

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELA PELIZZA PETERLE

OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS E FURFURIL ÁLCOOL EM
ESPUMANTES

Porto Alegre

2017

GABRIELA PELIZZA PETERLE

**OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS E FURFURIL ÁLCOOL EM
ESPUMANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheira de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliane Elisa Welke

Porto Alegre

2017

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS E FURFURIL ÁLCOOL EM
ESPUMANTES**

Gabriela Pelizza Peterle

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Juliane Elisa Welke
Doutora em Química (UFRGS)

Karine Nicolli
Doutora em Química (UFRGS)

Paula Rossini Augusti
Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica (UFRGS)

*Dedico este trabalho aos meus pais que sempre
me apoiaram e incentivaram para que eu
realizasse meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e saúde.

Aos meus pais, Gilmar e Zilma, por serem meus maiores exemplos apesar de estarem longes; por sempre me mostrarem os verdadeiros valores de vida, me orientando a fazer as melhores escolhas; por entenderem minha ausência em diversos momentos importantes para eles. A minha madrasta Claudia, aos meus irmãos Enzo e Guilherme e ao meu namorado Lucas, pela grande torcida e constante apoio; pela paciência e por todos os momentos divididos, pelo seu amor e carinho. A minha família, meu muito obrigado e a certeza de que é em vocês que eu encontro toda a minha força.

A minha orientadora Juliane Welke, por ter me aceitado como orientada e me acolhido em seu laboratório, pela sua competência na participação de todos os processos de construção deste trabalho de conclusão de curso, me apoiando e confiando no meu trabalho. Uma verdadeira mestre, sempre disposta a esclarecer minhas dúvidas (de forma muito rápida inclusive) e indicar os melhores caminhos. Obrigada pelo carinho, pela paciência pois sem você nada do que realizados seria possível. Agradeço a dedicação e expresso, nesse momento, minha profunda admiração e respeito.

A Professora Claudia Zini por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Química Analítica do IQ/UFRGS. A Karolina Hernandez que esteve comigo durante o período das análises no cromatógrafo, me explicou todo mecanismo e detalhes do método de análise, bem como na interpretação dos resultados, que até então era tudo desconhecido; obrigada pelos ensinamentos, pela calma, paciência e tempo dispensado comigo. Ao estagiário Julio Terra, pela dedicação, explicações e auxílio nas análises, tanto no IQ como no ICTA/UFRGS. A todos os colaboradores do Laboratório de Toxicologia de Alimentos (118) do ICTA, em especial a Luana Schmidt que me auxiliou nas análises físico-químicas, sem medir esforços e de uma forma muito carinhosa, juntamente com os bolsistas de iniciação científica Tiago e Natália.

Agradeço também aos meus amigos e colegas do curso, que sempre estiveram ao meu lado me dando força para encarar os desafios; por cada momento dividido, sendo eles bons ou ruim e pelos conhecimentos compartilhados.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar a oportunidade do conhecimento. Aos funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por toda atenção e cordialidade.

Ao CPNQ e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A produção de espumantes ocorre através de duas fermentações. Após a elaboração do vinho base, ocorre a segunda fermentação que pode ser realizada na garrafa em que o espumante será comercializado (método *Champenoise* ou tradicional) ou em tanques, seguido de posterior engarrafamento em condições isobáricas (método Charmat). A ocorrência de dois processos fermentativos leva a alterações na composição química dessa bebida, e consequentemente podem resultar na formação de compostos carbonílicos e furfúril álcool. Estes compostos podem formar adutos com o DNA, RNA e proteínas devido ao seu perfil eletrofílico, sendo que a toxicidade, manifesta-se principalmente no fígado e trato aerodigestivo superior composto pela cavidade oral, faringe, laringe e esôfago. A ocorrência desses compostos em espumante foi pela primeira vez estudada nesse trabalho, cujo objetivo foi verificar a presença de acetaldeído, acroleína, carbamato de etila (CE), formaldeído, furfural e furfúril álcool em espumantes através da microextração em fase sólida no modo *headspace* combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar no modo de monitoramento seletivo de íons (HS-SPME-GC/qMS-SIM). Além disso, o risco da exposição a esses compostos através do consumo de espumantes foi avaliado. Os compostos tóxicos foram detectados em todas as amostras avaliadas, sendo que os níveis de acetaldeído foram os mais elevados (5.2 a 50.5 µg/L). A exposição a acroleína pode representar risco para o consumidor e por isso, estratégias focadas na diminuição da ocorrência desse composto devem ser estudadas. Além disso, este trabalho gerou dados sobre os níveis destes compostos em espumantes comercialmente disponíveis, que poderão servir de subsídio para a regulamentação da ocorrência desses compostos em bebidas.

