

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Júlia Teresa Santos

**CARBAMATO DE ETILA EM
BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS**

Araraquara

2017

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Júlia Teresa Santos

**CARBAMATO DE ETILA EM
BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. João Bosco Faria
Coorientadora: Me. Mariana Gouvêa Rodrigues

Araraquara

2017

Dedicatória

À minha mãe Patrícia Cristina Casoni, por todo apoio e amor incondicional;

À minha madraستا e amiga Yara Areas dos Santos, uma grande inspiração;

Ao meu pai Vlademir Adriano dos Santos, por realizar todos os meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim e tornaram possível a realização de todas as minhas conquistas.

Agradeço aos amigos, às irmãs e amigas da República Eternamente, a segunda família que encontrei em Araraquara, e aos melhores amigos do Grupo Aonde, que me acompanharam em todos os momentos.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, aos mestres, aos funcionários, aos alunos e ex-alunos. Sobretudo à doutoranda e amiga Mariana Gouvêa Rodrigues, que sempre me orientou e motivou a alcançar o meu melhor.

Índice de ilustrações

Figuras

Figura 1. Fluxograma de etapas do processo de seleção dos estudos para a revisão.	12
Figura 2. Formação de CE pela reação entre ácido ciânico e etanol (A) e ácido isociânico e etanol (B). Isomerização de ácido ciânico e isociânico (C).	16

Quadros e Tabelas

Quadro 1. Estudos selecionados para a revisão	12
Tabela 1. Teores de CE analisados nos estudos selecionados em ug/L	19

Índice de abreviaturas e siglas

BMDL: Limite inferior do intervalo de confiança da Dose de Referência

BMDL₁₀: Limite inferior do intervalo de confiança da Dose de Referência associado com um risco adicional de 10% de efeito adverso

CE: Carbamato de Etila

EFSA: Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

GC/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HPLC-ESI/MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa por ionização eletrospray

HPLC-FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência

JEFCA: Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/OMS

MOE: Margem de Exposição

IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

OMS: Organização Mundial da Saúde

Sumário

Introdução	9
Desenvolvimento	11
1. Metodologia	11
2. Resultados	11
3. Discussão	13
3.1. Formação	14
3.2. Riscos à saúde	16
3.3. Métodos de análise	17
3.4. Teores encontrados na literatura	19
3.5. Propostas para diminuição	20
Conclusão	24
Referências bibliográficas	26
Dados finais	33

Resumo

O carbamato de etila (CE) é um contaminante químico presente em alimentos fermentados, como pão, iogurte, vinho, cerveja assim como em bebidas destiladas, como uísque e cachaça. É reconhecido como carcinógeno em testes laboratoriais envolvendo animais, por isso é considerado um provável carcinógeno para humanos. Em 2005, o Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliou os riscos envolvidos com o carbamato de etila, e concluiu que a ingestão do contaminante da alimentação diária e de bebidas alcoólicas, combinadas, é motivo de preocupação, portanto recomenda estudos visando à diminuição deste composto em bebidas alcoólicas. Esse trabalho de revisão bibliográfica tem como objetivo reunir dados relativos à concentração do carbamato de etila encontradas em bebidas alcoólicas destiladas entre 2010 e 2015. Foram selecionados 32 artigos, obtidos dos bancos de dados eletrônicas *Web of Science*, *Science Direct*, *Scopus* e *PubMed*. Entender a formação do carbamato de etila é o primeiro passo para se estudar métodos de prevenção e/ou eliminação. A maior parte do contaminante é formada após a destilação, por reação do etanol com o cianato e seus derivados (isocianato, ácido cianico e ácido isocianico). Outros fatores, como a presença de cobre, calor, envelhecimento, armazenamento na presença de luz, favorecem sua formação. O método oficial de análise de carbamato de etila para bebidas alcoólicas é baseado na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), porém outro método que vêm ganhando espaço pela sua rapidez e sensibilidade é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD). Propostas de prevenção e diminuição do contaminante têm sido amplamente estudadas e implementadas, desde métodos simples até técnicas que envolvem engenharia genética, que alinhados com boas práticas de fabricação, levam ao efetivo controle do carbamato de etila. A maior parte dos estudos analisou cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar. Os maiores teores de carbamato de etila foram encontrados em bebidas não registradas e produzidas em pequena escala, cabendo destacar a importância da fiscalização e das boas práticas de fabricação.

Palavras-chave: uretana, medidas de redução de contaminantes, teor de contaminantes.

Abstract

Ethyl carbamate (EC) is a chemical contaminant in fermented foods and beverages such as bread, yogurt, wine, beer, as well as distilled beverages like whiskey and cachaça. It is proved by laboratory tests to be a carcinogen for animals, though it is considered a probable human carcinogen. In 2005, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) assessed the risks involved with ethyl carbamate, and concluded that the combined intake of the contaminant from the daily diet and from alcoholic beverages is of concern, therefore recommends studies aiming the compound decrease in alcoholic beverages. This literature reviews aims to gather data on ethyl carbamate content in distilled alcoholic beverages from 2010 to 2015. Thirty-two articles from the electronic databases *Web of Science*, *Science Direct*, *Scopus* and *PubMed* were selected. Understanding EC formation is the first step in studying prevention and/or elimination methods. Most of the contaminant is formed after distillation by reaction of ethanol with cyanate and its derivatives (isocyanate, cyanic acid and isocyanic acid). Other factors, such as the presence of copper, heat, aging, storage in the presence of light, favor formation. The official method of analysis of EC for alcoholic beverages is based on Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS), but another method that is gaining space for its speed and sensitivity is High-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Contaminant prevention and mitigation proposals have been extensively studied and implemented, ranging from simple methods to techniques involving genetic engineering, which in line with good manufacturing practices lead to effective control of EC. Most of the studies analyzed cachaças and sugarcane spirits. The higher EC levels were found in unregistered and small-scale beverages, emphasizing the importance of inspection and good manufacturing practices.

Keywords: urethane, contaminant reduction measures, contaminant rate.

Introdução

O carbamato de etila (CE) é um contaminante químico presente em alimentos fermentados, como pão, iogurte, vinho, cerveja tal qual em bebidas destiladas, como o uísque e a cachaça. Em bebidas destiladas, a principal via de formação envolve a reação entre o etanol e composto nitrogenados (Cook et al. 1990). Logo na etapa de fermentação, ele já é formado a partir de ureia e proteínas como citrulina e carbamoíl-fosfato (Weber e Sharypov 2009). O cianato é possivelmente o último precursor do contaminante, responsável por sua formação durante e após a destilação (Cook et al. 1990).

