Thiago Hideyuki Kobe Ohe

**Estudo das principais rotas de formação de carbamato de etila
em aguardente de cana**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em química analítica e inorgânica.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Douglas Wagner Franco

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2016

DEDICATÓRIA

À memória de Douglas Wagner Franco.
E especialmente à minha família.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado de um grande esforço conjunto. E que com poucas palavras é impossível agradecer e citar todos que merecem. No entanto, não posso deixar de agradecer a presença de algumas pessoas nesta jornada.

Aos meus pais Ana e Mário, que sacrificaram seus sonhos para que os meus fossem realizados e me deram muito mais do que precisei. E à minha irmã Thaís que amo tanto.

À minha querida companheira Marcela que esteve ao meu lado em todos os momentos. E sempre incentivou e acreditou neste sonho.

Ao professor Douglas pela valiosa orientação e amizade.

Aos professores Benedito, Daniel e Stanislau, do Grupo de Química Inorgânica e Analítica, que dividiram suas experiências, me acolheram e ajudaram em momentos difíceis.

Aos amigos de laboratório que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho: Felipe, Peter, Alexandre, Vinícius, Antônio, Augusto, Thiago, Ivonete, Silmara, Flávio, Thaís e Irene. Sem vocês tudo seria mais difícil.

Aos amigos que fiz durante este período: Andressa, Beatriz, Carlos, Carol, Cidinha, Cláudia, Daniele, Fernanda, Fernando, Glauco, Henrique, Ivan, Jennifer, Joacilia, João, Jonatan, Larissa A., Larissa R., Letícia, Marcela, Papa, Patrícia, Pedro, Regina, Renato, Stephano e Veroneide. Por todo o apoio e momentos de alegria.

Ao professor Frank e sua aluna Fernanda pela colaboração e atenção cedida.

Ao IQSC-USP, CAPES, CNPq e FAPESP.

RESUMO

As propriedades de fluorescência da 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona, produto da reação entre o íon cianato e o ácido 2-aminobenzóico possibilitaram o desenvolvimento de um método simples, sensíveis, seletivo e reprodutível para a análise de íons cianato em meio aquo etanólico. O método foi aplicado a análises de íons cianato em diferentes frações do destilado de cana e os dados sugerem uma forte correlação entre a presença de ureia no vinho, e as concentrações de íons cianato e de carbamato de etila (CE) no destilado. A citrulina apresenta-se também como uma fonte de íons cianato, tendo como um de seus produtos o CE na presença do etanol. Acompanhando-se no destilado recém-obtido as variações nas concentrações de íons cianato e de carbamato de etila em função do tempo, observa-se que à medida que diminui a concentração de íons cianato há um aumento na concentração de carbamato de etila. Foram estudados os aspectos cinéticos e termodinâmicos da formação de CE por meio da reação entre íons cianato e o etanol. Os valores das constantes de velocidade para o consumo do íon cianato e para a de formação de CE são de $(8,0 \pm 0,4) \times 10^{-5}$ e de $(8,90 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, a 25 °C em solução etanólica 48% (v/v) com pH 4,5. Nas condições experimentais, as constantes de velocidade são independentes das concentrações de etanol e dos íons cianato, porém são dependentes da acidez pH e apresentam os valores dos parâmetros de ativação de $\Delta H^\ddagger = 19,4 \pm 1 \text{ kcal/mol}$, $\Delta S^\ddagger = -12,1 \pm 1 \text{ cal/K}$ e $\Delta G^\ddagger = 23,0 \pm 1 \text{ kcal/mol}$. Cálculos computacionais empregando-se teoria do funcional de densidade (DFT) sugerem que os valores calculados de $\Delta H_1^\ddagger$, $\Delta S_1^\ddagger$ e $\Delta G_1^\ddagger$ estão de acordo com os obtidos experimentalmente e condizem com o mecanismo proposto. Observa-se que íons de Cu(II) catalisam a oxidação de íons cianeto à cianato promovendo a formação de CE. Além disso, íons de Cu(II) pode se coordenar com alguns precursores de CE.

Palavras-chave: Aguardente de cana, carbamato de etila, íons cianato.

ABSTRACT

Based on the fluorescence properties of 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinedione, a product of the reaction between cyanate and 2-aminobenzoic acid, a simple, sensitive, selective, and reproducible method for the cyanate analysis in aqueous ethanolic media is proposed. The method was applied to cyanate analysis in different fractions of sugarcane distillate and the data strongly suggest a correlation between the presence of urea in wine, and cyanate and ethyl carbamate (EC) concentrations in the spirit. Citrulline also presents itself as a cyanate source, having EC as one of its products in the presence of ethanol. Monitoring changes in cyanate and EC concentrations as function of the time in freshly distilled sugar cane spirit, it was observed that as the cyanate concentration decreases, the EC concentration increases. Thermodynamic and kinetic aspects of EC formation through the reaction between cyanate and ethanol were investigated. The rate constant values for cyanate ion decay and EC formation are $(8.0 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ and $(8.90 \pm 0.4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, respectively, at 25 °C in 48% ethanolic solution at pH 4.5. Under the investigated experimental conditions, the rate constants are independent of the ethanol and cyanate concentrations but increase as the temperature increases ($\Delta H^\ddagger = 19.4 \pm 1 \text{ kcal/mol}$, $\Delta S^\ddagger = -12.1 \pm 1 \text{ cal/K}$ e $\Delta G^\ddagger = 23.0 \pm 1 \text{ kcal/mol}$) and decrease as pH solution increases. According to molecular modeling (DFT) that was performed to analyze the reaction mechanism, Isocyanic acid is the active EC precursor. The calculated $\Delta H_1^\ddagger$, $\Delta S_1^\ddagger$ and $\Delta G_1^\ddagger$ values are in very good agreement with the experimental ones. The copper effect on EC formation reaction was also studied. Copper acts on the cyanide oxidation reaction and could coordinate with some EC precursors.

Keywords: sugar cane spirit, ethyl carbamate, cyanate.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Exemplos de aparelhos que são utilizados para destilação do caldo de cana fermentado. 18
- Figura 2** – Estrutura química da arginina, citrulina e carbamoil fosfato. 20
- Figura 3** - Aparato utilizado para fermentação: 1 - dornas de aço inox, 2 – serpentinas de metal e 3 – banho termostatizado. 25
- Figura 4** - Fluxograma do procedimento adotado na etapa de fermentação. 26
- Figura 5** - Alambique de cobre. 1 – caldeira, 2 – termômetro, 3 – coluna com prato , 4 – deflagrador, 5 – capitel e 6 – serpentina em recipiente para circulação de água. 27
- Figura 6** - Espectro de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) do ácido 2-aminobenzóico. Dados de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7,69 (dd, J = 8,0 e 1,6 Hz, 1H); 7,21 (t, J = 7,6 Hz, 1H); 6,73 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,49 (t, J = 7,6 Hz, 1H). 35
- Figura 7** - Espectro de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) da 2,4-(1H,3H)-quinazolinediona. Dados de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11,26 (s, 1H); 11,18 (s, 1H); 7,89 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,70 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H); 7,63 (t, J = 7,8 Hz, 1H); 7,18 (d, J = 5,4 Hz, 1H); 6,79 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,55 (t, J = 7,5 Hz, 1H)... 35
- Figura 8** – Gráfico de concentração de íons cianato em função intensidade de fluorescência em soluções aquo etanólicas (40%) para: (■) pH = 3,5; (▲) pH = 4,5; (●) pH=5,5. 36
- Figura 9** - Gráfico de concentração de íons cianato em função da intensidade de fluorescência em soluções aquo etanólicas com pH 4,5 para: (●) 0% etanol; (◆) 40% etanol (■) 70% etanol. 37
- Figura 10** – Espectros de absorção (a) e de emissão (b) de soluções contendo a 2,4-(1H,3H)-quinazolinediona formada pela reação entre íons cianato (1×10^{-3} mol/L) e o ácido 2-aminobenzóico (1×10^{-2} mol/L) em misturas de água e etanol (40% v/v). Espectro de emissão do branco (c). 38
- Figura 11** - Formação de carbamato de etila ao longo do tempo em aguardentes de cana tamponadas (47% v/v, $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4,5, 25°C) com adição de 5×10^{-3} mol/L de uréia, íons cianato, íons cianeto, L-arginina, L-citrulina e carbamoil fosfato após 10 dias da destilação. 43
- Figura 12** – O Ciclo da ureia. As enzimas que catalisam essas reações estão distribuídas entre a matriz mitocondrial e o citosol. Um grupo amino entra no ciclo da ureia como carbamoil-fosfato, formado na matriz; o outro entra como aspartato, produzido na matriz pela transaminação entre o oxaloacetato e glutamato, catalisada pela aspartato-aminotransferase. O ciclo da ureia consiste em quatro passos. 1. Formação de citrulina a partir da ornitina e carbamoil-fosfato. 2. Produção de argino-

succinato, via um intermediário citrullil-AMP. 3. Formação da arginina a partir do argino-succinato. 4. Formação de ureia; esta também regenera a ornitina.45

Figura 13 – Concentração de CE em destilados onde o processo de destilação foi conduzido em coluna de vidro. Os precursores ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) foram adicionados no início da etapa de fermentação do caldo de cana.47

Figura 14 – Concentração de CE em solução etanólica 40% (v/v), pH 4,5 a 75 °C em função do tempo contendo 1×10^{-2} mol/L de arginina e de citrulina.49

Figura 15 – Concentração de CE (mol/L) em função do tempo a partir de 0,05 mol/L de citrulina em soluções contendo 10, 20 e 40% de etanol (v/v), pH 4,5 a 75 °C.50

Figura 16 – Sobreposição de espectros de ^1H RMN de uma solução de citrulina (preto) e de um padrão de ornitina (azul). O espectro de ^1H RMN foi obtido a partir do aquecimento a 85°C durante 24 horas de uma solução de etanol 10% (v/v) com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina. O pico em 3,06 ppm, referente a ornitina, foi monitorado.52

Figura 17 – Aumento da concentração de ornitina observado em função do tempo no meio reacional envolvendo o aquecimento a 75°C de uma solução de etanol 10% (v/v) com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina.53

Figura 18 – Espectros de fluorescência ($\lambda = 410$ nm) em função do tempo para a identificação da presença de íons cianato no meio reacional envolvendo o aquecimento a 75°C de uma solução de etanol 10% (v/v) com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina na reação de formação de CE.54

Figura 19 – Concentrações de íons cianato e de CE em aguardentes recém destiladas em função da concentração de uréia adicionada ao caldo fermentado.56

Figura 20 – Gráfico típico do consumo de ureia (A) e íons cianato (B) e formação de carbamato de etila (C) em função do tempo (10% etanol, 89°C e $5,7 \times 10^{-3}$ mol/L de ureia).57

Figura 21 – Espectros de massas do CE formado a partir da uréia não marcada (a), uréia marcada (b) e de uma amostra (c) contendo uma mistura de volumes equivalentes (1:1) das soluções (a) e (b).58

Figura 22 – Espectros de FTIR-ATR das superfícies das placas de cobre expostas aos vapores da destilação de soluções etanólicas (10% v/v) fortificadas com 5×10^{-3} mol/L de KCN, KOCN e uréia.62

Figura 23 – Concentração de carbamato de etila em cachaças obtidas de vinhos fortificados com ureia, CuSO_4 , FeSO_4 e ácido antranílico.64

Figura 24 – Formação de carbamato de etila (A) e decaimento de íons cianato (B) em soluções etanólicas 40% (v/v) tamponadas ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4,5) contendo 1×10^{-3} mol/L de KOCN a 45°C.65

Figura 25 – Formação de carbamato de etila ao longo do tempo em aguardente de cana (42% etanol, $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4,7, 25°C) após sucessivas adições de 5×10^{-3} mol/L de cianato de potássio. A seta indica o momento da segunda adição de cianato de potássio.66

Figura 26 – Variação da energia de Gibbs relativa da formação de CE, obtida através de cálculos computacionais com o método de solvente explícito, através da reação entre o ácido isociânico e o etanol.69

Figura 27 – Variação da energia de Gibbs relativa da formação de CE, obtida através de cálculos computacionais com o método de solvente explícito, através da reação entre o ácido cianico e o etanol.70

Figura 28 – Rotas de formação de carbamato de etila em aguardentes de cana.73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Maiores estados brasileiros produtores de aguardente de cana.	15
Tabela 2 - Teores de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida.	15
Tabela 3 - Itens analisados para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para a aguardente de cana e para cachaça de acordo com o MAPA	17
Tabela 4 – Parâmetros das curvas de calibração para diferentes valores de pH.....	38
Tabela 5 - Parâmetros das curvas de calibração para diferentes concentrações de etanol.	39
Tabela 6 – Determinações de íons cianato na presença de íons estranhos, uréia e carbamato de etila.	40
Tabela 7 – Concentrações de íons cianato ^a e de carbamato de etila na fração “coração” de cachaças destiladas com e sem adição de uréia ao vinho. O dados apresentados são valores da média de 3 repetições das medidas ($p \leq 0,05$).	41
Tabela 8 - Concentrações de íons cianato e carbamato de etila nas frações de aguardentes de cana destiladas com adição de uréia. O dados apresentados são valores da média de 3 repetições das medidas ($p \leq 0,05$)	42
Tabela 9 – Teores de CE nos destilados do caldo de cana fermentado fortificado com diferentes concentrações de arginina ([Arg]), utilizando serpentinas de diferentes materiais para o controle da temperatura durante a fermentação.....	46
Tabela 10 – Constantes de formação de CE em soluções com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina em diferentes temperaturas e teor alcoólico.....	51
Tabela 11 - Constantes de decaimento da uréia e dos íons cianato e de formação do carbamato de etila em soluções aquo etanólicas (5×10^{-3} mol/L de uréia, pH = 4,5, ácido acético/acetato de sódio) em diferentes temperaturas e graduação alcoólica.	59
Tabela 12 – Parâmetros de ativação para uma reação selecionada.	59
Tabela 13 – Formação de CE em soluções modelo (10% etanol e pH 4,5) fortificadas com 1×10^{-2} mol/L de CN^- a 75°C na presença de íons metálicos e de cobre metálico após 2 horas.....	60
Tabela 14 – Concentração de CE ($\mu\text{g/L}$) em destilado utilizando coluna de vidro preenchida ou não com cobre (Cu) metálico na forma de <i>pellets</i> a partir de solução modelo (10% de etanol, pH 4,5) fortificada com precursores de CE. Os dados apresentados são valores da média de 2 repetições da medida ($p \leq 0,05$)	61