Palavras-chave: acetaldeído, acroleína, carbamato de etila, formaldeído, furfural, furfúril álcool, compostos tóxicos, espumante.

ABSTRACT

Sparkling wine production occurs through two fermentative processes. After the base wine elaboration, the second fermentation takes place, which may be performed in the bottle used to commercialization of this beverage (Champenoise or traditional method) or in tanks, followed by bottling in isobaric conditions (Charmat method). The occurrence of two fermentative processes results in changes in the chemical composition of the sparkling wines and consequently may result in the formation of carbonyl compounds and furfuryl alcohol. Such compounds may form adducts with the DNA, RNA and proteins due to their electrophilic nature and their toxicity manifests mainly in liver and superior aero digestive tract, composed by oral cavity, pharynx, larynx and esophagus. The occurrence of such compounds was first studied in this work, which goal was to quantify acetaldehyde, acrolein, ethyl carbamate (EC), formaldehyde, furfural and furfuryl alcohol in sparkling wines through headspace solid phase microextraction associated with gas chromatography with quadrupole mass spectrometric detection in selected-ion monitoring mode (HS-SPME-GC/qMS-SIM). Furthermore, the risk of exposure to these compounds through consume of sparkling wine was evaluated. The toxic compounds were detected in all evaluated samples, and the acetaldehyde was found in the highest levels (5.2 a 50.5 $\mu\text{g/L}$). The exposition to acrolein represents a risk to consumer's health and strategies focused on reducing the occurrence of this compound should be studied. In addition, this work generated data on the levels of these compounds in commercially available sparkling wines, which may serve as a subsidy for the regulation of these compounds in sparkling wines.

Key words: acetaldehyde, acrolein, ethyl carbamate, formaldehyde, furfural, furfuryl alcohol, toxic compounds, sparkling wine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparativo da comercialização de vinhos espumantes entre 2006-2016.....	18
Figura 2 - Fluxograma da elaboração de espumantes através do método tradicional.	21
Figura 3 - Fluxograma da elaboração de espumantes utilizando o método Charmat.....	24
Figura 4 - Mecanismo de formação do acetaldeído a partir do ácido pirúvico durante a fermentação alcohólica.	31
Figura 5 - Via metabólica de formação da acroleína, com o glicerol como precursor.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variedades de uva comumente usadas para a produção de espumante.....	19
Tabela 2 - Padrões de identidade e qualidade dos espumantes segundo a Portaria Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1988).....	25
Tabela 3 - Classificação dos espumantes produzidos no Brasil de acordo com o teor de açúcares definido pelo Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014 (Brasil, 2014).....	26
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos compostos tóxicos que podem ser encontrados nos espumantes.	30
Tabela 5 - Informações sobre as amostras de espumante avaliadas neste estudo.....	40
Tabela 6 - Compostos tóxicos e seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons monitorados e o padrão interno utilizados na quantificação por HS-SPME-GC/qMS-SIM.	44
Tabela 7 - Valores de BMDL10 e efeitos tóxicos observados após exposição oral de animais ao acetaldeído, acroleína, carbamato de etila, formaldeído, furfural e furfural álcool.....	46
Tabela 8 - Acidez total e pH das amostras de espumantes produzidas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2011 a 2014.....	47
Tabela 8 - Acidez total e pH das amostras de espumantes produzidas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2011 a 2014.....	48
Tabela 9 - Parâmetros de validação do método de HS-SPME-GC/qMS-SIM para quantificação de compostos carbonílicos e furfural álcool em espumantes.	50
Tabela 10 - Níveis ($\mu\text{g/L}$) dos compostos tóxicos detectados em espumantes avaliados através da HS-SPME-GC/qMS-SIM.	51
Tabela 11 - Ingestão diária estimada (IDE) em $\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo por dia calculada para as amostras em que o acetaldeído, acroleína, furfural e furfural álcool foram detectados em níveis acima do LOQ do método.....	54
Tabela 12 - Margem de exposição (MOE) do acetaldeído e acroleína considerando os dados de ocorrência desses compostos (Tabela 10) e de IDE (Tabela 11). As amostras que representam risco à saúde ($\text{MOE} < 10.000$) estão destacadas em vermelho.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-HPA	3-hidroxipropionaldeído
ADH	álcool desidrogenase (do inglês: <i>alcohol dehydrogenase</i>)
ADI	Ingestão Diária Aceitável (do inglês: <i>Acceptable daily intake</i>)
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
BMDL10	Limite inferior do intervalo de confiança da dose que causou o aumento de 10% na incidência de um determinado efeito tóxico (do inglês: <i>benchmark dose lower confidence limit</i>)
CAS	Registro CAS (do inglês: <i>Chemical Abstracts Service</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CE	Carbamato de etila
CHO	Ovário de hamster chinês (do inglês: <i>Chinese hamster ovary</i>)
DVB/CAR/PDMS	Divinil benzeno-carboxen-polimetilsiloxano
EDI	Ingestão diária estimada (do inglês: <i>estimated daily intake</i>)
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês: <i>European Food Safety Authority</i>)
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura (do inglês: <i>Food and Agriculture Organization</i>)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês: <i>gas chromatography</i>)
GC/qMS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês: <i>gas chromatography with mass spectrometry</i>)
GC/qMS-SIM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar no modo de monitoramento seletivo de íons (do inglês: <i>gas chromatography with mass spectrometry detection in selected-ion monitoring mode</i>)