Também conhecido como uretana, é um composto genotóxico e carcinogênico. Doses únicas ou dosagem oral de curto prazo de 100-2000 mg/kg de peso corporal demonstraram indução de tumores em ratos, camundongos e hamsters (JEFCA 2006). Por isso é considerado um potencial carcinógeno para humanos, tendo sido reclassificado do grupo 2B (“possível carcinogênico para humanos”) para o grupo 2A (“provável carcinogênico para humanos”) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2007.

O Canadá foi o primeiro país a estabelecer um teor máximo de CE para bebidas alcoólicas, em 1986. Esses limites variam de 30µg/L para vinhos até 400µg/L para aguardentes de frutas. A República Checa segue os mesmos parâmetros do Canadá, enquanto a França difere apenas no limite para aguardente de frutas, que é de 1000µg/L (EFSA 2007). Para as demais bebidas destiladas, todos os países citados anteriormente apresentam o mesmo limite de 150µg/L (EFSA 2007), que também era o limite brasileiro para cachaça e aguardente de cana-de-açúcar, porém em 2014 foi alterado para 210µg/L pela Instrução Normativa no. 28, de 8 de agosto de 2014. (Brasil 2014).

Em 2005, o Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e da Organização Mundial da Saúde (JECFA) se reuniu para avaliação dos riscos envolvidos com o CE. O JECFA utilizou um BMDL (limite inferior do intervalo de confiança da dose de referência) no valor de 300µg/kg de peso corporal por dia que foi baseado em um aumento da incidência de adenoma bronquial e alveolar ou carcinoma em camundongos. Considerando a ingestão diária estimada do CE proveniente dos alimentos de 15ng/kg de peso corpóreo, a margem de exposição (MOE) é 20.000. Quando bebidas alcoólicas são incluídas, a ingestão diária sobe para 80ng/kg de peso corpóreo, resultando em um MOE de 3.800 (JEFCA 2006).

Dessa forma, o JECFA concluiu que a ingestão do CE proveniente somente dos alimentos é de baixa preocupação, porém a ingestão na alimentação diária combinada com a de bebidas alcoólicas é motivo de preocupação, dessa forma recomenda estudos visando à diminuição deste contaminante nas bebidas alcoólicas (JEFCA 2006).

Uma quantidade significativa de pesquisas tem sido destinada a prevenir ou diminuir a formação CE em bebidas alcoólicas. Os métodos atualmente disponíveis podem ser classificados em físicos, químicos, enzimáticos e até envolvendo rotas de engenharia metabólica.

Esse trabalho de revisão bibliográfica teve como objetivo, reunir dados relativos à concentração do CE encontradas em bebidas alcoólicas destiladas de 2010 a 2015 para avaliação, visando assim conhecer a sua evolução nesses anos e com isso discutir a eficácia das medidas de incentivo a sua redução.

Desenvolvimento

1. Metodologia

Revisão bibliográfica da literatura do tipo narrativa ou tradicional, cujo objetivo é descrever e discutir a concentração de CE em bebidas alcoólicas destiladas a partir de um ponto teórico e contextual de vista, em artigos científicos publicados entre 2010 e 2015. Tais trabalhos foram selecionados de bases de dados, seguindo a metodologia proposta por Bento (2012):

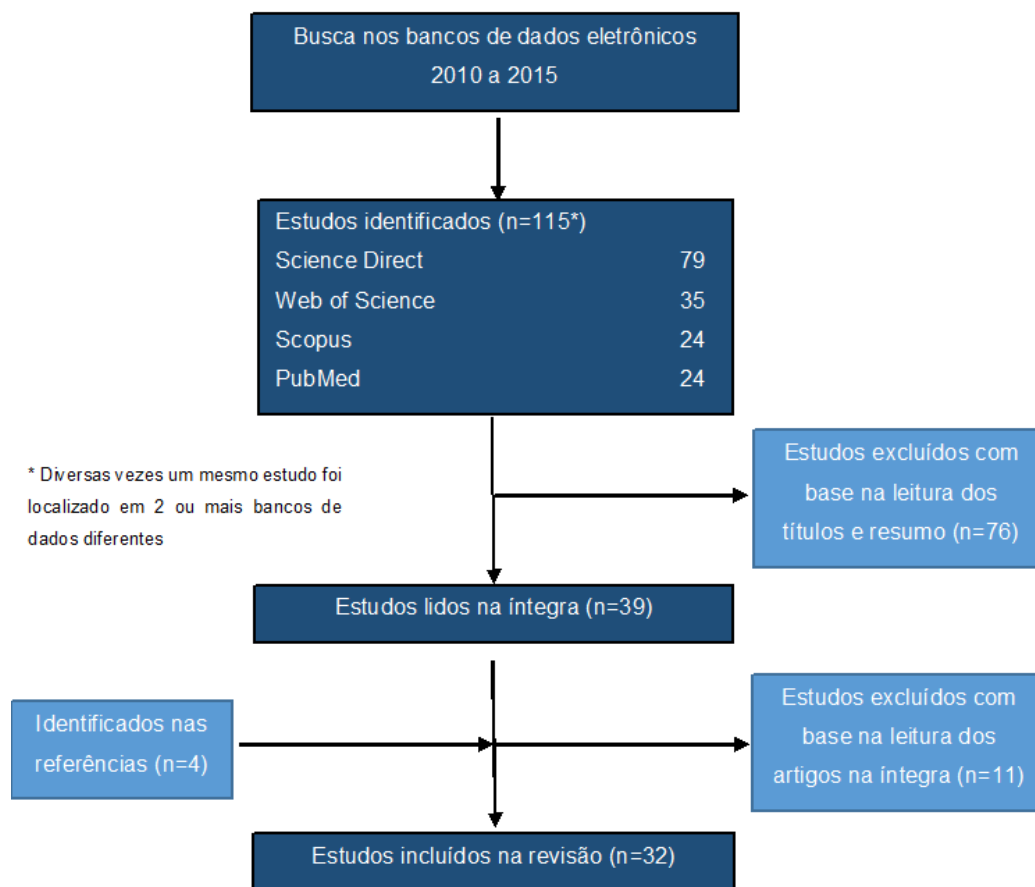
- 1º. Identificar uma lista com palavras-chave de acordo com o objetivo do trabalho para a pesquisa nas bases de dados;
- 2º. Buscar por fontes secundárias, que são as publicações escritas por autores que analisaram e interpretaram outros trabalhos, como por exemplo resumos e até outras revisões da literatura, que são importantes para adquirir uma visão geral sobre o tema;
- 3º. Recolher fontes primárias, que são os artigos mais relevantes para o trabalho, são a fonte original de autores e investigadores. Nessa etapa, é possível classificar cada fonte como “Muito importante”, “Importante”, “Pouco importante” como forma de melhor direcionar a leitura mais tarde;
- 4º. Criticamente, ler e resumir a literatura, a fim de alcançar uma síntese coerente sobre o assunto.

