentes comprimentos de onda (250, 280, 310, 330, 410, 440 e 500 nm), não resultou em uma variação considerável no teor final de CE (Tabela 10).

Comparando-se os teores de uretana para as aguardentes que não foram submetidas à irradiação fotoquímica (244 e 289 $\mu\text{g/L}$), com as frações destas mesmas aguardentes irradiadas em bancada fotoquímica, observa-se que esta variação está dentro do erro experimental da metodologia analítica (Tabela 10).^[41,42]

Tabela 10. Concentração de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em aguardentes comerciais após irradiação em bancada fotoquímica em diferentes comprimentos de onda, durante três horas.

Comprimento de onda (nm)	[CE] aguardente não envelhecida *	[CE] aguardente envelhecida **
Não irradiada	289	244
250	253	260
280	275	251
310	255	250
330	241	250
410	279	253
440	281	251
500	292	257
Média [CE]	271	252

Desvio padrão relativo (*RDS*, residual standard deviation): * = 7,0%; ** = 2,0%.

Os teores médios de CE foram 271 $\mu\text{g/L}$ e 252 $\mu\text{g/L}$ para as aguardentes, não envelhecida e envelhecida (Tabela 10), respectivamente. Estas concentrações médias foram concordantes dentro do erro experimental (*RDS*) de 7,0% (não envelhecida) e 2,0% (envelhecida), sugerindo que possíveis precursores de CE, se presentes, não foram ativados fotoquimicamente. Outra possibilidade é que estes tenham sido consumidos anteriormente numa possível formação do CE, pois estas amostras possuíam mais de seis meses de estocagem. Estes resultados foram semelhantes aos observados para amostras de vinho expostas a luz fluorescente, nos quais não foram observadas variações no teor de uretana.^[77]

4.3 Experimentos com Aguardentes Coletadas *in loco*

Considerando-se que a destilação reduz substancialmente o teor de carbamato de etila,^[115] se procurou verificar a formação de uretana após a destilação. Para tanto, decidiu-se por utilizar amostras de aguardente recém destiladas. Foram coletadas (*in loco*) 15 amostras de aguardente junto aos produtores no momento de sua produção. O seu armazenamento e sua análise estão descritos na seção 3.5.2.

A Figura 7 apresenta a curva de formação de CE, para uma mesma aguardente a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), na presença e na ausência de luz difusa (luz solar). Como se observa, as duas curvas apresentam perfis semelhantes e são reprodutivas, dentro dos limites de erro experimental,^[41,42] com respeito ao seu traçado e aos teores finais de uretana.

A reprodução deste resultado utilizando-se aguardentes de diferentes produtores, sugere que contrariamente ao descrito na literatura para outros destilados,^[78,80] no caso das aguardentes aqui estudadas, é pouco provável a ocorrência de um precursor ativado fotoquimicamente.

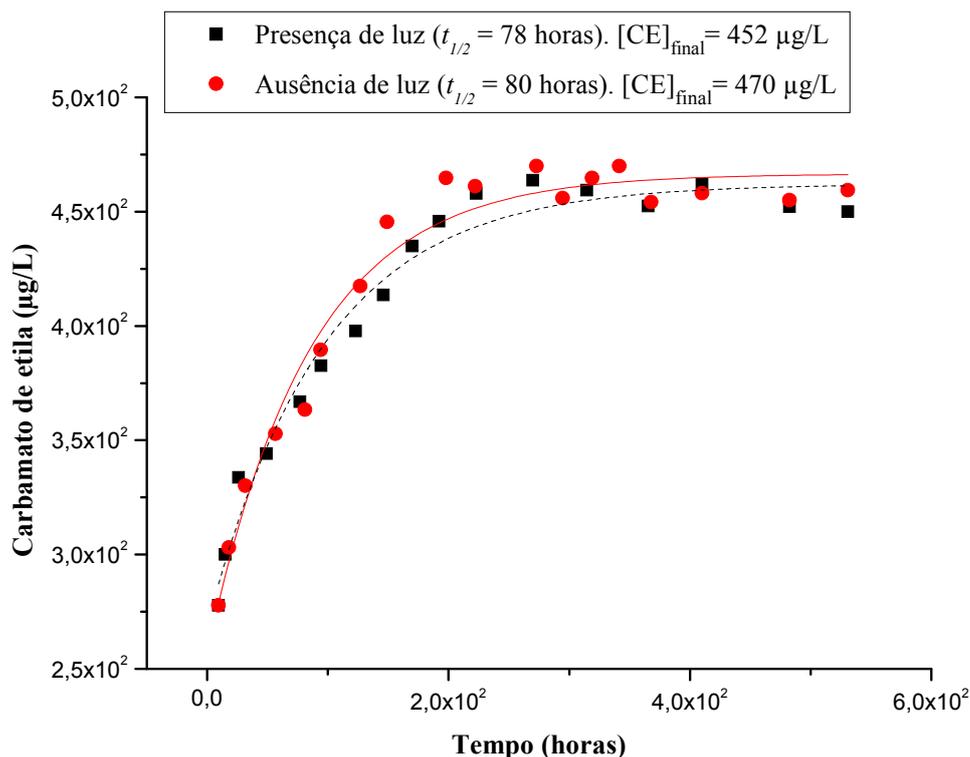


Figura 7. Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo (horas) em uma amostra de aguardente coletada *in loco*, analisada na presença (■) e na ausência de luz difusa (●) a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$).

A Figura 8 ilustra a evolução do teor de carbamato de etila em aguardentes (coletadas *in loco*), provenientes do mesmo vinho e destiladas em alambique de cobre e em coluna de aço inox, em função do tempo. Observa-se que independente da destilação ser processada em alambique ou em coluna, atinge-se um valor máximo de uretana ($[\text{CE}]_\infty$) após um período médio de aproximadamente 7 dias, com tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) de 85 e 80 horas, respectivamente.

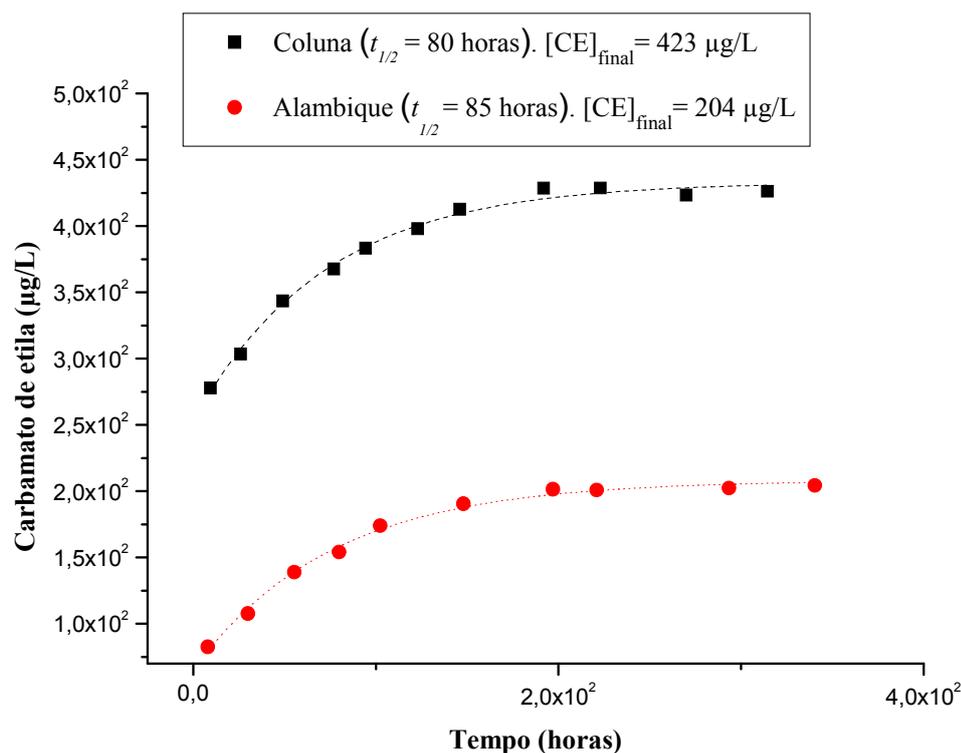


Figura 8. Carbamato de etila (µg/L) em função do tempo (horas) em aguardentes coletadas *in loco*, oriundas de um mesmo produtor (mesmo vinho) destiladas em alambique de cobre (●) e em coluna de aço inox (■), a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$).

O mesmo vinho (mosto fermentado de cana-de-açúcar), destilado em alambique e em coluna (Figura 8), conduziu a aguardentes com teores de carbamato de etila finais de respectivamente 204 e 423 µg/L. Trata-se de nosso conhecimento, do primeiro relato sobre experimentos com carbamato de etila, sobre a destilação do mesmo vinho em alambique e em coluna originando produtos com concentrações finais de uretana diferentes.^[117]

A Tabela 11 apresenta a concentração de CE para aguardentes oriundas de um mesmo mosto fermentado de cana (vinho), destilado em diferentes sistemas de destilação. Anteriormente foi descrito que as aguardentes destiladas em alambique tinham a tendência a apresentar teores de uretana inferiores as destiladas em coluna.^[41] Deve-se ressaltar que este fato não deve depender apenas do sistema de destilação, mas também do material utilizado na confecção destes aparelhos e também dos diferentes procedimentos realizados durante a destilação.

Tabela 11. Concentração mediana, média, mínima e máxima de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$), para aguardentes oriundas de vinhos iguais e vinhos diferentes, destiladas em coluna e alambique.

	<u>Vinhos Diferentes</u>		<u>Mesmo Vinho</u>	
	<u>Coluna</u>	<u>Alambique</u>	<u>Coluna</u>	<u>Alambique</u>
Número de amostras	40	68	5	5
Mediana ($\mu\text{g/L}$)	42	12	396	152
Média ($\mu\text{g/L}$)	66	24	432	145
Concentração mínima ($\mu\text{g/L}$)	10	10	125	58
Concentração máxima ($\mu\text{g/L}$)	368	323	216	812

Assim, os resultados aqui obtidos estão em concordância com relatos anteriores^[18,41,96] indicando um menor teor de uretana para aguardentes destiladas em alambique em relação às destiladas em coluna.

É curioso à primeira vista o fato de um alambique, com um poder de separação inferior ao de uma coluna, que possui um número bem maior de pratos teóricos, conduzir a um produto com teor inferior de carbamato de etila. Foi possível verificar^[54] que o teor de CE, contrariamente ao que se verifica para o destilado de coluna, não se distribui de forma equivalente nas três frações (cabeça, coração e cauda) do produto. Isto se explica, pois no alambique contrariamente existe a necessidade de cortes durante a destilação. Assim, foi possível constatar que os teores de uretana, mais solúvel em etanol do que em água,^[30] possui sua distribuição seguindo a sequência: cabeça > coração > cauda (Tabela 12).^[42]

Tabela 12. Concentração de carbamato de etila para aguardentes oriundas de um mesmo vinho destiladas em alambique (cabeça, coração e cauda) e em coluna.^[42]

Aguardente	Cabeça (µg/L)	Coração (µg/L)	Cauda (µg/L)	Coluna (µg/L)
A	247	152	75	147
B	< 30	< 30	< 30	< 30
C	66	58	< 30	125
D	101	< 30	79	< 30
E	583	216	63	644
F	395	152	99	812

Também foi analisada a influência dos processos fermentativos e do sistema de destilação (alambique e coluna) na formação de CE. Para tanto, amostras de diferentes produtores foram coletadas e analisadas quanto ao teor de uretana (Figura 9).

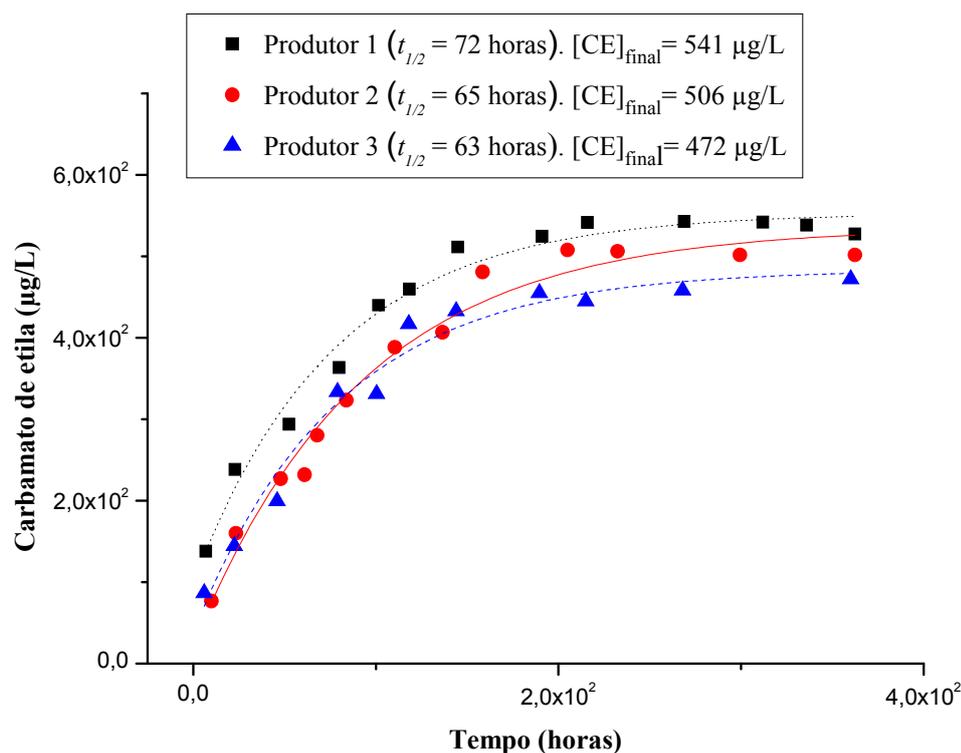


Figura 9. Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo (horas) em aguardentes oriundas de três diferentes produtores coletadas *in loco*, a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$): produtor 1 (■) 54% v/v etanol; produtor 2 (●) 51% v/v; produtor 3 (▲) 46% v/v.

As curvas da [CE] *versus* o tempo, obtidas para os destilados de diferentes produtores (Figura 9), são semelhantes, conduzindo a valores de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o processo de mesma ordem de grandeza. Isto sugere que em princípio a etapa determinante para a formação de uretana nestas três aguardentes, é a mesma ou muito semelhante.

A diferença observada para os teores de carbamato de etila para as aguardentes oriundas de diferentes produtores (472, 506 e 541 $\mu\text{g/L}$), ocorre provavelmente em função da diferença na composição dos vinhos utilizados na produção destas aguardentes.

A evolução do teor de CE em aguardentes produzidas a partir do mesmo produtor e do mesmo vinho, acompanhada a diferentes temperaturas esta apresentada na Figura 10.

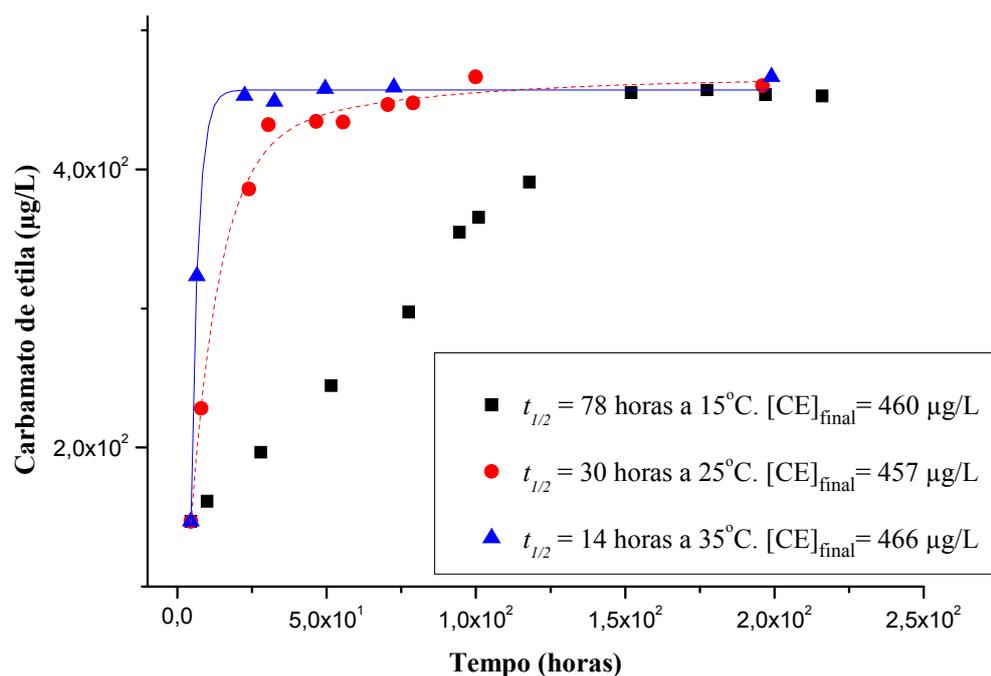


Figura 10. Carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo (horas) analisado nas temperaturas de 15°C (■), 25°C (●) e 35°C (▲) para aguardentes coletadas *in loco*, oriundas de um mesmo produtor e mesmo vinho.

