

DIFICULDADES NA AVALIAÇÃO DA CARCINOGENICIDADE E NO DOSEAMENTO DO CARBAMATO DE ETILO EM BEBIDAS ALCOÓLICAS

DIFFICULTIES ON CARCINOGENICITY EVALUATION AND ETHYL CARBAMATE DETERMINATION IN ALCOHOLIQUE BEVERAGES

J. OLIVEIRA FERNANDES e MARGARIDA A. FERREIRA

Laboratório de Bromatologia, Faculdade de Farmácia (U. P.)
4000 PORTO

RESUMO

Neste trabalho é efectuada uma abordagem sobre a actividade carcinogénica do carbamato de etilo e dos seus mecanismos de carcinogenicidade.

Faz-se um resumo das metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação dos baixos teores de carbamato de etilo normalmente encontrados nas bebidas alcoólicas, referindo-se a contribuição pessoal dos autores neste domínio.

Dá-se conta também de algumas das dificuldades enfrentadas pelo controlo de qualidade face aos limites impostos pelas autoridades sanitárias nos vinhos, nas aguardentes e licores.

Palavras chave: Carbamato de etilo, toxicidade, carcinogenicidade, metodologias analíticas, bebidas alcoólicas.

Key words: Ethyl carbamate, toxicity, carcinogenicity, analytical methodologies, alcoholic beverages.

INTRODUÇÃO

Um relatório oficial publicado no Canadá, em 1985, pelo Liquor Control Board of Ontario (LCBO), revelando que um considerável número de amostras de diversas bebidas alcoólicas apresentava teores particularmente elevados de carbamato de etilo, veio criar embaraços aos produtores e exportadores destes produtos.

Neste relatório referia-se existirem teores de algumas centenas de $\mu\text{g/l}$ em alguns vinhos generosos e teores da ordem dos mg/l em certas aguardentes de frutos. Pelo facto do car-

bamato de etilo ou uretano ser considerado potencialmente carcinogénico e mutagénico para o homem, geraram-se fortes apreensões e o problema foi alvo das atenções de considerável número de investigadores e de diversas organizações com responsabilidades na área da saúde pública.

A breve trecho, e tendo por base a dose de ingestão diária aceitável (ADI) para o homem de $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e os diferentes níveis de consumo das diversas bebidas alcoólicas, os produtores viram-se confrontados com a imposição de limites máximos nos seus produtos, designadamente, de $30 \mu\text{g}/\text{l}$, $100 \mu\text{g}/\text{l}$, $150 \mu\text{g}/\text{l}$ e de $400 \mu\text{m}/\text{l}$ nos vinhos de mesa, nos vinhos generosos, nas aguardentes vónicas e whiskies e nas aguardentes de frutos e licores, respectivamente.

À data não havia descrição de métodos analíticos com suficiente sensibilidade para o doseamento do composto que pudessem ser utilizados em rotina pela generalidade dos laboratórios enológicos. Eram também escassos os dados relativos à origem e formação da substância. Por isso, as possibilidades dos produtores de bebidas alcoólicas respeitarem os limites impostos tornou-se inicialmente difícil.

Aquele relatório teve, contudo, o grande mérito de despertar a comunidade científica para a realização dos trabalhos que urgia realizar. Os estudos sucederam-se em várias vertentes e, em consequência disso, muitos foram os avanços conseguidos, embora o tema esteja longe de ser esgotado.

Neste trabalho que apresentamos (i) faz-se uma abordagem da problemática carcinogenética do carbamato de etilo, (ii) apresentam-se as metodologias analíticas opcionais desenvolvidas até ao presente com a sensibilidade requerida para os níveis em que este produto é permitido nas bebidas alcoólicas e (iii) dá-se conta de algumas das dificuldades com que se debateram os produtores e os responsáveis do controlo de qualidade para a correcta detecção dos reduzidos níveis que foram impostos e também do caminho percorrido para as superar.

CARCINOGENECIDADE DO CARBAMATO DE ETILO

A actividade carcinogénica do carbamato de etilo foi reconhecida pela primeira vez por Nettleship *et al.* (1943). Estes autores, ao depararem com uma incidência anormalmente ele-

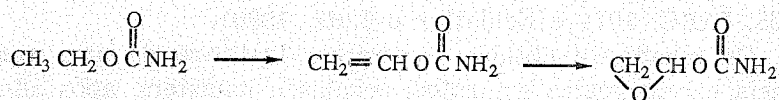
vada de cancros do pulmão em cobaias utilizados em ensaios laboratoriais, vieram a concluir que a causa estava no carbamato de etilo que usavam como anestésico. Desde então, inúmeros trabalhos experimentais foram dedicados a elucidar os mecanismos dessa actividade (Para revisão exaustiva ver Mirvish, 1968, IARC, 1974 e Schlatter e Lutz, 1990).

Os resultados obtidos mostraram tratar-se de uma substância carcinogénica em ratos, cobaios e hamsters, após administração por via oral, subcutânea, intraperitoneal ou por inalação. É susceptível de induzir, entre outros, carcinomas do pulmão, hepatomas, carcinomas mamários, linfomas, melanomas e tumores vasculares. O carbamato de etilo manifesta ainda uma acção potenciadora dos efeitos leucogénicos das radiações X. A actividade carcinogénica manifesta-se após a administração de uma única dose. Segundo Schlatter e Lutz (1990), uma incidência de tumores de 40 a 100 % é típica, em cobaios, após administração, na água de bebida, de 100 a 1000 mg de carbamato de etilo/kg de peso corporal/dia, dependendo da duração do tratamento. Experiências realizadas com doses mais pequenas, através das quais é possível fazer com maior rigor extrapolações para o género humano, demonstraram uma correlação significativa entre a dose e a incidência de tumores, sendo estes predominantes no fígado (ratos e cobaios), no pulmão (cobaios apenas) e ainda na glândula mamária (ratos e cobaios fêmeas) (Schmähl *et al.*, 1977, Dahl *et al.*, 1980). Os cobaios recém-nascidos são mais susceptíveis à indução de cancro do que os cobaios adultos.