Tabela 15 – Valores da concentração de carbamato de etila ([CE]) formado, da constante de velocidade observada (k_{obs}) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) a partir de soluções aquo etanólicas fortificadas com $2,0 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN em diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), pH e teor alcoólico (% v/v).67

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações estudadas: dados experimentais (Exp), DFT em fase gasosa (Gás), DFT com solvatação implícita (IEFPCM) e DFT com efeito explícito do solvente (S.E.).....71

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Vias propostas para a formação do carbamato de etila envolvendo a uréia.	19
Equação 2 – Formação do carbamato de etila envolvendo o íon cianeto e tendo o cobre(II) como catalisador.	20
Equação 3 – Formação do carbamato de etila através do ataque da molécula de água ao ciano complexo de cobre em solução alcoólica.	21
Equação 4 - Formação do carbamato de etila através do ataque do etanol ao ciano complexo de cobre.	21
Equação 5 – Formação de carbamato de etila a partir do HNCO e HOCN durante o processo de destilação.	22
Equação 6 – Reação de derivatização dos íons cianato.	30
Equação 7 – Reações estudadas através de cálculos computacionais (DFT/B3LYP): (A) reação de isomerização dos ácidos isociânico e ciânico, (B) formação de CE através da reação entre o ácido isociânico e o etanol e (C) formação de CE por meio da reação entre o ácido ciânico e o etanol e (D) a reação de hidrólise do ácido isociânico formando NH_3 e CO_2	32
Equação 8 – Proposta da sequência de reações enzimáticas no metabolismo da arginina em vinhos por bactérias. Onde ADI (do inglês, “ <i>arginine deiminase</i> ”), OTC (do inglês, “ <i>ornithine transcarbamylase</i> ”) e CK (do inglês, “ <i>carbamate kinase</i> ”) são as enzimas responsáveis pelo processo.	48
Equação 9 – Proposta para a rota de formação de carbamato de etila a partir da citrulina em meio aquo etanólico.	55

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aguardente de cana-de-açúcar	16
1.2. Sistemas de produção	17
1.3. Carbamato de etila	18
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Fermentação e destilação.....	25
3.1.1. Fermentação do caldo de cana-de-açúcar.....	25
3.1.2. Destilação	26
3.2. Reagentes.....	27
3.3. Equipamentos	27
3.4. Determinação de uréia.....	28
3.5. Determinação de carbamato de etila.....	29
3.6. Determinação de íons cianato	29
3.7. Estudo da influência do aumento da superfície interna de cobre na coluna de destilação.....	30
3.8. Experimentos para determinação dos parâmetros cinéticos.....	31
3.9. Cálculos computacionais.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Desenvolvimento de método para a determinação de íons cianato e identificação da 2,4-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-quinazolinediona.....	34
4.1.1. Efeito do pH e da concentração de etanol na análise de íons cianato	36
4.1.2. Influência de íons estranhos, uréia e carbamato de etila na determinação de íons cianato.....	39
4.2. Avaliação do método desenvolvido em modelo: Adição de uréia ao vinho e destilado	40
4.3. Investigação dos principais precursores de carbamato de etila	42
4.8. A influência da presença de compostos nitrogenados, durante a etapa de fermentação, no teor final de CE no destilado.....	43

4.5. Estudo da decomposição térmica da uréia atuando como fonte de íons cianato na reação de formação de carbamato de etila.....	55
4.6. Efeito da presença de alguns íons metálicos e do cobre metálico na reação de formação de carbamato de etila.....	60
4.7. Possíveis armadilhas dos precursores de CE.	63
4.4. Aspectos cinéticos e termodinâmicos da formação de carbamato de etila a partir da reação entre o etanol e os íons cianato.....	64
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

O acordo para o reconhecimento mútuo e proteção da cachaça e da tequila firmado em 2016, entre o Brasil e o México, tem como objetivo melhorar o trabalho de promoção e defesa da cachaça em mercados internacionais. Antes, apenas os Estados Unidos da América e a Colômbia reconheciam a cachaça como um destilado genuinamente brasileiro. Com os acordos de reconhecimento da cachaça, empresas de outros países estão proibidas de usar o termo “cachaça” em seus produtos. Espera-se, assim, um aumento nas exportações do produto, pois a famosa “caipirinha” será oficialmente vendida nas lojas no exterior.¹⁻³

As exportações de cachaça atualmente estão abaixo do potencial de mercado, estima-se que menos de 1% do volume produzido é exportado. Na verdade, este número persiste há muitos anos. Em comparação com o México, que em 2015 exportou mais de 180 milhões de litros para mais de 120 países, o Brasil exportou pouco mais de 7 milhões de litros para 61 países. Assim, tornam-se exemplos a serem seguidos, o modelo organizacional adotado pelo México com a Tequila e o do Reino Unido com o *Scotch Whisky*, pelo setor produtivo da cachaça.¹⁻³

Existem, no Brasil, mais de 4 mil marcas de aguardente registradas e cerca de 40 mil produtores. Destes, 98% são referentes à micro empresas. Cerca de 80% do volume total de aguardente produzido é oriundo da produção industrial e aproximadamente 20% é de origem artesanal. A produção de aguardente se tornou importante na economia brasileira, gera uma receita em torno de US\$ 500 milhões e mais de 600 mil postos de trabalho. Destacam-se na produção de cachaça os estados brasileiros (Tabela 1), pela ordem: São Paulo, Pernambuco, Ceará e Minas Gerais, responsáveis por aproximadamente 70% do produto.³⁻⁵

Tabela 1 - Maiores produtores brasileiros de aguardente de cana.

Estados Produtores	Produção Nacional (%)
São Paulo	45
Pernambuco	12
Ceará	11
Rio de Janeiro	8
Minas Gerais	8
Goiás	8
Paraná	4
Paraíba	2

Fonte: Adaptação das referências 3–5.

O carbamato de etila ($\text{H}_2\text{NCOOCH}_2\text{CH}_3$, CE), de ocorrência natural na cachaça, é amplamente estudado devido ao seu reconhecido potencial carcinogênico e controle pelos órgãos de regulamentação.^{6,7} Está presente em bebidas alcoólicas e em alimentos fermentados. A presença de CE em concentrações superiores a 150 µg/L dificulta a exportação de nossa bebida.^{7–10} A Tabela 2 ilustra o limite máximo estabelecido para bebidas alcoólicas em diversos países.

Tabela 2 - Teores de carbamato de etila (µg/L) estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida.

País	Vinho	Vinho fortificado^a	Uísque	Saque	<i>Fruit Brandy</i>	Aguardente de cana
Canadá	30	100	150	200	400	-
EUA	15	100	-	-	-	-
República Tcheca	30	100	150	200	400	-
França	-	-	150	-	400	-
Alemanha	-	-	-	-	800	-
Brasil	-	-	-	-	-	210

Fonte: Adaptação das referências 8 e 10. ^a – Vinho que teve seu teor alcoólico ajustado através de adição de etanol.

No exterior, a preocupação com o carbamato de etila teve início na década de 80 no Canadá.⁸ No Brasil, somente em 2005 o governo brasileiro visando a exportação da cachaça se preocupou em definir teores limites para o carbamato de

etila.⁶ A implantação do limite máximo para o carbamato de etila no destilado foi e continua a ser fato controverso, pois atualmente em nosso país, é estabelecido o teor máximo de 210 µg/L. Enquanto que no exterior, geralmente, é estabelecido o valor de 150 µg/L para os destilados.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento⁶ – MAPA, por meio de sua Instrução Normativa nº13 de 29/06/2005, estabeleceu o prazo de 3 anos, contados a partir de 2005, para a adequação dos teores de contaminantes. A exceção foi o carbamato de etila, com prazo estabelecido de 5 anos. Assim, o limite de 150 µg/L deveria ser implantado em junho de 2010. No entanto, este prazo foi prorrogado em 2 anos, devendo passar a vigorar a partir de 2012.⁹ Em 2014, foi publicada no Diário Oficial da União a Instrução Normativa nº 28 estabelecendo o limite superior de carbamato de etila permitido em aguardente de cana.¹⁰ Este valor não deverá ser superior a 210 µg/L. A decisão foi tomada após consulta pública, entre maio e junho de 2014.¹¹

1.1. Aguardente de cana-de-açúcar

A aguardente de cana-de-açúcar é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v ou ABV (do inglês, “*alcohol by volume*”) a 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L.⁶ Cachaça 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.⁶ Assim, segundo esta definição toda cachaça é uma aguardente, mas nem toda aguardente é uma cachaça.

Compostos secundários como o metanol, o carbamato de etila, a acroleína, o 2-butanol e o 1-butanol, são classificados como contaminantes orgânicos.⁶ O cobre, o chumbo e o arsênio são classificados como contaminantes inorgânicos.⁶ A Tabela 3 apresenta os itens analisados para a fixação dos padrões de identidade e de qualidade para a aguardente de cana e para cachaça.

Tabela 3 - Itens analisados para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para a aguardente de cana e para cachaça de acordo com o MAPA.

Item analisado	Tolerância	Unidade
Grau alcoólico	38 a 54%	v/v a 20°C
Cobre	5	mg/L
Acidez volátil (expresso em ácido acético)	150	mg/100 mL de A. A.
Ésteres totais (expresso em acetato de etila)	200	mg/100 mL de A. A.
Aldeídos (expresso em aldeído acético)	30	mg/100 mL de A. A.
Furfural + hidroximetilfurfural	5	mg/100 mL de A. A.
Álcoois superiores (pela soma dos álcoois n-propílico, iso-butílico e isoamílico)	360	mg/100 mL de A. A.
Soma dos componentes secundários	200 a 650	mg/100 mL de A. A.
Metanol	20	mg/100 mL de A. A.
Carbamato de etila	210	µg/L
Chumbo	200	µg/L
Arsênio	100	µg/L
Acroleína	5	mg/100 mL de A. A.
Álcool sec-butílico	10	mg/100 mL de A. A.
Álcool n-butílico	3	mg/100 mL de A. A.
Açúcares (expresso em sacarose)	6	g/L
Açúcares (expresso em sacarose) para cachaça adoçada	>6 e <30	g/L

Fonte: Adaptação da referência 6. A. A. = álcool anidro.

1.2. Sistemas 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. Esta última etapa não é considerada obrigatória.¹²⁻¹⁴

O vinho, produto resultante da fermentação alcoólica, é composto principalmente por água (89 a 94%), etanol (5 a 8%) e por uma fração minoritária (<1%) composta por um grande número de substâncias, como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos, cetonas e álcoois.¹⁵⁻¹⁷

Dois tipos de sistemas são comumente utilizados para a destilação do vinho: alambique (cobre) e coluna (aço inoxidável). A Figura 1 ilustra os aparelhos utilizados para a destilação do caldo de cana fermentado. Sabidamente, a escolha do material afeta diretamente a qualidade final do produto.¹⁵⁻¹⁷

Aparelhos construídos exclusivamente em aço inox conduzem a produtos com características sensoriais desagradáveis, relacionadas aos teores de dimetil sulfeto (H_3CSCH_3), liberado no processo e que permanece no produto final.¹⁴⁻¹⁶ O emprego de dispositivos construídos com cobre, no aparelho destilador, diminui a ocorrência de compostos com propriedades organolépticas negativas.¹⁶⁻¹⁸

Figura 1 – Exemplos de aparelhos que são utilizados para destilação do caldo de cana fermentado.

Fonte: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Qualidade da Cachaça, Unesp, Araraquara – SP.

1.3. Carbamato de etila

O carbamato de etila é um éster etílico do ácido carbâmico (NH_2COOH), possui massa molar de 89,09 g/mol, temperatura de ebulição entre 182 e 185 °C e temperatura de fusão de 49 °C.^{7,8,19} É encontrado na forma de cristais incolores e inodoros, sendo solúvel em água (100 mg/mL) produzindo uma solução transparente e incolor. É também solúvel em etanol (1,2 g/mL), clorofórmio (1,2 g/mL), óleo de oliva (31 mg/mL), glicerol (400 mg/mL) e éter (666 mg/mL).¹⁹ Pode ser encontrado em diversos alimentos e bebidas fermentadas, como por exemplo: queijos, iogurtes, molhos de soja, pães, vinhos, vodka, rum e cerveja.⁷

Muitos esforços são despendidos com o intuito de conhecer as reações de formação e os precursores de carbamato de etila em alimentos e bebidas, bem como o desenvolvimento de técnicas para a sua quantificação e controle.^{8,20-26} A formação de carbamato de etila durante a etapa de fermentação ocorre por meio de

reações influenciadas pelo tipo de levedura, nutrientes adicionados ao mosto, tais como a uréia, a concentração de etanol, a temperatura, o pH, o tempo de estocagem e a incidência de luz.^{8,20-26}

A principal via de formação do carbamato de etila em bebidas destiladas consiste na reação do etanol com compostos nitrogenados como a uréia, cianidrina, íons cianeto, cianato e isocianato.^{7,8,27} Encontram-se na literatura evidências do aumento na concentração de carbamato de etila em bebidas recém destiladas ao longo da primeira semana após a sua produção, a partir deste período o teor permanece constante.^{22,24,28,29} O sistema (alambique ou coluna), a geometria do aparelho e a maneira como é conduzida a destilação são fatores que também influenciam nos teores de carbamato de etila em aguardente de cana.^{16-18,20,28,30}

Diversas rotas são propostas para a formação do carbamato de etila. Dentre estas, merece destaque a que envolve a reação de uréia (H_2NCONH_2) em meio ácido na presença de etanol.^{7,8,27,31-33} A uréia (Equação 1) decompõe-se termicamente em amônia (NH_3) e ácido isociânico (HNCO), que se encontra em equilíbrio com o ácido ciânico (HOCN), e este reage com o etanol levando à formação de CE.^{7,8,27,31-33} A decomposição da uréia em íons isocianato (OCN^-) e cianato (NCO^-) em solução hidro alcoólica, em temperaturas entre 60 e 100°C, também conduz a formação de CE.^{7,8,27,31-33}

Equação 1 – Vias propostas para a formação do carbamato de etila envolvendo a uréia.

Fonte: Autoria própria.