Nota-se claramente na Figura 10 uma redução nos valores de $t_{1/2}$ em função do aumento da temperatura, como esperado. São concordantes os teores finais de uretana (457, 460 e $466 \mu\text{g/L}$).

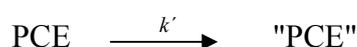
Os resultados experimentais estão resumidos na Tabela 13. Por extrapolação dos gráficos de $\ln ([\text{CE}]_{\infty} - [\text{CE}]_t)$ versus o tempo, para o instante da coleta (t_0 , tempo zero), foi possível estimar que em média 40% do CE total é forma-se durante a destilação. Isto sugere que a formação de uretana ocorre também dentro do interior do aparelho destilador (coluna e serpentina), continuando após a destilação. Assim é provável que a forma “ativa” dos precursores de carbamato de etila ("PCE") se origina durante o processo de destilação.

Tabela 13. Concentração média de carbamato de etila inicial $[CE]_{inicial}$, final $[CE]_{final}$, no tempo zero $[CE]_{t0}$, porcentagem média (% CE) e a porcentagem média total de carbamato de etila formado durante a destilação.

Aguardente	$[CE]_{inicial}$	$[CE]_{final}$	$[CE]_{t0}$	% de CE formado durante a destilação
Produtor 1	162	541	147,7	27,3
Produtor 2	94,9	506	83,4	16,5
Produtor 3	98,7	472,0	89,8	19,0
Produtor 4	92,7	204	86,5	42,4
Produtor 5	287,9	452	271,0	60,0
Produtor 6	266	412	238,9	58,0
Produtor 7	179,1	457	169	37,0
Produtor 8	696	1109	668	60,3
% média total	-	-	-	40,1

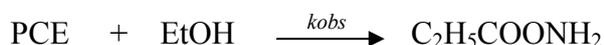
Também se pode concluir destes experimentos que após um período de 7 dias, este(s) precursor(s) ("PCE"), seria(m) completamente consumido(s), originando o correspondente carbamato de etila. Assim, o armazenamneto deste destilado (aguardente) por um período de 7 a 10 dias, promoveria a estabilização do mesmo e a subsequente redestilação promoveria a redução em média de 84%no teor de CE.

Embora se desconhecendo a natureza do(s) precursor(s) do carbamato de etila (PCE) nesta matriz, sua concentração é muito inferior a do etanol ([EtOH]) presente nas aguardentes, $[PCE] \lll [EtOH]$. Outra possibilidade que deve ser considerada é o fato deste precursor PCE converter-se em uma forma reativa "PCE" (Esquema 8),^[115] no interior do destilador.



Esquema 8. Precursor de carbamato de etila convertendo-se em uma forma reativa.^[115]

Assim, considerando o conhecimento acumulado sobre a reação de formação de carbamato de etila em outras bebidas,^[70,72,76,102] esta reação seria de primeira ordem em relação as concentrações do precursor e do etanol (Esquema 9).^[115]



Esquema 9. Formação do carbamato de etila por meio do seu precursor (PCE) em meio alcoólico.^[115]

Entretanto, nas aguardentes estudadas a concentração molar de etanol oscilou entre 7,0 a 9,3 mol/L. Nestas condições é interessante considerar a possibilidade da reação ser independente da concentração de etanol e dos precursores, mas dependente da concentração do precursor em sua forma ativada “PCE”, ou seja, dependente da constante k' .

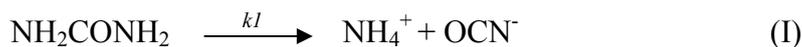
Considerando-se diferentes amostras, do mesmo produtor ou não, foi possível calcular o valor de k_{obs} , expresso pela sua média, como sendo da ordem de $(6,4 \pm 0,5) \times 10^{-6}/s$ a 25°C.

Os parâmetros de ativação ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger e ΔG^\ddagger calculados, para uma amostra de aguardente coletada de um mesmo produtor, são respectivamente, 34 kcal/mol, - 69 cal/K e 54 kcal/mol.

4.4 Experimentos Realizados com Uréia sob Refluxo

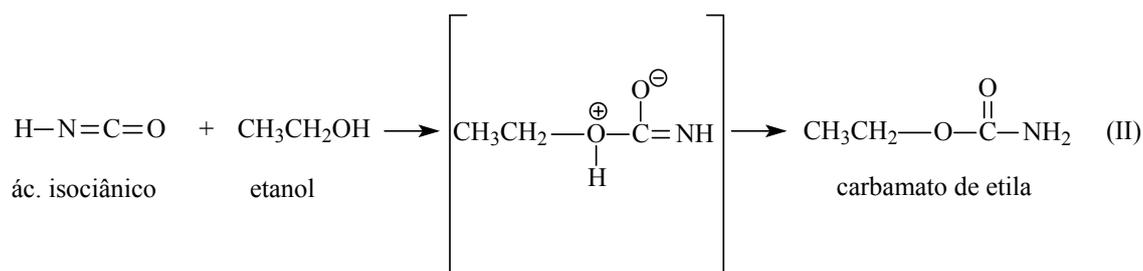
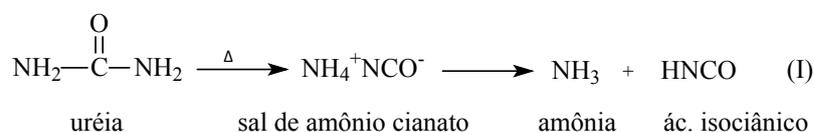
É conhecido na literatura que a uréia é um dos principais precursores de carbamato de etila em vinhos.^[72-76,117] A uréia pode se decompor em cianato de amônio (NH_4CNO) em meio aquoso (pH alcalino, neutro e ácido) em temperaturas acima de 60°C.^[118,119]

Em meio ácido (0,05 M H_2SO_4) os íons cianato (OCN^-) se convertem rapidamente em íons amônio (NH_4^+) e ácido carbônico (H_2CO_3). A reação é considerada de primeira ordem para a uréia, com uma constante de velocidade de decomposição k_1 de $1,20 \times 10^{-5} /s$ a 90°C e E_a de 32,4 kcal/mol (Esquema 10, reações I e II).^[109,118-119]



Esquema 10. Reações propostas para a decomposição da uréia.^[118,119]

É reportado^[120] que o carbamato de etila é formado durante a síntese do dietil carbonato ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OCOOC}_2\text{H}_5$).^[s] Foi observado a formação de CE, do por meio de reações de alcoólise da uréia em temperatura acima de 150°C (Esquema 11, reações I e II).



Esquema 11. Proposta de formação do carbamato de etila como intermediário durante a síntese do dietil carbonato.^[120]

Sabendo-se que a uréia é um precursor de CE e que a mesma em solução alcoólica, quando aquecida, leva a formação de uretana,^[120] foram realizados experimentos com a “aguardente de referência” adicionada de uréia e posteriormente submetida a refluxo. O preparo e os parâmetros avaliados nestas soluções modelo de aguardente que foram mantidas sob refluxo, encontram-se descritos no Procedimento Experimental (seção 3.8).

Dentro do erro experimental, não foi observado variação nos teores finais de uretana da aguardente de referência (sem adição de compostos nitrogenados) bem como na aguardente de referência adicionada de íons amônio (Tabela 14), antes e após o refluxo.

^[s] O Dietil carbonato atualmente vem se tornando um promissor aditivo ao combustível em substituição ao éter metil *terc*-butílico (*MTBE*).

Para as demais aguardentes adicionadas com uréia e mantidas sob refluxo, observou-se um aumento nos teores finais de uretana. Observa-se que a adição de uréia a aguardente, que posteriormente foi mantida sob refluxo durante mais de 7000 minutos, levou a um aumento nos teores finais de uretana (Tabela 14).

Tabela 14. Concentração de carbamato de etila formado e tempo de refluxo para aguardentes de referência,* adicionadas ou não de uréia e de íons amônio (sulfato de amônio), que foram mantidas sob refluxo.

Sal adicionado	[CE] formado	Tempo de refluxo
Sem adição	$0,30 \times 10^{-7}$ mol/L	4590 min. ($2,75 \times 10^5$ s)
$1,02 \times 10^{-1}$ mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$0,47 \times 10^{-7}$ mol/L	4175 min. ($2,50 \times 10^5$ s)
$1,05 \times 10^{-3}$ mol/L $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	$3,71 \times 10^{-5}$ mol/L	8800 min. ($5,28 \times 10^5$ s)
$5,17 \times 10^{-2}$ mol/L $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	$1,92 \times 10^{-3}$ mol/L	8600 min. ($5,16 \times 10^5$ s)
$1,12 \times 10^{-1}$ mol/L $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	$4,48 \times 10^{-3}$ mol/L	7316 min. ($3,65 \times 10^5$ s)

* [CE] da aguardente de referência $\approx 1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

A Figura 11 apresenta a evolução dos teores de CE (mol/L) em função do tempo (minutos) para uma aguardente de referência a qual foi adicionado uréia e posteriormente submetida a refluxo. Nota-se que os teores de uretana aumentam em função do tempo de refluxo (temperatura $\approx 84^\circ\text{C}$), aumento este bastante próximo a linearidade.

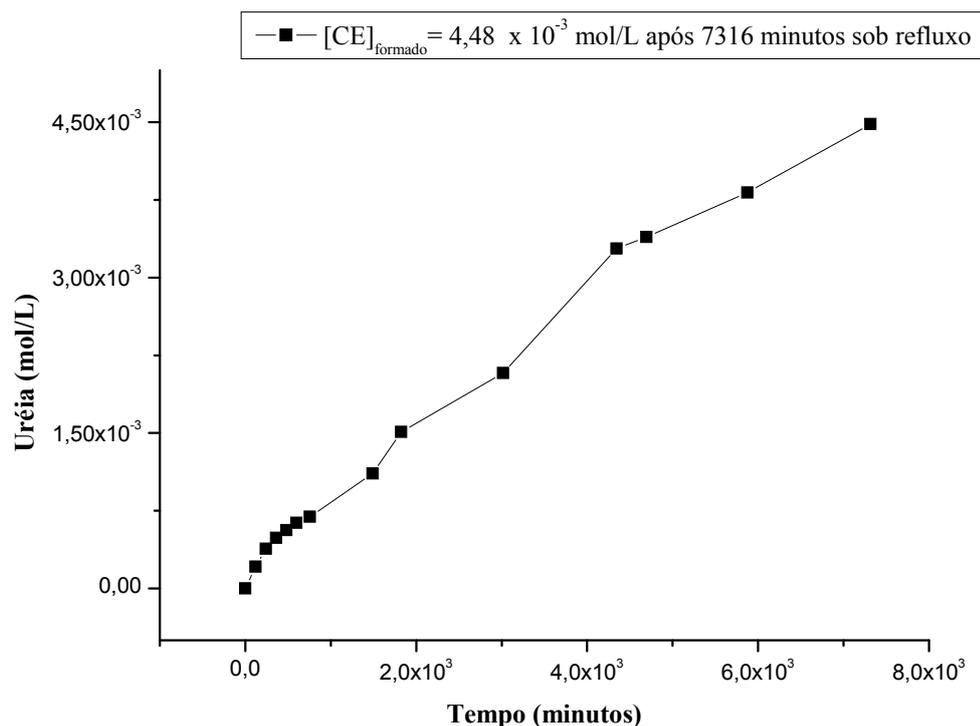


Figura 11. Evolução dos teores de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (minutos) para aguardente adicionada com $1,12 \times 10^{-1}$ mol/L de uréia, que foi mantida sob refluxo a temperatura de $\approx 84^{\circ}\text{C}$, durante 7316 minutos.

As Tabelas 15 e 16 apresentam a concentração de carbamato de etila formado para a aguardente de referência, tamponada (ácido acético 0,0064 mol/L / acetato de sódio 0,0036 mol/L) e não tamponada, que posteriormente foram submetidas a refluxo. A uréia foi adicionada, nas concentrações de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L e $1,10 \times 10^{-2}$ mol/L, logo após a aguardente atingir a temperatura de refluxo. Alíquotas foram coletadas a cada 30 minutos, durante 150 minutos, e analisadas quanto ao teor de CE.

A concentração inicial de CE, na aguardente de referência antes do refluxo, era $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L. Após 30 minutos da adição da uréia nas aguardentes, observou-se um aumento na concentração de uretana de cerca de quinze vezes para as aguardentes tamponadas, e de mais de cem vezes para as aguardentes não tamponadas (Tabelas 15 e 16). O aumento na concentração de carbamato de etila foi diretamente proporcional ao tempo de refluxo, comportamento este observado para todas as alíquotas analisadas.

Tabela 15. Concentração de carbamato de etila formado na aguardente de referência,* tamponada e não tamponada, adicionada de uréia após atingir a temperatura de refluxo e os respectivos pHs observados.

Tempo	[CE] _{formado} (1,02 x 10 ⁻² mol/L de uréia)	pH	[CE] _{formado} (1,01 x 10 ⁻² mol/L de uréia)	pH
	Com tampão**		Sem tampão	
30 (min.)	1,5 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	5,3	1,7 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	5,3
60 (min.)	2,2 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	5,3	2,2 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	6,8
90 (min.)	3,3 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	5,3	2,7 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	8,5
120 (min.)	4,2 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	5,3	3,2 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	9,1
150 (min.)	5,2 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	5,4	3,4 x 10 ⁻⁵ mol/L CE	9,4

* [CE] da aguardente de referência ≈ 1,0 x 10⁻⁶ mol/L. ** Tampão: ácido acético 0,0064 mol/L / acetato de sódio 0,0036 mol/L.

Comparando-se as aguardentes (tamponada e não tamponada) as quais foram adicionados os mesmos teores de uréia (Tabela 16), que o aumento no pH causou uma inibição na evolução das concentrações de uretana, levando a concentrações de CE diferente para o mesmo intervalo de tempo.

Tabela 16. Concentração de carbamato de etila formado na aguardente de referência,* tamponada e não tamponada, adicionada de uréia após atingir a temperatura de refluxo e os respectivos pHs observados.

Tempo	[CE] _{formado} (1,10 x 10 ⁻¹ mol/L de uréia)	pH	[CE] _{formado} (1,12 x 10 ⁻¹ mol/L de uréia)	pH
	Com tampão**		Sem tampão	
30 (min.)	1,1 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	5,6	1,3 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	5,9
60 (min.)	2,3 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	6,6	1,9 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	7,1
90 (min.)	3,1 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	7,2	2,4 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	9,0
120 (min.)	4,2 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	7,7	2,9 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	9,0
150 (min.)	5,1 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	8,2	3,7 x 10 ⁻⁴ mol/L CE	9,6

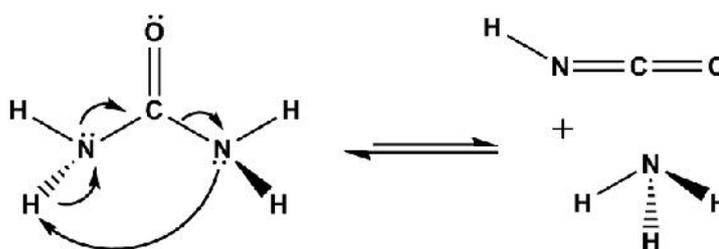
* [CE] da aguardente de referência ≈ 1,0 x 10⁻⁶ mol/L. ** Tampão: ácido acético 0,0064 mol/L / acetato de sódio 0,0036 mol/L.