HS-SPME	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> (do inglês: <i>headspace solid phase microextraction</i>)
HS-SPME-GC/qMS-SIM	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar no modo de monitoramento seletivo de íons (do inglês: <i>headspace solid microextraction combined with gas chromatography and mass spectrometry detection in selected-ion monitoring mode</i>)
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês: <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAVIN	Instituto Brasileiro do Vinho
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização (do inglês: <i>International Conference on Harmonisation</i>)
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química (do inglês: <i>International Programme on Chemical Safety</i>)
JECFA	Cômite de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e da Organização Mundial da Saúde (do inglês: <i>Joint FAO/WHO Experts Committee on Food</i>)
LOAEL	Menor dose na qual o efeito adverso foi observado (do inglês: <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês: <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês: <i>limit of quantification</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MOE	Margem de exposição (do inglês: <i>margin of exposure</i>)
MS	Espectrometria de massas (do inglês: <i>mass spectrometer</i>)
NAS	Academia Nacional de Ciências (do inglês: <i>National Academy of Sciences</i>)
NOAEL	Maior dose na qual não se observou efeito adverso (do inglês: <i>No Observable Adverse Effect Level</i>)

NTP	Programa Nacional de Toxicologia (do inglês: <i>National Toxicology Program</i>)
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho (do francês: <i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Padrão interno
PM	Peso molecular
PMTDI	Ingestão diária tolerável máxima provisória (do inglês: <i>Provisional Maximun Tolerable Daily Intake</i>)
PTMI	Ingestão tolerável mensal provisória (do inglês: <i>Provisional Tolerable Monthly Intake</i>)
PTWI	Ingestão tolerável semanal provisória (do inglês: <i>Provisional Tolerable Weekly Intake</i>)
SIM	Monitoramento de íons selecionados (do inglês: <i>selected ion monitoring</i>)
TFEH	2,2,2-trifluoroetilhidrazina
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês: <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Definição e dados da produção de espumante	17
3.2 Cultivares de uva utilizadas na produção de espumantes	19
3.3 Métodos de elaboração de espumantes	20
3.3.1 <i>Método Champenoise ou tradicional</i>	20
3.3.2 <i>Método Charmat</i>	23
3.4 Legislação brasileira – Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho	25
3.5 Composição e efeitos à saúde relacionados ao consumo do espumante	26
3.6 Compostos carbonílicos e furfuril álcool	29
3.6.1 <i>Acetaldeído</i>	31
3.6.2 <i>Acroleína</i>	32
3.6.3 <i>Carbamato de etila (CE)</i>	33
3.6.4 <i>Formaldeído</i>	34
3.6.5 <i>Furfural</i>	35
3.6.6 <i>Furfuril álcool</i>	35
3.7 Avaliação do risco relacionado à exposição aos compostos tóxicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Amostras	39
4.2 Determinação da acidez total e pH	40
4.2.1 <i>Determinação da acidez total</i>	41
4.2.2 <i>Determinação do pH</i>	41

