

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**

**Faculdade de Ciências**

**Licenciatura em Química**

**Paula Monique Chiconi de Picoli**

**Quantificação de Carbamato de Etila em vinhos**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Bauru**

**2012**

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**

**Faculdade de Ciências**

**Licenciatura em Química**

**Paula Monique Chiconi de Picoli**

**Quantificação de Carbamato de Etila em vinhos**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Dissertação Orientada pelo  
Prof.Doutor Manoel Lima de Menezes**

**Bauru**

**2012**

## **Agradecimento**

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida; por me auxiliar e guiar meus caminhos desde o vestibular até a conclusão deste curso.

Agradeço a Nossa Senhora pela intercessão nos períodos de prova.

À minha mãe, Vânia, pelas inúmeras noites de espera, em que aguardava meu regresso para casa; pelo carinho e atenção em ouvir, altas horas da noite, as novidades que a faculdade me proporcionava.

Ao meu pai, Carlos, por patrocinar o meu sonho, deixando muitas vezes os dele de lado para sonhar e torcer pelos meus.

Ao meu irmão, Caio, por dividir o computador, colaborando com a execução dos trabalhos e estudos para as provas.

A Belinha, minha cachorra, que muitas vezes teve que me ouvir confabular as teorias de química.

Aos amigos conquistados durante estes cinco anos, em especial a Karla e o Giovanni, pelo carinho, cuidado, conselhos e cumplicidade.

A todos os professores que participaram do meu crescimento acadêmico, em especial a professora Silvia Zuliani pelos conselhos, e ao professor Manoel Menezes pela orientação e paciência dedicados à mim na realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a todos que torceram e ainda torcem pelo meu sucesso pessoal e profissional.

## Resumo

O carbamato de etila é um composto presente na maioria dos alimentos fermento-destilados; devido ao seu potencial carcinogênico, a legislação nacional estabeleceu um limite de 0,150 µg/mL para bebidas destiladas, valores superiores ao mesmo representa uma ameaça tanto para saúde pública como também para o setor econômico, já que impedem a exportação destes produtos. Objetivou-se neste trabalho efetuar a otimização de um método analítico empregando a técnica de cromatografia gasosa equipado com o detector de ionização de chama (FID), para determinar os níveis de concentração de carbamato de etila em amostras de vinhos. O emprego do acetato de etila como solvente empregado na extração, do carbamato de etila presente em amostras de vinhos, mostrou-se adequado, onde foram obtidas recuperações entre 97,6 a 103,3 % (m/m), com um desvio padrão relativo entre 0,56 a 3,50%. Os níveis de concentração de carbamato de etila determinados em amostras de vinhos variam entre 3,22 µg/mL e 3,80 µg/mL, com média de 3,48 µg/mL. Estes valores são bem superiores ao limite estabelecido pela legislação. Desta forma os resultados indicam a necessidade de alterações no processo de produção de vinho, visando o controle dos teores da substância.

**Palavras Chave: Carbamato de etila , vinho, CG, FID.**

## Abstract

The ethyl carbamate is a compound present in most foods yeast-distillates; due to its carcinogenic potential, national legislation has established a limit of 0.150  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for spirits, so the values above the same, pose a threat to both public health as well for the economic sector by preventing the export of these products. The aim of this work is to provide the optimization of an analytical method employing the technique of gas chromatography equipped with flame ionization detector (FID) to determine the concentration levels of ethyl carbamate in some samples of wine. The use of ethyl acetate as solvent employed in the extraction, the ethyl carbamate present in wine samples proved to be suitable, where Recoveries were between 97.6 to 103.3% (m / m), with a standard deviation for between 0.56 to 3.50%. The concentrations of ethyl carbamate in particular wine samples vary between 3.22  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 3.80  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , with a mean of 3.48  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . These values are all above the limit set by law. Thus, the results indicate the need for changes in the process of wine production, in order to control the levels of the substance.

**Keywords:** Ethyl carbamate, wine, GC, FID.

**Lista de figuras**

**Figura 1** – Estrutura do Carbamato de Etila

**Figura 2** – Vias Metabólica do Carbamato de Etila

**Figura 3** – Sistema de cromatografia gasosa, acoplado ao headspace

**Figura 4** – Injeção de 1,0 µL de uma amostra de vinho fortificada com 2,0 µg L<sup>-1</sup> de carbamato de etila.

**Figura 5** – Curva de analítica para o carbamato de etila ( $r^2 = 0,9889$ ).

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1** – Limites legais em vigor no Canadá para Carbamato de Etila em bebidas alcoólicas

**Tabela 2** – Condições cromatográficas aplicada para a otimização da metodologia para determinação de Carbamato de Etila utilizando o detector FID