Os teores de CE para as aguardentes adicionadas de uréia, mantidas sob refluxo (Tabela 14, 15 e 16), não se alteraram após o fim do aquecimento por um período de até uma semana.

Os resultados apresentados nas Tabelas 14,15 e 16 são semelhantes aos descritos na literatura,^[120] a qual trata da formação de carbamato de etila em soluções de etanol contendo uréia, aquecidas acima de 190°C em autoclave, em meio não tamponado. Os autores^[120] verificam que o CE seria uma espécie que se forma intermediariamente na síntese do dietil carbonato.

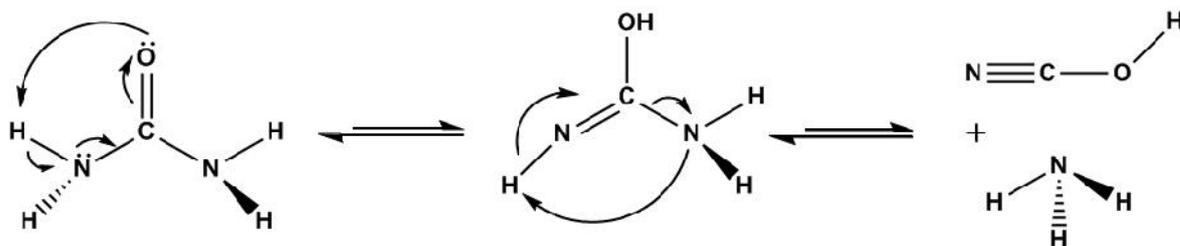
4.4.1 A degradação da uréia

Cálculos quânticos foram realizados para a degradação da uréia, originando amônia, ácido isociânico (Esquema 12) e ácido cianico (Esquema 13).



Estado de transição (TS): $\Delta E = 51,2$ kcal/mol e $\Delta G = 48,4$ kcal/mol. **Complexo produto (PC):** $\Delta E = 22,4$ kcal/mol e $\Delta G = 13,8$ kcal/mol.

Esquema 12. Proposta de degradação da uréia formando HNCO e NH₃.



Estado de transição da primeira etapa (TSI): $\Delta E = 49,0$ kcal/mol e $\Delta G = 44,4$ kcal/mol. **Intermediário da reação (INT):** $\Delta E = 18,6$ kcal/mol e $\Delta G = 18,5$ kcal/mol. **Estado de transição da segunda etapa (TSII):** $\Delta E = 83,3$ kcal/mol e $\Delta G = 80,2$ kcal/mol. **PC:** $\Delta E = 45,7$ kcal/mol e $\Delta G = 38,1$ kcal/mol.

Esquema 13. Proposta de degradação da uréia formando HOCN e NH_3 .

A formação de ácido isociânico é favorecida em relação ao ácido cianico por um valor de ΔG 24,3 kcal/mol. Assim a modelagem sugere a formação preferencial do ácido isociânico. Também a formação de ácido isociânico é favorecida pelas energias ΔG dos estados de transição. Os diagramas das energias relativas (ΔG) para a degradação da uréia formando ácido isociânico e o ácido cianico encontram-se nos Anexos III e IV, respectivamente.

4.5 Experimentos com Soluções Modelo de Aguardente

A fim de facilitar a discussão dos resultados apresentados nesta seção, os teores de carbamato de etila serão expressos em mol/L. Para tanto deve se considerar a seguinte relação: $1,12 \times 10^{-8}$ mol/L de CE equivale a $1,0 \mu\text{g/L}$ de CE.

4.5.1 Soluções modelo de aguardente adicionada com íons cianato (OCN⁻)

Considerando-se que o carbamato de etila pode-se originar durante a destilação e também por meio da uréia mantida sob refluxo, procurou-se verificar a formação de uretana em soluções modelo de aguardente em função da adição de cianato de potássio (KOCN). Para

tanto, decidiu-se por utilizar uma aguardente (*blend*) na preparação das soluções modelo (aguardente de referência, seção 3.5.3).

Inicialmente foi efetuado o acompanhamento espectrofotométrico (seção 3.9.3) do decaimento dos teores de cianato de potássio em solução (Figura 12). A concentração de CNO^- foi determinada pontualmente utilizando o método de Guilloton e Karst.^[109]

A Figura 12 apresenta a variação do espectro de absorbância a 310 nm, região de absorção da benzoiluréia.^[109]

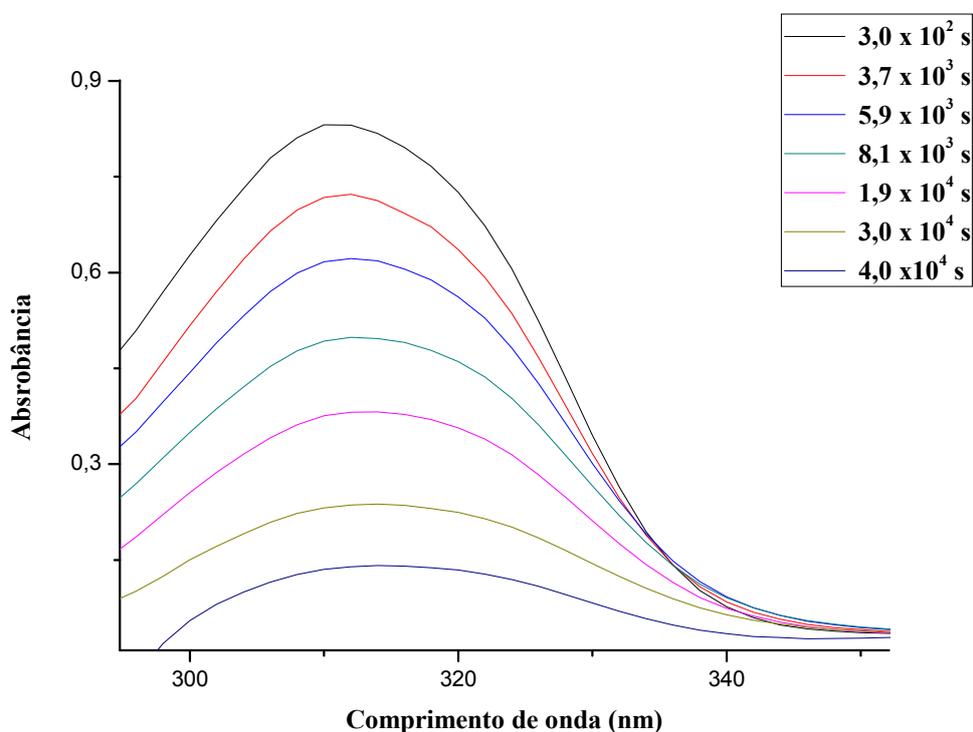


Figura 12. Decaimento das concentrações de KOCN adicionado em soluções modelo de aguardente a 25°C, em $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ e com $\epsilon = 412 \text{ L / mol cm}$.

A Figura 13 ilustra a variação da absorbância ($\lambda_{\text{max}} 310 \text{ nm}$) em função do tempo (segundos). A partir do gráfico de $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus o tempo (segundos) (Figura 13, *Insert*), foi possível calcular o valor de k_{obs} para o decaimento do íon cianato e também o valor de $t_{1/2}$, respectivamente, $8,0 \times 10^{-5} \text{ /s}$ e $8,9 \times 10^3 \text{ s}$, a 25°C.

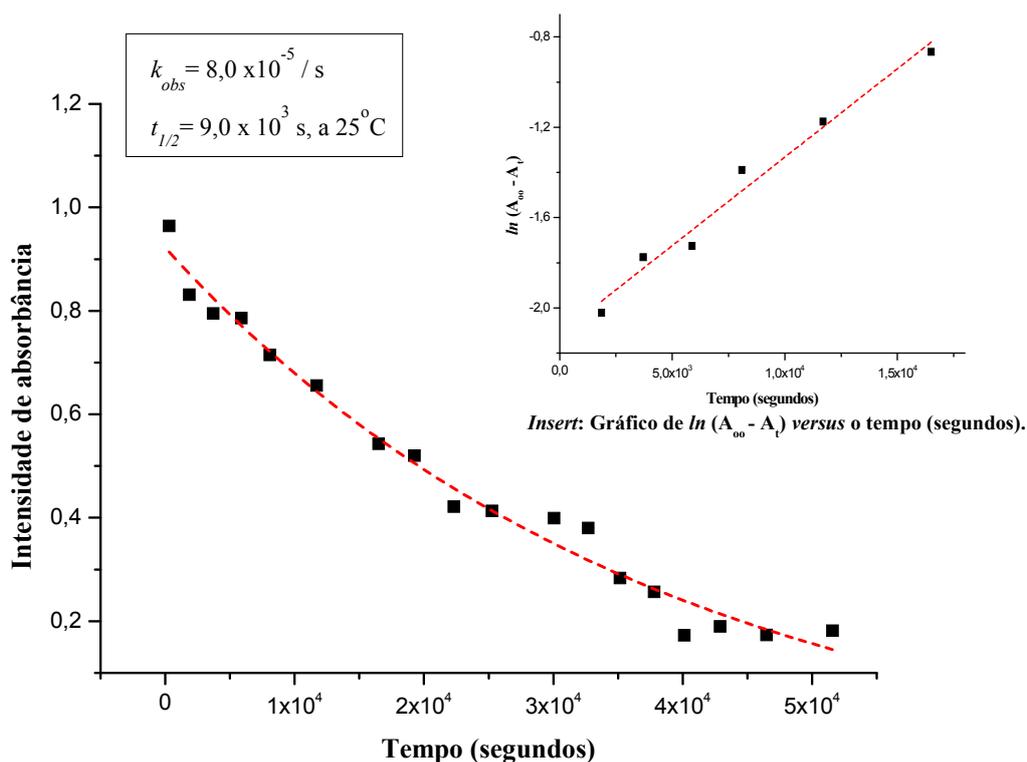


Figura 13. Absorbância em função do tempo (segundos) para uma solução modelo de aguardente (48% v/v) adicionada com $4,10 \times 10^{-4}$ mol/L de KOCN, a $25^{\circ}C$ em pH 4,5. *Insert* do gráfico de $\ln(A_{\infty} - A_t)$ versus o tempo (segundos).

Estes resultados demonstram que o consumo de íons cianato é acompanhado com a concomitante a formação do carbamato de etila. A Figura 14 apresenta a evolução dos teores de uretana, para uma solução modelo de aguardente a qual foi adicionado KOCN.

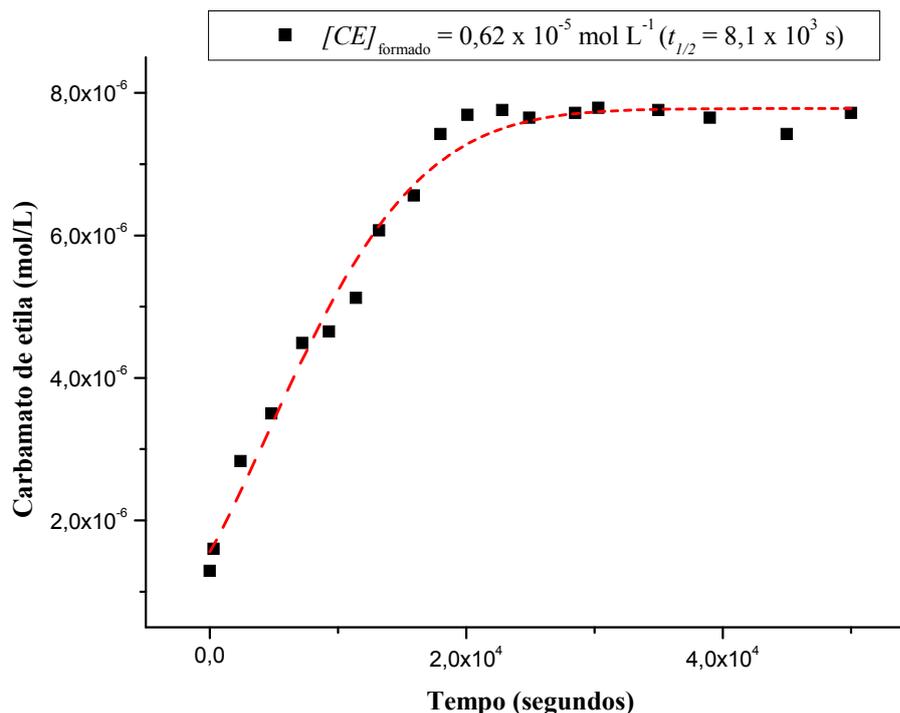


Figura 14. Formação de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) para uma solução modelo de aguardente (48% v/v) adicionada com $2,12 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C em pH 4,5.

A Tabela 17 demonstra que a concentração final de carbamato de etila depende da concentração de íons cianato adicionado a solução modelo de aguardente. Também indica que são formados aproximadamente $0,31 \pm 0,02$ mol de CE por mol de cianato adicionado ($[CE]_{\text{formado}} / [OCN]_{\text{adicionado}}$), conforme será discutido mais a frente neste trabalho.

Tabela 17. Concentração de KOCN adicionado, carbamato de etila formado $[CE]_{\text{formado}}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ para soluções modelo de aguardente (48% v/v) a 25°C em pH 4,5.

$[OCN]_{\text{adicionado}}$	$[CE]_{\text{formado}}$	k_{obs}	$t_{1/2}$
$0,53 \times 10^{-5}$ mol/L	$0,16 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,5 \times 10^{-5}$ /s	$8,4 \times 10^3$ s
$0,78 \times 10^{-5}$ mol/L	$0,26 \times 10^{-5}$ mol/L	$9,3 \times 10^{-5}$ /s	$7,6 \times 10^3$ s
$2,12 \times 10^{-5}$ mol/L	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,6 \times 10^{-5}$ /s	$8,1 \times 10^3$ s
$4,48 \times 10^{-5}$ mol/L	$1,45 \times 10^{-5}$ mol/L	$9,1 \times 10^{-5}$ /s	$7,8 \times 10^3$ s

Foram concordantes dentro do erro experimental os valores de constante de velocidade observada (k_{obs}) para o decaimento de íons cianato ($8,0 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ s) e para a formação de uretana ($8,9 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ s, valores este determinados utilizando-se técnicas diferentes e monitorando o reagente (OCN^-) e o produto (CE).

A Figura 15 apresenta para fins de ilustração as curvas de decaimento dos íons cianato (mol/L) e da evolução dos teores de uretana (mol/L) em função do tempo (segundos), para duas diferentes soluções modelo de aguardentes, adicionadas com $4,10 \times 10^{-4}$ mol/L (decaimento do íon OCN^-) e $2,12 \times 10^{-5}$ mol/L (formação de CE). Observa-se que a medida os íons cianato são consumidos ocorre à formação da uretana.

