

## CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES EM AGUARDENTES DE CANA

Lidiany Mendonça Zacaroni, Maria das Graças Cardoso,\* Adelir Aparecida Saczk, Wilder D. Santiago e Jeancarlo Pereira dos Anjos

Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

José Masson e Felipe C. Duarte

Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

David Lee Nelson

Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

Recebido em 26/1/10; aceito em 27/8/10; publicado na web em 24/11/10

ANALYSIS OF ORGANIC CONTAMINANTS AND COPPER IN CACHAÇA. The objective of the present study was the evaluation of the presence of organic and inorganic contaminants in samples of aged cachaça from the South of the state of Minas Gerais. Furfural, methanol and copper were determined by colorimetric reactions, while the analyses of ethyl carbamate and acrolein were performed by GC/MS and HPLC, respectively. High levels of furfural and copper were obtained. All samples showed concentrations below the established by legislation for the ethyl carbamate, and for acrolein, only one sample showed higher levels. Methanol was not detected in the samples.

Keywords: beverage; contaminants; wood.

### INTRODUÇÃO

De acordo com o Decreto nº 4851 de 2003 e com a Instrução Normativa nº 13 de 30/6/2005, aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v à 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressas em sacarose. A cachaça, entretanto, foi definida como sendo a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% v/v à 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressos em sacarose.<sup>1,2</sup>

As bebidas alcoólicas fermento-destiladas distinguem-se uma das outras pela presença de componentes secundários que irão formar um “buquê” característico de cada bebida. Esses componentes secundários se formam juntamente com o álcool etílico durante o processo de fermentação do mosto, mudam de caráter e proporção durante a destilação, havendo uma posterior maturação do produto.<sup>3,4</sup> No entanto, alguns compostos são indesejáveis à bebida devido, principalmente, as suas propriedades tóxicas, cancerígenas e características que depreciem a qualidade do produto final.

Devido à complexidade da composição química da cachaça esta é dividida em fração orgânica e inorgânica. A primeira é constituída basicamente de alcoóis, aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, carbamato de etila e compostos sulfurados. Dependendo do teor e dos compostos presentes, a bebida pode ser classificada como desejável ou não, em relação à aceitação sensorial, ou em tóxica e não tóxica, em relação à saúde. A fração inorgânica é constituída principalmente por íons metálicos, tais como alumínio, cádmio, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, ferro, etc.<sup>5</sup>

A legislação brasileira, Decreto nº 2314 de 04/09/1997 estabelece o limite máximo de cobre em 5 mg/L de produto.<sup>6</sup> No entanto, no

mercado internacional o limite máximo estabelecido é de 2 mg/L tornando-se, assim, um entrave para as exportações da bebida.<sup>7</sup> Embora nesta concentração o cobre não possa ser considerado como tóxico, a sua presença contribui para ressaltar o sabor ácido na bebida, além de facilitar os processos oxidativos devido à presença de íons cobre (II).

O metanol é um álcool indesejável na bebida, devido a sua alta toxicidade. Ele origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, durante o processo de fermentação.<sup>4,8</sup>

O furfural, aldeído cuja presença é indesejável na bebida, resulta da decomposição química de carboidratos. Pode ser formado em diferentes etapas do processo de produção da cachaça, tais como pela pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques ou mesmo durante o envelhecimento da bebida por meio da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), que podem estar presentes nos recipientes de madeira utilizados no armazenamento da bebida.<sup>9-13</sup>

A acroleína, também conhecida como 2-propenal, é uma substância carcinogênica oriunda do processo de fermentação, podendo ser formada pela desidratação do glicerol ou por contaminação bacteriana.<sup>8,14</sup> É uma substância extremamente tóxica por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos.<sup>15,16</sup> Os vapores de acroleína são lacrimogênicos, muito irritantes aos olhos, nariz e garganta, podendo associar sua presença ao aroma de pimenta das bebidas.<sup>17</sup>

O carbamato de etila, substância altamente carcinogênica, é um contaminante orgânico, cuja quantificação em aguardentes de cana passou a ser exigida a partir de junho de 2010. É encontrado naturalmente em baixas concentrações, em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados. Sua origem e formação ainda não estão bem elucidadas. Alguns autores acreditam que originam da degradação de aminoácidos, outros que venham de reações entre o etanol e o ácido cianídrico catalisado pelo cobre ou pela auto-oxidação de compostos insaturados induzidos pela radiação ultravioleta.<sup>18-20</sup>

\*e-mail: mcardoso@dqi.ufla.br

O presente trabalho objetivou avaliar a presença de contaminantes orgânicos (furfural, metanol, carbamato de etila e acroleína) e inorgânicos (cobre) em aguardentes de cana da região Sul de Minas Gerais.