**Tabela 3** – Avaliação da recuperação do Carbamato de Etila em amostras de vinhos fortificadas

**Tabela 4** – Determinação dos níveis de Carbamato de Etila em amostras de vinhos

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

Alc.- Álcool

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE - Carbamato de Etila

CG-FID - Cromatografia a Gás com Detecção por Ionização de Chama

GC-MS - Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

MAPA -Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

UVIBRA – União Brasileira de Vitivinicultura

ppm - parte por milhão

°C - graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

M - Molaridade

L – litro

mL – mililitro

min – minutos

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	1
<b>1.1 Carbamato de Etila (CE)</b>	2
1.1.1 Propriedades Físicas	2
1.1.2 Aplicação	3
1.1.3 Toxicidade	3
1.1.4 Regulamentação em bebidas alcoólicas	4
1.1.5 Via Metabólica em vinhos	5
1.1.6 Forma de Controle	7
1.1.7 Objetivo	8
<b>2. Material e Métodos</b>	9
2.1 Otimização Cromatográfica	9
2.1.1 Reagentes	9
2.1.2 Preparação da solução-padrão de carbamato de etila	9
2.1.3 Preparação das soluções-padrão para a obtenção da curva analítica	9
2.1.4 Fortificação das amostras de vinho	9
2.1.5 Instrumentação	10
2.2 Métodos	10
2.2.1 Condições cromatográficas para a determinação de carbamato de etila presentes em soluções-padrão	10
2.2.2 Avaliação da recuperação do carbamato de etila presente em amostra de vinhos fortificadas	11
<b>3. Resultados e Discussão</b>	11
3.1 Otimização cromatográfica	11
3.2 Avaliação da recuperação do carbamato de etila presentes em amostras de vinho fortificadas	13
3.3 Determinação dos níveis de carbamato de etila presentes em diferentes amostras de vinho	14
<b>4. Conclusão</b>	17
<b>5. Referências</b>	18

## 1. Introdução

Considerado por muitos o elixir da juventude, o vinho é uma das bebidas mais consumidas e produzidas no mundo; de raízes europeias, em destaque os maiores produtores Itália, França e Espanha, se expandiu pelos demais continentes através da colonização. No Brasil, a viticultura nasce a partir do século XVI, com a chegada dos portugueses; com o cultivo e o desenvolvimento das primeiras videiras, providas de Portugal e Espanha, na capitania de São Vicente. Apenas no século XIX, com a chegada dos imigrantes italianos na região sul do país a produção e a comercialização de vinhos ganharam força.

Em 1970, as primeiras multinacionais do vinho adentram ao país, mas apesar dos investimentos e do trabalho, os resultados não foram de grande expressão, pois as técnicas de cultivo europeu em território brasileiro levaram tempo para serem adaptadas e desenvolvidas. O progresso na produção dos vinhos começou a partir dos anos 80, com o grande desenvolvimento tecnológico incorporados nas vinícolas. Na década de 90, os vinicultores deram ênfase para qualidade do destilado, e ao mesmo tempo a bebida se popularizou.

Atualmente, diversos empresários têm investido na produção de vinhos, visando o mercado externo, onde o país tem conquistado um grande prestígio. A viticultura brasileira ocupa, atualmente, uma área de 71 mil hectares que abrange desde o extremo sul do Brasil até regiões próximas à linha do Equador. Segundo dados da Embrapa, 95% da produção de vinho no país corresponde ao estado do Rio Grande do Sul, onde o clima temperado, da região favorece o cultivo.

Em Petrolina, Pernambuco, corresponde ao segundo polo produtor do país, de clima quente e seco é possível obter mais de uma safra de uva por ano, diferente do clima temperado presente no sul do país e na Europa que possui uma safra apenas por ano. Segundo José Gualberto Almeida, presidente do Instituto do Vinho do Vale do São Francisco, a produção da região corresponde 7 milhões de litros/ano, e vem aumentando entre 5% e 10% ao ano.

Contudo, a grande dificuldade enfrentada pelo vinho nacional é a competição presente no mercado interno, perante aos vinhos providos da Argentina e do Chile, segundo Adriano Miolo, diretor técnico de vinícola, de cada 10 garrafas de vinho fino vendidas, sete são importadas.

Quando o assunto é a saúde, é considerado o melhor amigo do coração, previne doenças cardíacas, controla as taxas de colesterol, é antioxidante, além de auxiliar na digestão. Segundo o doutor Gary Curham, a bebida reduz cerca de 59% no risco de pedras nos rins e 75% na taxa de mal de Alzheimer. A casca da uva possui substâncias como resveratrol e flavonóides, substâncias presentes em maior quantidade em vinhos tintos, sendo a primeira responsável pelo controle das taxas de colesterol; já a segunda possui um poder antioxidante superior aos da vitamina E (Uvibra,1995).

Entretanto, tudo que é consumido em excesso traz malefícios á saúde, danos como alcoolismo, distúrbios de comportamento, síndrome fetal alcoólica, hipertensão arterial, arritmia, miocardiopatia e morte súbita, é o preço a pagar pelo consumo excessivo do destilado (NETO,1994). Além de conter inúmeras substâncias benéficas o vinho contém substâncias danosas como o carbamato de etila, responsável por diversos tipos de câncer.

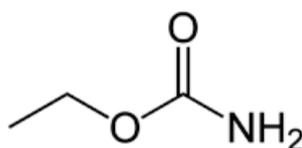
## **1.1 - Carbamato de Etila (CE)**

### **1.1.1 Propriedades Físicas**

O Carbamato de Etila ou uretana, ( $C_2H_5OCONH_2$ ), é um éster etílico do ácido carbâmico, é considerado uma substância carcinogênica, encontrada em diversos alimentos como queijo, iogurtes, molhos de soja, pães, e bebidas fermento-destiladas, como o vinho.