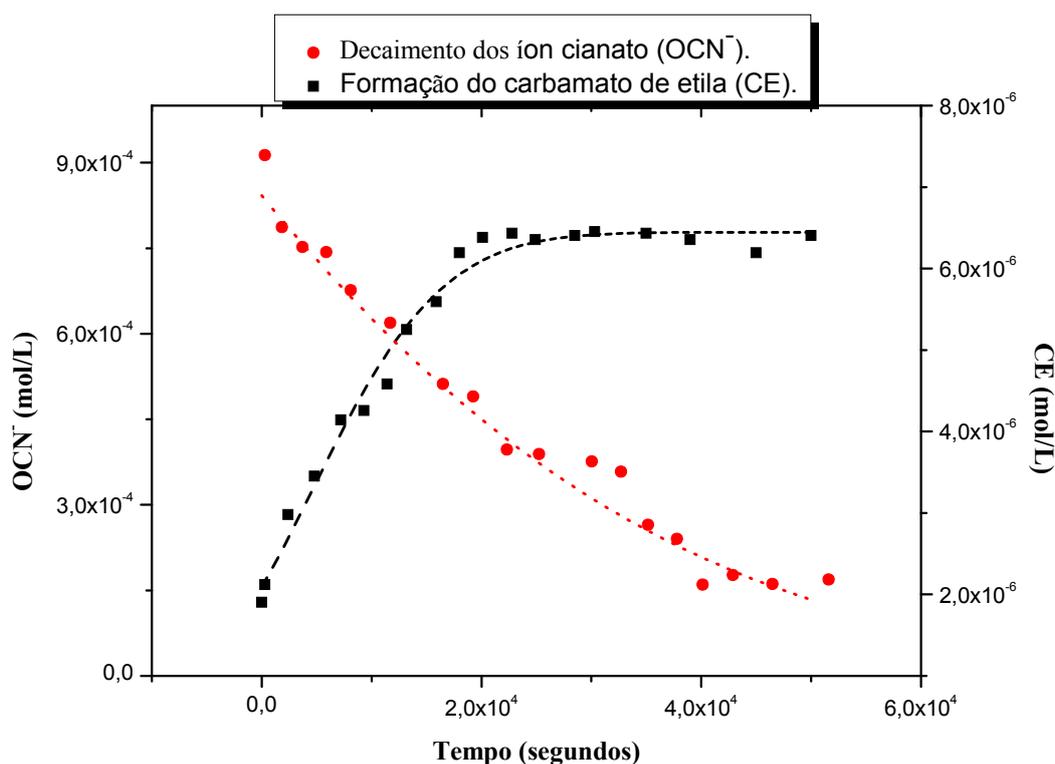


Figura 15. Decaimento dos íons cianato (mol/L) e formação de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) para duas diferentes soluções modelo de aguardente adicionadas de $4,10 \times 10^{-4}$ mol/L de KOCN (decaimentos do íon OCN^-) e $2,12 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN (formação de CE), a 25°C e pH 4,5.

O pH de aguardentes comerciais geralmente encontra-se entre 3,7 e 5,7 (Anexo II). Assim, a concentração hidrogeniônica do meio foi sempre controlada, utilizando-se solução tampão ácido acético 0,0064 mol/L e acetato de sódio 0,0036 mol/L.

Quando KOCN foi adicionado às soluções modelo de aguardente, por exemplo, $2,07 \times 10^{-5}$ mol/L íons cianato a 25°C em diferentes pHs (Tabela 18), verificou-se que as concentrações finais de carbamato de etila foram próximas ($\approx 0,62 \times 10^{-5}$ mol/L). Entretanto, observou-se que os valores de k_{obs} variam de forma diretamente proporcional ao aumento da concentração hidrogeniônica ($[H^+]$).

Como pode ser observado na Tabela 18, à medida que o meio vai se tornando mais ácido (pH de 6,0 para 3,0) as constantes de velocidade observada (k_{obs}) aumentaram, indicando que a velocidade de reação aumenta a medida que aumenta a $[H^+]$. Este fato é coerente com a protonação do íon OCN^- e do seu isômero CNO^- , cuja constante de dissociação a 25°C é de $2,2 \times 10^4$.^[116] Também se sugere que a forma ativa é a protonada, e não o ânion.

Tabela 18. pH, concentração de carbamato de etila formado $[CE]_{formado}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ para soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionada com $2,07 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C.

pH	$[CE]_{formado}$	k_{obs}	$t_{1/2}$
3,0	$0,60 \times 10^{-5}$ mol/L	$7,5 \times 10^{-4}$ /s	$8,8 \times 10^2$ s
3,9	$0,64 \times 10^{-5}$ mol/L	$4,4 \times 10^{-4}$ /s	$1,7 \times 10^3$ s
4,5	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,6 \times 10^{-5}$ /s	$8,1 \times 10^3$ s
5,3	$0,61 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,5 \times 10^{-5}$ /s	$1,9 \times 10^4$ s
6,0	$0,63 \times 10^{-5}$ mol/L	$1,4 \times 10^{-5}$ /s	$5,5 \times 10^4$ s

Alguns trabalhos na literatura descrevem que os íons de cobre (II)^[17,18,59,60,78-81] e ferro (II e III),^[59] presentes nos aparelhos de destilação, podem atuar como catalisadores na

formação de carbamato de etila em destilados. Adição^[60] de sais de EDTA, reconhecido agente quelante, inibiu formação de CE em amostras de uísque recém destiladas, o que foi interpretado como devido ao sequestro dos íons de cobre e de ferro do meio.

Assim, soluções modelo de aguardente, as quais foram previamente adicionadas com sai de cobre (II), ferro (II) e EDTA, foram fortificadas com KOCN. A Tabela 19 resume os resultados para estes experimentos.

Tabela 19. Efeito da adição de cobre (II), ferro (II) e EDTA na formação de carbamato de etila em soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionadas com $2,06 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C e pH 4,5.

Concentração dos sais adicionados	[CE] _{formado}	k_{obs}	$t_{1/2}$
Sem adição	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,6 \times 10^{-5}$ /s	$8,1 \times 10^3$ s
$3,0 \times 10^{-4}$ mol/L de Cu (II)*	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,8 \times 10^{-5}$ /s	$8,2 \times 10^3$ s
$1,0 \times 10^{-5}$ mol/L de Fe (II)**	$0,63 \times 10^{-5}$ mol/L	$9,2 \times 10^{-5}$ /s	$7,6 \times 10^3$ s
$2,0 \times 10^{-2}$ mol/L de EDTA***	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,6 \times 10^{-5}$ /s	$8,0 \times 10^3$ s

* Cu (II) = $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; ** $FeCl_2 \cdot 4H_2O$; *** $C_{10}H_{16}N_2O_8$.

Observa-se na Tabela 19 que a adição ou não de sais cobre (II), ferro (II) e EDTA as soluções fortificadas com íons cinato, não influenciaram nem nos valores de k_{obs} e tampouco na concentração final de uretana ($\approx 0,62 \times 10^{-5}$ mol/L). Diferentemente do observado em trabalhos anteriores,^[17,18,59,60,78,80,81] a adição de metais (Cu II e Fe II) não promoveu um aumento na constante de velocidade de formação de uretana $k_{obs} \approx (8,90 \pm 0,30) \times 10^{-5}$ /s.

A aguardente de referência (seção 3.5.3, Tabela 7) contém teores íons de cobre ($2,7 \times 10^{-5}$ mol/L) e ferro ($8,0 \times 10^{-7}$ mol/L). Assim, ao comparar-se a solução modelo sem adição de sais de Cu (II) e Fe (II) com a amostra adicionada de EDTA (Tabela 19), era de se esperar que este último inibisse a formação de uretana, como foi descrito^[60] para amostras de uísque. No entanto, o teor formado de CE, o k_{obs} e o $t_{1/2}$ foram experimentalmente concordantes,

demonstrando que a presença ou não de íons de cobre e de ferro não influenciou na constante de velocidade de formação do CE em aguardentes, e tampouco no teor total de CE formado.

Foi verificado^[78] um aumento na velocidade de formação de uretana em amostras de uísque expostas a luz fluorescente. Perfil semelhante^[80] foi observado para vinhos destilados (grapa). O mesmo não foi observado em trabalho anterior^[77] para amostras de vinho, para a velocidade de formação, bem como nos teores de CE em amostras de vinho, quando expostas a luz fluorescente e luz verde em relação as mantidas no escuro.

A partir destas observações, soluções modelo de aguardente adicionada de KOCN, foram expostas à irradiação luminosa em diferentes comprimentos de onda (λ). A Tabela 20 apresenta a concentração de carbamato de etila formado e os valores de k_{obs} e $t_{1/2}$ para as soluções modelo de aguardente irradiadas em bancada fotoquímica a 25°C.

Tabela 20. Comprimento de onda (λ , nm) da fonte luminosa, concentração de carbamato de etila formado $[CE]_{formado}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ para soluções modelo de aguardente (48% v/v) contendo $2,08 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 25°C e pH 4,5.

λ de irradiação da aguardente	$[CE]_{formado}$	k_{obs}	$t_{1/2}$
Não irradiada	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,6 \times 10^{-5}$ /s	$8,1 \times 10^3$ s
250 nm	$0,65 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,9 \times 10^{-5}$ /s	$7,7 \times 10^3$ s
280 nm	$0,64 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,5 \times 10^{-5}$ /s	$7,8 \times 10^3$ s
310 nm	$0,66 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,8 \times 10^{-5}$ /s	$7,9 \times 10^3$ s
330 nm	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,4 \times 10^{-5}$ /s	$8,1 \times 10^3$ s
410 nm	$0,61 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,1 \times 10^{-5}$ /s	$8,7 \times 10^3$ s
440 nm	$0,65 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,1 \times 10^{-5}$ /s	$8,5 \times 10^3$ s
500 nm	$0,66 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,9 \times 10^{-5}$ /s	$7,7 \times 10^3$ s

A Tabela 20 demonstra que a exposição das soluções modelo de aguardente a irradiação com luz de diferentes comprimentos de onda não influi, dentro do erro

experimental, na constante de velocidade de formação do CE com k_{obs} da ordem de $(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ mol/L, a 25°C. Os teores finais de CE foram concordantes dentro do erro experimental $(0,64 \pm 0,02) \times 10^{-5}$ mol/L. Assim, diferente do reportado para amostras de uísque,^[78] a luz não exerceu influência na constante de velocidade de formação da uretana em aguardentes bem como no teor final. No entanto, os resultados obtidos neste experimento foram iguais aos observados aqui para amostras recém destiladas (seção 4.3). Isto sugere que a etapa determinante da reação, bem como o(s) intermediário(s) envolvido(s) possam ser diferentes daqueles relatados para uísque^[78] e vinhos destilados.^[80]

Alguns trabalhos destacam que a constante de velocidade de formação de carbamato de etila em uísque,^[78] vinho,^[121] soluções modelo de etanol^[70,72] e vinho (adicionadas de uréia e citrulina)^[73,117] ocorrem mais rapidamente com o aumento da temperatura. Este fato foi comprovado anteriormente neste trabalho estudando-se a formação de uretana em amostras de aguardente recém destiladas (seção 4.3).

Assim foi acompanhada a formação de CE em soluções modelo de aguardente contendo KOCN ($2,08 \times 10^{-5}$ mol/L), nas temperaturas de 15, 25 e 35°C. A Figura 16 claramente evidencia a influência da temperatura na evolução da formação de uretana para as soluções modelo.

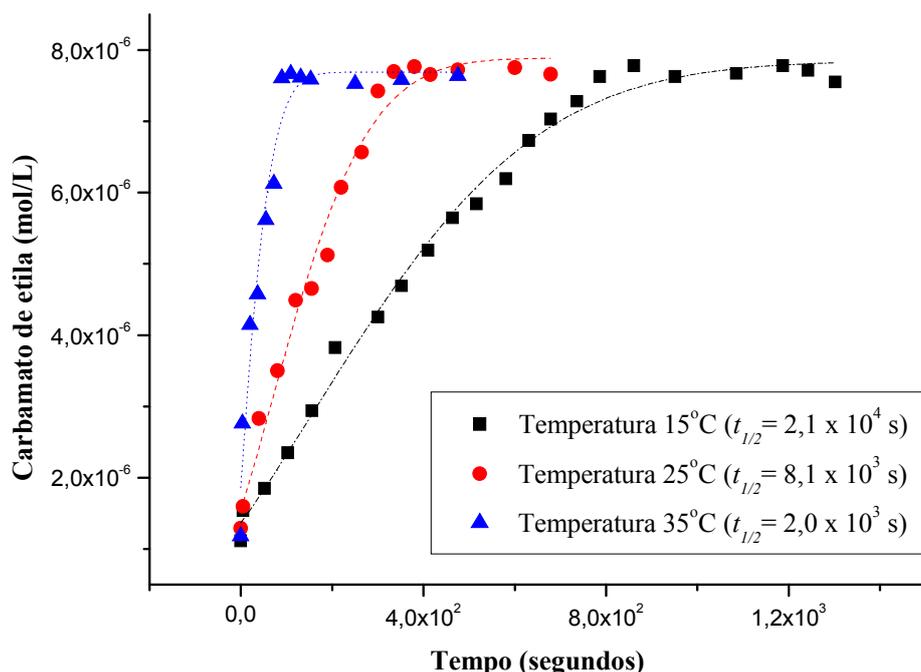


Figura 16. Formação de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) em soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionadas com $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, a 15°C (■), 25°C (●) e a 35°C (▲) em pH 4,5.

Analogamente ao observado para experimentos com aguardente recém destiladas (seção 4.3), o aumento da temperatura (Tabela 21) promoveu uma redução nos valores de $t_{1/2}$ e das constantes de velocidade (k_{obs}).

Tabela 21. Temperatura das soluções modelo de aguardente (48% v/v) adicionadas com $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, concentração de carbamato de etila formado $[CE]_{formado}$, k_{obs} e $t_{1/2}$ em pH 4,5.

Temperatura da solução modelo de aguardente	$[CE]_{formado}$	k_{obs}	$t_{1/2}$
15°C	$0,65 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,7 \times 10^{-5}$ /s	$2,0 \times 10^4$ s (5,56 horas)
25°C	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,6 \times 10^{-5}$ /s	$8,1 \times 10^3$ s (2,26 horas)
35°C	$0,64 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ /s	$2,1 \times 10^3$ s (0,59 horas)

Utilizando-se o valor de k_{obs} (Tabela 21) a 15, 25 e a 35°C, juntamente com as Equações 1, 2 e 3 (seção 3.7) foi possível calcular os parâmetros de ativação: ΔH^\ddagger 20,6

kcal/mol, ΔS^\ddagger - 96,1 cal/K e ΔG^\ddagger 48,7 kcal/mol. A Tabela 22 apresenta os parâmetros de ativação, obtidos neste trabalho para aguardentes recém destiladas e soluções modelo de aguardente, e em trabalhos anteriores com soluções modelo de etanol adicionadas de uréia, citrulina e isocianato de potássio.^[73,75,77,79,121]

Observa-se (Tabela 22) que os valores de ΔH^\ddagger para as aguardentes recém destiladas difere de mais de 13 kcal/mol para os experimentos com soluções modelo de aguardente e soluções adicionadas com de isocianato de potássio.^[79] Quando se compara os valores de ΔH^\ddagger das aguardentes recém destiladas com as soluções de etanol adicionadas de uréia^[74] e citrulina^[74] a diferença é de menos de 9 kcal/mol. Neste ponto, a comparação pura e simples dos parâmetros termodinâmicos pouco informa sobre a reação.

A energia de ativação (E_a) da reação calculada a 25°C foi de 19,0 kcal/mol, valor este semelhante ao calculado em trabalho anterior^[79] para soluções modelo etanol (20 % v/v etanol, pH 5) adicionada isocianato de potássio, E_a 76,2 kJ/mol (\approx 18,2 kcal/mol). Entretanto, este valor de E_a difere ligeiramente do reportado^[74] para a uréia E_a 107 kJ/mol (\approx 25,6 kcal/mol) e para a citrulina E_a 113 kJ/mol (\approx 27,0 kcal/mol), ambas em soluções 20% v/v etanol e pH 3,2.

Tabela 22. Parâmetros de ativação para a formação de carbamato de etila deste e de trabalhos anteriores.

Bebida	Teor alcoólico (% v/v etanol)	pH	ΔH^\ddagger (kcal/mol)	ΔS^\ddagger (cal/K)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
Aguardente recém destilada	41	4,6	34	- 69	54
Solução modelo de aguardente	48	4,5	20,6	- 96,1	48,7
Etanol + uréia ^[74]	20	3,2	25,6	-	-
Etanol + citrulina ^[74]	20	3,2	27,0	-	-
Etanol + isocianato ^[79]	-	3,2	18,2	-	-

Outro parâmetro avaliado nos experimentos com soluções modelo de aguardente, adicionada de íons cianato, foi o teor alcoólico, ou seja, a influência da concentração de etanol na ordem da reação. É conhecido^[72] que a adição de uréia em soluções modelo de etanol (20% v/v e pH 3,2), com diferentes teores alcoólicos, conduz a formação de uretana com teores finais diferentes, com uma constante de velocidade de $7,5 \times 10^{-10}$ /h ($2,08 \times 10^{-13}$ /s).