Metabólitos formados durante a fermentação, principalmente durante a fermentação malolática, como a citrulina ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$), arginina ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) e o

carbamoil fosfato ($\text{H}_2\text{NCOOPO}_3\text{H}_2$) são considerados precursores do CE.^{7,8,27,32,34,35} A Figura 2 ilustra a estrutura química da arginina, citrulina e carbamoil fosfato.

Figura 2 – Estrutura química da arginina, citrulina e carbamoil fosfato.

Fonte: Autoria própria.

Outra fonte natural de formação de CE envolveria o íon cianeto (CN^-).^{7,8,27,32} Embora ainda não devidamente isolados, mas por analogia com outros vegetais, acredita-se que a cana-de-açúcar contenha glicosídeos cianogênicos.^{23,36–38} Estes podem ser enzimaticamente degradados gerando açúcar e a respectiva cianidrina ($\text{R}_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$). Esta última molécula se decompõe rapidamente originando íons CN^- . Os íons cianeto são oxidados a íons cianato (OCN^-) e estes reagem com o etanol para formar o CE.^{7,8,23,27,32,36–38}

O íon cianato (NCO^-) e o seu isômero isocianato (OCN^-) são considerados os principais precursores do carbamato de etila em bebidas destiladas.^{7,8,27,32,39–41} A formação dos íons NCO^- e OCN^- , a partir do íon cianeto (CN^-), durante a produção de aguardente, ainda não está bem esclarecida.^{20,39,42}

As principais propostas de reações que envolvem o íon cianeto ocorrem na presença dos íons de $\text{Cu}(\text{II})$ e/ou de $\text{Fe}(\text{II})$, que atuariam como catalisadores da reação.^{39,42} As Equações 2, 3 e 4 representam propostas da literatura para a formação do CE envolvendo o íon cianeto e $\text{Cu}(\text{II})$.

Equação 2 – Formação do carbamato de etila envolvendo o íon cianeto e tendo o cobre(II) como catalisador.

Fonte: Referência 42.

Equação 3 – Formação do carbamato de etila através do ataque da molécula de água ao ciano complexo de cobre em solução alcoólica.

Fonte: Referência 42.

Equação 4 - Formação do carbamato de etila através do ataque do etanol ao ciano complexo de cobre.

Fonte: Referência 42.

Taki et al. (1992) adicionaram sais de cianeto (KCN, $\text{Ni(CN)}_2 \cdot 2\text{KCN}$, CuCN), cianato (KOCN) e o tiocianato (KCNS) em saque, licor e soluções modelo de etanol e observaram que a concentração final de CE depende do teor alcoólico e da concentração do sal adicionado.³⁹

O carbamato de etila tem baixa volatilidade ($\text{PE} \approx 182 - 185^\circ\text{C}$), em destilados não deveria ser transferido ao destilado em uma destilação bem conduzida.¹⁹ Somente uma pequena fração do CE em solução é transportada durante a destilação.^{20,22,30,41,43,44}

Devido ao seu baixo ponto de ebulição ($< 30^\circ\text{C}$), o ácido cianídrico (HCN) é destilado e pode reagir com o etanol na presença de cobre metálico ou íons complexos de cobre (azinhavre) no interior da coluna, originando ácido isociânico (HNCO) e ácido ciânico (HOCN) e, então, o CE. Esta reação ocorreria preferencialmente em aparelhos confeccionados em cobre.^{7,8,20,42}

A formação do CE ocorre a partir do ácido isociânico e do ácido ciânico durante o processo de destilação, pois estes ácidos gerados durante a destilação poderiam reagir com o etanol ou produzir intermediários como o ácido carbâmico e o cianato de etila, que levariam a formação de carbamato de etila no destilado.^{7,8,27,29,40,42} A Equação 5 representa estas reações.

Equação 5 – Formação de carbamato de etila a partir do HNCO e HO-CN durante o processo de destilação.

Fonte: Referência 42.

Uma das maneiras de se evitar a formação de carbamato de etila em bebidas destiladas, considerando seu elevado ponto de ebulição, é a eliminação de íons cianeto e íons cianato presentes na matéria prima antes da etapa da destilação.^{7,8} Devido ao íon de Cu (II) ser considerado um possível catalisador para a formação de CE, encontra-se na literatura diversas propostas para a sua remoção em bebidas após a destilação.^{7,8,42} São exemplos, a percolação do destilado por resinas de troca iônica, carvão ativado, carvão vegetal, quitosana, tratamento com CaCO_3 ou MgCO_3 e pela dupla destilação da bebida.^{25,30,45-50} No entanto, estes procedimentos podem extrair outros compostos além dos íons de cobre, como álcoois superiores, aldeídos e ésteres, que são indispensáveis à qualidade sensorial da bebida.^{28,30,45}

Menos frequentes, são os estudos com foco nas reações químicas que levam a formação de carbamato de etila em aguardentes de cana. Normalmente, as conclusões são limitadas a extrapolações e analogias com o que foi descrito para outras matrizes. Existem algumas similaridades qualitativas entre a composição química de diferentes destilados, mas, certamente, de acordo com a matéria prima utilizada em suas respectivas produções, diferenças devem existir.

Seguindo esta abordagem, no Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente (LDQA), os esforços são direcionados para investigar a gênese e o controle de carbamato de etila em cachaças. Os experimentos permitiram verificar que aguardentes destiladas em alambiques apresentam menor teor de carbamato de etila do que as destiladas em coluna, e que pelo menos 60% do carbamato de etila presente em aguardente de cana é formado após a destilação.^{22,29} Sua formação se completa em uma semana a partir do ponto em que seu teor se mantém constante.^{22,29} Em relação às aguardentes recém-destiladas, a luz ambiente, íons de cobre e de ferro não interferiram quer na cinética quer no rendimento da formação de carbamato de etila. Além disso, a simples redestilação de uma aguardente estabilizada (uma semana após a sua destilação) reduz a

concentração de carbamato de etila em até 90%.^{22,29} Este procedimento foi aplicado por alguns produtores artesanais e apresentaram bons resultados na redução do teor de CE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar as reações químicas que levam à formação de carbamato de etila em aguardentes de cana. Investigar a gênese e o controle de carbamato de etila em aguardentes.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um método para a análise de íons cianato que seja sensível, seletivo e reprodutível para o meio estudado.
- Estudar a influência da presença de compostos nitrogenados, no caldo de cana fermentado e no destilado, sobre a formação de carbamato de etila.
- Estudar o efeito da presença de íons metálicos e do cobre metálico na formação de carbamato de etila.
- Controlar as variações dos precursores de carbamato de etila em função do tempo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fermentação e destilação.

As etapas de fermentação do caldo de cana e de destilação do vinho foram conduzidas em escala de bancada no Laboratório para o Desenvolvimento da Química da Aguardente – LDQA do Instituto de Química de São Carlos – USP.

3.1.1. Fermentação do caldo de cana-de-açúcar.

A fermentação foi conduzida em dornas de aço inox com temperatura controlada a 30 ± 1 °C por um banho termostatzado (TECNAL modelo TE-184), conforme a Figura 3.

Figura 3 - Aparato utilizado para fermentação: 1 - dornas de aço inox, 2 – serpentinas de metal e 3 – banho termostatzado.

Fonte: Autoria própria.

O caldo de cana e a levedura (fermento biológico Fleischmann[®]) utilizada na fermentação foram adquiridos no dia de execução do experimento em comércio local. A determinação e o controle da concentração aproximada de açúcar (Brix, °Bx; escala numérica que mede a quantidade de compostos solúveis em uma solução de sacarose) presente no caldo de cana-de-açúcar foram feitas utilizando um refratômetro Master-M (Atago[®]). A Figura 4 ilustra o procedimento seguido para a produção do vinho, sendo as etapas de adição de caldo de cana-de-açúcar e de retirada do vinho das dornas de fermentação foram executadas somente ao obter-se

o valor de 0 °Bx da solução em fermentação. A última etapa do processo de fermentação foi a retirada de 15 L de vinho para o procedimento de sua destilação.

Figura 4 - Fluxograma do procedimento adotado na etapa de fermentação.

Fonte: Autoria própria.

3.1.2. Destilação

Por razões práticas o procedimento de destilação do vinho foi feito em escala de bancada utilizando um alambique de cobre com capacidade de 30 litros, conforme a Figura 5. A coluna de destilação do sistema foi confeccionada de forma a permitir mudanças e maior controle de variáveis, como aumento da área de contato com o cobre e controle de temperatura, no processo de destilação.

Figura 5 - Alambique de cobre. 1 – caldeira, 2 – termômetro, 3 – coluna com prato , 4 – deflagmador, 5 – capitel e 6 – serpentina em recipiente para circulação de água.

Fonte: Autoria própria.

O controle do teor alcoólico durante a destilação, para separação das frações cabeça, coração e cauda, foi feito com auxílio de um alcoômetro Gay-Lussac modelo Cartier (Incoterm).

3.2. Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico (Fluka, Mallinckrodt Baker, Merck, Panreac e Sigma-Adrich) e utilizados sem prévio tratamento. A água utilizada foi previamente destilada e em seguida deionizada por um sistema Milli-Q (Millipore) modelo Academic.

As soluções aquo etanólicas foram preparadas usando água e etanol e tamponadas utilizando sistema tampão ácido acético/acetato de sódio.

3.3. Equipamentos

As medidas de fluorescência foram feitas por meio de um espectrofotômetro de fluorescência modelo RF-5301 (Shimadzu) com o auxílio de cubetas de quartzo com as quatro faces polidas e dimensões de 1 cm x 1 cm (Hellma® QS). Os espectros de emissão foram obtidos utilizando 310 nm como comprimento de onda

de excitação e o máximo de emissão foi observado em 410 nm. A abertura da fenda utilizada para a excitação e a emissão foi de 5 nm.

As determinações de concentração de uréia foram feitas em um espectrofotômetro UV-vis V630 (JASCO). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 700 nm com velocidade de varredura de 150 nm/min.

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro de RMN Agilent DD2 500/54 *Premium Shielded* (operando na frequência de 500 MHz para o hidrogênio), a 26 °C utilizando soluções de dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d₆) contendo 0,03% de tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência ou D₂O contendo 0,05% de 3-(Trimetilsilil)propionato de sódio-D₄ (TMSP-d₄).

As determinações de concentração de carbamato de etila foram executadas por meio de injeções direta das amostras, sem tratamentos prévios, em um cromatógrafo para fase gasosa modelo GC-2010 (Shimadzu) equipado com um injetor automático modelo AOC-20i (Shimadzu) e acoplado a um detector de massas modelo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu) usando impacto eletrônico (70 eV) como fonte de ionização.

O estudo da interação entre os vapores das soluções aquo etanólicas fortificadas (KCN, KOCN e uréia) e a superfície do cobre foi feito por meio da técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês "*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*") em modo de refletância total atenuada (ATR, do inglês "*Attenuated Total Reflection*") empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). O espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier utilizado foi um Bruker modelo Tensor 27. Cada espectro foi obtido após 32 varreduras na região de 400 a 4000 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹.

3.4. Determinação de uréia

A concentração de uréia foi determinada por meio de método colorimétrico sensível com o emprego da diacetil monoxima e tiosemicarbazida como reagentes derivatizantes em meio ácido (ácido fosfórico-ácido sulfúrico). As medidas de

absorbância para o produto da reação foram realizadas em 527 nm ($\epsilon = 99$ L/mol cm).⁵¹

3.5. Determinação de carbamato de etila

As determinações de carbamato de etila foram conduzidas de acordo com o método descrito por Andrade-Sobrinho et al. (2002).⁵² O espectrômetro de massas foi operado em modo SIM (monitoramento de íon seletivo com razão $m/z = 62$) e o carbamato de propila foi utilizado com padrão interno. Para a separação do carbamato de etila foi usada uma coluna capilar HP-FFAP (50 m, 0,2 mm, 0,3 μ m; Agilent). A temperatura do injetor e do detector foi configurada em 250 e 230 °C, respectivamente. A temperatura do forno utilizada foi: 90°C (2 min), seguida de um aumento para 150 °C a 10 °C/min (0 min), e então aumentada para 230 °C a 40 °C/min (10 min). O volume injetado foi de 1 μ L em modo splitless.

3.6. Determinação de íons cianato

A investigação que se propõe, envolve a determinação precisa de íons cianato no nível de traços, na presença de uma série de íons. Assim, foi necessária em uma primeira etapa, a elaboração de um método sensível, seletivo e reprodutível para íons cianato em meio aquo etanólico.

As determinações de íons cianato em meio aquo etanólico foram feitas através de adaptação do método proposto inicialmente por Guilloton and Karst (1985), para análise de íons cianato em plasma sanguíneo.⁵³ Este método envolve a reação entre íons cianato e o ácido 2-aminobenzóico na presença de HCl para formar a 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona (Equação 6).

Equação 6 – Reação de derivatização dos íons cianato.

Fonte: Adaptação da referência 53.

A solução 0,01 mol/L de ácido 2-aminobenzóico, sempre recém-preparada e mantida ao abrigo da luz, e a solução 4,1 mol/L de ácido clorídrico foram usadas nas reações de derivatização dos íons cianato.

Para conduzir esta reação, inicialmente, alíquotas de 2,0 mL de solução contendo KOCN foram adicionadas a 2,0 mL de uma solução de ácido 2-aminobenzóico. As soluções resultantes foram armazenadas em frascos de vidro, selados com septos de borracha e envoltos com papel alumínio antes de serem aquecidos a $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em banho seco por 10 minutos, na sequência, 4 mL de HCl foram adicionados. Esta mistura foi aquecida a $75 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 10 minutos em banho seco. A solução final contendo a quinazolinediona foi resfriada a temperatura ambiente. Após cerca de 10 minutos, a solução foi analisada em um espectrofotômetro de fluorescência. Os espectros de emissão foram obtidos em uma faixa de 320 a 600 nm com velocidade de varredura de 240 nm/min, abertura da fenda de 5 nm e utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm x 1 cm com as quatro faces polidas.

A reprodutibilidade foi avaliada por meio do preparo de 10 amostras de mesma concentração seguindo o método proposto.⁵⁴

3.7. Estudo da influência do aumento da superfície interna de cobre na coluna de destilação

O estudo da influência do aumento da superfície interna de cobre, na coluna de destilação foi feito através de destilações em coluna de vidro preenchida ($10 \pm 0,1$ g) ou não com *pellets* de cobre (Sigma-Aldrich). As destilações foram conduzidas a

partir de soluções etanólicas (10% v/v, pH 4,5) fortificadas com os precursores de CE: KCN, KOCN e uréia.