Os artigos foram buscados nas bases de dados eletrônicas *Web of Science*, *Science Direct*, *Scopus* e *PubMed*, utilizando as palavras-chave “*Ethyl carbamate*” “*Concentration*” “*Acoholic beverages*” e o período determinado de 2010 a 2015. Foram analisados artigos em inglês e em português. As listas de referências dos artigos selecionados também foram analisadas. Apenas os estudos com classificação maior do que “Pouco importante” foram incluídos na revisão. Basicamente, foram excluídos artigos que não se referiam ao carbamato de etila e/ou que não estudaram o contaminante em bebidas alcoólicas destiladas.

2. Resultados

Na Figura 1, está representado o Fluxograma de etapas do processo de seleção dos estudos para a revisão.

Figura 1. Fluxograma de etapas do processo de seleção dos estudos para a revisão.



Os estudos excluídos com base na leitura dos títulos e resumos ($n=76$) eram artigos que não tinham o carbamato de etila como variável de estudo ou que estudavam o contaminante apenas em alimentos e bebidas alcoólicas fermentadas, como vinho, cerveja e saque. Os estudos excluídos com base na leitura na íntegra ($n=11$) foram excluídos por não correlacionarem o contaminante a bebidas alcoólicas destiladas.

Os 32 artigos selecionados foram divididos em tópicos de interesse de modo a direcionar a leitura para o momento da revisão (Quadro 1).

Quadro 1. Estudos selecionados para a revisão

Autores (ano)	Periódico	Tópicos de interesse abordados
Alberts et al. (2011)	Food Additives & Contaminants: Part A	Teores e método de análise
Alcarde et al. (2012a)	Journal of the Institute Brewing	Proposta de diminuição
Alcarde et al. (2012b)	Journal of the Institute Brewing	Formação e proposta para diminuição
Baffa Júnior et al. (2011)	Food Chemistry	Formação e método de análise
Borges et al. (2014)	Food Control	Método de análise, proposta para diminuição

Bortoletto e Alcarde (2015)	Food Control	Teores e método de análise
Caruso et al. (2010)	Química Nova	Teores e método de análise
Da Silva et al. (2013)	Química Nova	Formação
Deák et al. (2010)	Food Research International	Teores e método de análise
Dos Anjos et al. (2011)	Química Nova	Método de análise
Galinaro e Franco (2011)	Química Nova	Formação, teores, método de análise, proposta para diminuição
Galinaro et al. (2015)	Journal of Agricultural and Food Chemistry	Formação
Huang et al. (2013)	Food Chemistry	Método de análise
Lachenmeier et al. (2010a)	BMC Cancer	Riscos à saúde
Lachenmeier et al. (2010b)	Food and Chemical Toxicology	Teores e método de análise
Lachenmeier et al. (2012)	International Journal of Cancer	Riscos à saúde
Lima et al. (2012)	Journal of the Institute Brewing	Proposta para diminuição
Liu et al. (2011)	Food Additives & Contaminants: Part B	Teores e método de análise
Machado et al. (2013)	Food Chemistry	Teores e método de análise
Negri et al. (2015)	Journal of Analytical Methods in Chemistry	Teores e método de análise
Nobrega et al. (2011)	Food Chemistry	Teores, método de análise, proposta de diminuição
Nobrega et al. (2013)	Deutsche Lebensmittel-Rundschau	Teores e método de análise
Ohe et al. (2014)	Journal of Food Science	Formação, método de análise
Riachi et al. (2014)	Food Chemistry	Formação, riscos à saúde
Santiago et al. (2014)	Journal of the Institute Brewing	Formação, método de análise
Serafim e Franco (2015)	Journal of Food Composition and Analysis	Teores e método de análise
Valente et al. (2014)	Analytical Methods	Método de análise
Wu et al. (2012)	Food Control	Teores e método de análise
Ye et al. (2011)	Journal of Chromatography A	Método de análise
Zacaroni et al. (2011)	Química nova	Teores e método de análise
Zacaroni et al. (2015)	Journal of the Institute Brewing	Formação, teores e método de análise
Zhao et al. (2013)	Trends in Food Science & Technology	Proposta para diminuição

3. Discussão

Os artigos selecionados apresentaram diferentes focos ao estudarem o contaminante em bebidas alcoólicas destiladas. Dessa forma, iremos discutir sua formação, os riscos da ingestão para a saúde, os métodos de análise e os teores encontrados nas bebidas alcoólicas destiladas, e por fim os métodos propostos para diminuição.

3.1. Formação

Foram propostos diferentes precursores e meios de formação para o CE em alimentos e bebida, que dependem do produto e do seu processamento e armazenamento (EFSA 2007). No caso dos vinhos, foi proposto que a ureia e outros subprodutos reagem com o etanol e levam a formação de CE, além de fatores como temperatura de fermentação, pH, luz e tempo de armazenamento que estão associados com o aumento da concentração de CE (Lachenmeier et al. 2010a).

Galinaro e Franco (2011) acompanharam a formação de CE em cachaças recém-destilladas em função do tempo de armazenamento, influência da luz, temperatura do processo e sistema de destilação (alambique ou coluna). Mais de 60% de todo CE é formado após a destilação, atingindo sua concentração máxima em 7 dias e permanecendo com o mesmo teor a partir dessa data, independente do sistema de destilação. Foi também observado que, as amostras destiladas em coluna apresentaram maiores teores do que as amostras destiladas em alambique e que o aumento da temperatura diminui o tempo de meia vida do CE, porém o teor máximo permanece inalterado.

Com relação a influência da luz, a formação de CE não sofre alteração se o destilado é submetido à irradiação, independente do comprimento de onda (Galinaro e Franco 2011), ao contrário do que está descrito para outras bebidas destiladas (Lachenmeier et al. 2010a; EFSA 2007). Entretanto, essa informação difere dos dados encontrados no estudo de Zacaroni et al. (2015), que analisando amostras de cachaças em um período de 6 meses constataram um aumento do teor de CE em 70% das amostras armazenadas na presença de luz, em comparação às mesmas amostras armazenadas na ausência de luz e também que algumas amostras armazenadas na ausência de luz apresentaram diminuição do teor de CE ao final de 6 meses.

Baffa Júnior et al. (2011) destacaram que o CE é formado na etapa de fermentação do caldo de cana-de-açúcar, da mesma maneira que nos vinhos. Entretanto, quase todo o CE formado nessa etapa fica concentrado na vinhaça, uma vez que sua temperatura de ebulição (182-185°C) é maior do que as temperaturas geralmente utilizadas no processo de destilação (Aresta, Boscolo, e Franco 2001). Cook et al. (1990) sugeriram que a formação do CE ocorre gradualmente durante a estocagem da cachaça, pela reação entre ureia e etanol. Essa hipótese foi porém descartada em estudo que constatou que os níveis de ureia não se alteram mesmo

após longos períodos de armazenamento, e mesmo que a reação ocorresse, ela seria muito lenta (Andrade-Sobrinho et al. 2009).