Possui uma estrutura cristalina incolor ou na forma de um pó branco granular, é uma substância inodora de sabor salino refrescante e levemente amarga, cujo o ponto de ebulição varia entre 182 e 184°C e o ponto de fusão entre 48 a 50°C; de peso molecular 89,09 g.mol<sup>-1</sup>, apresenta solubilidade em metanol, etanol, clorofórmio, água e éter etílico ( BARCELOS, 2007).

**Figura 1** . Estrutura do carbamato de etila



Fonte – <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Carbamato\\_de\\_etila](http://pt.wikipedia.org/wiki/Carbamato_de_etila)>, 2012.

Considerado um composto biologicamente ativo, é conhecido pelo seu efeito anestésico (BOSCOLO, 2001).

### **1.1.2 Aplicação**

O carbamato de Etila é utilizado como anestésico veterinário, cos-solvente em algumas síntese orgânica. Comercialmente, é utilizado na produção de amino-resinas, cos-solvente para pesticidas e fumigantes, e em limpeza e secagem de peças de vestuário (HOFFLER et al.,2003).

Na área médica, auxilia no tratamento de varizes, leucemia crônica e mieloma múltiplo (HOFFLER et al.,2003).

### **1.1.3 Toxicidade**

Em testes de toxicidade em animais o CE causou edemas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos, hepatomas, carcinomas mamários, tumores de ovário, hemangiomas hepáticos, tumores melanóticos de pele, de íris, entre tantos outros (Galinaro & Franco, 2011).

Sendo classificado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, agente cancerígeno de classe 2 A, como provável carcinogênico para humanos (Nagato,2000).

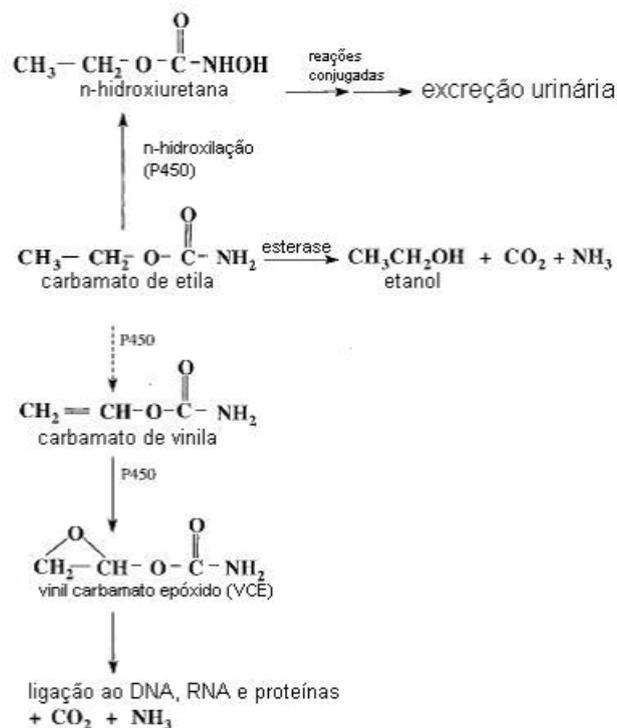
Além de carcinogênico, o composto e seu metabólito carbamato de vinila causam mutações em diversos órgãos, incluindo pulmões, fígado e glândulas mamárias (Labanca,2008).

Depois da ingestão dos alimentos nos quais contém composto, o mesmo é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e uniformemente distribuído pelo organismo. A eliminação, de 90% da substância danosa é rápida e ocorre num período entre 6 e 24 horas em roedores (JOINT FAO/WHO, 2005; HOFFLER, 2003).

A metabolização do CE ocorre através de duas vias principais; a primeira responsável pela formação do vinil carbamato através de processos oxidativos que ainda estão sendo estudados, catalisados pelos citocromos P450 e 2E1. Imediatamente, o vinil carbamato poderá ser oxidado resultando no vinil carbamato epóxido, um composto considerado como o principal agente cancerogênico causador de mutações genéticas (HOFFLER et al., 2003).

A segunda via leva a formação de CO<sub>2</sub>, etanol e NH<sub>3</sub>, num processo catalisado pela esterase (HOFFLER et al., 2003).

**Figura 2.** Vias metabólicas do carbamato de etila



Fonte: HOFFLER et al., 2003

#### 1.1.4 Regulamentação em bebidas alcoólicas

A fim de monitorar os níveis de CE em bebidas destiladas, em 1985, o Canadá através do “Health and Welfare Department”, estabeleceu um limite da substância danosa nos destilados, sendo considerado como padrão 0,150 µg/mL para vinhos, limites estes adotados como referência para os EUA e diversos países europeus (ZIETSMAN, 2006).

**Tabela 1** – Limites legais em vigor no Canadá para CE em bebidas alcoólicas

<b>Bebida Alcoólica</b>	<b>Concentração CE (µg/mL)</b>
Cerveja ( < 8,5 % alc.)	0,150
Cerveja ( > 8,5 % alc.)	0,300
Vinho de mesa ( < 14 % alc.)	0,150
Cidra( % de alc. não indicada)	0,300
Saké ( % de alc. não indicada)	0,200

Em 1990, o “Food and Drug Administration” conscientizou os produtores de vinhos americanos a fazer o controle do teor do CE na bebida, sendo que os valores estipulados para vinhos de mesa foram de 0,150 µg/mL e para vinhos licorosos de 0,600 µg/mL (CANAS, 1994).