Para verificar a existência de interação entre os vapores e o cobre, foram utilizadas chapas (3 cm × 1 cm × 1 mm) de cobre no interior da coluna de vidro. A caracterização química do material adsorvido nas chapas metálicas, expostas aos vapores durante o processo de destilação, foi realizada por FTIR-ATR.

Além disso, para fins comparativos, foram obtidos espectros por FTIR-ATR do material depositado sobre o cobre através da suspensão de uma gota das soluções modelo fortificadas. As chapas metálicas foram armazenadas em dessecador e então conduzidas ao espectrômetro. Também foram efetuadas leituras na região do infravermelho do KCN, KOCN, CE e uréia em pastilhas de KBr.

3.8. Experimentos para determinação dos parâmetros cinéticos

Os experimentos cinéticos foram realizados em soluções etanólicas, preparadas com etanol de grau analítico, ou em aguardentes de cana, em que ambas as matrizes tiveram seu pH controlado utilizando sistema tampão ácido acético/acetato de sódio.

Durante os experimentos cinéticos, cianato de potássio ou uréia foram adicionados a estas soluções e a formação de carbamato de etila, decaimentos de íons cianato e/ou de uréia foram monitorados. Estas análises foram realizadas em função dos seguintes parâmetros: teor alcoólico, pH e temperatura. A temperatura foi controlada utilizando um banho termostatzado ($\pm 0,5$ °C).

As reações foram estudadas sempre em condições de pseudo-primeira ordem com excesso de etanol.⁵⁵ As constantes de velocidade (k_1) foram calculadas por meio de gráficos $\ln ([C]_{\infty} - [C]_t)$ em função do tempo, onde C refere-se às concentrações de CE, uréia e íons cianato.⁵⁵ Os parâmetros de ativação ($\Delta G_1^{\ddagger}$, $\Delta H_1^{\ddagger}$ e $\Delta S_1^{\ddagger}$) foram determinados graficamente.⁵⁵

3.9. Cálculos computacionais.

Os cálculos computacionais da formação de CE envolvendo a reação entre os íons cianato e o etanol foram realizados em conjunto com o professor Sebastião

Claudino da Silva (UFMT) e o doutorando Augusto Cesar Huppes da Silva (IQSC-USP).

A reação entre o íon cianato e o etanol foi modelada empregando-se a teoria do funcional da densidade (DFT – Density Functional Theory) utilizando o método B3LYP.^{56–58} As estruturas eletrônicas dos sistemas avaliados foram determinadas com a função de base 6-31+G(d,p).^{59–61}

O equilíbrio da reação de isomerização foi considerado (Equação 7, A) para as espécies ácidas dos correspondentes ácido cianico (HOCN) e ácido isociânico (HNCO). Ambas as espécies podem reagir com o etanol (EtOH) de acordo com o mecanismo (B e C) do Equação 7, formando carbamato de etila (CE). A reação de hidrólise (D) também foi considerada.

Equação 7 – Reações estudadas através de cálculos computacionais (DFT/B3LYP): (A) reação de isomerização dos ácidos isociânico e cianico, (B) formação de CE através da reação entre o ácido isociânico e o etanol e (C) formação de CE por meio da reação entre o ácido cianico e o etanol e (D) a reação de hidrólise do ácido isociânico formando NH_3 e CO_2 .

Fonte: Referência 62.

O mecanismo de reação foi proposto com base em cálculos de varredura da superfície de energia potencial (SEP) em três condições: i) fase gasosa, ii) efeito de solvente pelo método IEFPCM, do inglês *"Integral equation formalism to the polarization continuum model"*, e iii) efeito explícito do solvente, em que incluiu-se na matriz do cálculo moléculas de solvente (água/etanol) para maximizar a estabilização da ligação de hidrogênio, além do efeito da solvatação implícita

IEFPCM.^{63,64} Os pontos estacionários da SEP, obtidos nos cálculos, foram confirmados via cálculo dos modos vibracionais.⁶³ As estruturas de menor energia não apresentaram frequências imaginárias, e os pontos de sela ou estados de transição, foram confirmados por meio do modelo QST3, revelando uma única frequência imaginária com deslocamento correspondente aos átomos mostrados no caminho reacional, também confirmados com o método de coordenada de reação intrínseca (IRC, do inglês *"Intrinsic Reaction Coordinate"*).^{65,66}

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento de método para a determinação de íons cianato e identificação da 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona.

Para os estudos cinéticos da formação de carbamato de etila foi desenvolvido um método para a análise de íons cianato, sensível, seletivo e reprodutível para o meio de trabalho. O método desenvolvido é baseado na propriedade fluorescente da 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona, produto formado entre os íons cianato e o ácido 2-aminobenzóico.

A formação do produto da reação entre os íons cianato e o ácido 2-aminobenzóico foi confirmada através de sinais característicos de ^1H RMN, como os deslocamentos químicos (δ) em 11,26 ppm (s, 1H) e em 11, 17 ppm (s, 1H), que foram reportados previamente na literatura.⁶⁷ Estes sinais não são observados no espectro (Figura 6) de ^1H RMN do precursor (ácido 2-aminobenzóico), que conforme mostrado na Equação 6, tem como produto da reação a 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona. O espectro de ^1H RMN completo é mostrado na Figura 7, e está de acordo com o reportado⁶⁷ para a espécie 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona. Deslocamentos químicos de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11,26 (s, 1H); 11,17 (s, 1H); 7,89 (d, J = 7,85 Hz, 1H); 7,70 (dd, J = 7,64 e 1,57 Hz); 7,63 (t, J – 7,82 Hz, 1H); 7,18 (d, J = 5,41 Hz, 1H); 6,78 (d, J = 8,41 Hz, 1H); 6,54 (t, J = 7,49 Hz, 1H).

Figura 6 - Espectro de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) do ácido 2-aminobenzóico. Dados de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7,69 (dd, J = 8,0 e 1,6 Hz, 1H); 7,21 (t, J = 7,6 Hz, 1H); 6,73 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,49 (t, J = 7,6 Hz, 1H).

Fonte: Adaptação da referência 41.

Figura 7 - Espectro de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) da 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolidinediona. Dados de ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11,26 (s, 1H); 11,18 (s, 1H); 7,89 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,70 (dd, J = 7,6 e 1,6 Hz, 1H); 7,63 (t, J = 7,8 Hz, 1H); 7,18 (d, J = 5,4 Hz, 1H); 6,79 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,55 (t, J = 7,5 Hz, 1H).

Fonte: Adaptação da referência 41.

4.1.1. Efeito do pH e da concentração de etanol na análise de íons cianato

O efeito da concentração de íons hidrogênio na intensidade de emissão do produto 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona foi avaliado em pH 3,5, 4,5 e 5,5 (sistema tampão ácido acético e acetato de sódio). Esta faixa de pH é bem mais ampla do que aquela geralmente apresentada pelas aguardentes de cana (4,0 – 5,0). A influência da concentração de etanol nas determinações de íons cianato foi estudada em misturas de água e etanol na faixa de 0% a 70% (v/v) de etanol. Alíquotas de solução estoque de cianato de potássio recém preparadas foram então adicionadas a estas soluções.

Curvas de calibração foram construídas lançando a concentração de íons cianato *versus* valores de emissão a um determinado valor de pH e de concentração de etanol, como mostrado nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Figura 8 – Gráfico de concentração de íons cianato em função intensidade de fluorescência em soluções aquo etanólicas (40%) para: (■) pH = 3,5; (▲) pH = 4,5; (●) pH=5,5.

Fonte: Adaptação da referência 41.

Figura 9 - Gráfico de concentração de íons cianato em função da intensidade de fluorescência em soluções aquo etanólicas com pH 4,5 para: (●) 0% etanol; (◆) 40% etanol (■) 70% etanol.

Fonte: Adaptação da referência 41.

A Figura 10 apresenta os espectros de excitação e de emissão para soluções contendo a 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinediona formada pela reação entre os íons cianato e o ácido 2-aminobenzóico em misturas de água e etanol (40% v/v). Os λ_{ex} e λ_{em} utilizados nestas condições foram 310 e 410 nm, respectivamente. Os comprimentos de onda de emissão foram apenas ligeiramente influenciados ($\Delta\lambda_{\text{máx}} < 2$ nm) pela concentração de etanol na faixa de 0% a 70% (v/v).

Figura 10 – Espectros de absorção (a) e de emissão (b) de soluções contendo a 2,4-(1*H*,3*H*)-quinazolinédiona formada pela reação entre íons cianato (1×10^{-3} mol/L) e o ácido 2-aminobenzóico (1×10^{-2} mol/L) em misturas de água e etanol (40% v/v). Espectro de emissão do branco (c).

Fonte: Adaptação da referência 41.

Não houve mudanças perceptíveis nos λ_{ex} e λ_{em} para as variações de pH (Tabela 4) na faixa de 3,5 a 5,5. Também não foram observadas mudanças perceptíveis ($< 1\%$) nos valores de emissão quando, em valor de pH fixo, a concentração de etanol foi variada de $40 \pm 2\%$, que é a condição experimental geralmente encontrada em aguardentes comerciais.

Tabela 4 – Parâmetros das curvas de calibração^a para diferentes valores de pH.

pH	Inclinação	Intercepto	r^2
3,5	$1,48 \times 10^7$	-2,543	0,998
4,5	$1,88 \times 10^7$	-3,329	0,991
5,5	$1,80 \times 10^7$	-3,116	0,972

Fonte: Adaptação da referência 41. ^a - Para $c_{\text{KOCN}} = 1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, etanol 40% (v/v).

No entanto, para variações na concentração de etanol $\pm 10\%$ nas amostras, foram observadas mudanças perceptíveis nos valores de emissão (Tabela 5). Por isso, para fins analíticos, as curvas de calibração devem reproduzir as condições experimentais das amostras.

Tabela 5 - Parâmetros das curvas de calibração^a para diferentes concentrações de etanol.

% Etanol	Inclinação	Intercepto	r ²
0	$2,37 \times 10^7$	1,685	0,998
10	$2,29 \times 10^7$	-9,032	0,997
20	$2,38 \times 10^7$	-7,847	0,997
30	$1,39 \times 10^7$	-5,086	0,993
40	$1,88 \times 10^7$	-3,329	0,991
50	$1,61 \times 10^7$	1,611	0,995
60	$1,31 \times 10^7$	-0,360	0,997
70	$6,23 \times 10^6$	5,725	0,966

Fonte: Adaptação da referência 41. ^a - Para $c_{\text{KOCN}} = 1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, pH = 4,5.

Os gráficos dos valores das intensidades de fluorescência *versus* as concentrações de íons cianato, a 410 nm, foram lineares na faixa de $6,7 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L, na faixa de pH (Tabela 4) de 3,5 a 5,5 e para concentrações de etanol (Tabela 5) na faixa de 0% a 70% (v/v). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram de $2,2 \times 10^{-7}$ e $6,6 \times 10^{-7}$ mol/L, respectivamente. O LOD foi calculado como 3 vezes o desvio padrão de 3 brancos e o LOQ como 10 vezes.⁵⁴

4.1.2. Influência de íons estranhos, uréia e carbamato de etila na determinação de íons cianato.

Para o estudo da influência de possíveis interferentes, soluções de KCN, NaSCN, NaCl, NaNO₃, Na₂SO₄, uréia e carbamato de etila foram preparadas em misturas tamponadas de água e etanol.

Com base nos resultados de reprodutibilidade, a melhor condição experimental foi estabelecida como: concentração de etanol igual a 40% e de pH 4,5. Nestas condições, soluções contendo 5×10^{-6} mol/L de íons cianato podem ser analisada e determinada em uma única medida com 95% de confiança com uma incerteza de $\pm 0,13 \times 10^{-6}$ mol/L (2,6%). A exatidão e precisão do método foram verificadas utilizando 3 concentrações de íons cianato ($1,0 \times 10^{-6}$, $2,0 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L).⁵⁴

Os dados experimentais obtidos apresentaram uma média de recuperação do analito de $100 \pm 3,8\%$ e coeficiente de variação de $1,8\%$. Esta análise pode ser realizada na presença de íons cianeto, tiocianato, cloreto, nitrato, sulfato, sódio e potássio, bem como de carbamato de etila e de uréia sem qualquer interferência no resultado (Tabela 6), mesmo quando estes componentes estão em concentrações 1000 vezes maiores que a do analito.

Tabela 6 – Determinações de íons cianato^a na presença de íons estranhos, uréia e carbamato de etila.

Íons estranhos ^b	Média	SD	%RSD
CN ⁻	$5,01 \times 10^{-6}$	$9,54 \times 10^{-8}$	1,91
*SCN ⁻	$4,97 \times 10^{-6}$	$1,23 \times 10^{-7}$	2,47
Cl ⁻	$4,81 \times 10^{-6}$	$1,68 \times 10^{-7}$	3,49
NO ₃ ⁻	$4,94 \times 10^{-6}$	$1,53 \times 10^{-7}$	3,01
SO ₄ ²⁻	$5,12 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-7}$	2,37
Uréia	$5,12 \times 10^{-6}$	$1,63 \times 10^{-7}$	3,18
Carbamato de etila	$5,00 \times 10^{-6}$	$9,52 \times 10^{-8}$	1,90

Fonte: Adaptação da referência 41. ^a - $c_{\text{KOCN}} = 5,0 \times 10^{-6}$ mol/L, pH = 4,5; ^b – Sais de sódio, exceto o *tiocianato que é um sal de potássio, em concentrações 1000 vezes maior que a do KOCN.

As determinações das concentrações de íons cianato também foram efetuadas em destilados previamente fortificados com KOCN. Amostras de aguardentes de cana, contendo 40% de etanol, foram usadas para este propósito. Os dados obtidos apresentaram concordância com os obtidos em misturas de água e etanol.

4.2. Avaliação do método desenvolvido em modelo: Adição de uréia ao vinho e destilado

Geralmente, na produção em pequena escala o processo de destilação ocorre em alambiques, onde o destilado é separado em 3 frações diferentes através de operações chamadas de corte. Estas frações são denominadas de cabeça (70% a 54% v/v), de coração (54% a 38% v/v) e de cauda (abaixo de 38% v/v). Portanto, as determinações de íons cianato foram realizadas nas frações cabeça, coração e cauda em aguardentes recém-destiladas, as quais foram fortificadas com uréia,

antes da destilação, como fonte de nitrogênio. A fração coração, que é a comercializada, corresponde a principal parte do destilado.