À semelhança de muitos outros compostos, o carbamato de etilo parece exercer o seu efeito carcinogénico pela formação de aductos com alguns componentes celulares, nomeadamente com ácidos nucleicos e proteínas (Miller e Miller, 1983). O processo requer, geralmente, a activação metabólica «in vivo» do composto em causa, da qual resulta a formação de derivados electrofílicos (agentes carcinogénicos finais), capazes de formar ligações covalentes com átomos nucleofílicos de azoto, oxigénio e enxofre dos resíduos purínicos e pirimidínicos dos ácidos nucleicos e dos resíduos de aminoácidos das proteínas.

O mecanismo químico envolvido na activação do carbamato de etilo até à sua forma carcinogénica final tem sido difícil de elucidar. Os últimos estudos (Guenguerich *et al.*, 1991 e Guen-

guerich e Kim, 1991) apontam para a ocorrência de uma dupla oxidação, inicialmente a carbamato de vinilo e, em seguida, a carbamato de epoxietilo, actuando este como agente carcinogénico final, segundo o esquema:



Os teores mais elevados de aductos com o DNA são sistematicamente obtidos no fígado, seguindo-se o pulmão. O nível de formação desses aducos, tendo em atenção as doses administradas, coloca o carbamato de etilo entre o grupo de agentes carcinogénicos hepatotóxicos moderadamente potentes, com uma potência carcinogénica 100 a 1000 vezes inferior à da aflatoxina B1 (Schlatter e Lutz, 1990).

A possível influência da administração conjunta de etanol no metabolismo e na actividade carcinogénica do carbamato de etilo não está ainda elucidada, havendo resultados contraditórios quanto à mesma. No caso do vinho, foi sugerida a possibilidade de o mesmo conter componentes, para além do etanol, capazes de desempenhar um papel de inibição do desenvolvimento de tumores. Será o caso, entre outros, do ácido cafeico e do ácido ferúlico (Stoewsand *et al.*, 1991).

METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NO DOSEAMENTO DO CARBAMATO DE ETILO NAS BEBIDAS ALCOÓLICAS

A quantificação de pequenos teores de carbamato de etilo em bebidas alcoólicas foi feita pela primeira vez por Löfroth e Gejvall (1971). Para o efeito, os autores utilizaram um método de diluição isotópica a partir de pirocarbonato de etilo «marcado» com tritium. Os resultados obtidos vieram posteriormente a revelar-se incorrectos, cerca de dez a cem vezes superiores aos obtidos por Fischer (1972) em idênticas condições.

Walker *et al.* (1974) foram os primeiros a desenvolver um método de cromatografia gasosa para o doseamento do composto em vinhos. O método requeria uma grande quantidade de amostra (250 ml) e um complexo e moroso processo de

extracção. Fazia uso de uma coluna de enchimento polar e de um detector de conductividade electrolítica de Coulson (CECD), permitindo a detecção de quantidades de carbamato de etilo da ordem dos 100 $\mu\text{g/l}$, com uma percentagem de recuperação de 80 a 100 %. A mesma metodologia, com ligeiras modificações, permitiu a Ough (1976) a detecção em amostras de vinho de teores da ordem dos 10 $\mu\text{g/l}$, com uma recuperação média de 66,5 %.

Desde então, a cromatografia gasosa tem sido considerada como a técnica de eleição para a análise do composto. Iremos fazer, de seguida, uma análise crítica das diferentes metodologias propostas pelos vários autores (apresentadas em resumo no Quadro 1), tendo em atenção as três etapas distintas do processo: extracção, separação cromatográfica e detecção/quantificação. Em separado, serão analisados os métodos que propõem a análise do composto após um processo prévio de derivatização.

Processos de extracção

Como se pode observar no Quadro 1, apenas um pequeno número de trabalhos relativos à análise de bebidas alcoólicas destiladas com teores de carbamato de etilo relativamente elevados (da ordem das centenas de $\mu\text{g/l}$), refere a possibilidade de injeção directa das amostras no cromatógrafo gasoso. Todas as outras metodologias propostas incluem um processo prévio de extracção. O objectivo fundamental é o de promover a eliminação de compostos indesejáveis presentes nas amostras, designadamente daqueles que são susceptíveis de perturbar o processo de separação cromatográfica. Simultaneamente, torna-se possível uma concentração do composto, com os óbvios benefícios daí decorrentes.

O processo de extracção pode ser executado em fase líquida, com a utilização de um solvente orgânico adequado, ou em fase sólida, através da passagem por colunas apropriadas, do tipo «Extrelut», «Chemelut» ou «Florisl», seguida de eluição por um solvente. Os processos em fase sólida, além de permitirem uma melhor separação de potenciais interferentes, apresentam a vantagem de evitar a formação de emulsões, fenómeno que ocorre com frequência quando a extracção é feita apenas

QUADRO 1

Metodologias analíticas propostas para o doseamento de carbamato de etilo em bebidas alcoólicas
Analytical methodologies proposed for ethyl carbamate analysis in alcoholic beverages