A Instrução Normativa Nº 13 de 23 de junho de 2005, no Brasil, adotou também, 0,150 µg/mL como limite máximo deste contaminante, validado a partir de 2010, sendo o país um dos maiores produtores de destilados do mundo é de suma importância o controle desta substância , pois além dos malefícios gerados a saúde pública, o setor econômico também é afetado já que valores superiores adotado do contaminante impede o exportação dos produtos (Galinaro & Franco, 2011).

Visto a importância em reduzir o teor da substância cancerogênica, não apenas em bebidas destiladas, em 2007 no Reino Unido foram efetuados estudos através da “Food Standards Agency” sobre a presença desta substância nos diversos alimentos fermentados .

### **1.1.5 Via Metabólica em Vinhos**

Em 1930 foi realizada a síntese de esteres carbâmicos, a partir do aquecimento da ureia com etanol sob uma temperatura variante entre 175 e 190°C. Em 1976, Ough sintetizou, em 72 horas, o CE partindo dos mesmos

reagentes, ureia e etanol, em temperatura ambiente; em condições semelhantes as existentes nos vinhos.

Nos anos 80, foram constatados os primeiros estudos da substância cancerogênica em bebidas destiladas, iniciando-se pelo o uísque.

No Brasil, os estudos sobre os níveis de CE em destilados foram realizados nos anos 90, em aguardentes; trabalhos como o de Andrade – Sobrinho (2002) e de Barcelos (2007) são atualmente ditos como referência.

Industrialmente, o Carbamato de Etila é produzido a partir do fosfogênio, da uréia ou da cianamida, mas a principal forma de produção do composto para fins comerciais é da reação entre a ureia e o etanol (ARESTA, BOSCOLO, FRANCO,2001).

Nos vinhos a formação do composto ocorre desde o plantio ate o armazenamento do produto; considerando a ureia como principal precursor.

A ureia é frequentemente formada durante o inicio e/ou no meio da fermentação; durante a fermentação alcoólica, a mesma é produzida pelas leveduras através da metabolização dos aminoácidos existentes no sumo de uva, sendo que entre estes o mais abundante é a arginina; A ureia é um produto intermediário que se acumula na célula da levedura e, sendo um agente desnaturante, seu excesso é excretado para o mosto (ZIETSMAN, 2006).

A arginina pode ser metabolizada por duas enzimas, a arginase e a arginina deshidrogenase. A arginase é responsável pela formação da ureia, o principal precursor da formação do CE; a arginina deshidrogenase será responsável pela formação da citrulina, um outro precursor do mesmo.

A citrulina poderá reagir diretamente com o etanol e formar o CE ou reagir enzimaticamente formando a ornitina e fosfato carbamílico, este ultimo, poderá reagir com etanol e originar o composto indesejável (ZIETSMAN, 2006).

A arginina não é totalmente metabolizada na fermentação alcoólica, algumas bactérias lácticas, por possuírem a mesma via metabólica das

leveduras da fermentação alcoólica, utilizam-na na fermentação malo láctica e geram mais alguns precursores do CE (BUTZKE & BISSON, 1997).

Na etapa seguinte do processo de fermentação, ocorre à destilação, a formação do carbamato pode ocorrer antes (fermentação alcoólica e malo láctica), durante e após essa etapa através da reação do etanol com alguns compostos nitrogenados (Nagatto,2003).

Os vinhos licorosos e algumas bebidas alcoólicas destiladas apresentam elevados teores de glicosídeos cianogênicos providos de suas respectivas matérias-primas, que levam a mecanismos adicionais de formação de CE (McKenzie et al.1990), conseqüentemente os vinhos licorosos apresentam teores superiores da substância cancerogênica ao comparado com vinhos de mesa. Os compostos cianogênicos são hidrolisados termicamente ou enzimaticamente originando íons de cianeto; estes são convertidos em íons cianato que reagem com água e forma o íon amônio, que ao entrar em contato com o etanol presente no meio forma o CE (Aylott et al. 1990). A hidrólise térmica dos precursores cianogênicos é catalisada por íons de cobre presentes nos equipamentos de destilação (RIFKIN et al.,1989).

Após a destilação, durante o engarrafamento e armazenamento dos vinhos, a ureia presente no meio ligada a compostos azotados formados durante os processos de fermentação, sofre hidrólise com o passar do tempo, e ao reagir com o etanol forma o composto cancerogênico ( Muller et al.,1996).

A concentração do carbamato de etila em bebidas destiladas depende da temperatura, concentração dos reagentes, pH, luz e tempo de armazenamento do produto.

#### **1.1.6 Forma de Controle**

Eliminar definitivamente o CE tanto nos vinhos como nos outros alimentos é inevitável, já que a maioria dos precursores do mesmo se encontram na própria matéria-prima dos alimentos nos quais o contem.

A solução é adotar medidas de controle para evitar altos teores da substância cancerogênica; tais medidas envolve a monitoração dos teores de nitrogênio no solo das vinhas e no mosto (ureia); vale ressaltar que compostos quimicamente preparados à base de urease não eliminam completamente a formação do CE, pois não possuem efeito sobre a maioria dos precursores nitrogenados presentes, além de ser um processo caro.