Os dados apresentados na Tabela 7 mostram claramente um aumento na concentração de íons cianato no destilado conforme se aumenta a concentração de uréia adicionada ao vinho. Além disso, os resultados também apontaram que a concentração de íons cianato e, como consequência, de carbamato de etila aumenta da seguinte forma: cabeça < coração < cauda. Adicionalmente, conforme resultados anteriores, a concentração de carbamato de etila em todas as amostras atingiu um valor máximo 10 dias após o processo de destilação, enquanto que a concentração de íons cianato nestas últimas amostras se encontra abaixo do LOD ($2,2 \times 10^{-7}$ mol/L).^{22,29} Esta última observação está em concordância com o fato de que íons cianato não foram detectados em análises realizadas em 50 amostras comerciais de aguardentes, runs e tiquiras.

Tabela 7 – Concentrações de íons cianato^a e de carbamato de etila^b na fração “coração” de cachaças destiladas com e sem adição de uréia ao vinho. O dados apresentados são valores da média de 3 repetições das medidas ($p \leq 0,05$).

Uréia (mol/L)	Íons cianato ^a em cachaça na fração “coração” (mol/L)	Carbamato de etila ^b (mol/L)
0	n.d.	$1,07 \times 10^{-6}$
$7,50 \times 10^{-3}$	$2,70 \times 10^{-6}$	$6,15 \times 10^{-6}$
$2,50 \times 10^{-2}$	$6,67 \times 10^{-6}$	$1,45 \times 10^{-5}$
0,05	$1,99 \times 10^{-5}$	$3,11 \times 10^{-5}$
0,10	$4,98 \times 10^{-5}$	$3,86 \times 10^{-5}$
0,20	$1,04 \times 10^{-4}$	$8,32 \times 10^{-5}$
0,40	$2,72 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-4}$

Fonte: Adaptação da referência 41. n.d. – não detectado; ^a – recém-destilada; ^b – concentração de carbamato de etila da fração “coração” 10 dias após a destilação.

Todas as amostras (Tabela 8) apresentaram a tendência, de aumento na concentração de carbamato de etila com o aumento da concentração de íons cianato. Entretanto, nenhuma correlação numérica definitiva pôde ser estabelecida entre a concentração de KOCN, nas frações de aguardentes recém-destiladas, e a correspondente concentração final de carbamato de etila. Estudos preliminares sugerem que a razão final de $\Delta C_{CE}/\Delta C_{\text{cianato}}$ é aproximadamente cerca de 0,3. Portanto, é provável que uma série de reações paralelas esteja ocorrendo, o que carece de maior investigação.^{33,40}

Tabela 8 - Concentrações de íons cianato^a e carbamato de etila^b nas frações de aguardentes de cana destiladas com adição de uréia. Os dados apresentados são valores da média de 3 repetições das medidas ($p \leq 0,05$)

Uréia (mol/L)	Íons cianato ^a nas frações de aguardentes de cana (mol/L)			CE ^b nas frações de aguardentes de cana (mol/L)		
	cabeça	coração	cauda	cabeça	coração	cauda
0,00	n.d.	n.d.	n.d.	$1,47 \times 10^{-6}$	$1,07 \times 10^{-6}$	$9,48 \times 10^{-7}$
$7,50 \times 10^{-3}$	$1,06 \times 10^{-6}$	$2,70 \times 10^{-6}$	$3,91 \times 10^{-6}$	$2,19 \times 10^{-6}$	$6,15 \times 10^{-6}$	$9,89 \times 10^{-6}$
$2,50 \times 10^{-2}$	$3,07 \times 10^{-6}$	$6,67 \times 10^{-6}$	$1,32 \times 10^{-5}$	$7,08 \times 10^{-6}$	$1,45 \times 10^{-5}$	$2,34 \times 10^{-5}$
0,05	$7,44 \times 10^{-6}$	$1,99 \times 10^{-5}$	$3,31 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-5}$	$3,11 \times 10^{-5}$	$5,07 \times 10^{-5}$
0,10	$1,16 \times 10^{-5}$	$4,98 \times 10^{-5}$	$7,24 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-5}$	$3,86 \times 10^{-5}$	$4,98 \times 10^{-5}$
0,20	$2,37 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-4}$	$3,33 \times 10^{-5}$	$8,32 \times 10^{-5}$	$9,98 \times 10^{-5}$
0,40	$5,15 \times 10^{-5}$	$2,72 \times 10^{-4}$	$2,63 \times 10^{-4}$	$7,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-4}$	$1,89 \times 10^{-4}$

Fonte: Adaptação da referência 41. n.d. – não detectado; ^a – recém-distilada; ^b – concentração de carbamato de etila nas frações de aguardentes de cana 10 dias após a destilação; Devido a diferença de teor alcoólico entre as frações, foram efetuadas curvas de calibração com diferentes graus alcoólicos.

4.3. Investigação dos principais precursores de carbamato de etila

No intuito de verificar a diferença e a influência significativa dos principais precursores nitrogenados de carbamato de etila encontrados na literatura, foram adicionadas em amostras de aguardentes (após 10 dias da destilação do vinho, 47% etanol, 25 °C e pH = 4,5) concentrações de 5×10^{-3} mol/L de uréia, íons cianato, íons cianeto, L-arginina, L-citrulina e carbamoil fosfato, e então acompanhou-se a formação de carbamato de etila ao longo do tempo (Figura 11). Os resultados indicam claramente que apenas os íons cianato conduzem, no período e condições do experimento, à formação de carbamato de etila na aguardente de cana. Somente uma pequena quantidade de CE é formada em consequência da adição de uréia ou íons cianeto. Esta formação residual de CE é menor que 0,5% do CE formado quando uma concentração equivalente de íons cianato é adicionada, e isto pode ser atribuído a presença de traços de íons cianato na uréia e no sal de cianeto.

Figura 11 - Formação de carbamato de etila ao longo do tempo em aguardentes de cana tamponadas (47% v/v, $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4,5, 25°C) com adição de 5×10^{-3} mol/L de uréia, íons cianato, íons cianeto, L-arginina, L-citrulina e carbamoil fosfato após 10 dias da destilação.

Fonte: Adaptação da referência 62.

Os aspectos cinéticos e termodinâmicos da formação de carbamato de etila a partir de compostos nitrogenados em soluções aquo etanólicas tamponadas, que mimetizam a aguardente de cana, são temas de estudo neste trabalho e serão apresentados e discutidos a seguir.

4.8. A influência da presença de compostos nitrogenados, durante a etapa de fermentação, no teor final de CE no destilado.

Os mecanismos de reação da formação de CE variam significativamente entre as matrizes. Dois dos principais precursores para a formação de CE, no caso dos fermentados de uva, são a ureia e a citrulina. Ambos são produtos de degradação microbiana da arginina. O controle da formação da CE em vinhos é feito, principalmente, pela redução dos níveis de arginina no mosto e pela seleção de microrganismos que produzam baixo teor de ureia ou de microrganismos que reaproveitam a maior parte da ureia produzida.^{8,34,68-70}

Durante a fermentação, quando a arginina não é completamente catabolizada, produtos intermediários da reação podem acumular no meio. A citrulina e o carbamil fosfato, ambos reconhecidos como precursores do CE, podem reagir espontaneamente com o etanol. A reação com o etanol é favorecida com o aumento da temperatura e a diminuição do pH do meio. A reação também pode ocorrer com a ureia produzida pelas leveduras. A citrulina resultante do consumo de arginina, pelas leveduras, tem sido descrita como principal precursora do CE em fermentados de uva.^{8,34,68-70}

A maior parte dos microrganismos obtém aminoácidos a partir do ambiente e os utilizam como combustível conforme suas condições metabólicas determinam.^{71,72} As vias do catabolismo dos aminoácidos são bastante semelhantes na maioria dos organismos.^{71,72} A Figura 12 ilustra o ciclo da ureia e as reações que fornecem grupos amino para o ciclo.

Figura 12 – O Ciclo da ureia. As enzimas que catalisam essas reações estão distribuídas entre a matriz mitocondrial e o citosol. Um grupo amino entra no ciclo da ureia como carbamoi-fosfato, formado na matriz; o outro entra como aspartato, produzido na matriz pela transaminação entre o oxaloacetato e glutamato, catalisada pela aspartato-aminotransferase. O ciclo da ureia consiste em quatro passos. 1. Formação de citrulina a partir da ornitina e carbamoi-fosfato. 2. Produção de argino-succinato, via um intermediário citrulil-AMP. 3. Formação da arginina a partir do argino-succinato. 4. Formação de ureia; esta também regenera a ornitina.

Fonte: Referências 71,72.

A partir destas informações, e a fim de estudar a influência dos principais precursores nitrogenados na reação de formação do CE no processo de produção da aguardente de cana, foram realizados experimentos envolvendo as etapas de fermentação e de destilação do caldo de cana.

Diferentes concentrações de arginina foram adicionadas ao caldo de cana no início da fermentação. Após o processo de fermentação, o caldo fermentado foi destilado em alambique e o teor final de CE no destilado foi determinado por GC-MS.

Vale ressaltar que a temperatura (30 ± 1 °C) da fermentação foi controlada com o auxílio de um banho termostatzado e uma serpentina de cobre. Após observar que a concentração final de CE no destilado não variava com o aumento da suplementação com arginina, mesmo após 10 dias do processo de destilação, a serpentina de cobre utilizada para controlar a temperatura da fermentação foi substituída por serpentinas de alumínio e de vidro. Os dados coletados estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Teores de CE nos destilados do caldo de cana fermentado fortificado com diferentes concentrações de arginina ([Arg]), utilizando serpentinas de diferentes materiais para o controle da temperatura durante a fermentação.

Serpentina	[Arg] (mol/L)	CE (mol/L)
Cobre	0	$2,0 \pm 0,1 \times 10^{-7}$
	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,7 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,9 \pm 0,1 \times 10^{-7}$
	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,9 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
	$7,5 \times 10^{-2}$	$1,7 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
Alumínio	$7,5 \times 10^{-2}$	$8,3 \pm 0,1 \times 10^{-7}$
Vidro	$5,0 \times 10^{-3}$	$6,6 \pm 0,1 \times 10^{-7}$
	$1,0 \times 10^{-2}$	$7,2 \pm 0,1 \times 10^{-7}$

Fonte: Autoria própria.

Com a substituição do material da serpentina, utilizada para auxiliar no controle da temperatura, foi possível verificar o aumento do teor final de CE nos destilados. Estas informações, apesar da necessidade de maiores experimentos, reforçam a influência do cobre na reação de formação de CE. Neste caso, a influência do metal foi observada durante a etapa de fermentação e não na já conhecida etapa de destilação.

Também foram realizadas destilações em coluna de vidro. Nestes experimentos, foram adicionados ao caldo de cana, no início da fermentação, 1×10^{-2} mol/L de arginina, citrulina, carbamil fosfato e uréia. Após o processo de destilação em coluna de vidro, o teor de CE no destilado foi determinado por GC-MS. Os valores observados estão ilustrados na Figura 13.

Figura 13 – Concentração de CE em destilados onde o processo de destilação foi conduzido em coluna de vidro. Os precursores ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) foram adicionados no início da etapa de fermentação do caldo de cana.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 13 é possível observar que a citrulina apresentou a maior influência na formação do CE. Entretanto, estes resultados sugerem a necessidade de mais experimentos antes de sugerir algum mecanismo de reação. Pois a citrulina é citada na literatura como um precursor de CE que reage espontaneamente com o etanol para formar o CE. E se fosse este o caso, não deveria estar presente em grande concentração no destilado. Uma vez que o ponto de ebulição do CE é de aproximadamente 182 °C, muito superior a temperatura praticada no processo de destilação (~90 °C).

Considerando que um catalisador diminui a energia de ativação (E_a) para que um processo ocorra. E também que, o aumento da temperatura pode fornecer energia para que uma reação ocorra. É razoável supor que as reações que ocorrem no ciclo da ureia, com o auxílio de enzimas, podem ocorrer sem a presença das

mesmas nas condições de estudo aqui propostas. As quais visam mimetizar o processo de produção da aguardente.

Em se tratando de vinho, o fermentado de uva, em especial sobre a fermentação malolática (transformação do ácido málico a ácido láctico) por bactérias. Apesar do ciclo da ureia indicar a via de metabolismo da arginina, encontra-se na literatura algumas avaliações de possíveis mecanismo de transporte, regulação e síntese de enzimas para o catabolismo da arginina por bactérias lácticas.^{34,69,70} Um deles é ilustrado pelo Equação 8.

Equação 8 – Proposta da sequência de reações enzimáticas no metabolismo da arginina em vinhos por bactérias. Onde ADI (do inglês, “*arginine deiminase*”), OTC (do inglês, “*ornithine transcarbamylase*”) e CK (do inglês, “*carbamate kinase*”) são as enzimas responsáveis pelo processo.

Fonte: Adaptação das referências 34,69,70.

Com o objetivo de estudar o comportamento da citrulina em solução alcoólica, na reação de formação de CE, em uma comparação com a arginina, um experimento preliminar foi conduzido contendo 1×10^{-2} mol/L de cada aminoácido em solução com 40% etanol e pH 4,5 a 75°C durante 3 horas (Figura 14).

Figura 14 – Concentração de CE em solução etanólica 40% (v/v), pH 4,5 a 75 °C em função do tempo contendo 1×10^{-2} mol/L de arginina e de citrulina.

Fonte: Autoria própria.

A influência da citrulina, na reação de formação do CE, foi maior que a da arginina em solução modelo. Além disso, também foi possível observar a influência da temperatura quando estes aminoácidos estão presentes em solução alcoólica. A formação de CE foi favorecida com o aumento da temperatura. Este comportamento é observado através da comparação entre a Figura 11, que ilustra um experimento semelhante a temperatura ambiente (25 °C), e a Figura 14, ambas apresentadas neste trabalho.