Foi acompanhada a variação do teor de uretana em soluções modelo de aguardente, com diferentes teores alcoólicos, fortificadas com teores iguais de KOCN. A Tabela 23 apresenta a concentração de CE formado, o k_{obs} e o $t_{1/2}$ para as soluções modelo de aguardentes em diferentes teores alcoólicos a 25°C e a 35°C.

Tabela 23. Teor alcoólico das soluções modelo de aguardente adicionadas com $(2,10 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN, carbamato de etila formado $[CE]_{formado}$, k_{obs} e $t_{1/2}$, a 25°C e a 35°C, em pH 4,5.

Teor alcoólico (% v/v etanol)	$[CE]_{formado}$	k_{obs}	$t_{1/2}$	Temperatura (°C)
13,3 (2,30 mol/L)	$0,19 \times 10^{-5}$ mol/L	$9,0 \times 10^{-5}$ /s	$7,7 \times 10^3$ s	25
24,4 (4,18 mol/L)	$0,39 \times 10^{-5}$ mol/L	$9,2 \times 10^{-5}$ /s	$7,6 \times 10^3$ s	25
48,0 (8,23 mol/L)	$0,62 \times 10^{-5}$ mol/L	$8,6 \times 10^{-5}$ /s	$8,1 \times 10^3$ s	25
1,70 (0,29 mol/L)	$3,35 \times 10^{-8}$ mol/L	$4,1 \times 10^{-4}$ / s	$1,7 \times 10^3$ s	35
2,00 (0,34 mol/L)	$1,90 \times 10^{-7}$ mol/L	$4,2 \times 10^{-4}$ / s	$1,6 \times 10^3$ s	35
4,54 (0,78 mol/L)	$4,20 \times 10^{-7}$ mol/L	$4,4 \times 10^{-4}$ / s	$1,6 \times 10^3$ s	35
5,26 (0,90 mol/L)	$4,00 \times 10^{-7}$ mol/L	$4,3 \times 10^{-4}$ / s	$1,6 \times 10^3$ s	35
10,6 (1,81 mol/L)	$1,74 \times 10^{-6}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ / s	$1,9 \times 10^3$ s	35
22,4 (3,83 mol/L)	$3,00 \times 10^{-6}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ / s	$1,9 \times 10^3$ s	35
35,0 (6,00 mol/L)	$4,80 \times 10^{-6}$ mol/L	$4,2 \times 10^{-4}$ / s	$1,8 \times 10^3$ s	35
48,0 (8,23 mol/L)	$6,40 \times 10^{-6}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ / s	$2,1 \times 10^3$ s	35
57,5 (9,85 mol/L)	$7,20 \times 10^{-5}$ mol/L	$4,3 \times 10^{-4}$ / s	$1,7 \times 10^3$ s	35
70,0 (12,0 mol/L)	$7,10 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ / s	$2,1 \times 10^3$ s	35
83,1 (14,2 mol/L)	$7,30 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ / s	$2,0 \times 10^3$ s	35
91,5 (15,7 mol/L)	$7,34 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ / s	$2,0 \times 10^3$ s	35

Observa-se na Tabela 23 que a constante de velocidade de formação do CE não dependeu do teor alcoólico das soluções modelo de aguardente no intervalo de concentração estudado, fato este comprovado pelos valores de $k_{obs} \approx 8,9 \times 10^{-5} /s$ e $t_{1/2} \approx 7,80 \times 10^3 s$, a 25°C. Foram também concordantes dentro do erro experimental os valores das constantes de velocidade (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), respectivamente de $(4,00 \pm 0,35) \times 10^{-4} /s$ e $(1,83 \pm 0,35) \times 10^3 s$, a 35°C (Tabela 23). Não é demais lembrar que nestas condições a $[ETOH] \gg \gg [KOCN]$. No entanto, a concentração final de uretana apresentou dependência do teor alcoólico da solução, entendendo-se a variação do teor alcoólico de 1,70 a 91,5% v/v etanol.

A Figura 17 apresenta a relação entre os diferentes teores alcoólicos e a razão concentração de carbamato de etila formado pela concentração de íon cianato adicionada a 35°C ($[CE]_{formado} / [OCN^-]_{adicionado}$). Observa-se que a concentração de carbamato de etila formado, para diferentes soluções modelo de aguardente adicionada com KOCN, aumenta à medida que o teor alcoólico é aumentado. Observa-se também que acima de aproximadamente 60% v/v de etanol (10,3 mol/L), a razão ($[CE]_{formado} / [OCN^-]_{adicionado}$) torna-se constante, aproximadamente igual a 0,35.

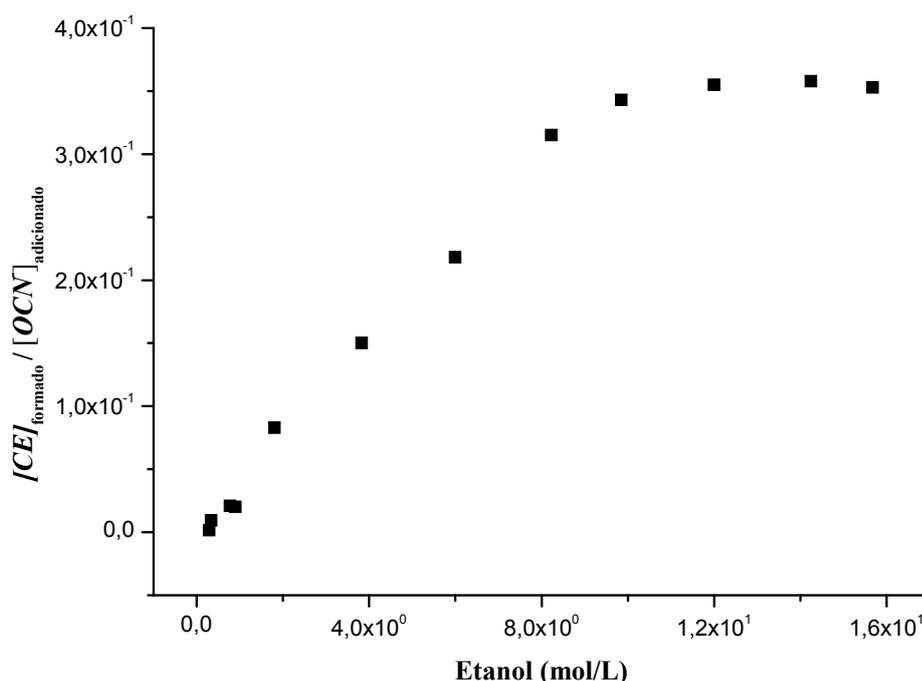


Figura 17. Dependência da formação do carbamato de etila em função do teor alcoólico, para soluções modelo de aguardente adicionadas com $2,10 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN com diferentes teores alcoólicos (1,70 a 91,5% v/v etanol) a 35°C em pH 4,5.

Estes resultados conduzem a reflexões. Nas condições do experimento (Tabela 23), a constante de velocidade não dependeu da concentração de etanol ($0,29 \text{ mol/L} < [CE] < 15,7 \text{ mol/L}$), mas o teor final de carbamato de etila sim. Isto indica que a molécula de etanol não está participando da etapa determinante da reação.

Existe ainda um segundo ponto a considerar. A concentração de etanol superior a aproximadamente 10 mol/L , o rendimento em termos de CE permanece constante. Isto sugere que todo o reagente disponível para a formação de uretana reage com o etanol, indicando a possível existência de uma reação competitiva consumindo este reagente.

4.6 Estudos teóricos sobre a formação de carbamato de etila

O ácido ciânico (HOCN) e o ácido isociânico (HNCO) existem em equilíbrio (Esquema 14):^[80,116]

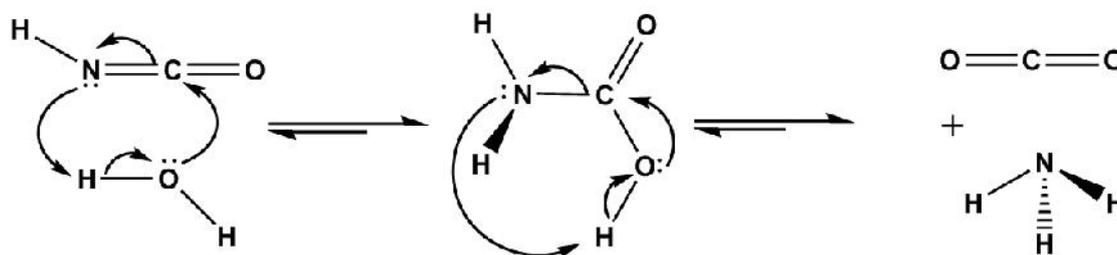


Esquema 14. Equilíbrio do ácido ciânico e isociânico.^[80,116]

A literatura estima a partir de dados de infravermelho, que a concentração de ácido ciânico é no máximo 0,2% da soma dos isômeros.^[116] Os valores de constante de dissociação (K_d) para ambos os ácidos é estimados^[116] em $2,2 \times 10^{-4}$ a 25°C. O aumento da temperatura favorece a formação de HNCO^[116] (Esquema 14).

Como em aguardentes, o pH esta em torno de 4,5, uma fração considerável do cianeto adicionado encontra-se protonado nestas condições ($pK_a = 3,9$). Considerando-se que os valores numéricos para as constantes de velocidade para a formação do CE aumentam com o aumento da concentração hidrogênionica (Tabela 18) é coerente admitir-se que a forma reativa é a forma protonada.

A existência de um dímero do ácido isociânico foi proposta na literatura^[116,124,125] para explicar suas propriedades. Este dímero (NH₂CONCO ou NH₂COOCN), por reação com íons OH⁻, originaria ácido carbâmico e OCN⁻.^[116,124,125] Por outro lado, o ácido isociânico, por hidrólise originaria CO₂ e NH₃ (Esquema 15).



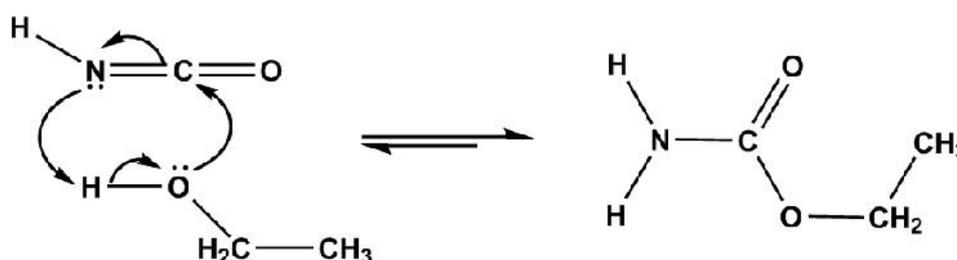
Estado de transição da primeira etapa (TSI): $\Delta E = 39,4$ kcal/mol e $\Delta G = 41,8$ kcal/mol. **Intermediário da reação (INT):** $\Delta E = -19,0$ kcal/mol e $\Delta G = -12,6$ kcal/mol. **Estado de transição da segunda etapa (TSII):** $\Delta E = 21,4$ kcal/mol e $\Delta G = 25,6$ kcal/mol. **Produto complexo (PC):** $\Delta E = -15,1$ kcal/mol e $\Delta G = -13,7$ kcal/mol.

Esquema 15. Proposta de reação paralela entre o HNCO e a água.

Assim, os produtos desta reação (Esquema 15) seriam $-13,7$ kcal/mol mais estáveis que os reagentes, o que implicaria em um valor de K_{eq} igual a $1,1 \times 10^{10}$. Assim, a

decomposição do ácido isocianico poderia ser uma possível etapa, que concorreria com a reação de formação do carbamato de etila. A este ponto é interessante considerar as vias possíveis pelas quais o carbamato de etila pode ser formado, por reação de ácido isocianico ou cianico com etanol.

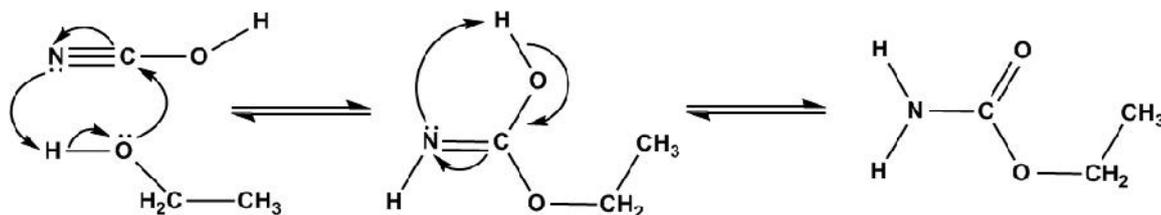
Segundo cálculos quânticos, considerando a presença da molécula de etanol na presença de água, a formação do CE via ácido isocianico seria exotérmica por um $\Delta G - 14,1$ kcal/mol, envolvendo um estado de transição, com $\Delta E 32,9$ kcal/mol e $\Delta G 37,8$ kcal/mol (Esquema 16).



Estado de transição (TS): $\Delta E = 32,9$ kcal/mol e $\Delta G = 37,8$ kcal/mol. **PC:** $\Delta E = - 22,6$ kcal/mol e $\Delta G = - 14,1$ kcal/mol.

Esquema 16. Proposta de formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HNCO e o etanol.

Para o ácido cianico, o valor de ΔG seria de $- 36,7$ kcal/mol na presença de uma molécula do solvente (H_2O). Entretanto, a modelagem prevê dois estados de transição (TSI e TSII), com $\Delta E 46,8$ kcal/mol e $\Delta G 49,0$ kcal/mol para o primeiro e $\Delta E 10,6$ kcal/mol e $\Delta G 13,8$ kcal/mol para o segundo estado de transição (Esquema 17).



TSI: $\Delta E = 46,8$ kcal/mol e $\Delta G = 49,0$ kcal/mol. **INT:** $\Delta E = - 21,1$ kcal/mol e $\Delta G = - 14,4$ kcal/mol. **TSII:** $\Delta E = 10,6$ kcal/mol e $\Delta G = 13,8$ kcal/mol. **PC:** $\Delta E = - 43,2$ kcal/mol e $\Delta G = - 36,7$ kcal/mol.

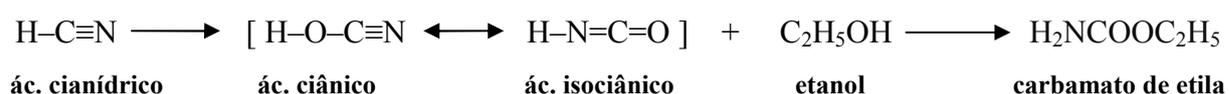
Esquema 17. Proposta de formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HOCN e o etanol.

Portanto, embora termodinamicamente mais favorável que a via envolvendo o ácido isociânico em $-22,6$ kcal/mol, existe uma barreira ditada pelas energias dos estados de transição. Esta, considerando ΔG , favorece a via envolvendo o ácido isociânico por -25 kcal/mol.

Os diagramas das energias relativas (ΔG) encontram-se nos Anexos V, VI e VII.

4.7 Soluções modelo de aguardente adicionada de íons cianeto (CN⁻)

Também é mencionado na literatura^[27,28,59,60] que o ácido cianídrico (HCN) atua como um precursor de carbamato de etila em bebidas (uísque, saque, licor). É proposto que os íons CN⁻ em solução sofreriam uma reação de adição nucleofílica na presença de compostos carbonílicos, tais como a pentanona (C₅H₈O₂), o diacetil (C₄H₆O₂) e o metilglioxal (C₃H₄O₂), originando ácido ciânico (HOCN) e isociânico (HNCO). Estas duas formas na presença de etanol levariam a formação de uretana (Esquema 18).^[80,116]



Esquema 18. Proposta para a formação de carbamato de etila via ácido ciânico/isociânico.^[80,116]

Considerando-se que o carbamato de etila forma-se também após a destilação, procurou-se verificar a formação de uretana em soluções modelo de aguardentes após a adição de cianeto de sódio (NaCN). A Figura 18 ilustra o perfil da variação da concentração de CE em uma aguardente em função do tempo, a qual foi adicionada de NaCN.