Outra forma de controle seria evitar a exposição dos vinhos a temperaturas elevadas durante o armazenamento e transporte; monitorar os teores de arginina presente no sumo de uva; selecionar linhagens de leveduras com baixa excreção de ureia; evitar o número de enxertos no plantio para contribuir com os baixos teores da mesma (ZIETSMAN,2006).

#### **1.1.7 Objetivo**

O objetivo deste trabalho consiste na otimização de um método analítico empregando, a técnica de cromatografia gasosa utilizando o detector de ionização de chama, na determinação dos teores de carbamato de etila em diferentes amostras de vinho.

## **2 - Material e Métodos**

### **2.1. Otimização cromatográfica**

#### **2.1.1 Reagentes**

Foram utilizados os solventes, acetato de etila e metanol, adquiridos junto a Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany); Carbamato de etila e acetato de sódio adquiridos junto a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical Company, USA).

#### **2.1.2 Preparação da solução-padrão de carbamato de etila**

A solução-padrão foi preparada, dissolvendo-se uma quantidade conhecida de carbamato de etila em metanol, obtendo a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Esta solução foi mantida sob-refrigeração a -8 °C.

#### **2.1.3 Preparação das soluções-padrão para a obtenção da curva analítica.**

As soluções-padrão foram preparadas diluindo-se volumes conhecidos da solução-padrão de carbamato de etila, em acetato de etila, obtendo concentrações de 1,37; 2,74, 5,48; 10,96 e 21,92 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### **2.1.4 Fortificação das amostras de vinho**

Em um volume de 2,0 mL da amostra de vinho foram adicionadas quantidade conhecidas de carbamato de etila, a fim de obter níveis de concentração de 2,0; 2,40; 2,94 e 4,30 mg L<sup>-1</sup> e, a esta foi ajustado o pH com auxílio de 0,5 mL de acetato de sódio, seguido pela adição 4 ml do solvente acetato de etila, ambos 1 M .

### 2.1.5 Instrumentação

Para efetuar a otimização do método para determinação do carbamato de etila foi empregado um sistema de cromatografia gasosa, equipado com *headspace*, *autosample*, detector de ionização de chama, captura de elétrons, uma coluna Elite Wax (30m x 0,25mm DI x 0,25 $\mu$ m), injetor *on column*, seringa de injeção com capacidade de 5 $\mu$ L com agulha de 0,47mm DI. O sistema de cromatografia gasosa modelo Clarus 600, foi adquirido junto a PerkinElmer, (Waltham, MA, USA).

**Figura 3.** Sistema de cromatografia gasosa, acoplado ao headspace.



Fonte – Arquivo pessoal, 2012

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Condições cromatográficas para a determinação de carbamato de etila presentes em soluções-padrão

A otimização cromatográfica aplicada para a quantificação do carbamato de etila presentes em soluções-padrão foi realizada de acordo com as condições cromatográficas apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2** – Condições cromatográficas aplicada para a otimização da metodologia para a determinação de carbamato de etila utilizando o detector FID.

<b>Equipamento</b>	<b>CG - Clarus 600, Perkin Elmer</b>
Coluna capilar	Elite Wax (30m x 0,25mm x 0,25µm).
Gás de arraste	Nitrogênio (1,3 mL min <sup>-1</sup> )
Modo de injeção	<i>On column</i>
Volume de injeção	1 µL
Detecção	Ionização de chama
Temperatura detector	300 °C
Temperatura injector	Programação do forno
Programação do forno	100°C/3min, 30°C/min a 200°C/0,5min.
Tempo final	6,33 min