Estas informações estão de acordo com a literatura. A reação de hidrólise da arginina é favorecida em meio ácido em altas temperaturas, reportada acima de 110 °C.^{73,74} A reação é muito lenta e com rendimento menor que 1% sob as condições normalmente praticadas para a hidrólise de proteínas.^{73,74} Entretanto, o rendimento da reação pode se tornar significativo se a temperatura e o tempo de aquecimento for aumentado.^{73,74}

Além disso, relatos sobre a relação entre arginina/citrulina, citrulina/ornitina e citrulina/CE em vinhos estão disponíveis na literatura e estão de acordo com os que foram reportados neste trabalho.^{8,34,68–70} Vale destacar que estes relatos são referentes a reações observadas na presença de microrganismos e enzimas.

Para obter mais informação da reação de formação de CE a partir da citrulina, soluções com 10, 20 e 40% (v/v) de etanol contendo 0,05 mol/L de citrulina com pH 4,5 foram mantidas a 75 °C e o teor de CE monitorado em função do tempo. Este experimento é ilustrado pela Figura 15. Além disso, a formação de CE também foi monitorada em função do tempo em soluções com 10% (v/v) de etanol contendo 0,05 mol/L de citrulina com pH 4,5 em temperaturas de 65 e 85°C.

Figura 15 – Concentração de CE (mol/L) em função do tempo a partir de 0,05 mol/L de citrulina em soluções contendo 10, 20 e 40% de etanol (v/v), pH 4,5 a 75 °C.

Fonte: Autoria própria.

Através dos dados obtidos foi possível estimar as constantes de velocidade aparentes de formação do CE a partir da citrulina, nas condições experimentais citadas anteriormente. Os valores das constantes de velocidade observados estão ilustrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Constantes de formação de CE em soluções com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina em diferentes temperaturas e teor alcoólico.

Temperatura (°C)	Teor alcoólico (% v/v)	$k_{obs} (s^{-1})$
75	10	$1,00 \pm 0,2 \times 10^{-5}$
75	20	$1,33 \pm 0,3 \times 10^{-5}$
75	40	$1,03 \pm 0,3 \times 10^{-5}$
65	10	$7,40 \pm 0,4 \times 10^{-6}$
85	10	$1,27 \pm 0,2 \times 10^{-4}$

Fonte: Autoria própria.

Os valores das constantes observados indicam que a reação de formação de CE a partir da citrulina é independente da graduação alcoólica e dependente da temperatura. E apesar da necessidade de um maior número de experimentos para avaliar o efeito do pH do meio sobre a formação de CE a partir da citrulina, resultados preliminares (não apresentados) apontaram uma possível dependência do pH do meio.

O efeito da temperatura na reação de formação de CE a partir da citrulina foi avaliado através dos dados cinéticos em função da temperatura e os parâmetros de ativação calculados foram: $\Delta H_1^\ddagger = 33,2 \pm 1$ kcal/mol, $\Delta S_1^\ddagger = 13,7 \pm 1$ cal/K mol $\Delta G_1^\ddagger = 28,4 \pm 1$ kcal/mol.

Durante os experimentos sobre a formação de CE a partir da citrulina, alíquotas de 1 mL foram coletadas, congeladas e liofilizadas. Os produtos resultantes foram solubilizados em 600 μ L de D₂O contendo 0,05% (v/v) de TMSP-D4 como referência para se obter espectros de ¹H RMN. A Figura 16 ilustra um dos espectro de ¹H RMN onde o pico em 3,06 ppm, referente a formação de ornitina, foi monitorado.

Figura 16 – Sobreposição de espectros de ^1H RMN de uma solução de citrulina (preto) e de um padrão de ornitina (azul). O espectro de ^1H RMN foi obtido a partir do aquecimento a 85°C durante 24 horas de uma solução de etanol 10% (v/v) com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina. O pico em 3,06 ppm, referente a ornitina, foi monitorado.

Fonte: Autoria própria.

Através das alíquotas coletas para monitorar a formação de ornitina em função do tempo foi possível quantificar a mesma. O aumento da concentração de ornitina observado no meio está ilustrada na Figura 17.

Figura 17 – Aumento da concentração de ornitina observado em função do tempo no meio reacional envolvendo o aquecimento a 75°C de uma solução de etanol 10% (v/v) com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina.

Fonte: Autoria própria.

Na busca de uma justificativa para a presença de CE no destilado, após o processo de destilação, a partir do aquecimento de uma solução contendo citrulina, foram realizadas análises para a determinação de íons cianato no meio reacional envolvendo o aquecimento a 75 °C de uma solução de etanol 10% (v/v) com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina. Estes espectros estão ilustrados na Figura 18.

Figura 18 – Espectros de fluorescência ($\lambda = 410$ nm) em função do tempo para a identificação da presença de íons cianato no meio reacional envolvendo o aquecimento a 75°C de uma solução de etanol 10% (v/v) com pH 4,5 contendo 0,05 mol/L de citrulina na reação de formação de CE.

Fonte: Autoria própria.

Através das análises de íons cianato foi possível detectar a presença destes precursores de CE na solução, o que justifica a presença de CE no destilado a partir do aquecimento de uma solução de etanol 10% (v/v) contendo citrulina. Pois a temperatura de ebulição do ácido isociânico é de aproximadamente 23 °C.

Além disso, a partir dos dados obtidos é possível propor que a reação de formação de CE a partir da citrulina ocorra pelo mecanismo ilustrado pelo Equação 9.

Equação 9 – Proposta para a rota de formação de carbamato de etila a partir da citrulina em meio aquo etanólico.

Fonte: Autoria própria.

4.5. Estudo da decomposição térmica da uréia atuando como fonte de íons cianato na reação de formação de carbamato de etila

A uréia é reconhecida como um dos precursores de CE em vinhos de uva e, como consequência, existe uma recomendação mundial contra o seu uso como fonte de nitrogênio na etapa de fermentação.⁷⁵ Porém, a presença de uréia no vinho não quer dizer que a mesma foi adicionada diretamente ao mosto, e é provável que este também seja o caso no fermentado de cana-de-açúcar. A uréia é um dos produtos metabólicos gerados durante a fermentação pelas leveduras, a partir dos aminoácidos arginina e citrulina, assim, está naturalmente presente no vinho.⁷⁵

A reação entre a ureia e o etanol é conhecida há tempos e é utilizada para diversos propósitos. Os aspectos estequiométricos desta reação são bem conhecidos, o mesmo não acontece em relação aos seus aspectos mecanísticos. Além de ser relevante por si só, o conhecimento dos aspectos cinéticos são obrigatório quando é necessário evitar ou controlar a formação de CE, como por

exemplo, quando a matriz são bebidas fermentadas, bebidas destiladas ou até mesmo etanol para fins farmacêuticos.

No caso da aguardente, mesmo após um cuidadoso processo de destilação e da diferença entre as temperaturas de destilação caldo de cana fermentado (< 100°C) e a de ebulição do CE (182 – 185 °C), quantidades consideráveis de CE podem ser encontradas nos destilados. Isto sugere uma transferência de um precursor volátil do vinho para o destilado.

A relação entre a presença de ureia no vinho e os teores de íons cianato e de carbamato de etila em aguardentes recém destiladas pode ser observada na Figura 19 e na Tabela 7 (seção 4.2). Foi observado que à medida que a concentração de ureia no vinho aumenta, as concentrações de íons cianato e de carbamato de etila no destilado também aumentam. Além disso, a concentração de íons cianato diminui com o tempo e a concentração de carbamato de etila aumenta.

Figura 19 – Concentrações de íons cianato e de CE em aguardentes recém destiladas em função da concentração de uréia adicionada ao caldo fermentado.

Fonte: Autoria própria.

A correlação direta entre a concentração de uréia, íons cianato e carbamato de etila também foi observada em experimentos utilizando uréia marcada (^{13}C) e não marcada em aguardentes de cana e em soluções modelo mimetizando a etapa de destilação do caldo fermentado. Em temperaturas superiores a 70 °C tanto os íons

cianato e o CE estão presentes em quantidades significantes. A Figura 20 ilustra um gráfico típico para as variações de ureia, íons cianato e CE em função do tempo. O valor do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtido para o decaimento de ureia e de íons cianato foi de 77 ± 1 h e de $0,48 \pm 0,03$ h, respectivamente. O tempo de meia-vida para a formação de carbamato de etila calculado foi de 32 ± 1 h.

Figura 20 – Gráfico típico do consumo de ureia (A) e íons cianato (B) e formação de carbamato de etila (C) em função do tempo (10% etanol, 89°C e $5,7 \times 10^{-3}$ mol/L de ureia).

Fonte: Autoria própria.

Os espectros de massas da Figura 21 ilustram o acompanhamento da conversão da uréia em CE utilizando uréia marcada (^{13}C) e não marcada (^{12}C), onde foi possível observar através dos espectros de massas que o CE formado a partir de uréia marcada continha o ^{13}C . Nestes experimentos, as destilações foram realizadas em coluna de vidro onde não há contato dos vapores com o cobre e/ou outros metais que poderiam estar presentes nos aparelhos comuns de destilação.

A Figura 21 (a) mostra o resultado do experimento utilizando a ureia não marcada e a Figura 21 (b) a ureia marcada. Pode ser observado na Figura 21 (a) a presença de fragmentos m/z 44 e 62 na solução que continha uréia não marcada. A Figura 21 (b) apresenta o espectro de massa com os fragmentos m/z 45 e 63, em

uma solução destilada utilizando ureia marcada (^{13}C). Os rendimentos de CE (Figuras 21 (a) e (b)), em ambos os casos, são os mesmos dentro dos limites do erro experimental. Para fins de comparação, a Figura 21 (c) mostra o espectro de uma amostra contendo uma mistura de volumes equivalentes (1:1) das soluções (a) e (b). Nota-se que os sinais de ^{13}C e ^{12}C , correspondentes aos fragmentos de m/z 44, 45 em $[\text{NH}_2\text{CO}]^+$ e m/z 62, 63 em $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3]^+$, respectivamente, são facilmente distinguíveis.

Figura 21 – Espectros de massas do CE formado a partir da uréia não marcada (a), uréia marcada (b) e de uma amostra (c) contendo uma mistura de volumes equivalentes (1:1) das soluções (a) e (b).

Os valores calculados das constantes de velocidade para o decaimento de ureia e de íons cianato e das constantes de velocidade de formação de CE, bem como os correspondentes rendimentos estão resumidos na Tabela 11. Enquanto que os parâmetros de ativação correspondentes são apresentados na Tabela 12. Foi observado, durante os experimentos de variação da temperatura, que uma degradação significativa da uréia ocorre a partir de 60°C. E que em temperaturas inferiores a esta, a velocidade de degradação da uréia é muito lenta.

Tabela 11 - Constantes de decaimento da uréia e dos íons cianato e de formação do carbamato de etila em soluções aquo etanólicas (5×10^{-3} mol/L de uréia, pH = 4,5, ácido acético/acetato de sódio) em diferentes temperaturas e graduação alcoólica.

Etanol (%, v/v)	Ureia (k_{obs})	Íons cianato (k_{obs})	CE (k_{obs})	Temperatura (°C)	Rendimento (%CE)
25	$4,30 \times 10^{-6}$	$5,60 \times 10^{-6}$	$7,20 \times 10^{-6}$	83	18,1
25	$1,50 \times 10^{-6}$	$2,70 \times 10^{-6}$	$2,90 \times 10^{-6}$	75	13,0
45	$6,30 \times 10^{-7}$	$4,70 \times 10^{-6}$	$3,10 \times 10^{-6}$	75	18,0
70	$4,10 \times 10^{-7}$	$2,20 \times 10^{-6}$	$2,60 \times 10^{-6}$	75	32,6
10	$6,80 \times 10^{-6}$	$8,40 \times 10^{-6}$	$7,90 \times 10^{-6}$	89	13,5

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 – Parâmetros de ativação para uma reação selecionada.

Espécie	Temperatura (°C)	Etanol (%)	ΔS (cal/mol K)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)
CE	89	10	$-25,8 \pm 1$	$29,8 \pm 1$	$20,4 \pm 1$
Íons cianato	89	10	$-27,7 \pm 1$	$29,7 \pm 1$	$19,7 \pm 1$
Ureia	89	10	$-9,0 \pm 1$	$29,9 \pm 1$	$26,6 \pm 1$

Fonte: Autoria própria.

O rendimento final de CE, expresso em termos de percentagem da concentração inicial de ureia (Tabela 11), segue a mesma tendência relatada anteriormente: aumenta à medida que a concentração de etanol e a temperatura aumentam atingindo um rendimento máximo de 32,6%.

O equação 1 apresentado anteriormente ilustra a proposta para a reação de formação de CE a partir da uréia em aguardentes de cana. A degradação da uréia e dos íons cianato seguem por duas rotas competitivas: a formação de amônia e dióxido de carbono e a formação de CE.

A partir dos estudos cinéticos e dos produtos analisados da reação de formação de CE a partir da uréia, foi possível reforçar a influência dos íons cianato como precursor ativo nesta reação. Além disso, fica constatada que a presença de uréia no caldo fermentado atua como fonte de íons cianato para a formação de CE.

4.6. Efeito da presença de alguns íons metálicos e do cobre metálico na reação de formação de carbamato de etila

A Tabela 13 apresenta os valores das concentrações de CE em soluções modelo (10% etanol e pH 4,5) fortificadas com 1×10^{-2} mol/L de KCN aquecidas a 75 °C, na presença de íons metálicos e de cobre metálico, durante 2 horas.

Tabela 13 – Formação de CE em soluções modelo (10% etanol e pH 4,5) fortificadas com 1×10^{-2} mol/L de CN^- a 75°C na presença de íons metálicos e de cobre metálico após 2 horas.

Componente	[CE] (mol/L)
Controle	$7,85 \pm 0,1 \times 10^{-8}$
Cu^0	$3,04 \pm 0,2 \times 10^{-6}$
Cu^{2+}	$1,01 \pm 0,2 \times 10^{-3}$
Fe^{2+}	$7,34 \pm 0,1 \times 10^{-7}$
Fe^{3+}	$6,23 \pm 0,1 \times 10^{-7}$

Fonte: Autoria própria.

Dos componentes utilizados, o Cu(II) apresentou maior influência na formação de CE. Além disso, foi detectado íons cianato no experimento envolvendo os íons cianeto e o Cu(II). É sabido que os íons cianeto podem ser oxidados a íons cianato e estes reagem com o etanol para formar o CE.⁴²

A Tabela 14 exhibe os resultados obtidos em experimentos de destilação de soluções modelo (10% etanol e pH 4,5) fortificadas com precursores de CE utilizando coluna de vidro, preenchida ou não com cobre metálico (*pellets*). O preenchimento da coluna de vidro com os pedaços de cobre metálico (10 g) foi realizado para verificar a influência do aumento da superfície de contato dos vapores com o cobre.