## PARTE EXPERIMENTAL

Doze amostras de aguardentes de cana foram coletadas na região sul do Estado de Minas Gerais. As análises físico-químicas (grau alcoólico, metanol, furfural e cobre) foram realizadas segundo parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005 do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

### Reagentes

Os reagentes empregados para análise foram permanganato de potássio, ácido cromotrópico, 2,4-dinitrofenil-hidrazina 99% (2,4-DNPH), bissulfato de sódio, ácido acético, anilina, ambos da Vetec; carbamato de etila 97% e acroleína 99% da Acros Organics; metanol e acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker); água ultrapura, ácido sulfúrico e etanol absoluto da Merck.

### Carbamato de etila

O método empregado para a quantificação do carbamato de etila foi o CG/EM no modo de monitoramento de íons seletivos (SIM). Para as análises, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massas (QP5050A), ambos Shimadzu. O monitoramento de íons seletivos foi empregado e os íons selecionados foram 62, 74 e 89 *m/z*. A coluna utilizada para a separação do carbamato de etila foi DB Wax 60 m x 0,25 mm x 0,50 µm.

Para as análises, empregou-se o modo *split* (1:10), com a temperatura do injetor e do detector à 220 °C. O hélio foi utilizado como o gás de arraste em um fluxo de 1,5 mL/min e o volume de injeção da amostra foi de 2 µL. A temperatura da coluna foi programada como segue: temperatura inicial de 90 °C por 2 min, seguida de uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até 150 °C e a partir desta temperatura, uma rampa de aquecimento de 40 °C/min até 220 °C.

Para a quantificação utilizou-se a técnica de padronização externa. A curva analítica foi preparada por meio da diluição de uma solução estoque de carbamato de etila na concentração de 10 mg/L, cuja variação linear foi de 0,05 a 0,75 mg/L. As amostras e as soluções da curva analítica foram analisadas em triplicata, sendo as primeiras previamente filtradas em membrana GV (*durapore*) em pvdf (0,22 µm x 12 mm).

### Acroleína

A metodologia empregada para a quantificação de acroleína baseou-se na metodologia proposta por Nascimento e colaboradores,<sup>17</sup> que consiste na derivação da amostra para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Os reagentes empregados para análise foram padrão de acroleína, metanol e acetonitrila (grau HPLC), água ultrapura, ácido sulfúrico, etanol absoluto e 2,4-dinitrofenil-hidrazina (2,4-DNPH), previamente purificado por três sucessivas recristalizações com metanol.

Para a preparação da 2,4-dinitrofenil-hidrazona de acroleína, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (2 mL) foi adicionado a 0,4 g de 2,4-DNPH, seguido da adição de 3 mL de água destilada, gota à gota, até a solubilização completa. Imediatamente 10 mL de etanol 95% foram adicionados. Em outro recipiente, dissolveu-se 0,1 g de acroleína em 20 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se a solução preparada anteriormente, deixando a mistura em repouso aproximadamente por 15 min, até a formação de um precipitado. Filtrou-se e recristalizou-se duas vezes

com etanol absoluto. A pureza foi confirmada por determinação da temperatura de fusão e análise elementar (C, H e N) e por HPLC.

A derivação das amostras foi realizada pela adição de 4 mL da amostra e 50 µL de HClO<sub>4</sub> consecutivamente para 1 mL da solução 0,4% de 2,4-DNPH em acetonitrila. A solução resultante foi estocada à temperatura ambiente por aproximadamente 45 min, seguida pela filtragem em membranas de polietileno 0,45 µm (Milipore).