Fonte – Arquivo pessoal, 2012

### **2.2.2 – Avaliação da recuperação do carbamato de etila presente em amostras de vinhos fortificadas**

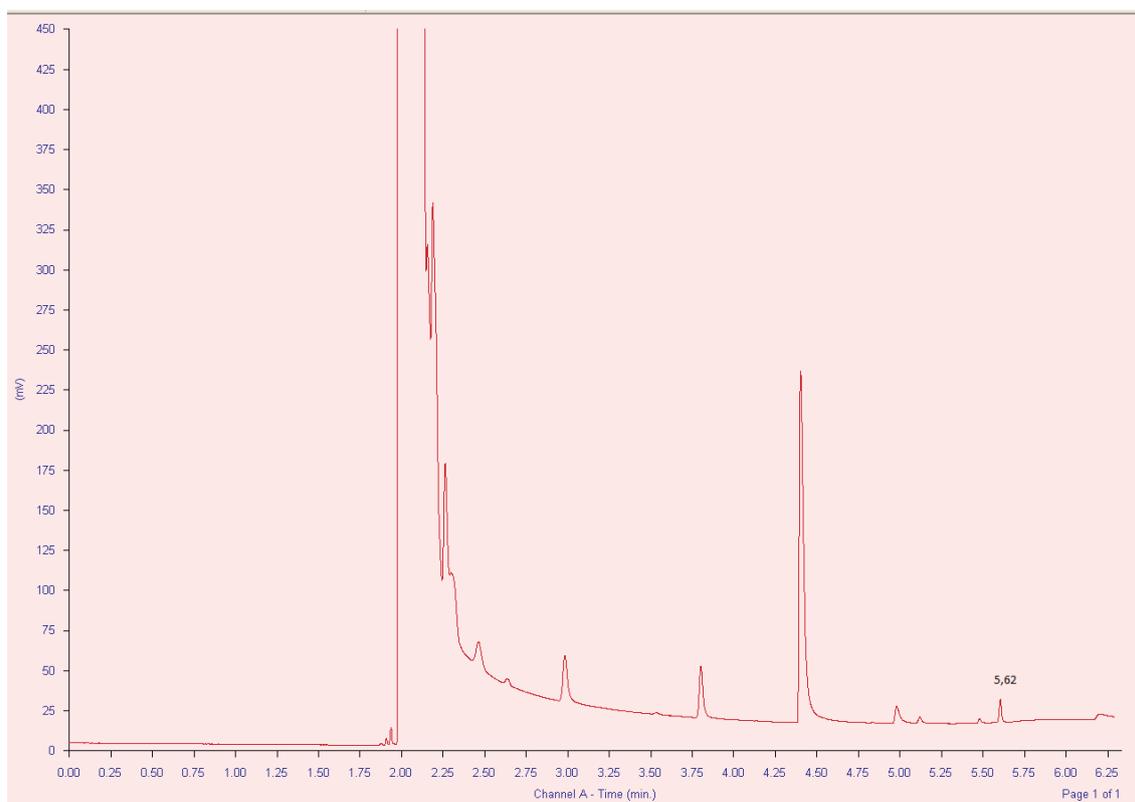
Esta avaliação foi realizada adicionando-se quantidades conhecidas de carbamato de etila em 2,0 mL na amostra de vinho, seguido pela adição de 0,5 mL de uma solução de acetato de sódio e 4,0 mL de uma solução de acetato de etila, ambas 1,0 mol L<sup>-1</sup>, em um tubo de centrifuga com capacidade de 15,0 mL. Após agitação e centrifugação, um mL da fase orgânica foi transferido para um vial e injetado 1,0 µL da amostra no sistema de cromatografia gasosa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3, no ítem “resultados e discussão”.

## **3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Otimização cromatográfica.**

O detector de ionização de chama apresentou-se adequado para efetuar as determinações do carbamato de etila presentes em amostras de vinhos fortificadas, empregando um sistema de cromatografia gasosa; juntamente com a coluna cromatográfica Elite Wax e o sistema de injeção *on column*. O emprego desta coluna mostrou-se adequado devido a inexistência de picos interferentes próximos ao pico do carbamato de etila, como pode ser observado na Figura 4.

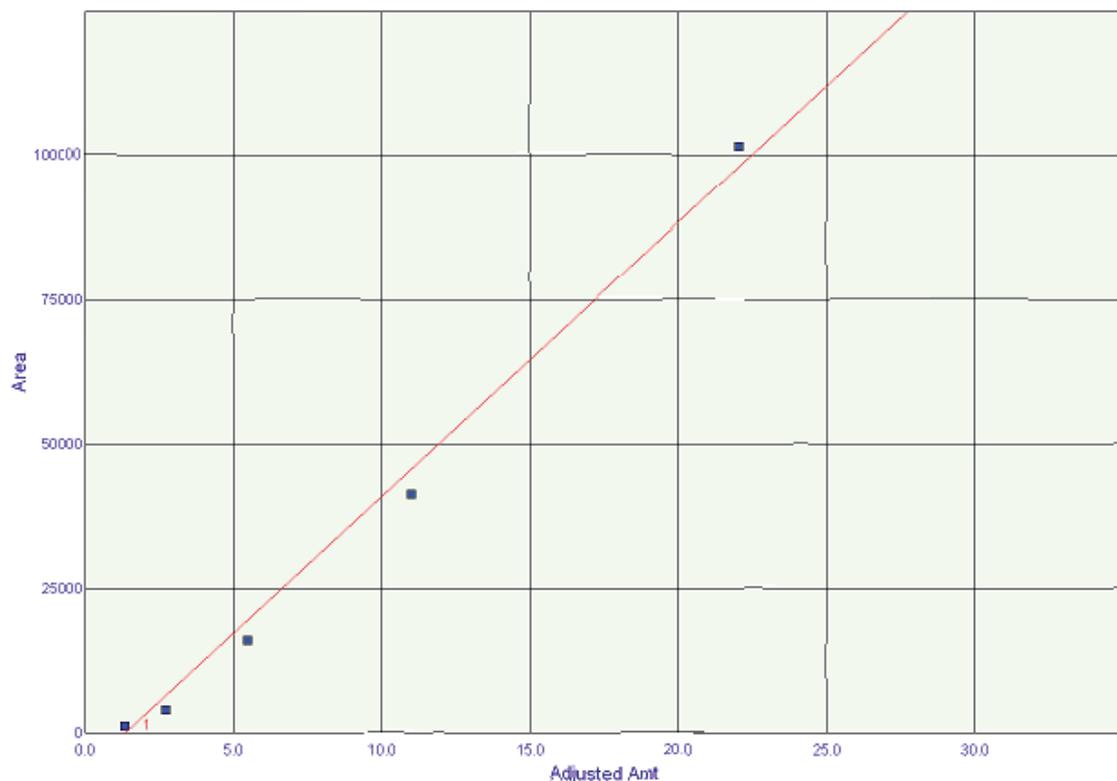
**Figura 4** – Injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  de uma amostra de vinho fortificada com 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de carbamato de etila.