Tabela 14 – Concentração de CE ($\mu\text{g/L}$) em destilado utilizando coluna de vidro preenchida ou não com cobre (Cu) metálico na forma de *pellets* a partir de solução modelo (10% de etanol, pH 4,5) fortificada com precursores de CE. Os dados apresentados são valores da média de 2 repetições da medida ($p \leq 0,05$)

Precursor	mol/L	[CE] sem Cu	[CE] com Cu
CN^-	$1,0 \times 10^{-3}$	4,73	11,48
	$5,0 \times 10^{-3}$	5,90	21,10
	$1,0 \times 10^{-2}$	7,83	31,42
OCN^-	$1,0 \times 10^{-3}$	39,65	3,12
	$5,0 \times 10^{-3}$	679,62	14,72
	$1,0 \times 10^{-2}$	1928,74	27,92
Uréia	$1,0 \times 10^{-3}$	213,26	3,95
	$5,0 \times 10^{-3}$	862,31	72,14
	$1,0 \times 10^{-2}$	1932,78	262,36

Fonte: Autoria própria.

Os dados mostram que o teor de carbamato de etila no destilado aumenta quando o vapor da solução modelo, fortificada com íons cianeto, entra em contato com o cobre metálico presente na coluna de destilação. Provavelmente devido à reação de oxidação do ácido cianídrico (HCN) em ácido isociânico (HNCO) catalisada pelos íons de cobre.

Entretanto, o inverso é observado nos destilados das soluções modelos fortificadas com KOCN e uréia. Onde a concentração final de CE nos destilados diminui com a presença de cobre metálico na coluna de destilação. O que sugere uma possível complexação das espécies precursoras de CE presentes no vapor no cobre da coluna ou sua conversão em espécies inativas para a formação de CE.

Esta hipótese foi avaliada através de experimentos envolvendo a exposição de chapas de cobre, durante o processo de destilação em coluna de vidro, aos vapores das soluções modelo fortificadas com os precursores de CE, conforme descrito anteriormente.

A Figura 22 ilustra os espectros de FTIR-ATR obtidos da superfície do cobre, após o processo de destilação, introduzido na coluna de vidro.

Figura 22 – Espectros de FTIR-ATR das superfícies das placas de cobre expostas aos vapores da destilação de soluções etanólicas (10% v/v) fortificadas com 5×10^{-3} mol/L de KCN, KOCN e uréia.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos dos espectros de FTIR-ATR das placas de cobre, expostas aos vapores da destilação de soluções etanólicas (10% v/v) fortificadas com 5×10^{-3} mol/L de KCN, KOCN e uréia, reforçam as propostas apresentadas anteriormente para a diminuição e para o aumento da concentração final de CE nos destilados.

Os espectros de FTIR-ATR obtidos da superfície das placas de cobre, expostas aos vapores das soluções fortificadas com KCN, apresentaram a banda observada em $\sim 2170 \text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento $\nu(\text{CN})$ do íon cianeto coordenado ao cobre.^{76,77} Também foi observada a banda característica de amidas $\nu(\text{CO})$ em $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ e em menor intensidade na região de $\nu(\text{NH}) \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$, provavelmente referente ao CE formado após a oxidação dos íons cianeto catalisada pelo cobre.^{76,77}

As placas de cobre expostas aos vapores das soluções fortificadas com KOCN e uréia apresentaram os espectros de FTIR-ATR com perfil semelhante, provavelmente devido a uréia gerar íons cianato em sua reação de decomposição térmica. Nos espectros obtidos foi possível observar as bandas em $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$ e em $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$, atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{NCO})$ dos íons cianato coordenados ao cobre.^{76,77} Além disso, é possível verificar o sinal bem definido em $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ atribuído à carbamatos primários, referente ao estiramento $\nu(\text{CO})$ da função amida.^{76,77}

O conjunto de dados obtidos apresentaram o efeito da presença de alguns íons metálicos e do cobre metálico na reação de formação de carbamato de etila. A presença do cobre durante o processo de destilação merece destaque. Sobretudo o efeito que este metal tem quando a sua área de contato com os vapores da destilação é aumentada. Em contato com os vapores das soluções fortificadas com KCN, o metal aumentou em até 4 vezes a concentração final de CE no destilado. Entretanto, em contato com os vapores das soluções fortificadas com ureia e com KOCN, o teor final de CE no destilado foi reduzido em até 98%.

4.7. Possíveis armadilhas dos precursores de CE.

No intuito de verificar a eficiência do uso de compostos que possam atuar como possíveis armadilhas dos precursores do carbamato de etila, sais de cobre (CuSO_4) e de ferro (FeSO_4) e o ácido antranílico foram adicionados ao vinho fortificado com uréia ($0,075\text{ mol/L}$) antes do processo de destilação. O sulfato de cobre(II) e de ferro(II) foram utilizados na proporção de 1:2 de uréia/sal e o ácido antranílico na proporção de 1:0,5 de uréia/ácido.

A Figura 23 mostra que a adição de ácido antranílico ao vinho diminuiu a concentração final de CE no destilado. O ácido antranílico é dos reagentes utilizados para a determinação de íons cianato, e entre os utilizados, foi o que apresentou maior eficiência, mesmo em um meio complexo como o caldo de cana fermentado.

Figura 23 – Concentração de carbamato de etila em cachaças obtidas de vinhos fortificados com ureia, CuSO_4 , FeSO_4 e ácido antranílico.

Fonte: Autoria própria.

É proposto⁴² que o cobre(II) e o ferro(II) atuem como catalisadores para a reação de oxidação de íons cianeto a cianato, este último reagiria com etanol e formaria o CE. Contudo, não apresentaram grande influência no teor final de CE no destilado quando comparados ao ácido antranílico. Os resultados deste estudo reforçam a importância dos íons cianato na reação de formação do CE.

4.4. Aspectos cinéticos e termodinâmicos da formação de carbamato de etila a partir da reação entre o etanol e os íons cianato

O suporte adicional para a discussão sobre a formação do carbamato de etila veio de experimentos onde KOCN foi adicionado em soluções aquo etanólicas, mimetizando a aguardente de cana, e os teores de íons cianato e o carbamato de etila foram monitorados ao longo do tempo. Conforme pode ser observado na Figura 24, a concentração de carbamato de etila (A) aumenta conforme a concentração de íons cianato (B) diminui. Estes resultados confirmaram prévias observações de que os íons cianato podem ser o principal precursor do carbamato de etila em aguardentes de cana recém-distiladas.^{22,29,40}

Figura 24 – Formação de carbamato de etila (A) e decaimento de íons cianato (B) em soluções etanólicas 40% (v/v) tamponadas ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4,5) contendo 1×10^{-3} mol/L de KOCN a 45°C.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 25 ilustra um dos experimentos realizados para monitorar a formação de carbamato de etila ao longo do tempo após sucessivas adições de íons cianato em solução aquo etanólica ou em cachaça. Conforme observado na Figura 25, as reações de formação de CE ao longo do tempo exibiram o mesmo tempo de meia vida. Este fenômeno é claramente reproduzível se a segunda adição de íons cianato for realizada após o fim da reação da primeira adição do sal de cianato.

Figura 25 – Formação de carbamato de etila ao longo do tempo em aguardente de cana (42% etanol, $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4,7, 25°C) após sucessivas adições de 5×10^{-3} mol/L de cianato de potássio. A seta indica o momento da segunda adição de cianato de potássio.

Fonte: Adaptação da referência 62.

A concentração final de CE depende da concentração de íons cianato adicionada a solução modelo de aguardente e indica que são formados aproximadamente 0,3 mol de CE por mol de íons cianato adicionado ($\approx 32\%$) quando todos os outros parâmetros experimentais são mantidos constantes. Em se tratando de uísques, a regra de ouro (“rule of thumb”), proposta para o uso em destilarias, é calcular a potencial formação de CE na bebidas como 32% do montante total dos precursores de CE.⁷⁸

A hidrólise do HNCO pode ocorrer paralelamente com a formação de CE. Em condições experimentais semelhantes, esta reação é 3,6 vezes ($k_{\text{obs}} = 2,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a 25°C) mais rápida do que a reação de formação de CE, o que pode contribuir para o rendimento de CE acima referido em relação aos íons cianato disponíveis.⁴⁰

De acordo com a Tabela 15, o rendimento de CE aumenta conforme a concentração de etanol aumenta, atingindo um valor máximo de cerca de 0,3 quando o teor de etanol é igual a 57,5% e, em seguida, mantém-se constante até um teor alcoólico de 91,5%. Além disso, em nossos experimentos, o rendimento de CE não foi afetado na faixa de pH estudada.

Tabela 15 – Valores da concentração de carbamato de etila ([CE]) formado, da constante de velocidade observada (k_{obs}) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) a partir de soluções aquo etanólicas fortificadas com $2,0 \times 10^{-5}$ mol/L de KOCN em diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), pH e teor alcoólico (% v/v).

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Teor alcoólico (% v/v)	pH	[CE] (mol/L)	k_{obs} (s^{-1})	$t_{1/2}$ (s)
15	48,0	4,5	$6,5 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^4$
25	48,0	4,5	$6,2 \times 10^{-6}$	$8,6 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^3$
35	48,0	4,5	$6,4 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^3$
25	48,0	3,0	$6,0 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-4}$	$8,8 \times 10^2$
25	48,0	3,9	$6,4 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$
25	48,0	5,3	$6,1 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^4$
25	48,0	6,0	$6,3 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^4$
25	0	4,5	n.d.	$2,9 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^3$
25	13,3	4,5	$1,9 \times 10^{-6}$	$9,0 \times 10^{-5}$	$7,7 \times 10^3$
25	24,4	4,5	$4,0 \times 10^{-6}$	$9,2 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^3$
35	1,7	4,5	$3,4 \times 10^{-8}$	$4,1 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$
35	2,0	4,5	$1,9 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^3$
35	4,5	4,5	$4,2 \times 10^{-7}$	$4,4 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^3$
35	5,3	4,5	$4,0 \times 10^{-7}$	$4,3 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^3$
35	10,6	4,5	$1,7 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^3$
35	22,4	4,5	$3,0 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^3$
35	35,0	4,5	$4,8 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^3$
35	57,5	4,5	$7,2 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$
35	70,0	4,5	$7,1 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^3$
35	83,1	4,5	$7,3 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^3$
35	91,5	4,5	$7,3 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^3$

Fonte: Adaptação das referências 40 e 62. n.d. = não detectado.

Dentro dos limites do erro experimental, os valores das constantes de velocidade (k_{obs}) para o decaimento de íons cianato $(8,0 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e para a formação de CE $(8,9 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ estão de acordo com os valores relatados na literatura, que foram determinadas utilizando técnicas diferentes e monitorando a concentração de íons cianato e de produto formado (CE).^{40,41}

As constantes de velocidade observadas são independentes da concentração de etanol na faixa de $2,9 \times 10^{-2}$ a $15,7 \text{ mol/L}$, mas aumentam a medida que a temperatura aumenta (Tabela 15). Na faixa de pH de estudada, as constantes de velocidade diminuem a medida que o pH da solução aumenta (Tabela 15). Quando o

pH da solução for superior a 7, a taxa de formação de CE foi estimada em $<10^{-7} \text{ s}^{-1}$, indicando a importância da forma protonada dos íons cianato desta reação.

O efeito da temperatura na reação de formação de CE foi avaliado através dos dados cinéticos em função da temperatura e os parâmetros de ativação calculados foram: $\Delta H_1^\ddagger = 19,4 \pm 1 \text{ kcal/mol}$, $\Delta S_1^\ddagger = -12,1 \pm 1 \text{ cal/K mol}$ $\Delta G_1^\ddagger = 23,0 \pm 1 \text{ kcal/mol}$.

O carbamato de etila é formado pela reação entre o etanol e íons cianato. Além disso, vale ressaltar que nas condições experimentais descritas na Tabela 15, a constante de velocidade para esta reação é independente das concentrações de etanol e de íons cianato e é igual a $(8,9 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 25°C. Estas observações sugerem que uma espécie intermediária é formada durante a reação, e que a constante de velocidade para a formação de CE é dependente da presença da forma protonada dos íons cianato no meio reacional.

Quatro isômeros do ácido ciânico são descritos na literatura: HNCO, HOCN, HONC e HCNO.⁷⁹⁻⁸¹ O ácido isociânico (HNCO, pKa = 3,7) e o ácido ciânico (HOCN, pKa <3,0) são os mais abundantes e existem em um equilíbrio tautomérico.⁷⁹⁻⁸¹ Com base em espectros da literatura na região do infravermelho do vapor e do líquido, inferiu-se a predominância do HNCO com <0,2% do HOCN. Além disso, a formação do HNCO é favorecida quando a temperatura aumenta.⁷⁹

De acordo com nossos cálculos computacionais (DFT), em água ou em soluções aquo etanólicas, o ácido isociânico é mais estável do que o seu correspondente isômero HOCN em termos de energia livre (ΔG_{eq}) por $23,6 \pm 2 \text{ kcal/mol}$. A barreira de isomerização é de $\Delta G_1^\ddagger = 24,9 \pm 1 \text{ kcal/mol}$ quando o efeito IEFPCM é considerado e as moléculas do solvente (três moléculas de água ou de etanol) estão explícitas na matriz.

Considerando que o pH típico encontrado em aguardentes é de 4,5 aproximadamente, ambas as espécies HNCO e HOCN podem ser consideradas como potenciais precursores ativos na reação de formação de CE. No entanto, o HNCO é provavelmente o precursor mais relevante devido à sua abundância nas condições experimentais estudadas.⁷⁹

A formação de carbamato de etila foi estudada através da modelagem da reação entre o etanol e ambos os ácidos isociânico (Figura 26) e ciânico (Figura 27). Considerando a via do ácido isociânico, a reação é direta e os parâmetros de

ativação $\Delta G_1^\ddagger$, $\Delta H_1^\ddagger$ e $\Delta S_1^\ddagger$ calculados foram 21,5 kcal/mol, 14,6 kcal/mol e -23,1 cal/K mol, respectivamente. E os parâmetros termodinâmicos ΔG_{eq} , ΔH_{eq} e ΔS_{eq} calculados foram -14,1 kcal/mol, 19,0 kcal/mol e 16,9 cal/K mol, respectivamente.