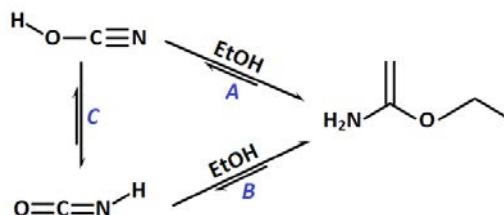
O cianato (NCO), seu tautômero isocianato (OCN) e seus respectivos ácidos (ácido ciânico e ácido isociânico) são os principais precursores para a formação de CE em cachaças (Aresta, Boscolo, e Franco 2001; Galinaro e Franco 2011; Da Silva et al. 2013). Eles são formados por reações enzimáticas e pela clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos, como a amígdalina presentes nas frutas com caroço e a epiheterodendrina da cevada (Battaglia, Conacher e Page 1990; Cook et al. 1990). Não se sabe ao certo a fonte de cianeto na cana-de-açúcar, no entanto ela é classificada como uma cultura cianogênica (Galinaro e Franco 2011).

O cobre presente em cachaças destiladas também apresenta um importante papel catalítico na formação desses precursores, pela reação de complexação de Cu^{2+} com cianeto (Aresta, Boscolo, e Franco 2001; Boscolo 2001). Alcarde et al. (2012a) estudando os teores de cobre e CE em uma segunda destilação de aguardente de cana-de-açúcar, verificaram que enquanto o teor de etanol diminui, os teores de CE e de cobre aumentam no decorrer da destilação. Em cachaças recém-destiladas, 0,8 mg/L de cobre é o suficiente para promover a formação de CE, contudo maiores teores do elemento não demonstram maior efeito catalítico (Bruno et al. 2007).

Da Silva et al. (2013), Ohe et al (2014) e Galinaro et al. (2015) estudaram o decaimento de íons cianato correlacionado com o aumento dos teores de CE em soluções aquo/etanólicas e amostras de cachaça. Ainda, verificaram que quando cianato é adicionado na solução ao final da reação de formação de CE, mais CE é formado com o novo precursor. Não há aumento significativo de CE quando arginina, citrulina ou carbamóil-fosfato são adicionados à solução e uma pequena quantidade de CE é formada quando ureia ou cianeto são adicionados, o que pode ser atribuído a vestígios de cianeto nesses precursores (Galinaro et al. 2015).

No caso da adição de ureia ao caldo de cana-de-açúcar, como fonte de nitrogênio para as leveduras na fermentação, há aumento da concentração de cianeto no destilado (Ohe et al. 2014). A rota de formação proposta é a reação do etanol tanto com o ácido ciânico quanto com o ácido isociânico, levando a formação de CE (Figura 2).

Figura 2. Formação de CE pela reação entre ácido cianico e etanol (A) e ácido isocianico e etanol (B). Isomerização de ácido cianico e isocianico (C).



Fonte: o Autor

O teor de CE em aguardentes de cana-de-açúcar também depende da configuração do alambique, assim como do método de destilação. A formação de CE na bebida é ainda favorecida por altas temperaturas utilizadas no processo quando o sistema de destilação é defeituoso, ou apresenta uma configuração inadequada, ou tem baixas taxas de refluxo (Alcarde et al. 2012b).

Nóbrega et al. (2009) e Nóbrega et al. (2011) também observaram maiores teores de CE em cachaças amarelas em comparação com cachaças brancas produzidas nas mesmas destilarias, demonstrando influência do armazenamento em madeira na formação de CE, apesar de não haver ainda uma explicação para tal até o período compreendido por essa revisão.

3.2. Riscos à saúde

O CE é considerado genotóxico e está incluído no grupo 2A da IARC como provável carcinógeno humano (IARC 2007). Beland et al (2005) demonstraram que o CE provoca aumentos dose-dependentes em adenomas ou carcinomas no pulmão, no fígado e na glândula de Harder, hemangiossarcomas no fígado e coração, tumores nas glândulas mamárias e ovários em fêmeas, e papilomas de células escamosas bem como carcinomas da pele e do estômago de roedores machos.

A EFSA recomenda a aplicação do cálculo de margem de exposição (MOE) para avaliar o risco de substâncias genotóxicas e cancerígenas. Em geral, um MOE maior ou igual a 10.000 é considerado de baixo nível de preocupação. Valores menores que 10.000 são utilizados para definir riscos à saúde pública (EFSA 2005).

Em 2007, a EFSA calculou os MOEs para a população europeia, de acordo com a ingestão estimada da média dos teores do contaminante em alimentos e bebidas alcoólicas, e o valor de nível dose de referência (BMDL_{10}) de 0,3 mg/kg/dia (10% de incidência de

neoplasias alveolares e bronquiolares em camundongos). Considerando a ingestão do contaminante proveniente dos alimentos, excluindo as bebidas alcoólicas, o MOE é de 17.600. Para os consumidores de bebidas alcoólicas, o MOE varia de 4.620 a 8.110, e esse valor cai para 540 para consumidores de aguardentes de frutas. O risco para a população brasileira, que é a maior consumidora de cachaça e aguardentes de cana-de-açúcar, é maior do que o calculado para consumidores europeus. Essa diferença entre a Europa e o Brasil ocorre devido às bebidas alcoólicas preferidas na Europa terem conteúdos relativamente baixos de CE, como o vinho e a cerveja. A estimativa do MOE para a população em geral brasileira varia de 4.294 a 5.058, porém para consumidores que bebem 1 dose por dia (50-80mL), esse valor cai para 800. Em um estudo realizado em Pernambuco, o MOE calculado para os consumidores que bebem em média 170mL por dia cai para 235, sendo ainda pior para aqueles que bebem até 680mL por dia, cujo MOE calculado é 59 (Lachenmeier et al. 2010a).

O limite máximo de CE estabelecido pela legislação para cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar não aumenta efetivamente o MOE para valores acima de 10.000 (Lachenmeier et al. 2010a), dessa forma eles estão mais expostos ao contaminante do que consumidores de outras bebidas alcoólicas destiladas.

De um ponto de vista epidemiológico, é necessário estabelecer um limite máximo mais seguro para consumidores dessas bebidas (Riachi et al. 2014). A preocupação com a saúde pública aumenta com o consumo de bebidas alcoólicas não registradas, que geralmente são vendidas a preços mais baixos e podem apresentar maiores teores de CE e outros contaminantes (Negri et al. 2015).

Por fim, é importante ressaltar que apesar da preocupação com os teores de CE e outros contaminantes, o etanol é comprovadamente o carcinógeno mais importante nas bebidas alcoólicas, que apresenta os menores MOEs calculados: 3,1 para consumidores moderados e 0,8 para consumidores que bebem 4 doses por dia (Lachenmeier et al. 2012).