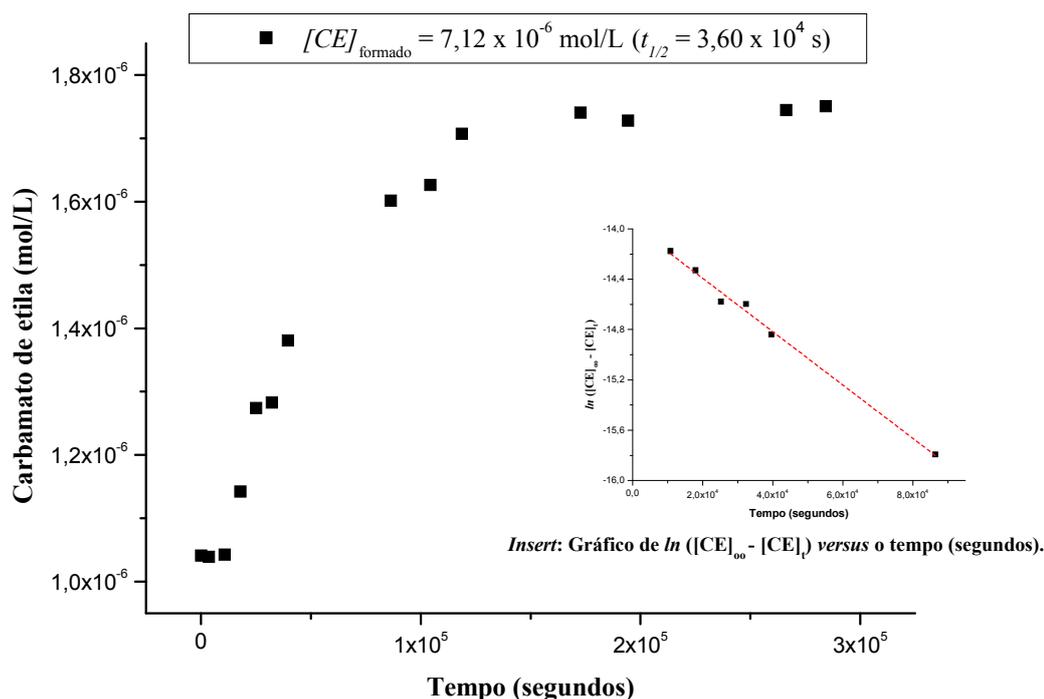


Figura 18. Variação na concentração de carbamato de etila (mol/L) em função do tempo (segundos) para uma solução modelo de aguardente (48% v/v) adicionada de $1,22 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ de NaCN, a 30°C em pH 4,5. *Insert* do gráfico de $\ln ([CE]_{\infty} - [CE]_t)$ versus o tempo (segundos).

Os resultados destes experimentos prévios encontram-se na Tabela 24. Nota-se que a concentração final de carbamato de etila dependeu da concentração de íons cianeto adicionada. Além disto, observa-se uma clara redução nos valores de $t_{1/2}$ em função do aumento da temperatura, fato este comprovado com o aumento do valor das constantes de velocidade observada (k_{obs}).

Tabela 24. Constantes de velocidade (k_{obs}) para o íon CN^- experimental e teórica para o íon OCN^- para soluções modelo de de aguardente (48% v/v), a temperatura de 25, 30, 35 e 37°C , em pH 4,5.

Temperatura	$\frac{[CE]_{\text{formado}}}{[CN^-]_{\text{adicionado}}}$	$k_{obs} [\text{CN}^-]$	* $k_{obs} [\text{OCN}^-]$
30°C	0,06	$2,1 \times 10^{-5} / \text{s}$	$1,8 \times 10^{-4} / \text{s}$
37°C	0,07	$4,9 \times 10^{-5} / \text{s}$	$3,9 \times 10^{-4} / \text{s}$

* Calculado por meio do gráfico de *Ahrrenius* das soluções modelo de aguardente adicionada de KOCN.

Nota-se, outrossim que as constantes de velocidade para a formação da uretana (k_{obs}), em solução contendo NaCN, são inferiores aqueles que ocorrem na presença de KOCN (Tabela 24).

A este ponto não se pode muito esclarecer (teorizar) sobre os mecanismos das reações envolvendo KOCN e NaCN, considerando-se apenas os valores de k_{obs} (Tabela 24). Entretanto, estes apresentam diferenças além do erro experimental. Assim é concebível que os mesmos ocorram por mecanismos que envolvam etapas determinantes diferentes. O estudo das reações envolvendo o NaCN é tema de pesquisa em andamento em nosso laboratório.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Os experimentos indicam que apenas parte do carbamato de etila é transferida durante a destilação. Em aguardentes já estabilizadas, com respeito ao teor de CE, nova destilação reduz o teor de uretana em até 92%.

Para aguardentes recém destiladas, de diferentes origens, foi possível constatar que o CE também se forma após a destilação, e que a formação esta completa após 10 dias. A luz difusa não influencia o processo o qual, entretanto é dependente da temperatura. Se observou que a reação ocorre com k_{obs} de $(6,4 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ /s, a 25°C e pH 4,5, sendo este valor independente da origem da aguardente e da exposição a radiação luminosa (luz difusa). Os parâmetros termodinâmicos calculados para esta reação são ΔH^\ddagger 34 kcal/mol, ΔS^\ddagger - 69 cal/K e ΔG^\ddagger 54 kcal/mol. Foi possível estimar como inferior a 60% em média do CE total, o teor de uretana formado no interior do destilador.

O excesso de uréia presente no vinho pode se decompor pelo aquecimento do mesma no processo de destilação, formando preferencialmente ácido isociânico, o qual originaria CE por reação com o etanol.

Estudos com aguardente as quais foi adicionado KOCN, indicam que ocorre a formação de uretana, com k_{obs} $(8,60 \pm 0,4) \times 10^{-5}$ /s, a 25°C, pH 4,5, com ΔH^\ddagger 20,6 kcal/mol, ΔS^\ddagger - 96,1 cal/K e ΔG^\ddagger 48,7 kcal/mol. Esta reação não é influenciada por radiação luminosa na faixa de 250 a 500 nm, bem como pela concentração em álcool da aguardente na faixa de 0,29 a 15,7 mol/L. Trata-se nestas condições de uma reação que depende da concentração de etanol e de KOCN. A concentração de etanol inferior a faixa estudada, deveria apresentar comportamento de segunda ordem, sendo de ordem 1 em KOCN e ordem 1 em etanol. Com o aumento da concentração de etanol, o gráfico de k_{obs} versus a concentração de etanol deve apresentar um comportamento de saturação, tendo a constante de velocidade observada a altas concentrações de etanol (aguardente). O rendimento no teor de CE aumenta em função do teor

alcoólico do meio, atingindo um valor máximo a 60% v/v, que corresponde a 35% do esperado considerando-se a reação estequiométrica, estudada em função da concentração hidrogeniônica do meio.

Cálculos quânticos sugerem que o HNCO é a molécula reativa. Os resultados experimentais colhidos até o momento sugerem a existência de uma reação paralela consumindo parte do HNCO e, portanto limitando k_{obs} e a relação $[CE]_{teórico} / [CE]_{experimental}$.

Experimentos preliminares sugerem que o cianeto de sódio em meio alcoólico também origina carbamato de etila.

Embora os resultados aqui relatados digam respeito à aguardente de cana, estes também se aplicam a química de etanol para o qual o teor de CE também deverá ser controlado.

REFERÊNCIAS

- 1 PORTAL NIPPO BRASIL: **Cana-de-açúcar coloca o Brasil na vanguarda tecnológica mundial**. Disponível em: <<http://www.nippobrasil.com.br/campo/especiais/especial563.php>>. Acesso em: 06 jul. 2011.
- 2 CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/articles/20320/1/PRODUCAO-DE-CANA-DE-ACUCAR/pagina1.html>>. Acesso em: 10 jun. 2011.
- 3 CANA-DE-AÇÚCAR. **Cana-de-açúcar**: boa alternativa agrícola e energética para a agricultura nacional. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trabcana1.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2011.
- 4 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário estatístico da agroenergia**. Brasília: MAPA, 2009. 160 p.
- 5 PLANETA ORGÂNICO: **Cana-de-açúcar: boa alternativa agrícola e energética para a agricultura nacional**. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trabcana1.htm>>. Acesso em: 26 jul. 2011.
- 6 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 13, 29 de junho de 2005. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para a aguardente de cana e para a cachaça. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de jun 2005. Seção 1, n. 124, p. 3-5.
- 7 EMBRAPA: **Cachaça**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>>. Acesso em: 15 maio 2011.
- 8 INTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA: **Mercado interno**. Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=47>. Acesso em: 15 maio 2011.
- 9 LÓPEZ, R. Cachaça brasileira planeja conquistar mercado externo. **Engarrafador Moderno**, n. 134, p. 6-13, 2005.
- 10 MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. cap. 20, p. 485-550.

11 MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente de cana. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. cap. 12, p. 237-266.

12 LIMA, U. A. **Aguardente: fabricação em pequenas destilarias**. Piracicaba: Ed. FEALQ, 1999. 187p.

13 PEREIRA, J. A. M.; ROSA, C. A.; FARIA, J. B. **Cachaça de qualidade**. Brasília: Ed. LK, 2006. 179p.

14 AQUINO, Francisco Wendel Batista. **Dextranas em açúcar e aguardentes de cana**. 2009. 128 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

15 JERONIMO, Elisangela Marques. **O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça**. 2004. 121 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

16 MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 12, n. 2, p. 29-39, 1994.

17 BRUNO, Sérgio Nicolau Freire. **Adequação dos processos de destilação e de troca iônica na redução dos teores de carbamato de etila em cachaças produzidas no estado do Rio de Janeiro**. 2006. 238 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Rio de Janeiro, 2006.

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

19 PULZATTO, Marcia Edilamar. **Fatores que influem na obtenção de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da fermentação alcoólica**. 2000. 112 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

20 RECHE, R. V.; LEITE-NETO, A. F.; DA SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; DE OSTI, R. Z.; FRANCO, D. W. Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of Brazilian cachaças. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 6603-6608, 2007.

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

- 22 SERAFIM, F. A. T.; BUCHVISER, S. F.; GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Ácidos orgânicos em aguardentes produzidas em alambique e em coluna. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2011.
- 23 AQUINO, F. W. B.; FRANCO, D. W. F. Dextranas em açúcares do estado de São Paulo. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1034-1037, 2008.
- 24 AQUINO, F. W. B.; FRANCO, D. W. Molecular mass distribution of dextran in Brazilian sugar and insoluble deposits of cachaça. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1391-1395, 2009.
- 25 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 21, de 19 de julho de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de jul 2010. Seção 1, n. 137, p. 8.
- 26 ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, v. 259, p. 325-350, 1991.
- 27 EUROPEAN Food Safety Authority. **The EFSA Journal**, v. 551, p. 1-44, 2007.
- 28 WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. **Environmental Chemical Letters**, v. 7, p. 233-247, 2009.
- 29 BELAND, F. A.; BENSON, R. W.; MELLICK, P. W.; KOVATCH, R. M.; ROBERTS, D. W.; FANG, J. L.; DOERGE, D. R. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F₁ mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 1-19, 2005.
- 30 SIGMA. **Urethane**: product information. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=U2500|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC>. Acesso em: 16 maio 2011.
- 31 GOUBET, M.; MOTIYENKO, R. A.; REAL, F.; MARGULES, L.; HUET, T. R.; ASSELIN, P.; SOULARD, P.; KRASNICKI, A.; KRASNICKI, A.; ALEKSEEV, E. A. Influence of the geometry of a hydrogen bond on conformational stability: a theoretical and experimental study of ethyl carbamate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, p. 1719-1728, 2009.
- 32 FORKERT, P. G.; KAUFMANN, M.; BLACK, G.; BOWERS, R.; CHEN, H.; COLLINS, K.; SHARMA, A.; JONES, G. Oxidation of vinyl carbamate and formation of 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine in murine lung. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 5, p. 713-720, 2007.

- 33 GHANAYEM, B. I. Inhibition of urethane-induced carcinogenicity in *Cyp2e1*^{-/-} in comparison to *Cyp2e1*^{+/+} mice. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 2, p. 331–339, 2007.
- 34 BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GUISSASSI, F.; BOUVARD, V.; ALTIERI, A.; COGLIANO, V. Carcinogenicity of alcoholic beverages. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 4, p. 292-293, 2007.
- 35 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **IARC Monographs on the valuation of carcinogenic risks to humans: alcohol consumption and ethyl carbamate**. Lyon: IRAC Group, 2007. v. 96.
- 36 LACHENMEIER, D. W.; LIMA, M. C. P.; NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; KERR-CORRÊA, F.; KANTERES, F.; REHM, J. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **BMC Cancer**, v.10, p. 1-15, 2010.
- 37 GUENGERICH, F. P.; KIM, D. H.; IWASAKI, M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. **Chemical Research in Toxicology**, v. 4, p. 168-179, 1991.
- 38 HOFFLER, U.; EL-MASRI, H. A.; GHANAYEM, B. I. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is the principal enzyme responsible for urethane metabolism: comparative studies using CYP2E1-null and wild-type mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, p. 557-564, 2003.
- 39 LEE, R. P.; PARKINSON, A.; FORKERT, P. G. Isozyme-selective metabolism of ethyl carbamate by cytochrome P450 (CYP2E1) and carboxylesterase (hydrolase A) enzymes in murine liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 26, p. 60-65, 1998.
- 40 HOFFLER, U. AND GHANAYEM, B. I. Increased bioaccumulation of urethane in CYP2E1⁻ versus CYP2E1^{+/+} mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, p. 1144-1150, 2005.
- 41 ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; CAPELLINI, L. T. D.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; BUCHVISER, S. F.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.
- 42 ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1074-1077, 2002.

- 43 MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. **Food Control**, v. 20, p. 139-143, 2009.
- 44 AGERDEO, E.; DUGAR, S.; FOSTER, G. D. SCHENCK, HILARY. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 5795-5802, 2002.
- 45 ABREU, S. M.; ALVES, A.; OLIVEIRA, B.; HERBERT, P. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 498-503, 2005.
- 46 FU, M. L.; LIU, J.; CHEN, O.; LIU, X. J.; HE, G.; CHEN, J. Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1297-1302, 2010.
- 47 DEÁK, E.; GYEPES, A.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; DERNOVICS, M. Determination of ethyl carbamate in pálinka spirits by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry after derivatization. **Food Research International**, v. 43, p. 2452-2455, 2010.
- 48 KIM, Y. K. L.; KOH, E.; CHUNG, H.; KWON, H. Determination of ethyl carbamate in some fermented foods and beverages. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 6, p. 469-475, 2000.
- 49 UTHURRY, C. A.; VARELA, F.; COLOMO, B.; LEPE, J. A. S.; LOMBARDERO, J.; GARCIA DEL, J. R. HIERRO. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. **Food Chemistry**, v. 88, p. 329-336, 2004.
- 50 HERBERT, P.; SANTOS, L. BASTOS, M.; BARROS, P.; ALVES, A. New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 67, n. 5, p. 1616-1620, 2002.
- 51 LACHENMEIER, D. W. Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1407-1412, 2002.
- 52 HASNIP, S.; CREWS, C. POTTER, N.; CHRISTY, J.; CHAN, D. BONDU, T.; MATTHEWS, W.; WALTERS, B.; PATE, K. Survey of ethyl carbamate in fermented foods sold in the United Kingdom in 2004. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2755–2759, 2007.

53 VAHL, M. A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 10, n. 5, p. 585-592, 1993.

54 SERAFIM, F. A. T.; GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Avaliação da concentração de carbamato de etila em amostras de cachaça na última década. **Engarrafador Moderno**, n. 205, p. 24-30, 2011.

55 NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; PAIVA, J. E.; LACHENMEIER, D. W. Ethyl carbamate in cachaça (Brazilian sugarcane spirit): extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1243-1247, 2011.

56 LACHENMEIER, D. W.; KANTERES, F.; KUBALLA, T. LÓPEZ, M. G.; REHM, J. Ethyl carbamate in alcoholic beverages from Mexico (tequila, mescal, bacanora, stool) and Guatemala (cuxa): market survey and risk assessment. **International Journal Research and Public Health**, v. 6, p. 349-360, 2009.