Figura 26 – Variação da energia de Gibbs relativa da formação de CE, obtida através de cálculos computacionais com o método de solvente explícito, através da reação entre o ácido isociânico e o etanol.

Fonte: Adaptação da referência 62.

O mecanismo proposto é mais complexo quando o ácido cianico é considerado como o precursor ativo na formação de CE, conforme ilustrado na Figura 27. Os parâmetros de ativação $\Delta G_1^\ddagger$, $\Delta H_1^\ddagger$ e $\Delta S_1^\ddagger$ calculados foram 41,8 kcal/mol, 34,4 kcal/mol e 23,0 cal/K mol, respectivamente.

Figura 27 – Variação da energia de Gibbs relativa da formação de CE, obtida através de cálculos computacionais com o método de solvente explícito, através da reação entre o ácido cianico e o etanol.

Fonte: Adaptação da referência ⁶².

A partir dos dados apresentados pela Tabela 16, é possível observar que a reação entre o etanol e o ácido isociânico é mais favorável do que a reação com o ácido cianico em torno de 23,3 kcal/mol. Além disso, os parâmetros de ativação da reação de formação de CE, via ácido isociânico, obtidos através de cálculos teóricos estão próximos dos valores observados experimentalmente.

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações estudadas: dados experimentais (Exp), DFT em fase gasosa (Gás), DFT com solvatação implícita (IEFPCM) e DFT com efeito explícito do solvente (S.E.).

Reação		$\Delta G_1^\ddagger$ (kcal/mol)	ΔG_{eq}
$HNCO \rightleftharpoons HOCN$	Exp	-	-
	Gás	90,6	27,6
	IEFPCM	82,5	23,6
	S.E.	24,9	22,1
$HNCO + EtOH \rightleftharpoons EC$	Exp	23,0	-
	Gás	40,1	-10,6
	IEFPCM	37,8	-14,1
	S.E.	21,5	-14,1
$HOCN + EtOH \rightleftharpoons EC$	Exp	-	-
	Gás	48,1	-39,7
	IEFPCM	49,0	-36,7
	S.E.	41,8	-23,4
$HNCO + H_2O \rightleftharpoons CO_2 + NH_3$	Exp	22,4	-
	Gás	40,4	-16,3
	IEFPCM	41,8	-13,7
	S.E.	24,0	-17,6

Fonte: Adaptação da referência 62.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O método proposto para a determinação de íons cianato em meio etanólico em concentrações entre $6,7 \times 10^{-7}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L é simples, sensível, seletivo e reprodutível. Além disso, pode ser realizado na presença de grande excesso de íons cianeto, tiocianato, cloreto, nitrato, sulfato, sódio e potássio, bem como carbamato de etila e uréia sem interferência analítica.

As análises de íons cianato em amostras de diferentes frações (cabeça, coração e cauda) de aguardentes de cana sugeriram uma forte correlação entre a presença de ureia no vinho, e as concentrações de íons cianato e carbamato de etila no destilado.

O aminoácido citrulina apresentou maior influência na reação de formação de CE em meio etanólico em relação a arginina. Além disso, foi observado a presença de íons cianato durante a formação de CE em solução etanólica a partir da citrulina.

Os íons cianato, que podem ser gerados a partir da decomposição da uréia e da citrulina, são os precursores ativos na formação de carbamato de etila em aguardentes de cana.

A medida que diminui a concentração de íons cianato, aumenta a de carbamato de etila. Os valores das constantes de decaimento dos íons cianato e de formação de CE observados foram de $(8,0 \pm 0,4) \times 10^{-5}$ e de $(8,90 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, a 25 °C em solução etanólica 48% (v/v) com pH 4,5.

As constantes de velocidade para esta reação são independentes das concentrações de etanol e dos íons cianato, mas aumentam com a elevação da temperatura e diminuição do pH ($\Delta H^\ddagger = 19,4 \pm 1 \text{ kcal/mol}$, $\Delta S^\ddagger = -12,1 \pm 1 \text{ cal/K}$ e $\Delta G^\ddagger = 23,0 \pm 1 \text{ kcal/mol}$).

Os cálculos computacionais (DFT), mostraram que os valores calculados de $\Delta H_1^\ddagger$, $\Delta S_1^\ddagger$ e $\Delta G_1^\ddagger$ estão de acordo com os obtidos experimentalmente.

O cobre tem um efeito significativo na reação de formação do CE. Atua na reação de oxidação de íons cianeto e pode se coordenar com alguns precursores de CE. Sua presença apresentou papel importante, durante as etapas de fermentação e de destilação, no teor final de CE.

Por meio dos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que as rotas de formação de carbamato de etila em aguardentes ocorram pelas sequencias de reações ilustradas pela Figura 28.

Figura 28 – Rotas de formação de carbamato de etila em aguardentes de cana.

Fonte: Autoria própria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR: EUA reconhece cachaça como produto brasileiro. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/noticia.php?area=1¬icia=11440>>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- (2) PORTAL DO PLANALTO: Estados Unidos reconhecem cachaça como bebida exclusivamente brasileira. Disponível em: <<http://www2.planalto.gov.br/imprensa/noticiasde-governo/estados-unidos-reconhecem-cachaca-como-bebida-exclusivamentebrasileira/> view>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- (3) INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA: Mercado interno. Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=47>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- (4) EMBRAPA: Cachaça. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canade-acucar>>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- (5) ABRABE: A Cachaça. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- (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) ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, v. 259, p. 325-350, 1991.
- (8) EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel in the food chain on a request from the European Commission on ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. **The EFSA Journal**, v. 551, p. 1-44, 2007.
- (9) 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 julho de 2010. Seção 1, n. 137, p.8.
- (10) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 28, de 08 de agosto de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de agosto de 2014. Seção 1, n. 152, p. 7.
- (11) MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA.

Disponível em:
 <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2014/08/definido-limite-de-carbamato-de-etila-em-aguardente-de-cana>>. Acesso em: 15 de agos. 2014.

- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) LIMA, U. A. Aguardente: fabricação em pequenas destilarias. Piracicaba: Ed. FEALQ, 1999. 187p.
- (15) MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos, v. 12, n. 2, p. 29-39, 1994.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) SIGMA. Urethane: Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- (20) 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.
- (21) MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. **Food Control**, v. 20, p. 139-143, 2009.
- (22) 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.
- (23) JONES, D. A. Why are so many food plants cyanogenic? **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 155-162, 1998.
- (24) 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.

- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) 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.
- (28) 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.
- (29) GALINARO, Carlos Alexandre. **Da formação e controle de carbamato de etila em aguardentes**. 2011. 107f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- (30) CAVALCANTI, A. F. **Bidestilação em alambiques de cobre contendo dispositivos de cobre e a sua influência na qualidade da cachaça**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2009.
- (31) SCHABER, P. M.; COLSON, J.; HIGGINS, S.; THIELEN, D.; ANSPACH, B.; BRAUER, J. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochimica Acta**, v. 424, p. 131-142, 2004.
- (32) JIAO, Z.; DONG, Y.; CHEN, Q. Ethyl carbamate in fermented beverages: Presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 611-626, 2014.
- (33) ALEXANDROVA, A. N.; JORGENSEN, W. L. Why urea eliminates ammonia rather than hydrolyzes in aqueous solution. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 720-730, 2007.
- (34) MIRA DE ORDUÑA, 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.
- (35) 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 Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 352-356, 1993.

- (36) SEIGLER, D. S. Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. **Phytochemistry**, v. 14, p. 9-29, 1975.
- (37) OKE, O. L. Toxicity of cyanogenic glycosides. **Food Chemistry**, v. 6, p. 97-109, 1980.
- (38) VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v. 38, p. 11-36, 2000.
- (39) TAKI, N.; IAMURA, L.; TAKERE, S.; KOBASHI, K. Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Japane Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 498-505, 1992.
- (40) DA SILVA, A. A.; OHE, T. H. K.; FRANCO, D. W. Decaimento de íons cianato e a formação de carbamato de etila. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1101-1103, 2013.
- (41) OHE, T. H. K.; DA SILVA, A. A.; ROCHA, T. S.; DE GODOY, F. S.; FRANCO, D. W. A fluorescence-based method for cyanate analysis in thanol/water media: correlation between cyanate presence and ethyl carbamate formation in sugar cane spirit. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 1950-1955, 2014.
- (42) ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper (II) catalysis in cyanide into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2819-2824, 2001.
- (43) SERAFIM, F. A. T.; GALINARO, C. A.; DA SILVA, A. A.; BUCHVISER, S. F.; DO NASCIMENTO, E. S. P.; NOVAES, F. V.; FRANCO, D. W. Quantitative chemical profile and multivariate statistical analysis of alembic distilled sugarcane spirit fractions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1506-1514, 2012.
- (44) DE ALMEIDA LIMA, U., TEIXEIRA, C. G., BERTOZZI, J. C.; SERAFIM, F. A. T., ALCARDE, A. R. Influence of fast and slow distillation on ethyl carbamate content and on coefficient of non-alcohol components in Brazilian sugarcane spirits. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, p. 305-308, 2012.
- (45) 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.
- (46) 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.
- (47) 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 pathway. **Journal of Chromatography A**, v. 14, p. 2881-2890, 2009.

- (48) 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.
- (49) JANEGITZ, B. C.; OLIVEIRA, A.; GOMES, M. S.; SARTORI, E. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FATBELLO-FILHO, O. Removal of copper (II) from sugar-cane spirits employing chitosan. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 458-460, 2010.
- (50) BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.
- (51) DOUGLAS, L. A.; BREMNER, J. M. Colorimetric determination of microgram quantities of urea. **Analytical Letters**, v. 3, n. 2, p. 79-87, 1970.
- (52) 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, p. 1074-1077, 2002.
- (53) GUILLOTON, M, KARST, F. A spectrophotometric determination of cyanate using reaction with 2-aminobenzoic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 149, p. 291-295, 1985.
- (54) MEIER, P. C.; ZÜND, R. E. **Statistical methods in analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 321 p.
- (55) BUNNETT, J. F. **Investigation of Rates and Mechanisms of Reaction Part I**, Lewis, E. S., ed.; Wiley: New York, 1974, v. 6, cap. 8.
- (56) HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review**, v. 136 (3B), p. B864-B871, 1964.
- (57) KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, v. 140 (4A), p. A1133-A1138, 1965.
- (58) BECKE, A. Density functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.
- (59) DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 54, p. 724-728, 1971.
- (60) CLARK, T.; CHANDRASEKHAR, J.; SPITZNAGEL, G. W.; SCHLEYER, P. V. R. Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III.

The 3-21+G basis set for first-row elements, Li–F. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, p. 294-301, 1983.

- (61) FRISCH, M. J.; POPLE, J. A.; BINKLEY, J. S. Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. **The Journal of Chemical Physics**, v. 80, p. 3265, 1984.
- (62) GALINARO, C. A.; OHE, T. H. K.; DA SILVA, A. C. H.; DA SILVA, S. C.; FRANCO, D. W. Cyanate as an active precursor of ethyl carbamate formation in sugar cane spirit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 7415-7420, 2015.
- (63) FORESMAN, J. B.; FRISCH, A. E. **Exploring Chemistry with Electronic Structure Method**, 2nd ed.; Gaussian Inc.: Pittsburgh, PA, USA, 1996.
- (64) CANCÈS, E.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. **The Journal of Chemical Physics**, v. 107, p. 3032, 1997.
- (65) HRATCHIAN, H. P.; SCHLEGEL, H. B. Finding minima, transition states, and following reaction pathways on ab initio potential energy surfaces. In: *Theory and Applications of Computational Chemistry: The First Forty Years*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005.
- (66) FUKUI, K. The path of chemical reactions - the IRC approach. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, p. 363–368, 1981.
- (67) GAO, J.; HE, L. N.; MIAO, C. X.; CHANFREAU, S. Chemical fixation of CO₂: efficient synthesis of quinazoline-2,4(1H,3h)-diones catalyzed by guanidines under solvent-free conditions. **Tetrahedron**, v. 66, p. 4063-4067, 2010.
- (68) BUTZKE, C. E.; BISSON, L. F. **Ethyl carbamate - preventive action manual**. U. C. Davis, CA, 1997. 13 p.
- (69) STEVENS, D. F.; 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**, vol. 44, 309-312, 1993.
- (70) AZEVEDO, Z.; COUTO, J. A.; HOGG, T. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 32-36, 2002.
- (71) NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Tradução de Ana Beatriz G. da Veiga et. al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1336 p.
- (72) STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução de João Paulo de Campos et. al. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 882 p.

- (73) MURRAY, K.; STROIER RASMUSSEN, P.; NEUSTAEDTER, J.; MURRAY LUCK, J. The hydrolysis of arginine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, 705-709, 1965.
- (74) LIU, S. -Q; PILONE, G. J. A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 315-327, 1998.
- (75) BUTZKE, C. E.; BISSO, L. F. **Ethyl Carbamate - Preventive action manual**. UCDAVIS - Cooperative Extension, 1997, 13 p.
- (76) COLTHUP, N. B.; L. H. DALY; WIBERLEY, S.E. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**. 3^a ed. USA: Academic Press, 1990. 547 p.
- (77) NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 4^a ed. USA: John Wiley & Sons, 1986. 484 p.
- (78) AYLOTT, R. I.; COCHRANE, G. C.; LEONARD, M. J.; MACDONALD, L. S.; MACKENZIE, W. M.; MCNEISH, A. S.; WALKER, D. A. Ethyl carbamate formation in grain based spirits part i: post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky fermented foods. **Journal of Institute Brewing**, v. 96, p. 213-221, 1990.
- (79) AMELL, A. R. Kinetics of the hydrolysis of cyanic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p. 6234–6238, 1956.
- (80) ADAMCZYK, K.; DREYER, J.; PINES, D.; PINES, E.; NIBBERING, E. T. J. Ultrafast protonation of cyanate anion in aqueous solution. **Israel Journal of Chemistry**, v. 49, p. 217–225, 2009.
- (81) ZABARDAST, A.; KAKAN, A. Theoretical study of hydrogen bonded clusters of water and cyanic acid: hydrogen bonding in terms of the molecular structure. **Polyhedron**, v. 27, p. 2973-2977, 2008.