3.3. Métodos de análise

A determinação de CE em bebidas alcoólicas requer métodos analíticos sensíveis devido aos baixos teores do contaminante e à interferência de outros componentes em uma mesma amostra (Weber e Sharypov 2009). A utilização de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) é considerado o método oficial para análise de CE em bebidas alcoólicas. A técnica geralmente requer a preparação das amostras, com etapas de extração do contaminante, devido à sua baixa concentração (Abreu et al. 2005).

Ye et al. (2011), Wu et al. (2012) e Huang et al. (2013) estudaram as técnicas extração em fase sólida para bebidas alcoólicas chinesas em GC/MS, como alternativa à técnica de extração líquido-líquido tradicional. Alberts et al. (2011) também estudaram técnicas de extração em fase sólida para aguardentes do Sul da África, para serem analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS).

Um método que tem sido utilizado como alternativa ao GC/MS é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD) de fase reversa. Esse método é mais rápido e apresenta níveis de detecção similares, além de não ser necessária extração ou concentração do contaminante da bebida. A técnica consiste na derivação de CE com 9-xantidrol em meio ácido, permitindo sua detecção por fluorescência ao formar carbamato de etil xantil (Abreu et al. 2005; Medrera e Valles 2009)

Deák et al (2010) modificaram o método utilizado por Medrera e Valles (2009), estudando a combinação da derivação de CE por 9-xantidrol e da monitorização de múltiplas reações (MRM) de carbamato de etil xantil com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa por ionização eletrospray (HPLC-ESI/MS). Isso por que a técnica de HPLC-FLD frequentemente revela outros constituintes da matriz que também possuem alto fator de resposta do detector de fluorescência (Madrera e Valles 2009).

GC/MS foi o método de análise mais utilizado nos estudos. Dos 23 artigos que abordaram métodos de análise do CE, 14 analisaram o contaminante por GC/MS (Caruso et al 2011; Lachenmeier et al 2010b; Baffa Júnior et al 2011; Galinaro e Franco 2011; Liu et al 2011; Nobrega et al 2011, 2013; Zacaroni et al 2011; Wu et al 2012; Huang et al 2013; Borges et al 2014; Ohe et al 2014; Bortoletto e Alcarde 2015; Serafim e Franco 2015), enquanto apenas 5 estudos analisaram o contaminante por HPLC-FLD (Dos Anjos 2011; Machado et al 2013; Santiago et al 2014; Valente et al 2014; Zacaroni et al 2015).

A preferência pelo método GC/MS, além de ser o método oficial de análise de CE como dito anteriormente, pode ser porquê a etapa de preparação de amostra nem sempre é necessária no caso das bebidas alcoólicas destiladas, que apresentam maiores teores do contaminante do que às bebidas não-destiladas. Nesse caso, realiza-se a injeção direta da bebida no aparelho, sem qualquer tratamento prévio (Nóbrega et al 2009, 2011, 2013; Santiago et al 2014; Bortoletto e Alcarde 2015; Serafim e Franco 2015).

3.4. Teores encontrados na literatura

Foram 15 os estudos que quantificaram os teores de CE em bebidas alcoólicas destiladas, somando um total de 717 amostras analisadas (Tabela 1). A maior parte dos estudos analisou cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar. Aguardentes de cereais, frutas e casca, vodca, conhaque, uísque, rum e bagaceira estão entre as outras bebidas estudadas.

Com exceção da cachaça e aguardente de cana-de-açúcar, a maior parte das bebidas alcoólicas destiladas não apresentam teores excessivos de CE. Lachenmeier et al. (2010b) estudando a composição de vodcas não registradas do leste ucraniano, observou que apenas 1 amostra apresentou teor exorbitante de CE (1500ug/L). A incidência foi inferior à encontrada anteriormente para aguardentes de frutas registradas da Alemanha, onde o problema persiste especialmente nos produtos de pequenas destilarias (Lachenmeier et al. 2005).

Tabela 1. Teores de CE analisados nos estudos selecionados em ug/L

Bebida	n	>150^a	>400^b	min-máx	Referências
Cachaça e aguardente de cana-de- açúcar	518	≥173 ^c	⊗ ^c	ND ^d -960	Caruso et al. (2010); Galinaro e Franco (2011); Nobrega et al. (2011); Zacaroni et al. (2011, 2015); Machado et al. (2013); Valente et al. (2014); Bortoletto e Alcarde (2015); Serafim e Franco (2015);
Aguardente de cereais	70	⊗	0	2,9-192	Liu et al. (2011); Wu et al. (2012)
Vodca	65	⊗	2	ND-1500	Lachenmeier et al. (2010b)
Aguardente de frutas	20	9	7	ND-2609	Deák et al. (2010)
Conhaque	26	0	0	4,4-46	Alberts et al. (2011)
Uísque	14	0	0	ND-90	Alberts et al. (2011); Nobrega et al. (2013); Valente et al. (2014)
Rum	2	0	0	2,7-51	Alberts et al. (2011);

					Valente et al. (2014)
Aguardente	1	0	0	1,9	Alberts et al. (2011)
de casca					
Bagaceira	1	0	0	ND	Valente et al. (2014)

^a Limite máximo canadense para bebidas alcoólicas destiladas (EFSA 2007) e antigo limite máximo brasileiro para cachaça e aguardentes de cana-de-açúcar (Brasil 2005)

^b Limite máximo canadense para aguardentes de frutas (EFSA 2007)

^c Informações completas insuficientes

^d ND: não detectável

No caso das aguardentes de frutas húngaras estudadas por Deák et al. (2010), apenas 2 amostras apresentaram teores exorbitantes de CE, com valores de 1390 e 2609ug/L. Ambas amostras foram produzidas em sistemas de pequena escala (domésticos), salientando a importância do controle das boas práticas de fabricação.

Caruso et al. (2010) e Nobrega et al. (2011), que estudaram os teores de CE em cachaças comerciais, encontraram mais de 50% das amostras em inconformidade com a lei vigente até 2014, cujo limite máximo era de 150ug/L (Brasil 2005). Os resultados obtidos por Bortoletto e Alcarde (2015) foram melhores, mas nem tanto: 46% das 268 cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar comerciais estavam acima de 150ug/L, e 104 amostras apresentaram teores acima de 210ug/L, teor máximo permitido pela atual legislação brasileira (Brasil 2014). De acordo com Riachi et al. (2014), pelo menos 42% das cachaças ou aguardentes brasileiras apresentam teor de CE acima de 210ug/L, valores concordantes com os encontrados por Bortoletto e Alcarde (2015), no qual 39% das amostras apresentaram teor acima do limite máximo estabelecido.