Um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20AD, detector com arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, injetor automático modelo SIL-M20A e forno modelo CTO-20AC foram empregados para análises. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna empacotada Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm), com partículas esféricas de 5 µm, conectada a uma pré-coluna Shim-pack VP-ODS (5,0 cm x 4,0 mm, 5 µm - Shimadzu). A fase móvel utilizada foi ácido acético 2% em água (Solvente A) e metanol (Solvente B). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 0 a 3 min (70% B); 3 a 5 min (70-85% B); 5 a 7 min (85-90% B); 7 a 9 min (90-70% B); 9 a 12 min (70% B). A absorbância foi medida a 365 nm, no fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 40 °C e volume de injeção de 20 µL.

A conversão quantitativa do aldeído nas bebidas destiladas em 2,4-dinitrofenil-hidrazona foi garantida pelo excesso de 2,4-DNPH empregada. A quantificação foi realizada utilizando-se o método de padronização externa. A curva analítica foi obtida por sucessivas diluições da solução-estoque (1000 mg/L em acetonitrila) em solução de álcool 50%, com uma faixa linear de 0-20 mg/L. Essa foi obtida por regressão linear, plotando-se a área do pico versus concentração.

### Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação dos métodos foram estimados utilizando-se os parâmetros da curva analítica, conforme equações abaixo:

$$LD = 3,3 \times s/S \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times s/S \quad (2)$$

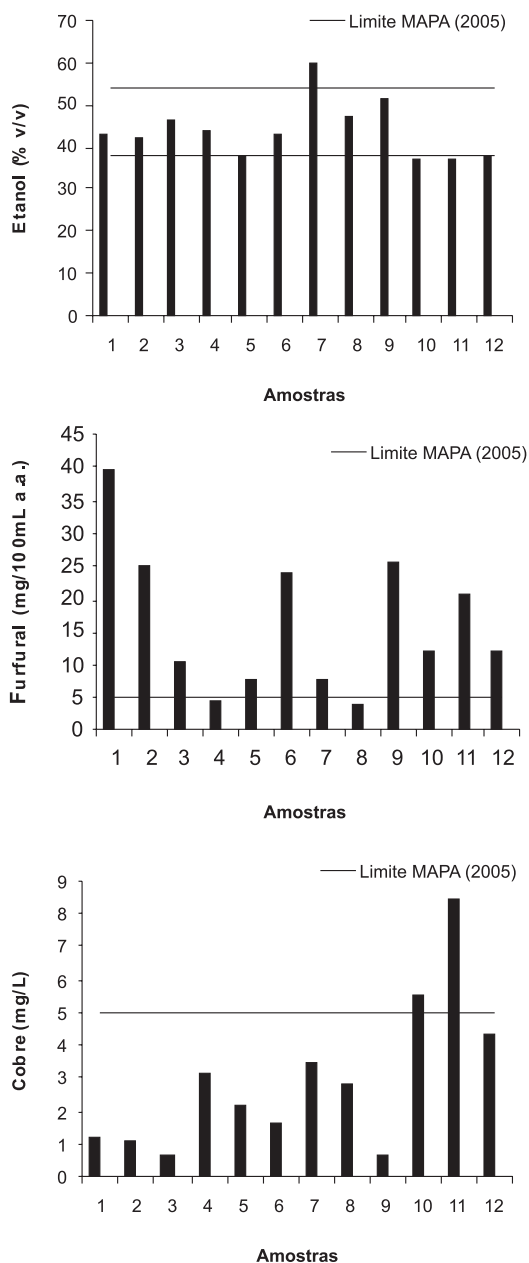
onde, *s* é a estimativa do desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e *S* é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.<sup>21,22</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Teor alcoólico, metanol e furfural

Os resultados obtidos por meio das análises físico-químicas estão representados na Figura 1. Pode-se observar que, das amostras analisadas, 25% se apresentaram fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico, 16,67% quanto ao teor de cobre e 83,33% quanto à presença de furfural. O metanol não foi detectado nas amostras analisadas.

O teor alcoólico elevado observado na amostra 7 pode ser explicado pela utilização da bebida, na fabricação de blends, misturando-a com outras cachaças mais fracas. Quanto aos teores alcoólicos inferiores ao permitido na legislação, para as amostras 10 e 11, podem ser relacionados às condições de armazenamento da bebida, tais como umidade, temperatura e porosidade do barril ou ao corte incorreto durante a etapa de destilação. Pesquisas de Maia e Campelo mostraram que as perdas de etanol podem ser reduzidas durante o envelhecimento, mantendo-se a temperatura da adega abaixo de 20 °C e a umidade relativa do ar em torno de 85%.<sup>23</sup> Entretanto, mesmo



**Figura 1.** Teores de álcool etílico, furfural e cobre nas amostras de aguardente de cana

assim, pode ocorrer perda de 1% ao ano.