4.3 Reagentes e padrões químicos.....	42
4.4 Determinação dos compostos tóxicos através da HS-SPME-GC/MS-SIM	43
4.5 Avaliação do risco da exposição aos compostos carbonílicos tóxicos através do consumo de espumante	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Acidez total e pH	47
5.2 Validação do método HS-SPME-GC/qMS-SIM	48
5.3 Determinação da concentração dos compostos tóxicos presentes em espumantes	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os compostos carbonílicos ocorrem em alimentos devido à contaminação ambiental e/ou podem ser formados durante a fermentação (JACKSON, 2008). A quantificação destes compostos ainda é considerada limitada na literatura científica, assim como não existe, na legislação brasileira vigente, limites para a presença desses compostos tóxicos em vinhos, incluindo espumantes.

Compostos carbonílicos e o furfuril álcool podem formar adutos com o DNA, RNA e proteínas devido ao seu perfil eletrofílico. A genotoxicidade desses compostos, incluindo acetaldeído, acroleína, carbamato de etila (CE), formaldeído, furfural e furfuril álcool, manifesta-se principalmente no fígado e trato aerodigestivo superior, composto pela cavidade oral, faringe, laringe e esôfago (SZENDE; TYIHÁK, 2010; ZERIN *et al.*, 2015). Além disso, esses compostos podem contribuir para o desencadeamento da diabetes (FEROE; ATTANASIO; SCINICARIELLO, 2016), danos na mucosa gástrica (ARKEMAN, 2008), aterosclerose (ROM *et al.*, 2016), entre outras complicações (ARTS *et al.*, 2004).

A fim de relacionar a exposição a estes compostos com os efeitos adversos que podem causar à saúde, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês: *International Agency of Research on Cancer*) classifica o acetaldeído e o formaldeído, a partir da ingestão de bebidas alcólicas, como carcinogênicos para humanos, o CE como provável carcinogênico e o furfuril álcool como possível carcinogênico, enquanto que o furfural e a acroleína pertencem ao Grupo 3, do qual a IARC ainda não possui evidências suficientes que comprovem os efeitos carcinogênicos destes compostos (IARC, 2017).

A produção de espumantes ocorre através de duas fermentações. A primeira fermentação do mosto ocorre em tanques abertos, normalmente de aço inoxidável, o que origina o vinho base. A segunda fermentação pode ser realizada na garrafa em que o espumante será comercializado (método *Champenoise* ou tradicional) ou em grandes tanques seguido de posterior engarrafamento em condições isobáricas (método Charmat) (RIBÉREAU-GAYON, *et al.* 2006). Os dois processos fermentativos levam a alterações expressivas na composição química dessa bebida, e conseqüentemente podem resultar na formação de compostos carbonílicos e furfuril álcool.

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de seis compostos tóxicos (acetaldeído, acroleína, CE, formaldeído, furfural e furfuril álcool) em espumantes e avaliar o risco da exposição a esses compostos através do consumo dessa bebida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência de compostos carbonílicos e furfural álcool em espumantes e avaliar o risco da exposição a esses compostos através do consumo de espumantes.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar simultaneamente seis compostos tóxicos (acetaldeído, acroleína, carbamato de etila, formaldeído, furfural e furfural álcool) em espumantes através do uso da microextração em fase sólida no modo *headspace* combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar no modo de monitoramento seletivo de íons (HS-SPME-GC/qMS-SIM);
- Estabelecer a estimativa de exposição a estes compostos tóxicos através do consumo de espumante;
- Caracterizar o risco relacionado à exposição aos compostos tóxicos detectados nos espumantes através da comparação com o parâmetro de ingestão segura ou cálculo da margem de exposição (MOE);