Enquanto isso, para os produtores brasileiros de uísque as estatísticas são favoráveis. Nobrega et al. (2013) comparou a qualidade do uísque brasileiro com amostras de uísques escoceses. Em seu estudo, 6 de 7 amostras apresentaram teores de CE abaixo de 50ug/L, o mesmo que ocorre para os uísques escoceses.

3.5. Propostas para diminuição

Existem diversos métodos propostos cujo objetivo é a redução dos teores de CE em bebidas alcólicas. Galinaro e Franco (2011) e Alcarde et al. (2012a) estudaram o efeito da dupla destilação na diminuição do CE para aguardentes de cana-de-açúcar, concluindo que até

97% do CE formado na primeira destilação pode ser eliminado da bebida com o processo de redestilação.

Uma técnica simples que se mostra eficaz na redução dos teores de CE é o armazenamento das bebidas alcóolicas destiladas na ausência de luz (JEFCA 2006; Zacaroni et al. 2015). Outro fator simples no caso das cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar é a separação correta das frações de “cabeça”, “coração” e “cauda” (Baffa Júnior et al. 2011; Borges et al. 2014). Grande parte dos produtores faz a separação das frações por volume e provocam a contaminação pelo cianato, que deveria se concentrar apenas na fração “cabeça”. Essa fração por sua vez apresenta elevada concentração de álcoois, que reagem com o cianato e leva à formação de CE (Borges et al. 2014).

Borges et al. (2014) verificaram que com o uso de cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas é possível reduzir até 70% dos teores de CE do mosto fermentado para a cachaça recém-destilada, enquanto que a fermentação espontânea reduz apenas 44% utilizando o mesmo processo de destilação. A fermentação com cepas de laboratório também reduz os teores de CE em aguardentes de frutas quando comparados às cepas comerciais, constatando a contribuição do metabolismo da levedura na formação do CE (Schehl et al. 2005).

A composição do destilador e o modo que a destilação é conduzida também influenciam na concentração de CE do destilado. Galinaro e Franco (2011) verificaram uma grande diferença para um mesmo mosto fermentado de cana-de-açúcar destilado em alambique de cobre e em coluna de aço inox, que apresentaram respectivamente 204 e 423 µg/L de CE no destilado, ou seja, as aguardentes destiladas em alambique apresentam menor teor de CE quando comparadas às destiladas em coluna (Bruno et al. 2007; Nobrega et al. 2009; Andrade-Sobrinho et al. 2009). Isso pode ser explicado pelas reações dos compostos cianogênicos com o cobre na parte ascendente do alambique, que formam compostos não voláteis (Aresta, Boscolo, e Franco 2001; Boscolo 2001). Ainda, quando o alambique de cobre possui a parte descendente (tubo do condensador + refrigerador da bobina) feita em aço inox, a contaminação por cobre no destilado é muito pequena, prevenindo consequentemente a formação de CE (Nobrega et al. 2011).

Sistemas de destilação utilizando temperaturas elevadas resultam bebidas com um teor mais elevado de CE, enquanto a presença de um deflegmador e sistema de resfriamento no alambique possibilitam a produção de aguardentes de cana-de-açúcar com menores teores

(Nóbrega et al, 2009). Bruno et al. (2007) também obtiveram aguardentes de cana-de-açúcar com baixo teor de CE utilizando uma baixa temperatura no deflegmador, resultando em um baixo fluxo de destilação e uma elevada taxa de refluxo durante a destilação em alambiques. Esses fatores previnem a contaminação pelos precursores no destilado.

Lima et al. (2012) também estudaram a influência da destilação lenta para diminuição dos teores de CE em aguardentes de cana-de-açúcar e cachaças, confirmando que uma destilação lenta reduz o teor de CE e também altera a composição do destilado, contribuindo para uma melhor qualidade da bebida.

Outro método de diminuição simples é a escolha de matérias-primas com menores quantidades de arginina e ureia, precursores do CE. Para bebidas de arroz, a maneira de diminuir os precursores do CE é o processo de refinação (Yoshizawa et al. 1988). Em aguardentes de frutas, um processo para retirada dos caroços foi proposto, uma vez que estes são ricos em cianeto (Lachenmeier et al. 2005). Entretanto, nenhum dos métodos é comumente utilizado por causar a perda de componentes importantes do sabor e aroma nas bebidas.

Também são formas de minimizar os teores de cianeto em aguardentes de frutas a otimização das condições de destilação (Christoph e Bauer-Christoph 1998) ou um procedimento de lavagem com vapor (Nusser, Gleim, e Tramm 2001).

Filtrar a bebida para remover CE também é um método disponível. Park et al. (2009), removeram com sucesso 47% de CE em destilados diluídos através do processo de filtração com carvão vegetal. Embora a absorção de baixa especificidade tenha afetado significativamente o sabor final das bebidas, o desenvolvimento de uma resina de absorção de alta especificidade poderia ser um método praticável para remover CE em bebidas alcoólicas.

Com o desenvolvimento de tecnologias de engenharia química e biológica, muitas novas abordagens têm sido estudadas para reduzir os níveis de CE em bebidas alcoólicas (Zhao et al. 2013). Estão entre elas: métodos químicos, como catalisadores de cianeto e catalisadores de cobre (Pieper et al. 1992); métodos enzimáticos, como a uréase ácida para degradar ureia e prevenir a formação dos precursores de CE (Kobashi, Takebe, e Sakai 1988; Yang, Wang, e Tian 2010), como também a uretanase, uma amidase que degrada CE em etanol e amônia (Toshiaki 2006) e por fim, métodos de engenharia metabólica, como a inibição da expressão gênica da arginase que degrada arginina em ureia (Schehl et al. 2007),

ou ainda o aumento da expressão de genes envolvidos no metabolismo e transporte da ureia (Coulon et al. 2006).

Conclusão

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de melhor compreender o CE, principalmente envolvendo sua formação e métodos de prevenção e/ou eliminação em bebidas alcoólicas destiladas. A maior parte dos artigos deste trabalho, revelam uma preocupação crescente com o CE presente em cachaças e aguardentes de cana-de-açúcar brasileiras

Entender a formação do CE é o primeiro passo para se estudar medidas preventivas. A maior parte do contaminante é formado após a destilação, por reação do etanol com o cianato e seus derivados (isocianato, ácido ciânico e ácido isociânico). A presença de cobre também é um diferencial, pois teores até 0.8 mg/L promovem maior formação de CE e além disso, fatores como calor, envelhecimento, e armazenamento na presença de luz também aumentam a concentração do contaminante.

O método de análise oficial para o CE em bebidas alcoólicas é o GC/MS. Amostras de cachaça e aguardente de cana-de-açúcar não necessitam de pré-tratamento neste método, tornando-o mais fácil e rápido. Ainda assim, o método alternativo HPLC-FLD tem ganho espaço pela sua rapidez e níveis de detecção similares. Quando realizados corretamente, ambos os métodos são considerados bastante sensíveis.