As concentrações obtidas nas amostras analisadas quanto ao teor de furfural variaram de 4,28 a 39,78 mg/100 mL de álcool anidro. Pelos resultados apresentados na Figura 1, pode-se observar que a maioria das amostras analisadas se apresenta fora dos padrões de qualidade exigidos, exibindo valores acima do permitido pela legislação brasileira (5 mg/100 mL de álcool anidro), exceto as amostras 4 e 8. Este composto é um aldeído indesejável na bebida, por ser considerado nocivo à saúde. A contaminação da bebida pode ocorrer por meio da degradação de pentoses durante as etapas de fermentação, destilação e envelhecimento da bebida. Outras possíveis formas de contaminação da bebida são por meio da requeima dos barris de madeira, no processo de envelhecimento e pela queima da cana durante a colheita.<sup>9-13</sup>

Estudos realizados por Miranda e colaboradores,<sup>24</sup> em cachaças armazenadas em tonéis de madeira, submetidos ao tratamento de irradiação por período de 390 dias, não mostraram influência do

processo de envelhecimento na formação de furfural. Para esses autores, a presença do contaminante está relacionada ao processo de destilação. Resultados semelhantes foram observados em sidras por Madera e colaboradores,<sup>11</sup> que constataram aumento de furfural apenas nas amostras que passaram por dupla destilação.

Barcelos e colaboradores,<sup>20</sup> analisando cachaças produzidas a partir de cana não queimada, proveniente de três regiões do Estado de Minas Gerais (Zona da Mata, sul de Minas e Vale do Jequitinhonha), verificaram concentrações de furfural dentro do limite estabelecido pelo MAPA. Os autores atribuíram a formação do furfural a falhas durante o processo fermentativo. Masson e colaboradores<sup>13</sup> quantificaram furfural em amostras de cachaças produzidas com cana queimada e não queimada e verificaram que a queima do palhicho da cana-de-açúcar proporcionou um aumento significativo na concentração de furfural nas amostras analisadas. Segundo os autores, durante a queima, a exsudação do açúcar torna-se um excelente aderente ao colmo, de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas e posteriormente para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural, chegando ao produto final.

Um problema comum que preocupa os produtores de aguardente de cana do Estado de Minas Gerais é o excesso de cobre nas bebidas. De acordo com a Figura 1, 16,67% das amostras analisadas apresentaram níveis superiores a 5 mg/L. A presença desse metal se deve principalmente à dissolução do carbonato básico de cobre [ $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ ] presente nas paredes internas do alambique, pelos vapores ácidos da bebida. A contaminação pode ser evitada fazendo-se uma cuidadosa higienização dos alambiques nas safras e entressafras, utilizando-se água e limão na primeira destilação<sup>8</sup> ou filtros com adsorventes, como o carvão ativado e as resinas de troca iônica. Entretanto, recomenda-se um cuidado especial na utilização desses últimos, pois, alguns materiais retiram além do cobre substâncias importantes para o sabor e aroma da bebida, descaracterizando-a.<sup>25-28</sup> Quanto à relação entre o envelhecimento da bebida e o teor de cobre, alguns autores apontam o processo de envelhecimento como uma alternativa para a redução do metal na bebida. Cavalheiro e colaboradores<sup>29</sup> mostraram redução significativa quanto aos teores de cobre em 7 amostras de cachaça, de diferentes procedências, antes e após o armazenamento em tonéis de carvalho com capacidade de 5 L, por um período de 6 meses. Resultados similares foram obtidos por Miranda *et al.*,<sup>24</sup> que atribuíram a redução do cobre a um possível processo de absorção ou de adsorção promovido pela madeira, durante o processo de envelhecimento da bebida.