Autores	Processo de extração	Padrão interno	Detector
Bailey <i>et al.</i> (1986)	Liq/Liq c/ diclorometano + formação de derivado trimetilado	NPD
Baumann e Zimmerli (1986)	Extrelut + pentano + diclorometano/acetato de etilo (2:1)	NPD
Bertrand e T.-Pissard (1986)	Liq/Liq c/ éter etílico	NPD
Dennis <i>et al.</i> (1986)	Chemelut ou Extrelut + diclorometano + Florisil Sep Pak + diclorometano/metanol (93:7)	TEA; HECD; MS
Schulz e Renner (1986)	Injecção directa	MS a)
Adam e Postel (1987)	Injecção directa	NPD a)
Andrey (1987)	Liq/Liq c/ acetato de etilo	Octanol	FID a)
Aylott <i>et al.</i> (1987)	Liq/Liq c/ diclorometano	Carbamato de n-propilo	NPD; MS
Bebiolka e Dunkel (1987)	Liq/Liq c/ clorofórmio + centrifugação	Butano 1,4-diol	MS
Cairns <i>et al.</i> (1987)	Liq/Liq c/ acetona/diclorometano/éter de petróleo (60:200:100) + Florisil + éter etílico/éter de petróleo (50:50) + acetona	Carbamato de etilo marcado (¹⁵ N, ¹³ C)	MS c/ ionização química e MS/MS
Conacher <i>et al.</i> (1987)	Liq/Liq c/ diclorometano + centrifugação + acetato de etilo	HECD; MS
Gaetano e Matta (1987)	Liq/Liq c/ diclorometano	Carbamato de etilo	MS
Heisz <i>et al.</i> (1987)	Injecção directa	NPD a)
Ingladew <i>et al.</i> (1987)	Liq/Liq c/ diclorometano	Nitrobenzeno	MS
Lau <i>et al.</i> (1987)	Liq/Liq c/ diclorometano	MS

Midaou <i>et al.</i> (1987)	Extrelut + pentano + diclorometano	Carbamato de n-butilo	MS
V. Ingen <i>et al.</i> (1987)	Líqu/Líqu c/ diclorometano	FID b)
Kobayashi <i>et al.</i> (1987)	Clorofórmio + Extrelut + benzeno/éter etílico/metanol (108:32:1) + acetoneitrilo + derivatização c/ N-dimetilformamida-dimetilacetato + Extrelut + hexano + acetoneitrilo	FID
Bertrand e Barros (1988)	Líqu/Líqu c/ éter etílico (injeção directa para destilados)	Carbamato de metilo e carbamato de n-butilo	NPD
Brumley <i>et al.</i> (1988)	Líqu/Líqu c/ diclorometano + centrifugação + acetato de etilo	Carbamato de etilo marcado (¹⁵ N, ¹³ C)	MS/MS c/ ionização química
Cannas <i>et al.</i> (1988)	Celite + alumina + diclorometano	Carbamato de etilo marcado (¹⁵ N, ¹³ C)	TEA; MS
Clegg e Frank (1988)	Líqu/Líqu c/ diclorometano + centrifugação + acetato de etilo	MS
Dennis <i>et al.</i> (1988)	Extrelut + diclorometano + Florisil Sep Pak + acetato de etilo/metanol (90:10)	Carbamato de n-propilo	TEA
Ough <i>et al.</i> (1988)	Chemelut + diclorometano + acetato de etilo	Carbamato de n-propilo	MS
Pierce <i>et al.</i> (1988)	Pentano + Líq/Líqu c/ diclorometano + alumina + diclorometano	Carbamato de n-butilo e carbamato de tert-butilo; Carbamato de etilo marcado (¹⁵ N, ¹³ C), com MS	FID; MS
Rifkin <i>et al.</i> (1989)	Líqu/Líqu c/ diclorometano	Carbamato de n-propilo	MS
Giachetti <i>et al.</i> (1991)	Líqu/Líqu c/ diclorometano/acetato de etilo (95:5) + derivatização com xantidrol	Carbamato de metilo derivatizado c/ xantidrol	MS
Ferreira e Fernandes (1992)	Líqu/Líqu c/ éter etílico + acetato de etilo	Carbamato de n-butilo e tetradecanoato de metilo	MS

a) Apenas para análise de bebidas destiladas.

b) Com utilização de um sistema de duas colunas cromatográficas em série.

em fase líquida. Em contrapartida, apresentam geralmente rendimentos inferiores e baixos níveis de reprodutibilidade.

Em qualquer dos casos, o solvente mais utilizado é o diclorometano, havendo também referências ao uso de clorofórmio, éter etílico, acetona e outros. As quantidades de amostra utilizadas são, em regra, de 10 a 25 ml, havendo autores que propõem a sua prévia diluição com água de forma a diminuir e, ao mesmo tempo, uniformizar os respectivos teores em etanol.

Dado que a solubilidade do carbamato de etilo é maior em água do que em qualquer dos solventes referidos, é comum a utilização de um sal para saturar a fase aquosa e promover dessa forma o fenómeno de «salting-out». Regra geral, utiliza-se cloreto de sódio, cloreto de potássio ou sulfato de sódio anidros. O processo envolve ainda, geralmente, uma prévia neutralização ou ligeira alcalinização da amostra, proposta por Joe *et al.* (1977). Dessa forma evita-se a passagem de ácidos para o extracto e diminui-se a possibilidade de formação de emulsões, extremamente prejudiciais para a rentabilidade do processo. A alcalinização exagerada da amostra deve ser evitada pois pode provocar a hidrólise do composto (Zimmerli e Schlatter, 1991). Alguns autores utilizam um processo de pré ou pós-extracção com pentano para remover possíveis compostos interferentes de características apolares. A centrifugação é, também, por vezes utilizada para a separação das fases, nomeadamente quando o processo de extracção é feito apenas com solventes.

Em virtude das más propriedades cromatográficas dos solventes utilizados (baixo ponto de ebulição, poder de dissolução da fase estacionária normalmente usada e, no caso do diclorometano, incompatibilidade com alguns detectores utilizados), é habitual proceder-se à transferência do extracto obtido para um outro solvente mais apropriado. Acetato de etilo e hexano são os mais utilizados, com predominância para o primeiro. Nessa operação, deve sempre evitar-se a concentração do extracto até à secura, dada a possibilidade de haver perdas de carbamato de etilo por sublimação (Clegg e Frank, 1988).