As bebidas que apresentam maiores teores de CE são as cachaças, aguardentes de cana-de-açúcar e aguardentes de frutas. Os maiores teores encontrados foram dentre as bebidas não registradas e produzidas em pequena escala. Os teores encontrados nas bebidas brasileiras apresentaram melhora de 2010 para 2015, no entanto muitas ainda não se encontram em conformidade com o limite máximo estabelecido pela lei (210 ug/L).

O aumento do limite máximo brasileiro de 150 ug/L para 210 ug/L não aumenta consideravelmente o risco para a população, e ainda está muito abaixo do limite máximo canadense para aguardentes de frutas (400 ug/L). Além disso, a alteração da lei estimula a discussão acerca do tema, aumentando a preocupação com as boas práticas de fabricação, e também auxilia e facilita os produtores a se manterem em conformidade com a lei, principalmente aqueles que produzem em pequena escala.

Propostas de prevenção e diminuição do contaminante têm sido amplamente estudadas e implementadas. Métodos bioquímicos tiveram bons resultados, como a utilização de cepas selecionadas na fermentação.

A velocidade, a temperatura e o modo que a destilação é conduzida, bem como o material do destilador, também fazem grande diferença nas concentrações de CE no destilado. Cachaças destiladas em alambique de cobre, com destilação lenta, o uso de deflegmador e sistemas de resfriamento, e a separação correta das frações “cabeça”, “coração” e “cauda”, apresentam menores teores de CE.

Técnicas simples que previnem a formação do CE após a destilação envolvem o armazenamento em ausência de luz e sob temperaturas controladas. Redestilação e filtração com carvão vegetal são técnicas também utilizadas para reduzir os teores de CE no produto final. Diferentes métodos alinhados com boas práticas de fabricação resultam na diminuição e controle do CE, porém a maior preocupação, nacional e internacional, ainda envolve principalmente os pequenos produtores e produtos não registrados, que ocasionalmente apresentam os maiores teores de CE provocados pela falta de controle da produção e fiscalização adequada.

Referências bibliográficas

- Abreu S. M., Alves A., Oliveira B., Herbert P. (2005) *Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods*. Analytical and bioanalytical chemistry, 382(2):498-503
- Alberts P., Stander M.A., De Villiers A. (2011) *Development of a novel solid-phase extraction, LCMS/MS method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages: application to South African wine and spirits*. Food Additives & Contaminants: Part A, 28(7):826–839
- Alcarde A.R., De Souza L.M. and Bortoletto A.M. (2012a) *Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit*. Journal of the Institute Brewing, 118:27-31
- Alcarde A.R., De Souza L.M. and Bortoletto A.M. (2012b) *Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. Part 2: influence of type of pot still*. Journal of the Institute Brewing, 118:352-355
- Andrade-Sobrinho L. G., Cappelini L. T. D., Da Silva A. A., Galinaro C. A., Buchviser S. F., Cardoso D. R., et al. (2009) *Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II*. Química Nova, 32(1):116–119
- Aresta M., Boscolo M., and Franco D. W. (2001) *Cooper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6): 2819–2824
- Baffa Júnior J.C., Mendonça R.C.S., Pereira J.M.A.T., Pereira J.A.M., Soares N.F.F., (2011) *Ethyl-carbamate determination by gas chromatography–mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit*. Food Chemistry, 129:1383–1387
- Beland F.A., Benson R.W., Mellick P.W., Kovatch R.M., Roberts D.W., Fang J.L., Doerge D.R. (2005) *Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice*. Food and Chemical Toxicology 43:1-19.
- Bento A.V. (2012) *Como fazer uma revisão da literatura: considerações teóricas e práticas*. Revista *JÁ*, 65:42-44. Disponível em: <http://www3.uma.pt/bento/Repositorio/Revisaodaliteratura.pdf>. Acesso em: 14 de Março de 2017.

Borges G.B.V., Gomes F.C.O., Badotti F., Silva A.L.D., Machado A.M.R. (2014) ***Selected Saccharomyces cerevisiae yeast strains and accurate separation of distillate fractions reduce the ethyl carbamate levels in alembic cachaças.*** Food Control, 37:380-384

Bortoletto A.M. and Alcarde A.R. (2015) ***Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachaças.*** Food Control, 54:1-6

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

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2014) ***Instrução Normativa no. 28 de 8 de agosto de 2014.*** Diário Oficial da União.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2005) ***Instrução Normativa no. 13 de 29 de julho 2005.*** Diário Oficial da União

Bruno S.N.F., Vaitsman D.S., Kunigami C.N., Brasil M.G. (2007) ***Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits.*** Food Chemistry, 104(4):1345-1352

Caruso M.S.F., Nagato L.A.F. e Alaburda J. (2010). ***Benzo(a)pireno, carbamato de etila e metanol em cachaças.*** Química Nova, 33(9):1973-1976

Christoph N., and Bauer-Christoph C. (1998). ***Measures to reduce the content of ethyl carbamate during production of stone-fruit spirits (I).*** Kleinbrennerei, 50:9-13.

Cook R., McCaig N., McMillan J.M.B., Lumsden W.B. (1990) ***Ethyl Carbamate Formation in Grain-Based Spirits 3: The Primary Source.*** Journal of the Institute Brewing, 93:233-244

Coulon J., Husnik J. I., Inglis D. L., van der Merwe G. K., Lonvaud A., Erasmus D. J., et al. (2006). ***Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae to minimize the production of ethyl carbamate in wine.*** American Journal of Enology and Viticulture, 57:113-124.

Da Silva A.A., Ohe T.H.K e Franco D.W. (2013) ***Decaimento de íons cianato e a formação de carbamato de etila.*** Química Nova, 36(8):1101-1103

Déak E., Gyepes A., Stefanovits-Bányai E., Dernovics M. (2010) *Determination of ethyl carbamate in pálinka spirits by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry after derivatization*. Food Research International, 43: 2452–2455

Dos Anjos J.P., Cardoso M.G., Saczk A.A., Zacaroni L.M., Santiago W.D. (2011) *Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (quercus sp) e recipiente de vidro*. Química Nova, 34(5):874-878

EFSA (European Food Safety Authority) (2005) *Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic*. The EFSA Journal, 282:1-31

EFSA (European Food Safety Authority) (2007) *Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants*. The EFSA Journal, 551:1-44

Galinaro C.A. e Franco D.F. (2011) *Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destilladas; Proposta para seu controle*. Química Nova, 34(6):996-1000

Galinaro C.A., Ohe T.H.K., Da Silva A.C.H., Da Silva S.C., Franco D.W. (2015) *Cyanate as an Active Precursor of Ethyl Carbamate Formation in Sugar Cane Spirit*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(33):7415–7420

Huang Z., Pan X.D., et al. (2013) *Validation (in-house and collaborative) of the quantification method for ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by GC–MS*. Food Chemistry, 141:4161–4165

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2007) *Carcinogenicity of alcoholic beverages*. The Lancet Oncology, 8(4):292–293

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2010) *Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate*. IARC Monography 96:1–1428

Jadad et al (1996). *Assessing the Quality of Reports of Randomized Clinical Trials: Is Blinding Necessary?* Controlled Clinical Trials 17:1-12

JEFCA. (2006) *Evaluation of Certain Food Contaminants: sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: WHO technical report series no. 930

Kobashi K., Takebe S., and Sakai T. (1988). ***Removal of urea from alcoholic beverages with an acid urease.*** Journal of Applied Toxicology, 8:73-74.