### Carbamato de etila (CE)

A quantificação do carbamato de etila foi feita utilizando-se a técnica de padronização externa e as curvas analíticas foram obtidas por regressão linear ( $y = 975050x + 2072,75$ ). O coeficiente de correlação obtido para a curva foi de 0,9997 e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados foram de 15,7 e 52,5  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras apresentaram concentrações abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira (150  $\mu\text{g/L}$ ), sendo a maior concentração encontrada de 119  $\mu\text{g/L}$ . Esses resultados se equiparam ao de Barcelos, que também não encontrou níveis de carbamato de etila nas cachaças do Sul de Minas Gerais.<sup>20</sup>

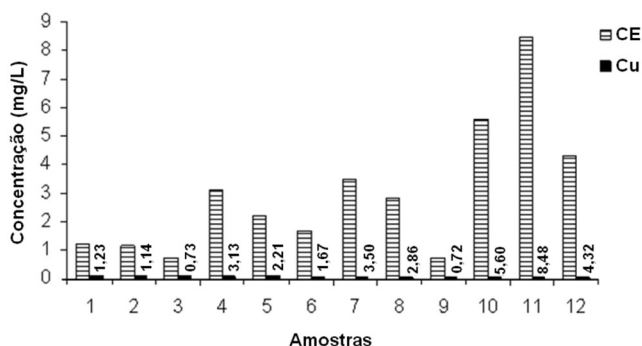
Diversos autores relatam a presença elevada desse contaminante em aguardentes de cana. Andrade Sobrinho *et al.*,<sup>30</sup> investigando a presença de CE em amostras de cachaças, tiquira, grapa e uísque, relataram que elas apresentaram teores médios de 770, 2400, 45 e 140  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente, observando que as amostras de cachaça

e tiquira apresentaram maiores concentrações para esse composto quando comparadas àquelas obtidas para as demais bebidas, além de estarem com a concentração de CE acima do limite exigido pela legislação.

Barcelos e colaboradores,<sup>20</sup> avaliando amostras de aguardente de cana de três diferentes regiões do Estado de Minas Gerais (Sul de Minas, Zona da Mata e Vale do Jequitinhonha), obtiveram valores que variaram de não detectado a 700 µg/L, encontrando um teor médio de 243 µg/L. Dentre as regiões estudadas, apenas as amostras do Vale do Jequitinhonha apresentaram níveis superiores ao estabelecido pelo MAPA para o contaminante em estudo.

Estudos de Labanca *et al.*,<sup>31</sup> com 71 amostras de aguardente de cana provenientes de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, demonstraram teores médios de 893 µg/L. Segundo os autores, 35% das amostras apresentaram teores de carbamato de etila entre 500 e 1000 µg/L e 12% continham teores 10 vezes maiores que o estabelecido pela legislação.

Para alguns autores, a realização da destilação da cachaça em alambiques de cobre poderia ser uma agravante na formação do carbamato de etila, já que há a possibilidade de esse metal atuar como catalisador nas reações de formação desse contaminante.<sup>19</sup> Porém, não se observou correlação entre o material do alambique e teores elevados de carbamato de etila nas amostras analisadas (Figura 2). Estes resultados corroboram com estudos realizados recentemente, como os de Barcelos *et al.* e Masson.<sup>20,32</sup>



**Figura 2.** Comparação entre os teores de cobre e carbamato de etila nas amostras analisadas do Sul de Minas Gerais (CE – carbamato de etila e Cu – cobre)

Acredita-se que a formação do CE durante o período de armazenamento da cachaça ocorra de maneira gradativa, por meio da reação entre o etanol e a ureia formada pela degradação de precursores nitrogenados, intrínsecos do processo de produção da bebida, sendo os principais deles os aminoácidos arginina, ornitina e citrulina. Além desses, outros compostos nitrogenados têm sido estudados como possíveis precursores para a formação do carbamato de etila antes e após o processo de destilação, como é o caso do fosfato de carbamila e do íon cianeto.<sup>33,34</sup>

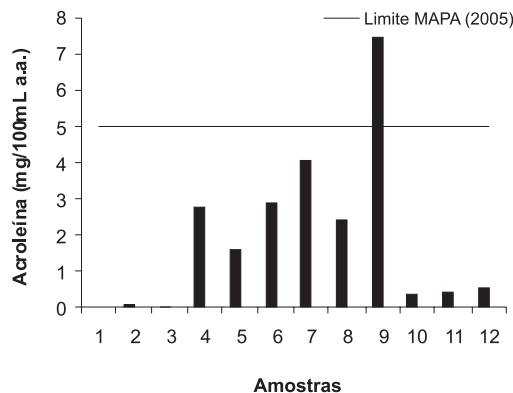
Diversos trabalhos relatam a influência positiva do tempo de estocagem e da temperatura na formação de carbamato de etila em vinhos e cachaças.<sup>35-38</sup> Nesse processo, a provável via de formação do carbamato de etila seria por meio da reação do etanol com ureia e com citrulina.