O rendimento médio dos diversos processos de extracção depende não apenas do processo em si, mas também de factores diversos como o tipo de bebida alcoólica sujeita a análise e o maior ou menor teor do carbamato de etilo presente. Situa-se, em regra, acima dos 60 %, sendo normalmente corrigido pela

utilização de um padrão interno adequado, sempre que se pretende fazer uma determinação quantitativa.

Um aspecto que nos parece importante salientar diz respeito à necessidade de usar de alguns cuidados especiais na conservação e no manuseamento das amostras, de modo a evitar a alteração das quantidades de carbamato de etilo presente nas mesmas, no decurso do próprio processo analítico. Esses cuidados decorrem dos conhecimentos actuais acerca da formação do composto, nomeadamente da acção precursora da ureia e de alguns compostos cianídricos e do importante papel desempenhado no processo pelo calor e pela luz, respectivamente.

No caso dos vinhos e, em especial, naqueles que apresentam significativos teores residuais de ureia é indispensável evitar a utilização de temperaturas superiores a 30-40° C. Tal facto implica a observação de cuidados especiais em todo o processo de extracção do composto, designadamente na fase de concentração dos extractos obtidos por evaporação do solvente. A destilação prévia da amostra, utilizada no sentido de reduzir a quantidade de etanol presente, é, também, totalmente desaconselhada, como foi provado por um trabalho de Funch e Lisbjerg (1988), em que os autores obtiveram em todas as amostras analisadas teores anormalmente elevados de carbamato de etilo.

Nas bebidas alcoólicas destiladas, nomeadamente naquelas obtidas a partir de produtos ricos em compostos cianídricos e cuja elaboração tenha sido recente, a concentração de carbamato de etilo pode aumentar drasticamente depois de uma exposição prolongada à luz, devendo, portanto, operar-se na ausência desta.

Processos de separação cromatográfica

Existe uma grande uniformidade no que respeita aos processos propostos para a separação cromatográfica do carbamato de etilo nos extractos obtidos. A quase totalidade dos métodos propostos desde 1986 referem o uso de colunas capilares com fase estacionária de características polares, do tipo polietilenoglicol (Carbowax 20 M; DB Wax 52, etc.).

No que respeita à escolha dos diversos parâmetros das colunas utilizadas, um bom compromisso entre a capacidade de

separação necessária e a realização da análise em tempo útil é normalmente conseguido pelo uso de colunas com 30 metros de comprimento (ou mais, no caso de se utilizar a detecção por espectrometria de massa), 0,25-0,32 milímetros de diâmetro interno e 0,25-0,50 microns de espessura de fase. As temperaturas indicadas para o injector são de 200-220° C e os programas de temperatura têm início a valores de 60-100° C, subindo gradualmente, de forma linear ou por patamares, até à temperatura do injector.

Processos de detecção e quantificação

Estão propostos diversos detectores para a detecção e quantificação do carbamato de etilo presente nos extractos sujeitos a análise. O mais utilizado de todos é o espectrómetro de massa (sistemas combinados de cromatografia gasosa — espectrometria de massa) a funcionar em modo de monitorização selectiva de iões. É considerado como detector de referência, sendo usado quer como detector primário quer na confirmação de resultados obtidos com outros detectores. Destes os mais utilizados são os detectores de condutividade electrolítica de Hall (HECD), de energia térmica (TEA) e termoiónico de azoto/fósforo (NPD). A sua característica comum reside na possibilidade de operar com selectividade para compostos azotados. Existe ainda referência à utilização do detector de ionização de chama (FID), mas apenas em determinadas condições específicas [utilização de duas colunas de diferentes polaridades (V. Ingen *et al.*, 1987) e análise do composto após derivatização (Kobayashi *et al.*, 1987)].

A opção generalizada por detectores selectivos deve-se à extrema complexidade composicional apresentada por certos extractos, em especial quando se trata de vinhos, aliada às diminutas concentrações em que o composto se encontra normalmente presente. Um composto em particular, o succinato de etilo, perturba de forma particularmente grave a separação do carbamato de etilo, apresentando sempre, independentemente do programa de temperatura utilizado, um tempo de retenção muito semelhante. Apenas a utilização de detectores incapazes de responder à presença de succinato de etilo, torna possível uma análise rigorosa do carbamato de etilo.

Dos detectores citados, o único a apresentar características de fácil manuseamento e custos relativamente baixos é o detector termoiónico de azoto/fósforo. O seu uso, contudo, restringe-se praticamente à determinação de carbamato de etilo em aguardentes e outras bebidas alcoólicas destiladas. Em vinhos, os resultados obtidos são pouco credíveis, sendo necessária a sua confirmação por outros detectores (Zimmerli e Schlatter, 1991).

O detector de condutividade electrolítica de Hall e o detector de energia térmica a operarem em modo de azoto apresentam, por seu lado, melhores características de sensibilidade, permitindo a obtenção de limites de detecção mais baixos com idênticos processos de extracção. O seu manuseamento, todavia, apresenta grandes dificuldades, sendo difícil a manutenção continuada do detector em condições optimizadas. Apresentam, além disso, um custo elevado. Estes factos levam a que o seu uso se restrinja a um reduzido número de autores.

Neste contexto, os espectrómetros de massa, a operar em modo de monitorização selectiva de iões, surgem como os detectores de eleição para este tipo de análise. Não obstante apresentarem, igualmente, alguns dos inconvenientes atrás referidos (alto custo, dificuldades de reprodutibilidade para teores muito pequenos, dificuldades na manutenção de condições optimizadas de detecção), as suas características únicas de selectividade tornam possível o estabelecimento de protocolos analíticos relativamente simples, com limites de detecção da ordem de 1-10 $\mu\text{g}/\text{l}$ nas amostras sujeitas a análise. Foi esta, também, a opção que seguimos no desenvolvimento da metodologia aplicada nos nossos estudos sobre a formação de carbamato de etilo em vinhos da Madeira (Ferreira e Fernandes, 1992).