Fonte – Arquivo pessoal, 2012

Á técnica de injeção *on column*, mostrou-se eficiente, uma vez que se observou uma excelente reprodutibilidade nas áreas obtidas após as injeção das soluções-padrão, para a construção da curva analítica, como pode ser visto na Figura 5.

**Figura 5** – Curva de analítica para o carbamato de etila ( $r^2 = 0,9889$ ).



Fonte – Arquivo pessoal, 2012

### 3.2 Avaliação da recuperação do carbamato de etila presentes em amostras de vinho fortificadas

O emprego da solução de acetato de sódio,  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  juntamente com o solvente acetato de etila, após agitação e centrifugação, mostrou-se eficaz na recuperação, uma vez que o efeito *salting* e correção do pH favoreceu a extração do carbamato de etila com o referido solvente. As recuperações obtidas para o carbamato de etila foram executadas em 5 níveis, sendo uma amostra controle (branco) e quatro níveis de concentração de fortificação. Os resultados obtidos para a recuperação do carbamato de etila, apresentaram valores percentuais entre 97,6 e 103,3 %, com CV de 0,56 a 3,5 %, como pode ser observado na Tabela 3.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (RIBANI).

Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$ . De acordo com os resultados obtidos, pode-se considerar a taxa de recuperação precisa, assim como o C.V. cujo o valor esta dentro do esperado.

Vale ressaltar que o carbamato de etila é um composto muito instável, decompõe-se rapidamente quando exposto a luz e a temperatura, desta forma as recuperações tornaram-se difíceis, por isso, cada extração foi mantida sob-refrigeração até o momento da injeção.

**Tabela 3** - Avaliação da recuperação do carbamato de etila em amostras de vinho fortificadas

Amostra	Carbamato de Etila		(%) Recuperação	(% )Média de Recuperação	C V (%)
	Adicionado ( $\mu\text{g/mL}$ )	Deter. ( $\mu\text{g/mL}$ )			
1	-----	1,61	-----	-----	-----
2	-----	1,60			
3	-----	1,57			
4	2,00	1,91	95,00	97,60	2,60
5	2,00	2,00	100,00		
6	2,00	1,97	98,00		
7	2,40	2,38	99,00	98,70	3,50
8	2,40	2,38	99,00		
9	2,40	2,30	95,00		
10	2,94	3,02	102,00	101,30	0,56
11	2,94	2,99	101,00		
12	2,94	2,98	101,00		
13	4,30	4,50	104,00	103,30	1,11
14	4,30	4,40	102,00		
15	4,30	4,48	104,00		

Fonte – Arquivo pessoal, 2012

### 3.3 Determinação dos níveis de carbamato de etila presentes em diferentes amostras de vinho

Os métodos otimizados para a determinação do carbamato de etila estão em conformidade com o protocolo da ANVISA, (ANVISA, 2003), estes são realizados empregando o sistema de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. O novo método proposto permitiu efetuar a determinação do carbamato de etila em diferentes amostras de vinho. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Determinação dos níveis de concentração de carbamato de etila em amostra de vinho

<b>Amostra</b>	<b>Carbamato de etila det. (µg/mL)</b>	<b>Média (µg/mL)</b>	<b>C.V (%)</b>
AA	3,48	3,40	2,06
	3,40		
	3,34		
AB	3,68	3,70	1,64
	3,80		
	3,72		
AC	3,64	3,60	1,94
	3,70		
	3,56		
AD	3,54	3,40	4,70
	3,22		
	3,38		
AE	3,36	3,30	2,09
	3,24		
	3,36		

Pode-se constatar através dos valores obtidos na análise que o teor de carbamato de etila encontrado nas diferentes amostras de vinho, foram superiores ao limite estabelecido pela legislação, 0,150µg/mL. A obrigatoriedade da detecção e controle da substancia em destilados em geral é de suma importância, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, a presença da mesma em concentrações superiores a 0,150 µg/mL constitui uma barreira para exportações, principalmente para Europa e América do Norte.

#### 4. Conclusões

A técnica de cromatografia gasosa proposta neste estudo como ferramenta de análise e determinação de carbamato de etila em amostras de vinhos, mostrou-se precisa e eficiente, podendo ser uma alternativa ao método considerado como oficial até o momento (GC-MS).

Os resultados obtidos nas cinco amostras de vinho avaliadas apresentaram teores de carbamato de etila superiores ao limite tolerado (0,150  $\mu\text{g/mL}$ ) pelo MAPA; com níveis que variaram entre 3,22  $\mu\text{g/mL}$  e 3,80  $\mu\text{g/mL}$ , com média de 3,48  $\mu\text{g/mL}$ .

Visto que a formação do composto em questão ocorre desde o plantio da matéria prima até o armazenamento do produto, e como este trabalho se restringiu em analisar o produto comercialmente, não monitorando todos os processos envolvidos, é possível prevê que os níveis elevados de CE encontrados correspondem ao mau armazenamento do produto.