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

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

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

60 RIFFKIN, H. L.; WILSON, R.; HOWIE, D.; MULLER, S. B. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 95, p. 115-119, 1989.

61 TAKI, N.; IAMURA, L.; TAKERE, S.; KOBASHI. Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 38, p. 498-505, 1992.

62 SCHABER, P. M.; COLSON, J.; HIGGINS, S.; THIELEN, D.; ANSPACH, B.; BRAUER, J. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochemica Acta**, v. 424, p. 131-142, 2004.

63 ORDUNÃ, R. M.; LIU, S. Q.; PATCHETT, M. L.; PILONE, G. J. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 31-35, 2000.

64 LAWRENCE, J. F.; PAGE, B. D.; CONACHER, H. B. S.; The formation and determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Advances in Environmental Science and Technology**, v. 23, p. 457-471, 1990.

65 OUGH, C. S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 323-328, 1976.

66 TAKANAO, M.; AOKI, T.; ABE, K.; FUKUTA, N.; HIGUCHI, T.; SASAKI, M.; UCHIDA, K. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 352-356, 1993.

67 UTHURRY, C. A.; LEPE, J. A. S.; LOMBARDELO, J.; DEL HIERRO, J. R. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. **Food Chemistry**, v. 94, p. 262-270, 2006.

68 BRADBURY, J. H. Development of a sensitive picrate method to determine total cyanide and acetone cyanohidrin contents of gari from cassava. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1329-1333, 2009.

69 JONES, D. A. Why are so many food plants cyanogenic? **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 155-162, 1998.

70 OUGH, C. S. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. II possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 328-331, 1976.

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

72 MONTEIRO, F. F.; TROUSDALE, E. K.; BISSON, L. F. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, n. 1, p. 1-8, 1989.

73 HASNIP, S.; CAPUTI, A.; CREWS, C.; BRERETON, P. Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p. 1155-1161, 2004.

- 74 OUGH, C. S.; CROWELL, E. A.; GUTLOVE, B. R. Carbamyl compound reactions with ethanol. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, n. 3, p. 239-242, 1988.
- 75 OUGH, C. S.; CROWELL, E. A.; MOONEY, L. A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: Effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, n. 3, p. 243-249, 1988.
- 76 KODAMA, S.; SUZUKI, T.; FUJINAWA, S.; TEJA, P. L.; YOTSUZUCA, F. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, n. 1, p. 17-24, 1994.
- 77 TEGMO-LARSSON, I. M.; SPITTLER, T. D. Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 4, p. 1167-1169, 1990.
- 78 AYLOTT, R. I.; COCHRANE, G. C.; LEONARD, M. J.; MACDONALD, L. S.; MACKENZIE, W. M.; MCNEISH, A. S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part I: post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, p. 213-221, 1990.
- 79 BOULTON, R. The formation of ethyl carbamate from isocyanate and ethanol at elevated temperatures. In: CANTAGREL, R. (Ed.). **Elaboration et connaissance des spiritueux**. Paris: Tec & Doc, 1992. p 339-343.
- 80 BERTRAND, A. Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin. In: CANTAGREL, R. (Ed.). **Elaboration et connaissance des spiritueux**. Paris: Tec & Doc, 1993. p 279-289.
- 81 MACKENZIE, W. M.; CLYNE, A. H.; MACDONALD, L. S. Ethyl carbamate identification of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in scotch grain whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, p. 223-232, 1990.
- 82 SCHEHL, B.; LACHENMEIER, D.; SENN, T.; HEINISCH, J. J. Effect of the stone content on the quality of plum and cherry spirits produced from mash fermentations with commercial and laboratory yeast strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 8230-8238, 2005.
- 83 TRIOLI, G.; OUGH, C. S. Causes for inhibition of an acid urease from *Lactobacillus fermentus*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, n. 4, p. 245-252, 1989.

- 84 FIDALEO, M.; ESTI, M.; MORESI, M. Assessment of urea degradation rate in model wine solutions by acid urease from *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 6226-6235, 2006.
- 85 MIYAGAWA, K.; SUMIDA, M.; NAKAO, M.; HARADA, M.; YAMAMOTO, H.; KUSUMI, T.; YOSHIKAWA, K.; AMACHI, T.; NAKAYAMA, T. Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 68, p. 227–236, 1999.
- 86 CIPOLLONE, R.; ASCENZI, P.; FRANGIPANI, E.; VISCA, P. Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. **Chemosphere**, v. 63, p. 942-949, 2006.
- 87 IMA, A. J. B.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; LIMA, J. M.; NELSON, D. L. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.
- 88 NEVES, E. A.; OLIVEIRA, A.; FERNANDES, A. P.; NÓBREGA, J. A. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, v. 101, p. 33–36, 2007.
- 89 SOUZA, P. P.; CARDEAL, Z. L.; AUGUSTI, R.; MORRISON, P.; MARRIOTT, P. J. Determination of volatile compounds in Brazilian distilled cachaça by using comprehensive two-dimensional gas chromatography and effects of production pathways. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2881–2890, 2009.
- 90 PARK, S. R.; HA, S. D.; YOON, J. H.; LEE, S. Y.; HONG, K. P.; LEE, E. H.; YEOM, H. J.; YOON, N. G.; BAE, D. H. Exposure to ethyl carbamate in alcohol-drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration. **Food Control**, v. 20, p. 946-952, 2009.
- 91 JANEGITZ, B. C.; OLIVEIRA, A.; GOMES, M. S.; SARTORI, E. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FATIBELLO-FILHO, O. Removal of copper (II) from sugar-cane spirits employing chitosan. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 458-460, 2010.
- 92 BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.
- 93 CAVALCANTI, A. F. **Bidestilação em alambiques de cobre contendo dispositivos de cobre e a sua influência na qualidade da cachaça**. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

- 94 NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Influência do Material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 2, n. 6, p. 735-739, 1998.
- 95 LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1860-1864, 2008.
- 96 NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; PAIVA, J. E.; LACHENMEIER, D. W. Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): influence of distillation and storage conditions. **Food Chemistry**, v. 117, p. 693-697, 2009.
- 97 NAGATO, L. A. F.; SILVA O. A.; YONAMINE, M.; PENTEADO, M. V. C. Quantitation of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. **Alimentaria**, v. 31, p. 31-36, 2000.
- 98 BAFFA JUNIOR, J. C.; SOARES, N. F. F. PEREIRA, J. M. A. T. K.; MELO, N. R. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças comerciais da região da Zona da Mata mineira – MG. **Alimentos e Nutrição – Araraquara**, v. 8, n. 4, p. 371-373, 2007.
- 99 LACHENMEIER, D. W.; SCHEHL, B.; KUBALLA, T.; FRANK, W.; SENN, T. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. **Food Additive and Contaminant**, v. 22, n. 5, p. 397-405, 2005.
- 100 LACHENMEIER, D. W.; NERLICH, U.; KUBALLA, T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 116-120, 2006.
- 101 JARYJ, E.; LORENZ, K.; SPANGENBERG, B. A simple method for the quantification of urethane in spirits. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 1969-1976, 2008.
- 102 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 103 RECHE, R. V.; LEITE-NETO, A. F.; DA SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; DE OSTI, R. Z.; FRANCO, D. W. Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of Brazilian cachaças. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6603-6608, 2007.

- 104 MACABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**. 5. ed. New York: McGraw-Hill. 1993. 1130 p.
- 105 SIMONI, D. A.; ANDRADE, J. C.; FAIGLE, J. F. G.; SIMONI, J. A. Um experimento com propostas múltiplas para um laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1034-1039, 2002.
- 106 LAIDLER, K. J. **Chemical kinetics**. 3. ed. New York: McGraw-Hill: 1987. 531p.
- 107 MONK, P. **Physical chemistry: understanding our chemical world**. Chichester: John Wiley, 2004. 618p.
- 108 AMELL, A. R. Kinetics of the hydrolysis of cyanic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p. 6234-6238, 1956.
- 109 GUILLOTON, M.; KARST, F. A spectrophotometric determination of cyanate using reaction with 2-aminobenzoic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 149, p. 291-295, 1985.
- 110 LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.
- 111 PETERSON, G. A.; BENNETT A.; TENSFELDT, T. G.; AL-LAHAM, M. A.; SHIRLEY, W. A. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. **Journal of the Chemical Physical**, v. 89, n. 4, p. 2193-2218, 1988.
- 112 DUARTE, H. A. Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 501-508, 2001.
- 113 FRANCO, A. C.; ROTA, M. B.; FARIA, J. B. A redestilação da cachaça e a sua influência na qualidade sensorial. **Alimentos e Nutrição – Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 331-334, 2009.
- 114 ROTA, M. B.; FARIA, J. B. Efeito do processo de bidestilação na qualidade sensorial da cachaça. **Alimentos e Nutrição – Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 121-127, 2009.
- 115 GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Carbamato de etila em aguardentes recém destiladas: proposta para o seu controle. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 996-1000, 2011.

116 AMELL, A. R. Kinetics of the hydrolysis of cyanic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 4, p. 6234-6238, 1956.

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

118 SHAW, W. H. R.; BORDEAUX, J. J. The decomposition of urea in aqueous media. . **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 18, p. 4729-4733, 1955.

119 WARNER, R. C. The kinetics of the hydrolysis of urea and of arginine. **Analytical Chemistry**, v. 142, p. 705-723, 1942.

120 WANG, D.; YANG, B.; ZHAI, X.; ZHOU, L. Synthesis of diethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea. **Fuel Processing Technology**, v. 88, n.8, p. 807-812, 2007.

121 TEGMO-LARSSON, I. M.; HENICK-KLING, T. The effect of fermentation and extended lees contact on ethyl carbamate formation in New York wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, n. 4, p. 269-272, 1990.

122 OUGH, C. S.; STEVENS, D.; ALMY, J. Preliminary comments on effects of grape vineyard nitrogen fertilization on the subsequent ethyl carbamate formation in wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, n. 3, p. 219-220, 1989.

123 KOEBEL, M.; ELSENER, M. Determination of urea and its thermal decomposition products by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 689, p. 164-169, 1995.

124 DAVIS, T. L.; BLANCHARD, K. C. Dictanic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 51, n. 6, p. 1806-1810, 1956.

125 BROWN, C. J. The crystal structure of the phenyl isocyanate dimer. **Journal of the American Chemical Society**, p. 2931-2936, 1955.

ANEXOS

Anexo I. Modelo do questionário respondido pelos produtores de aguardente.

Nome do Produtor:		
Nome do Produto:		
Município:	Endereço:	
CEP:	Telefone para contato: ()	Celular: ()
E-mail:	Fax: ()	
Produção anual em litros:		
Qual a variedade da cana utilizada?		
Origem da cana: Própria () Comprada ()		
Cana: Crua () Queimada () Mistura das duas ()		
Se misturar as duas, qual a porcentagem da mistura?		
Tipo de Solo:	Cana Lavada: Sim () Não ()	
Qual o tempo gasto entre o corte da cana e a moagem?		
Choveu durante o período entre o corte e a moagem da cana?		
Usa produto orgânico na lavoura: Sim () Não () Qual:		
Usa defensivo na lavoura: Sim () Não () Qual: _____		
Tipo de Alambique: Cobre () Inox () Alumínio () Outro ()		
Qual o volume do alambique?		
Em caso de alambique misto, especifique o material dos seguintes componentes:		
Panela: _____ Capitel: _____		
Alonga: _____ Serpentina ou Resfriadeira: _____		
Aquecimento do alambique: lenha ou bagaço () vapor produzido em caldeira () gas ()		
A temperatura do alambique é controlada durante a destilação? Sim () Não ()		
Durante a destilação, separa cabeça e cauda: Sim () Não ()		
Se afirmativo qual é o critério que usa para isso?		
Grau alcoólico? Temperatura?		
Qual é o destino da cabeça? Descarte () Nova destilação () Outro ()		
Em caso de outro destino, especifique:		
Qual é o destino da cauda? Descarte () Nova destilação () Outro ()		
Em caso de outro destino, especifique:		
Em caso de nova destilação, a cabeça e a cauda são misturadas? Sim () Não ()		
A cachaça resultante desta nova destilação é misturada com o coração da alambicada anterior ou é utilizada para a produção de outros produtos (licor, batidas)?		

Anexo I. Continuação do modelo do questionário respondido pelos produtores de aguardente.

Quando a destilação é feita em coluna, qual o tipo da mesma? _____

A coluna possui alguma parte em cobre? Sim () Não () Qual: _____

Tipo de fermento usado na fermentação:

Qual o tempo médio em horas da fermentação?

Qual o grau Brix no qual é iniciada a fermentação?

Adiciona uréia ou outra substância durante a fermentação: Sim () Não ()

Qual: _____

Controla a temperatura do processo de fermentação? Sim () Não ()

Em caso afirmativo, qual a temperatura inicial? Qual a temperatura final?

Controla o pH do mosto? Sim () Não ()

Em caso afirmativo, qual o pH?

Qual o material da dorna de fermentação?

Destilação: Simples () Bidestilada ()

Adição de Caramelo: Sim () Não ()

Em caso de resposta afirmativa, informe o teor adicionado:

(a) 0,5 g/L (b) 2 g/L (c) 6 g/L (d) 8 g/L (e) acima de 10 g/L

Adição de Açúcar: Sim () Não ()

Em caso de resposta afirmativa, informe o teor adicionado:

(a) 2 g/L (b) 4 g/L (c) 6 g/L (d) 8 g/L (e) acima de 10 g/L

Aguardente Envelhecida: Sim () Não ()

Tipo de madeira do tonel:

Carvalho () Amendoim () Castanheira () Jequitibá ()

Bálsamo () Amburana () Outros () Qual:

O tonel foi submetido à queima interna?

Sabe estimar a idade do tonel? Volume do tonel em litros:

Tempo de envelhecimento:

A aguardente é envelhecida em mais de um tipo de madeira?

Se afirmativo, quais as madeiras e quanto tempo a aguardente fica em cada tonel?

Obs: Estas informações serão estritamente confidenciais.

Anexo II.

Tabela. Medidas pH, média, valor mínimo e valor máximo de aguardentes comerciais analisadas no LDQA-USP

Aguardente Comercial	pH
A	4,4
B	4,6
C	5,0
D	3,9
E	3,7
F	4,9
G	5,7
H	4,2
I	4,7
J	4,2
K	4,3
L	4,2
M	3,8
N	4,1
O	4,3
P	4,6
Q	3,8
R	5,9
S	3,9
T	4,0
Média dos pHs	4,4
Valor mínimo de pH	3,7
Valor máximo de pH	5,7

Anexo III. Energias relativas ΔG para a degradação da uréia a ácido isociânico (HNCO).