Como se pode observar na figura 1, o espectro de massa do carbamato de etilo obtido por impacto electrónico apresenta como iões mais abundantes os correspondentes a fragmentos de relação massa/carga 44, 45, 62 e 74. De todos, o único susceptível de poder ser utilizado com êxito na quantificação é o ião m/z 62, não só pela sua grande intensidade como também por estar sujeito a menos interferências. A sua formação é resultante de uma reacção de rearranjo do tipo «McLafferty + 1», ilustrada na figura 2. Os iões m/z 44 e m/z 45 não são de grande utilidade para diagnosticar a presença de carbamato de etilo devido à

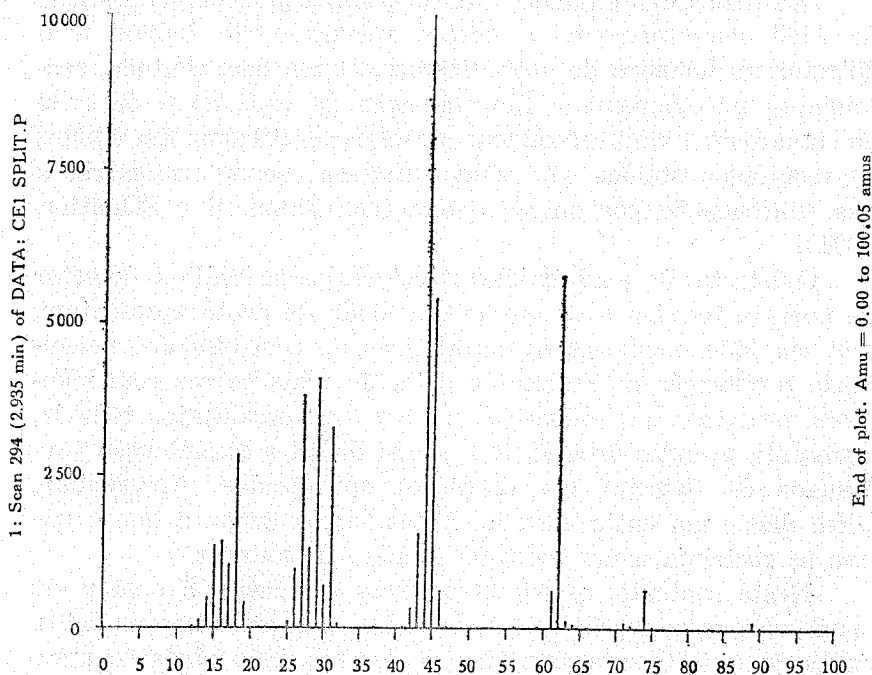


Fig. 1 — Espectro de massa do carbamato de etilo obtido por impacto electrónico (70 eV).

Electron impact (70 eV) mass spectrum of ethyl carbamate.

falta de especificidade provocada por interferências do ruído de fundo cromatográfico (CO_2 , por exemplo). O ião m/z 74, por seu lado, é comum à maioria dos ésteres alquílicos, fazendo parte do espectro de massa do succinato de etilo, o que também o torna de pouca utilidade. Finalmente, o ião m/z 89, que corresponde ao ião molecular do composto, tem uma intensidade demasiado baixa.

Técnicas adicionais de espectrometria de massa, como a ionização química, com metano ou isobutano, a monitorização selectiva de iões em alta resolução e a combinação espectrometria de massa/espectrometria de massa (MS/MS) estão também descritas, não apresentando, todavia, vantagens muito evidentes em relação à técnica convencional. Os limites de detecção ligeiramente mais baixos dessa forma obtidos não compensam, em regra, as dificuldades acrescidas na realização da análise

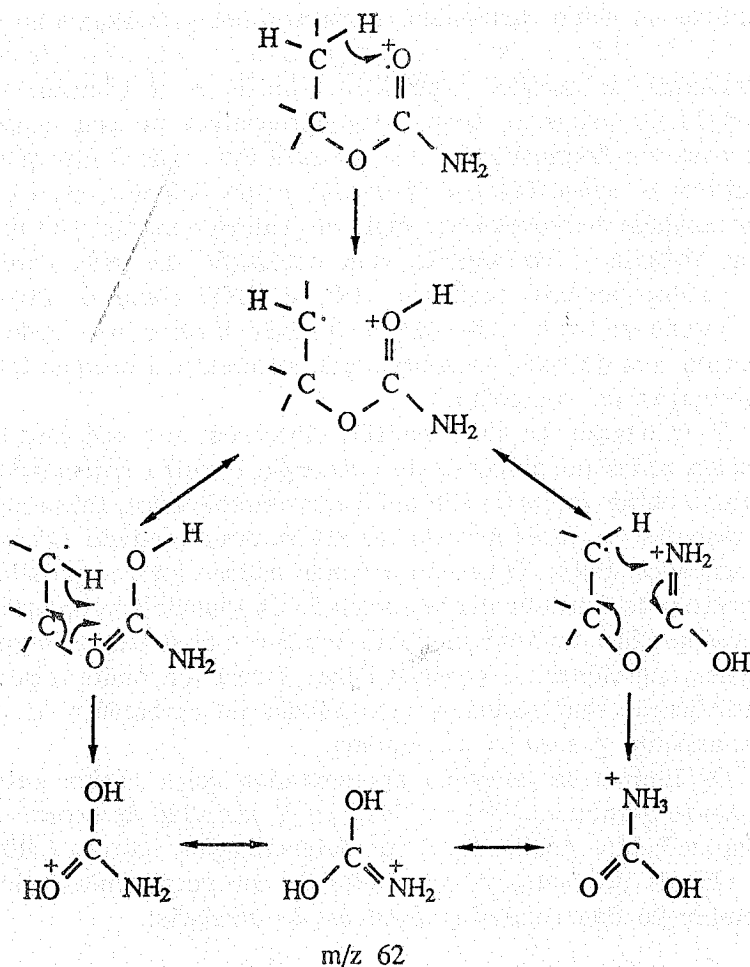


Fig. 2 — Formação do fragmento m/z 62 a partir da molécula de carbamato de etilo por rearranjo do tipo «McLafferty + 1».