### Acroleína

A curva analítica foi obtida por regressão linear ( $y = 133686,58x - 2471,76$ ) e o coeficiente de correlação de 0,9999, sendo  $y$  a área do pico obtida por meio das análises de acroleína e  $x$  a concentração

correspondente. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,02758 e 0,09194 mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente.

As concentrações de acroleína presentes nas amostras de aguardente de cana analisadas estão mostradas na Figura 3.



**Figura 3.** Concentrações de acroleína nas amostras de aguardente de cana analisadas do Sul de Minas Gerais

Pela análise dos resultados, pode-se observar valores para teores de acroleína de não detectado a 7,45 mg/100 mL de álcool anidro. Dentre as amostras analisadas, somente a amostra 9 se apresentou fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira, estando sua concentração acima do limite estabelecido de 5 mg/100 mL de álcool anidro.

Na literatura são encontrados poucos relatos sobre a quantificação de acroleína em aguardentes de cana. Nascimento e colaboradores, analisando 56 amostras de aguardentes de cana oriundas de vários estados do Brasil, obtiveram concentrações que variaram de não detectada a 0,660 mg/100 mL de álcool anidro.<sup>17</sup> Posteriormente, Nascimento *et al.*, avaliando a influência da destilação de aguardentes de cana em alambiques confeccionados com cobre e aço inox, quanto à presença de alcoóis, ésteres, ácidos, aldeídos e cetonas, não detectaram a presença de acroleína nas 3 amostras analisadas, provenientes de cada alambique.<sup>39</sup> Em 2006, Braga avaliou a presença de acroleína em aguardentes de cana produzidas com três linhagens de leveduras com temperatura de fermentação controlada (20 e 32 °C) e encontrou níveis inferiores a 0,7 mg/100 mL de álcool anidro para o contaminante.<sup>40</sup> Esses valores relatados na literatura mostram-se bem inferiores aos resultados obtidos para a maioria das amostras analisadas no presente trabalho.

Para Azevedo e colaboradores, esse contaminante pode ser formado durante o processo de fermentação da bebida, por meio da degradação do glicerol, podendo também estar associado à presença de bactérias termofermentativas (*Bacillus amaracrylus* e *Lactobacillus colinoides*).<sup>41</sup>

### CONCLUSÃO

Em termos físico-químicos, 25% das amostras analisadas apresentaram-se fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico, 16,67% quanto ao teor de cobre e 83,33% quanto à presença de furfural. Todas as amostras apresentaram concentração abaixo do estabelecido pela Legislação (150,00 µg/L) para o carbamato de etila e, para a acroleína, apenas uma amostra apresentou níveis superiores a 5,00 mg/100 mL de álcool anidro. O metanol não foi detectado nas amostras analisadas.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológica (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de



Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida e apoio financeiro, aos produtores pelo fornecimento de amostras, ao Departamento de Química da UFLA e ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa pelo suporte nas análises.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Decreto nº 4851 de 02/11/ 2003, *Diário Oficial da União*, Brasília, 03/10/2003.
2. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução normativa nº 13 de 29/6/ 2005, *Diário Oficial da União*, Brasília, 30/6/2005, Seção 1.
3. Almeida, M. E. W.; Barreto, H. H. C.; *Revista do Instituto Adolf Lutz* **1971**, *31*, 117.
4. Pereira, N. E.; Cardoso, M. G.; Azevedo, S. M.; Morais, A. R.; Fernandes, W.; Aguiar, P. M.; *Ciência e Agrotecnologia* **2003**, *27*, 1068.
5. Siebalde, H. G. L.; Canuto, M. H.; Lima, G. M. de; Silva, J. B. B.; *Informe agropecuário* **2002**, *23*, 59.
6. Brasil, Leis, decretos, etc.; Decreto nº 2.314 de 04/9/1997, *Diário Oficial da União*, Brasília, 05/9/1997.
7. Azevedo, S. M.; *Ciência e Agrotecnologia* **2003**, *27*, 618.
8. Cardoso, M. G.; *Produção de aguardente de cana*, 2ª ed., UFLA: Lavras, 2006.
9. Moreno, M. V. G.; Barroso, C. G.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7556.
10. Ledauphin, J.; Guichard, H.; Saint-Clair, J. F.; Picoche, B.; Barillier, D.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 433.
11. Madrera, R. R.; Gomis, D. B.; Alonso, J. J. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7969.
12. Risner, C. H.; Kiser, M. J.; Dube, M. F.; *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 179.
13. Masson, J.; Cardoso, M. G.; Vilela, F. J.; Pimentel, F. A.; Morais, A. R.; Anjos, J. P.; *Ciência e Agrotecnologia* **2007**, *31*, 1805.
14. Sauvageot, N.; Gouffi, K.; Laplace, J. M.; Auffray, Y.; *International Journal of Food Microbiology* **2000**, *55*, 167.
15. Nougier, T.; Marty, J. L.; *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 453.
16. Fleet, G. H.; *Food Science and Technology: LWT* **2003**, *86*, 11.
17. Nascimento, R. F.; Marques, J. C.; Lima Neto, B. S.; Keukeleire, D.; Franco, D. W.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *782*, 13.
18. Mackenzie, W. M.; Clyne, A. H.; Macdonald, L. S.; *Journal of the Institute of Brewing* **1990**, *96*, 223.
19. Aresta, M.; Boscolo, M.; Franco, D. W.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2819.
20. Barcelos, L. V. F.; Cardoso, M. G.; Vilela, F. J.; Anjos, J. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1009.
21. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC method development*, 2ª ed., Wiley: New York, 1997.
22. Harris, D. C.; *Análise química quantitativa*, 7ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2008.
23. Maia, A. B. R. A.; Campelo, E. A. P.; *Sebrae/MG/Sindbebedas*, Belo Horizonte, 2006.
24. Miranda, M. B.; Hori, J.; Alcarde, A. R.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, *26*, 772.
25. Neves, E. A.; Oliveira, A.; Fernandes, A. P.; Nóbrega, J. A.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 33.
26. Cantão, F. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2006.
27. Lima, A. J. B.; Cardoso, M. G.; Guerreiro, M. C.; Pimentel, F. A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 247.
28. Cantanhede, L. B.; Lima, J. B.; Lopes, G. S.; Farias, R. F.; Bezerra, C. W. B.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2005**, *25*, 500.
29. Cavalheiro, S. F. L.; Andrade-Sobrinho, L. G.; Cardello, H. M. A. B.; *B. CEPPA* **2003**, *21*, 99.
30. Andrade-Sobrinho, L. G.; Boscolo, M.; Lima-Neto, B. S.; Franco, D. W.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1074.
31. Labanca, R. A.; Glória, M. B. A.; Afonso, R. J. C. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1860.
32. Masson, J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2009.
33. Cook, R.; Mccaig, N.; Mcmillan, J. M. B.; Lumsden, W. B.; *Journal of the Institute of Brewing* **1990**, *96*, 233.
34. Lawrence, J. F.; Page, B. D.; Conacher, H. B. S.; *Advice Environment Science Technology* **1990**, *23*, 457.
35. Stevens, D. F.; Ough, C. S.; *American Journal Enology and Viticulture* **1993**, *44*, 309.
36. Hasnip, S.; Caputi, A.; Crews, C.; Breton, P.; *Food Addit. Contam., Part A* **2004**, *21*, 1155.
37. Andrade Sobrinho, L. G.; Cappelini, L. T. D.; Silva, A. A.; Galinaro, C. A.; Bushviser, S. F.; Cardoso, D. R.; Franco, D. W.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 116.
38. Nóbrega, I. C. C.; Pereira, J. A. P.; Paiva, J. E.; Lachenmeier, D. W.; *Food Chem.* **2009**, *117*, 693.
39. Nascimento, R. F.; Cardoso, D. R.; Lima-Neto, B. S.; Franco, D. W.; Faria, J. B.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 735.
40. Braga, V. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
41. Azevêdo, L. C.; Reis, M. M.; Silva, L. A.; de Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1968.