Sendo o carbamato de etila, uma substância com reconhecido potencial carcinogênica, fica evidente a importância da realização de estudos mais aprofundados para elucidar todas as possibilidades de formação deste composto; estudos detalhados de todos os processos de produção do destilado, analisando minuciosamente todos os precursores existentes desde o plantio da uva até o armazenamento e transporte do produto pronto faz-se necessário para que o teor desta substancia se enquadrem no limite proposto pela legislação.

## 5. Referência:

ALABURDA, J.; CARUSO, M.S.F.; NAGATO, L.A.F. Benzo(a) pireno, carbamato de etila e metanol em cachaças. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.9, 2010.

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

ANDRADE SOBRINHO, L. G.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D.W. Teores de carbamato de etila em aguardente de cana e de mandioca. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 116-119, 2009.

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

BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; ANJOS, J. P. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da mata, sul de minas e vale do jequitinhonha. **Química Nova**, vol.30, n.4, p.1009-1011, 2007

BOSCOLO, M. **Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana. Ocorrência e quantificação**, (Tese – Doutorado), Instituto de Química de São Carlos, USP, São Paulo, 2001.

BOSCOLO, M.; FRANCO, D W ; ANDRADES OBRIBHO, L G . Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, Brasil, v. 25, n. 6, p. 1074-1077, 2002.

BUTZKE, C.E.; BISSON, L. F. Ethyl carbamate preventative action manual, Depart.of Viticulture & Enology, U. of CA, Davis, CA, for US FDA, 1997.

Disponível em :<<http://www.cfsan.fda.gov/~frf/ecaction.html> >. Acesso em: 13 maio 2012.

BRUNO, S.N.F. **Adequação dos processos de destilação e troca iônica na redução dos teores de carbamato de etila em cachaças produzidas no Estado do Rio de Janeiro.** Dissertação ( Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2006.

CANAS, B.J. et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by gas chromatography with mass selective detection. Collaborative study. *J. AOAC Int.*, v.77, n.6, p.1530-1536, nov.- dez. 1994.

CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W.; NASCIMENTO, R. F. . Influência do Material do Alambique na Composição Química da Aguardente. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 165-169, 2003.

FRANCO, D.W.; GALINARO, C.A. Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destiladas; proposta para seu controle. **Química Nova**, Brasil, v. 34, n.6, p. 996-1000, 2011.

HOFFLER, U. et al. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is the principal enzyme responsible for urethane metabolism: comparative studies using CYP2E1-null and wild-type mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.305, n. 2, p. 557-564, May 2003.

JOINT FAO/WHO. Ethyl carbamate. In: Expert Committee on Food Additives. Sixty-Fourth meeting, Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Summary and Conclusions. Rome, Feb. 8 -17, 2005. Disponível em:

<[http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary\\_report\\_64\\_ final.pdf](http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_ final.pdf)>.

Acesso em 09 jun. 2012.

LABANCA, R. A. **Teores de carbamato de etila, cobre e grau alcoólico em aguardentes produzidas em Minas Gerais**. 2004, Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM. **Química Nova**, v. 31, n.7, p. 1860-1864, 2008.

LELIS, V. G. **Ocorrência de carbamato de etila e sua formação em cachaça de alambique e em aguardente de cana-de-açúcar**. 2006, 66p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2006.

MACKENZIE, W. M.; A. H. CLYNE, L. S. MCDONALD. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II. The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in Scotch whisky. *J. Inst. Brew.* , v. 96, p. 223-232, 1990.

MOSQUEIRO, A.A.F.C.S. **Carbamato de etilo em vinhos portugueses**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Portugal, 2007.

NAGATO, L. A. F.; SILVA, O. A.; YONAMINE, M.; PENTEADO, M. de V. C. Quantification of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. **Alimentaria, Revista de tecnologia e higiene de los alimentos** , Madrid, n. 311, p. 31-36, abril 2000.

NAGATO, L. A. F.; NOVAES, F. V.; PENTEADO, M. V. C. **Carbamato de Etila em Bebidas Alcoólicas**. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, n.37, v.1, p. 40-47, 2003

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Rum flavour. In: PIGGOTT, J. R. **Flavour of distilled beverages: Origin and Development**. Flórida: Verlag Chemie Internacional, INC., 1983. p. 49-63.

NÓBREGA, I. C. C.; PEREIRA, J. A. P.; PAIVA, J. E. ; LACHENMEIER, D. W. Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits):Influence of distillation and storage conditions. **Food Chemistry**, v. 117, p. 693-697, 2009

PAULA FERREIRA, Brasil inova na produção de vinhos tropicais. Disponível em:<http://revista.brasil.gov.br/reportagens/vinhos-tropicais/brasil-inovana-producao-de-vinhos-tropicais>. Acesso em 16 de jul.2012.

POLASTRO, L.R.; BOSO, L.M.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; LIMA-NETO, B.S; FRANCO, D.W. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(1): 78-81, jan.-abr. 2001.

RIFFKIN, H. L. et al. Ethyl carbamate formation in the production. of pot still whisky. *J. Inst. Brew.*, Edinburgh, v. 95, p.115 -119, Mar./Apr. 1989.

ZIETSMAN et al. Preventing ethyl carbamate formation in wine. A Technical Guide for Wine Producers. Department of Microbiology, University of Stellenbosch. Disponível em: <<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/1200ethyl.php3>>. Acesso em : 22 Jun. 2012.