«McLafferty + 1» rearrangement for ethyl carbamate with formation of the m/z 62 fragment.

e o aumento de custos inerente. Uma otimização de alguns desses métodos talvez seja, contudo, ainda possível.

A quantificação de carbamato de etilo é feita geralmente com o auxílio de um padrão interno, adicionado à amostra no início do processo. De entre as diversas substâncias propostas para desempenhar esse papel, predominam os diferentes ésteres

alquílicos do ácido carbâmico, estruturalmente análogos ao carbamato de etilo e com um comportamento químico idêntico: carbamatos de metilo, n-propilo, n-butilo e tert-butilo. Com excepção do primeiro, todos eles apresentam no seu espectro de massa um fragmento intenso de m/z 62, o que é útil quando se utiliza o espectrómetro de massa como detector, pois evita a necessidade de monitorizar mais um valor de massa. Um maior rigor, todavia, é conseguido pela utilização de carbamato de etilo isotopicamente marcado ($^{13}\text{C}_1$ e ^{15}N), como é proposto por alguns autores. Este tipo de padrão interno não pode ser utilizado com outros detectores, dado apresentar o mesmo tempo de retenção do composto.

A utilização de dois padrões internos, um adicionado à amostra antes do processo de extracção e outro adicionado ao extracto obtido antes da sua análise cromatográfica, foi proposta em trabalho da nossa autoria, já anteriormente citado (Ferreira e Fernandes, 1992). O uso do segundo padrão interno possibilita o controlo do funcionamento adequado da globalidade do sistema cromatográfico, nomeadamente do injectador e do detector. Segundo a nossa experiência, é possível dessa forma um maior rigor na quantificação das pequenas quantidades de carbamato de etilo normalmente presentes em vinhos.

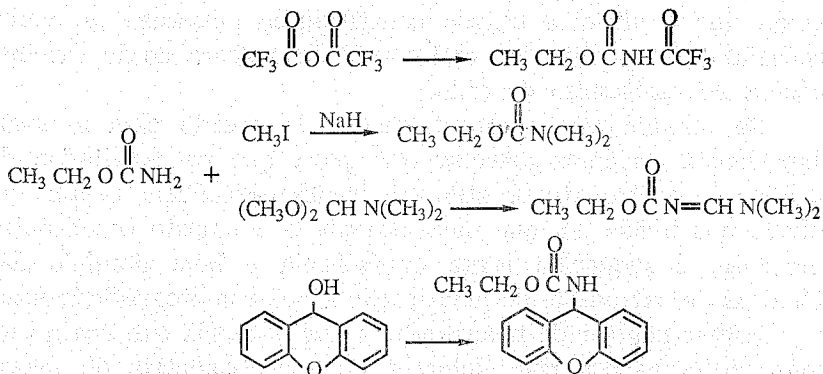
Os limites de detecção apresentados pelos vários autores situam-se geralmente entre 1 e 20 $\mu\text{g/l}$, variando de acordo com o tipo de bebida analisada. A sua determinação rigorosa é difícil, em virtude do facto, já apontado, de ser geralmente difícil a manutenção das condições óptimas de detecção.

Processos de derivatização

Tendo em vista a obtenção de uma maior sensibilidade na resposta e, fundamentalmente, uma melhor separação cromatográfica, foram feitas algumas tentativas de analisar o carbamato de etilo após derivatização química.

Como agentes derivatizantes foram propostos, sucessivamente, anidrido trifluoroacético (Walker *et al.*, 1974), iodeto de potássio na presença de hidreto de sódio (Bailey *et al.*, 1986), N, N-dimetilformamida-dimetilacetil (Kobayashi *et al.*, 1987) e xantidrol (Giachetti *et al.*, 1991) que originam a formação, respectivamente, dos derivados N-trifluoracetilado, N, N-dimetilado,

N, N-metilenodimetilaminado e xantidrílico do carbamato de etilo, de acordo com o esquema seguinte:



De todos os processos de derivatização propostos, é o último, correspondente à utilização de xantidrol, o que parece apresentar maiores potencialidades. Segundo os autores, a reacção revelou-se fácil de executar, tendo os rendimentos obtidos sido superiores a 95 %, tanto para o carbamato de etilo como para o carbamato de metilo, utilizado como padrão interno. Os derivados formados apresentaram boas características cromatográficas, designadamente no que respeita à sua estabilidade térmica, o que aliado a uma certa lipoficidade dos mesmos permitiu o uso de colunas cromatográficas de carácter apolar, com as vantagens daí decorrentes: possibilidade de utilização de temperaturas mais elevadas e, em consequência, tempos de análise mais curtos; menores problemas com a estabilidade da coluna; ruído de fundo menos intenso. O limite de detecção observado na análise de aguardentes foi de 1 µg/l, com um sistema de cromatografia gasosa/espectrometria de massa a operar em monitorização selectiva de iões. Com um detector termoiónico de azoto-fósforo, apresentou-se um pouco mais elevado, mas permitindo, mesmo assim, uma quantificação rigorosa.