Lachenmeier D. W., Schehl B., Kuballa T., Frank W., and Senn T. (2005). ***Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits.*** Food Additives & Contaminants, 22:397-405.

Lachenmeier D.W., Lima M.C.P, Nóbrega I.C.C., Kerr-Corrêa F., Kanteres F., et al. (2010a) ***Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira.*** BMC Cancer, 10:266

Lachenmeier D.W., Samokhvalov A.V, Leitz J., et al (2010b) ***The composition of unrecorded alcohol from eastern Ukraine: Is there a toxicological concern beyond ethanol alone?*** Food and Chemical Toxicology, 48:2842–2847

Lachenmeier D. W., Przybylski M.C., Rehm J. (2012) ***Comparative risk assessment of carcinogens in alcoholic beverages using the margin of exposure approach.*** International Journal of Cancer, 131:E995–E1003

Lima U.G., Teixeira C.G., Bertozzi J.C., Serafim F.A.T., and Alcarde A.R. (2012) ***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 Brewing, 118:205-308

Liu Y.P, Dong B., Qin Z.S., et al (2011) ***Ethyl carbamate levels in wine and spirits from markets in Hebei Province, China.*** Food Additives & Contaminants: Part B, 4(1):1-5

Machado A.M.R., Cardoso M.G., Saczk A.A., Dos Anjos J.P., Zacaroni M.D., et al. (2013) ***Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC.*** Food Chemistry, 138:1233–1238

Nóbrega I.C.C., Pereira J.A.P., Paiva J.E., and Lachenmeier D.W. (2009) ***Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): influence of distillation and storage conditions.*** Food Chemistry, 117(4):693–697

Nóbrega I.C.C., Pereira J.A.P., Paiva J.E., and Lachenmeier D.W. (2011) ***Ethyl carbamate in cachaça (Brazilian sugarcane spirit): Extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation.*** Food Chemistry, 127:1243–1247

- Nóbrega I.C.C., Oliveira S.P.A., Monakhova Y.B., et al. (2013) *Chemical composition of whiskies produced in Brazil compared to international products*. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 109:145-149A
- Nusser R., Gleim P., and Tramm A. (2001). *The removal of cyanide. New washing procedure with vapour*. *Kleinbrennerei*, 53:6-9
- Ohe T.H.K, Da Silva A.A., Rocha T.S., Godoy F.S, Franco D.W. (2014) *A Fluorescence-Based Method for Cyanate Analysis in Ethanol/Water Media: Correlation between Cyanate Presence and Ethyl Carbamate Formation in Sugar Cane Spirit*. *Journal of Food Science*, 79(10):1950-1955
- Park S.R., Ha S.D., et al. (2009) *Exposure to ethyl carbamate in alcohol-drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration*. *Food Control*, 20(10):946-952
- Pieper H. J., Seibold R., Luz E., and Jung O. (1992). *Reduction of the ethyl carbamate concentration in manufacture of Kirsch (cherry spirit)*. *Kleinbrennerei*, 44:125-130.
- Riachi L.G., Santos Â., Moreira R.F.A., De Maria C.A.B. (2014) *A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits*. *Food Chemistry*, 149:159-169
- Santiago W.D. Cardoso M.G., Duarte F.C., et al. (2014) *Ethyl carbamate in the production and aging of cachaça in oak (Quercus sp.) and amburana (Amburana cearensis) barrels*. *Journal of the Institute Brewing*, 120:507–511
- Serafim F.A.T. and Franco D.W. (2015) *Chemical traceability of industrial and natural yeasts used in the production of Brazilian sugarcane spirits*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38:98–105
- Schehl B, Lachenmeier D.W., Senn T., and Heinisch J.J. (2005) *Effect of the Stone Content on the Quality of Plum and Cherry Spirits Produced from Mash Fermentations with Commercial and Laboratory Yeast Strains*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21):8230–8238

Schehl B., Senn T., Lachenmeier D. W., Rodicio R., and Heinisch J. J. (2007). *Contribution of the fermenting yeast strain to ethyl carbamate generation in stone fruit spirits*. Applied Microbiology and Biotechnology, 74:843-850.

Toshiaki. (2006). *Novel urethanase gene*. Japanese patent WO 2006/ 019095 A1.

Valente I.M., Ramos R.M., Gonçalves L.M., Rodrigues J.A. (2014) *Determination of ethyl carbamate in spirits using salting-out assisted liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. Analytical Methods, 6:9136-9141

Weber J.V. e Sharypov V.I. (2009) *Ethyl carbamate in foods and beverages: a review*. Environmental Chemistry Letters, 7:233-247

Wu P., Pan X., Wang L., et al. (2012) *A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China*. Food Control, 23:286-288

Yang L. Q., Wang S. H., and Tian Y. P. (2010). *Purification, properties, and application of a novel acid urease from Enterobacter sp.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 160:303-313.

Ye C.W., Zhang X.N., Huang J.Y., et al. (2011) *Multiple headspace solid-phase microextraction of ethyl carbamate from different alcoholic beverages employing drying agent based matrix modification*. Journal of Chromatography A, 1218:5063-5070

Yoshizawa K., Takahashi K., and Sato K. (1988). *Changes of urea content in rice and sake moromi during sake making process*. Journal of the Brewing Society of Japan, 83:136-141.

Zacaroni L.M., Cardoso M.G., Saczk A.A., et al. (2011) *Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana*. Química Nova

Zacaroni L.M., Cardoso M.G., Santiago W.D., Gomes M.S., et al. (2015). *Effect of light on the concentration of ethyl carbamate in cachaça stored in glass bottles*. Journal of the Institute Brewing, 121:238-243

Zhao X., Dua G., Zoub H., Fub J., Zhoua J., Chena J. (2013) *Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages*. Trends in Food Science & Technology 32:97-107

Dados finais

Data:

Júlia Teresa Santos

Aluna

De acordo:

Prof. Dr. João Bosco Faria

Orientador

Me. Mariana Gouvêa Rodrigues

Coorientadora