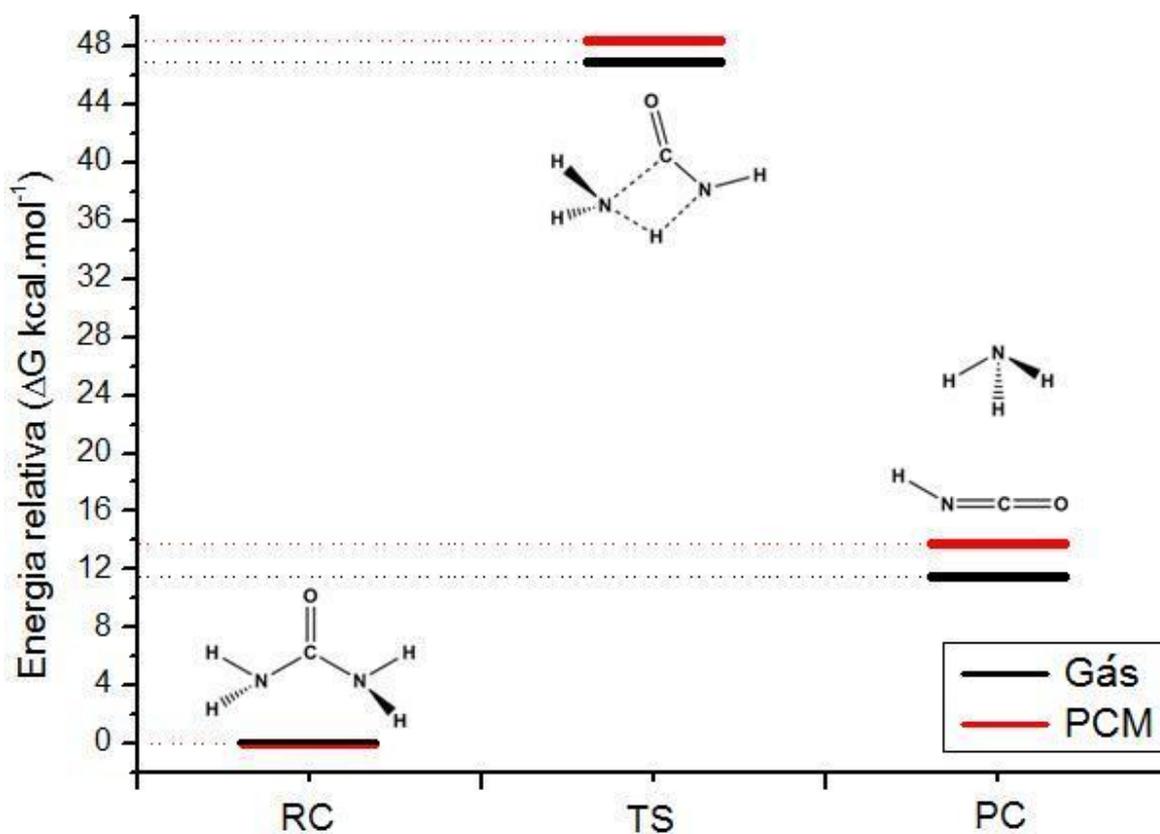


Figura. Energias relativas ΔG para a degradação da uréia a ácido isociânico (HNCO).

Estado de transição (TS): $\Delta E = 51,2$ kcal/mol e $\Delta G = 48,4$ kcal/mol. **Complexo produto (PC):** $\Delta E = 22,4$ kcal/mol e $\Delta G = 13,8$ kcal/mol.

Anexo IV. Energias relativas ΔG para a degradação da uréia a ácido ciânico (HOCN).

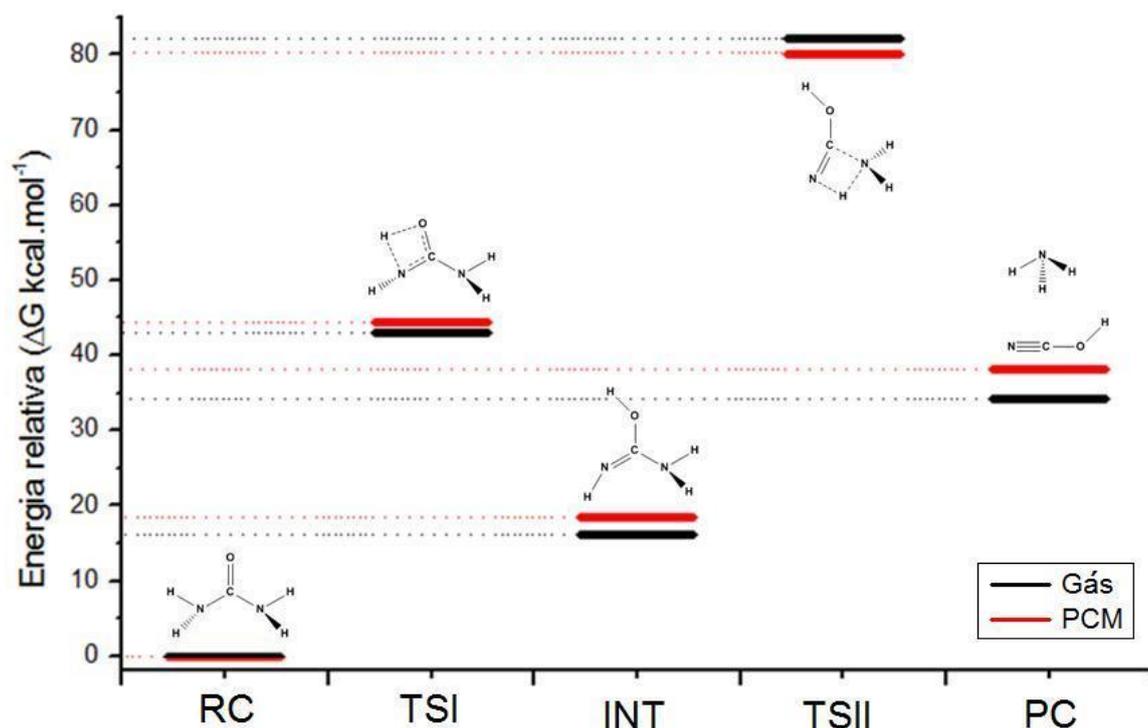


Figura. Energias relativas ΔG para a degradação da uréia a ácido ciânico (HOCN).

Estado de transição da primeira etapa (TSI): $\Delta E = 49,0$ kcal/mol e $\Delta G = 44,4$ kcal/mol.

Intermediário da reação (INT): $\Delta E = 18,6$ kcal/mol e $\Delta G = 18,5$ kcal/mol. **Estado de transição da**

segunda etapa (TSII): $\Delta E = 83,3$ kcal/mol e $\Delta G = 80,2$ kcal/mol. **PC:** $\Delta E = 45,7$ kcal/mol e $\Delta G =$

38,1 kcal/mol.

Anexo V. Energias relativas ΔG para reação paralela entre o HNCO e a água.

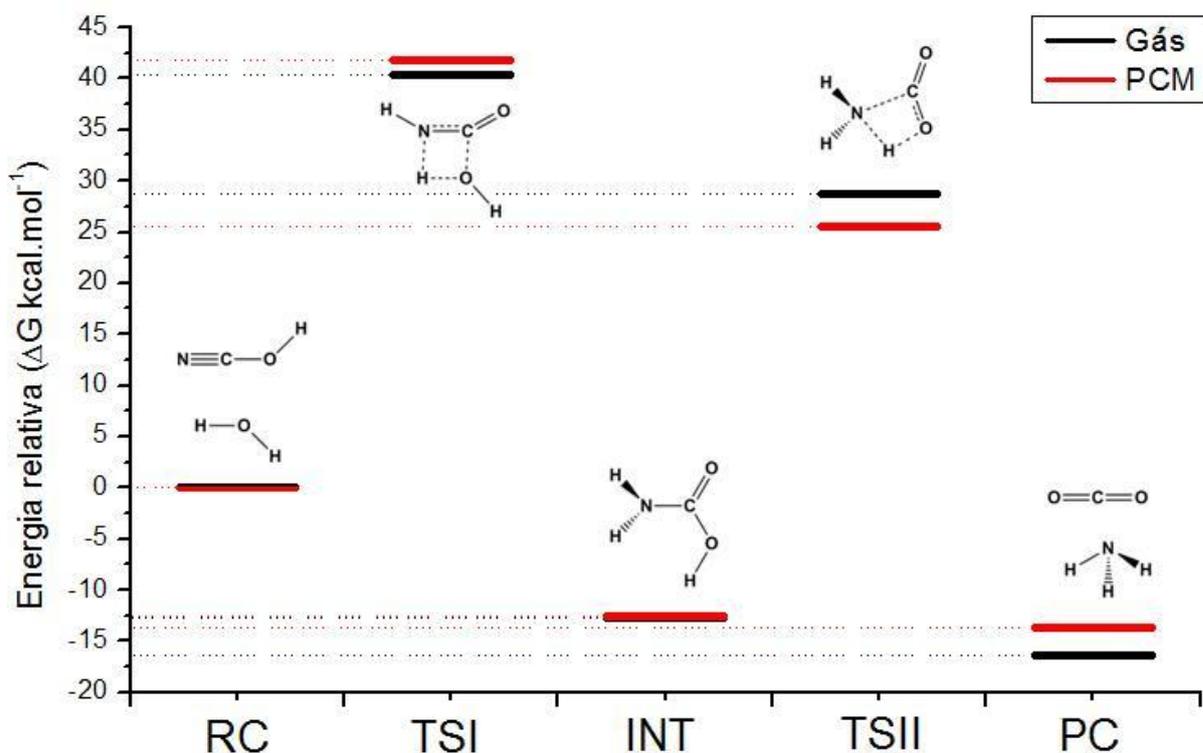


Figura. Energias relativas ΔG para reação paralela entre HNCO e a água.

Estado de transição da primeira etapa (TSI): $\Delta E = 39,4$ kcal/mol e $\Delta G = 41,8$ kcal/mol.
Intermediário da reação (INT): $\Delta E = -19,0$ kcal/mol e $\Delta G = -12,6$ kcal/mol. **Estado de transição da segunda etapa (TSII):** $\Delta E = 21,4$ kcal/mol e $\Delta G = 25,6$ kcal/mol. **Produto complexo (PC):** $\Delta E = -15,1$ kcal/mol e $\Delta G = -13,7$ kcal/mol.

Anexo VI. Energias relativas ΔG para a formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HNCO e o etanol.

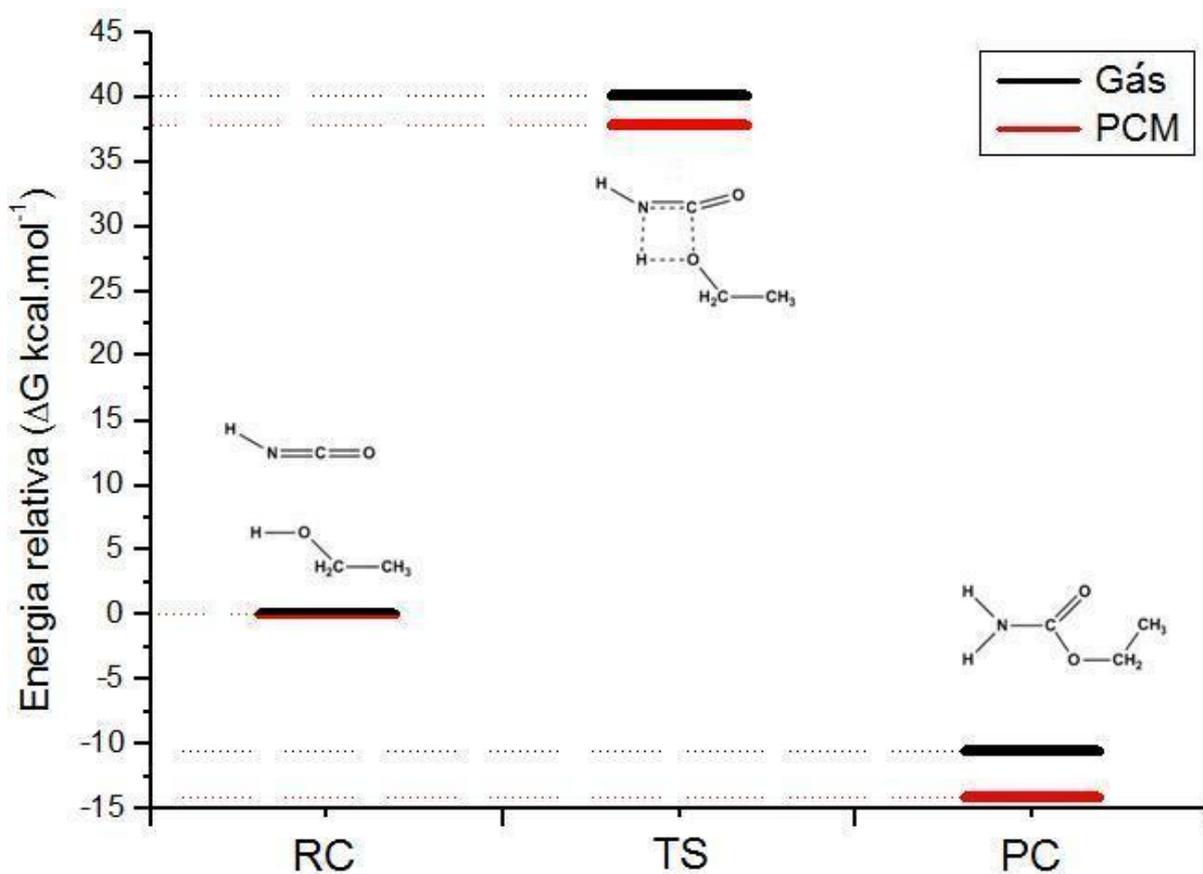


Figura. Energias relativas ΔG para a formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HNCO e o etanol.

Estado de transição (TS): $\Delta E = 32,9$ kcal/mol e $\Delta G = 37,8$ kcal/mol. **PC:** $\Delta E = - 22,6$ kcal/mol e $\Delta G = - 14,1$ kcal/mol.

Anexo VII. Energias relativas ΔG para a formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HOCN e o etanol.

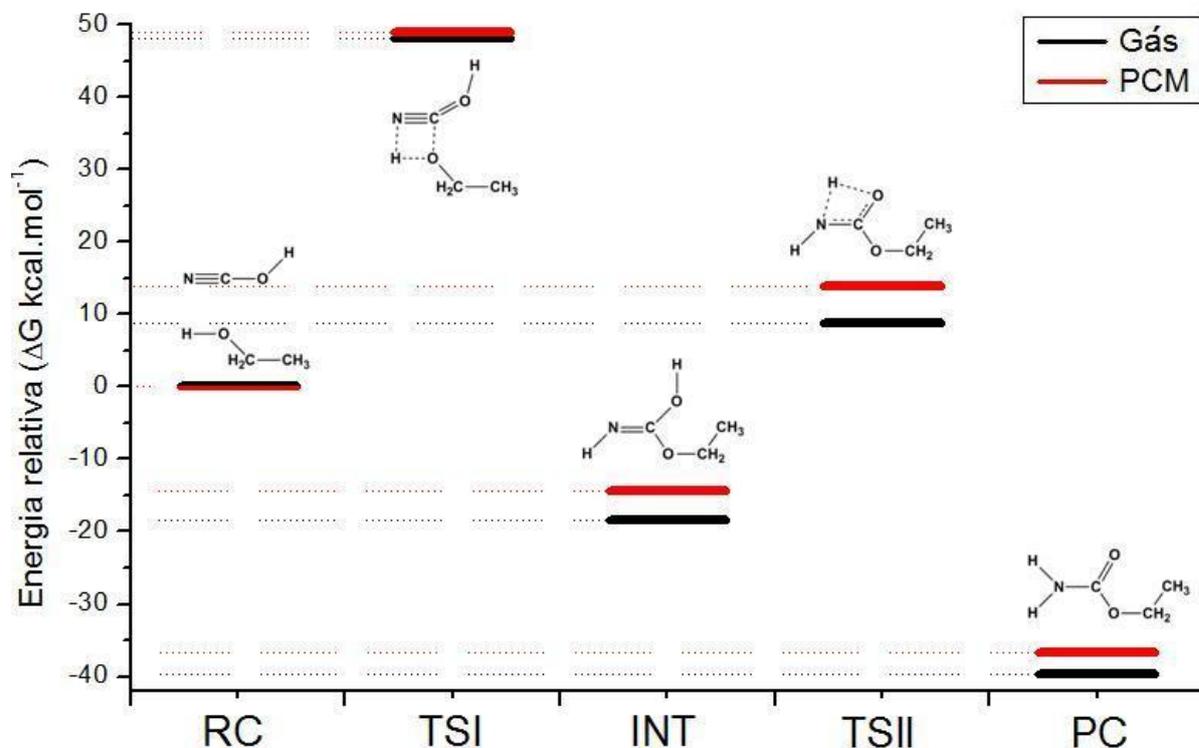


Figura. Energias relativas ΔG para a formação do carbamato de etila a partir da reação entre o HOCN e o etanol.

TSI: $\Delta E = 46,8$ kcal/mol e $\Delta G = 49,0$ kcal/mol. **INT:** $\Delta E = - 21,1$ kcal/mol e $\Delta G = - 14,4$ kcal/mol. **TSII:** $\Delta E = 10,6$ kcal/mol e $\Delta G = 13,8$ kcal/mol. **PC:** $\Delta E = - 43,2$ kcal/mol e $\Delta G = - 36,7$ kcal/mol.