CONCLUSÕES

Dos estudos de carcinogenicidade realizados até ao presente e que são do nosso conhecimento, pode concluir-se que o carbamato de etilo se revelou como hepatocarcinogénico moderado para os animais de laboratório em que foi ensaiado. Porém,

não havendo ensaios epidemiológicos no homem comprovativos da carcinogenicidade do vinho não é lícito extrapolar para o homem o efeito observado nos animais de laboratório. Acresce ainda que o álcool e outros constituintes presentes no vinho poderão desempenhar um efeito inibitório dessa acção carcinogénica do carbamato de etilo.

Da súmula que apresentamos e de acordo com a nossa experiência podemos afirmar que para que os resultados da análise de carbamato de etilo em bebidas alcoólicas sejam credíveis nos níveis em que normalmente o composto se encontra presente, é requerida larga experiência e bom domínio das técnicas de extracção, de purificação e de cromatografia gasosa.

Parece-nos ser de recomendar a metodologia que usa a cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa a operar em modo de monitorização selectiva de iões, com a utilização de dois padrões internos, um adicionado à amostra antes do processo de extracção e outro adicionado ao extracto destinado à análise cromatográfica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelo Projecto de Investigação n.º 314.86.217FCI da Junta Nacional de Investigação Científica (JNICT) e pelo Contrato de Investigação 89/SAD/4 do Instituto Nacional de Investigação Científica (INIC) para a realização deste trabalho.

RÉSUMÉ

Difficultés dans l'évaluation de la carcinogénicité dans la détermination du carbamate d'éthyle dans les boissons alcooliques

Dans ce travail on fait une description de l'activité carcinogénique du carbamate d'éthyle et de ses mécanismes d'action.

On présente un résumé des méthodologies analytiques développées pour le dosage des basses teneurs de carbamate d'éthyle qui sont d'habitude présentes dans les diverses boissons alcooliques, en faisant référence à la contribution personnelle des auteurs dans ce domaine.

On fait référence aussi aux difficultés de l'analyste en face des limites imposées par les autorités sanitaires dans les vins, les eaux-de-vie de vin et les eaux-de-vie de fruits.

SUMMARY

Difficulties on carcinogenicity evaluation and ethyl carbamate determination in alcoholic beverages

In this paper an abbreviated description of carcinogenicity activity of ethyl carbamate and its mechanisms is presented.

A summary is made of the analytical methodologies which have been developed for the determination of the ethyl carbamate levels usually found in alcoholic beverages referring to personal contributions of the authors in this field.

Also outlined are some difficulties faced by the quality control with the ethyl carbamate limitation in the limits established by health authorities for wines, spirits and liquors.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adam, L.; Postel, W., 1987. Gaschromatographische Bestimmung von ethylcarbamate (urethan) in spirituosen. *Branntweinwirtschaft*, **127**: 66-68; citado em *Food Sci. Technol. Abstracts*, **19**: 8H101.
- Andrey, D., 1987. A simple gas chromatography method for determination of ethyl carbamate in spirits. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **185**: 21-23; citado em *Food Sci. Technol. Abstracts* **19**: 11H122.
- Ayloult, R. I.; McNeish, A. S.; Walker, D. A., 1937. Determination of ethyl carbamate formation in distilled spirits using nitrogen specific and mass spectrometric detection. *J. Inst. Brew.*, **93**: 382-386.
- Bailey, R.; Noth, D. Myatt, D.; Lawrence, J. F., 1986. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by methylation and gas chromatography with nitrogen-phosphorus thermionic detection. *J. Chromatogr.*, **369**: 199-202.
- Baumman, U.; Zimmerli, B., 1986. Gaschromatographische bestimmung von urethan (ethylcarbamate) in alkoholischen getränken. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **77**: 327-332.
- Bebiolka, H.; Dunkel, 1987. Bestimmung von ethylcarbamate in alkoholischen getränken mittels kappillargaschromatographie/massenspektrometrie. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, **83**: 75-76; citado em *Food Sci. Technol. Abstracts*, **19**: 9H11.
- Bertrand, A.; Triquet-Pissard, R., 1986. Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin. Observations sur son origine. *Connaiss. Vigne Vin*, **20**: 131-136.
- Bertrand, A.; Barros, P., 1988. Dosage du carbamate d'éthyle dans les vins et les eaux-de-vie. *Connaiss. Vigne Vin*, **22**: 39-47.
- Brumley, W. C.; Canas, B. J.; Perfetti, G. A.; Mossoba, M. A.; Sphon, J. A.; Corneliusen, P. E., 1988. Quantitation of ethyl carbamate in whiskey, sherry, port and wine by gas chromatography/tandem mass spectrometry using a triple quadrupole mass spectrometer. *Anal. Chem.*, **60**: 975-978.

- Cairns, T.; Siegmund, E. G.; Luke, M. A.; Doose, G. M., 1987. Residue levels of ethyl carbamate in wines and spirits by gas chromatography and mass spectrometry/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **59**: 2055-2059.
- Canas, B. J.; Harvey, D. C.; Joe Jr., F. L., 1988. Rapid gas chromatography method for determining ethyl carbamate in alcoholic beverages with thermal energy analyzer detection, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 509-511.
- Clegg, B. S.; Frank, R., 1988. Detection and quantitation of trace levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring. *J. Agric Food Chem.*, **36**: 502-505.
- Conache, H. B. S.; Page, B. D.; Lau, B. P. Y.; Lawrence, J. F.; Bailey, R.; Calway, P.; Hanchay, J. P.; Mori, B., 1987. Capillary column gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**: 749-751.
- Dahl, G. A.; Miller, E. C.; Miller, J. A., 1980. Comparative carcinogenicities and mutagenicities of vinyl carbamate, ethyl carbamate and ethyl N-hydroxycarbamate. *Cancer Res.*, **49**: 1194-1203.
- Dennis, M. J.; Howarth, N.; Massey, R. C.; Parker, I.; Scotter, M.; Startin, J. R., 1986. Method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **369**: 193-198.
- Dennis, M. J.; Howarth, N.; Massey, R. C.; McWeeny, D. J.; Parker, I.; Scotter, M.; Startin, J. R., 1988. Ethyl carbamate analysis in fermented products: a comparison of measurements of mass spectrometry, thermal energy analyser and Hall electrolytic conductivity detector. *J. Res. Nat. Bureau Standards*, **93**: 249-251.
- Ferreira, M.; Fernandes, J., 1992. The application of an improved GC-MS procedure to investigate ethyl carbamate behavior during the production of Madeira wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**: 339-343.
- Fisher, E., 1972. Formation of urethane in beverages treated with diethyl pyrocarbonate. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **148**: 221-222.
- Funch, F.; Lisbjerg, S., 1988. Analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **186**: 29-32.
- Gaetano, G.; Matta, M., 1987. Dosage du carbamate d'éthyle dans les vins et spiritueux par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. *Bull. OIV*, **60** (671-672): 36-42.
- Giachetti, G.; Assandri, A.; Zanolò, G., 1991. Gas chromatography — mass spectrometric determination on ethyl carbamate as the xanthylamide derivative in Italian aqua vitae (grappa) samples. *J. Chromatogr.*, **585**: 111-115.
- Guengerich, F. P.; Kim, D.-H., 1991. Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1, N⁶-ethenoadenosine. *Chem. Res. Toxicol.*, **4**: 413-421.
- Guengerich, F. P.; Kim, D.-H.; Iwasaki, M., 1991. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspectst. *Chem. Res. Toxicol.*, **4**: 168-179.

- Heisz, O.; Fritsch, H.; McCreadie, S. W. S., 1987. Ethylcarbamate in slivovic-anmerkung zur Methodenentwicklung. *Labor Praxis*, **11**: 309-310.
- IARC, 1974. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Some Antithyroid and Related Substances. *Nitrofurans and Industrial Chemicals*, Vol. 7, 111-140. International Agency for Research on Cancer.
- Ingledeu, W. M.; Magnus, C. A.; Patterson, J. R., 1987. Yeast foods and ethyl carbamate formation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**: 332-335.
- Joe Jr, F. L.; Kline, D. A.; Miletta, E. M.; Roach, J. A. G.; Roseboro, E. L.; Fazio, T., 1977. Determination of urethane in wines by gas-liquid chromatography and its confirmation by mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**: 509-516.
- Kobayashi, K.; Toyoda, M.; Saito, Y., 1987. Determination of ethyl carbamate in sake by alkylation and gas chromatography with a flame ionization detector. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **28**: 330-335; citado em *Analytical Abstracts*: **50**: 666.
- Lau, B. P.-Y.; Weber, D.; Page, B. D., 1987. Gas chromatographic mass spectrometric determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *J. Chromatogr.*, **402**: 233-241.
- Löfroth, G.; Gejvall, T., 1971. Diethyl pyrocarbonate: formation of urethane in treated beverages. *Science*, **174**: 1248-1250.
- Mildau, G.; Preuss, A.; Frank, W.; Heering, W., 1987. Ethylcarbamate in alkoholischen getränken: verbesserte analyse und lichtabhängige bildung. *Lebensm. Rdsch*, **83**: 69-74; citado em *Food Sci. Technol. Abstracts*, **19**: 9H10.
- Miller, J. A.; Miller, E. C., 1983. The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *Br. J. Cancer*, **48**: 1-15.
- Mirvish, S. S., 1968. The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-hydroxyurethane. *Adv. Cancer Res.*, **11**: 1-42.
- Nettleship, A.; Henshaw, P. S.; Meyer, H. L., 1943. Introduction of pulmonary tumours in mice with ethyl carbamate (urethane). *J. Nat. Canc. Inst.*, **4**: 309-319.
- Ough, C. S., 1976. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.*, **24**: 323-328.
- Ough, C. S.; Crowell, E. A.; Gutlove, B. R., 1988. Carbamyl compound reaction with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**: 239-242.
- Pierce Jr, W. M.; Clark, A. O.; Hurst, H. E., 1988. Determination of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 781-784.
- Riffkin, H. L.; Wilson, R.; Howie, D.; Muller, S. B., 1989. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. *J. Inst. Brew.*, **95**: 115-119.
- Schlatter, J.; Lutz, W. K., 1990. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem. Toxicol.*, **28**: 205-211.

- Schmähel, D.; Port, R.; Wahrendorf, J., 1977. A dose — response study on urethane carcinogenesis in rats and mice. *Int. J. Cancer*, **19**: 77-80.
- Schulz, J.; Renner, R., 1986. Ethylcarbamate (urethan) in steinobstbranntweinen. Schnelles nachweisen und quantifizieren mit dem massenselektiven detektor (MSD). *GIT Fach. Lab.*, **12/86**: 1215-1220; citad em *Analytical Abstracts*: **49**: 788.
- Stoewsand, G. S.; Andersen, I. L.; Munson, L., 1991. Inhibition by wine of tumurogenesis induced by ethyl carbamate. *Food Chem. Toxicol.*, **29**: 291-295.
- V. Ingen, R. H. M.; Nijssen, L. M.; Van den Berg, F.; Maarse, H., 1987. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by two-dimensional gas chromatography. *J. High Resol. Chrom. Commun.*, **10**: 151-152.
- Walker, G.; Winterlin, W.; Fouda, H.; Seiber, J. 1974. Gas chromatographic analysis of urethane (ethyl carbamate) in wine. *J. Agric. Food Chem.*, **22**: 944-947.
- Zimmerli, B.; Schlatter, J., 1991. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Res.*, **259**: 325-350.