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Definição e dados da produção de espumante

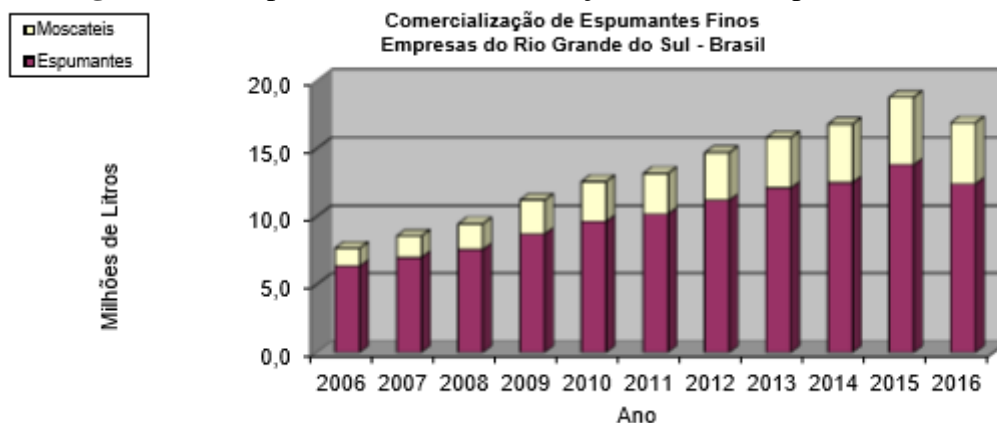
O espumante é definido pela legislação brasileira como o vinho cujo anidrido carbônico (CO₂) provém exclusivamente de uma segunda fermentação alcoólica do vinho em garrafas (método *Champenoise*/tradicional) ou em grandes recipientes (método Charmat), com uma pressão mínima de 4 atmosferas (atm) a 20 °C e com teor alcoólico de 10 a 13% em volume (BRASIL, 2004).

Atualmente, a produção de espumante apresenta um rápido crescimento no comércio mundial de vinhos (MARTÍNEZ-GARCÍA *et al.*, 2017). De acordo com o último relatório publicado pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2014), o mercado de espumantes tem se desenvolvido graças a expansão da demanda mundial e a produção aumentou 40% na última década, enquanto que a produção mundial de vinhos tranquilos cresceu somente 7%.

Os países da União Europeia continuam líderes deste segmento de mercado, contudo é evidente que a produção e consumo de espumantes no resto do mundo também esteja aumentando. De 2002 a 2013 a produção tem se diversificado: enquanto que em 2002, 74% dos espumantes eram fabricados por apenas quatro países europeus (França, Itália, Alemanha e Espanha), no ano de 2013 estes países contribuíram com cerca de 63% (OIV, 2014). O Brasil é o quinto maior produtor de vinhos do hemisfério Sul e vem se destacando gradativamente na produção de vinhos de alta qualidade (JEZIORNY & ORTEGA, 2012). Na última década, a produção no Brasil triplicou, resultando em um aumento de 248% (OIV, 2014).

Conforme comparativo disponibilizado pelo Instituto Brasileiro do Vinho (Ibravin) (Figura 1), que compreende os anos de 2006 a 2016, a comercialização no mercado interno brasileiro de espumantes produzidos por empresas gaúchas, aumentou de 6,3 para 12,4 milhões de litros, o que significa um crescimento de 97% e mostra que o produto possui grande potencial de vendas (IBRAVIN, 2017). Uma redução da quantidade comercializada no ano de 2016 foi observada em relação ao ano anterior (de 17 para 12,4 milhões de litros) como reflexo da crise econômica brasileira.

Figura 1 - Comparativo da comercialização de vinhos espumantes entre 2006-2016.



Fonte: Ibravin, 2017

Segundo De Mello (2017), no ano de 2016 o Brasil apresentava 77.786 hectares de videiras, distribuídos em regiões incluindo a Serra Gaúcha, Campanha Gaúcha e Planalto Catarinense.

O Rio Grande do Sul liderou a cadeia produtiva de vinhos e seus derivados, ao deter 64,3% da produção, além de compreender cerca de 700 vinícolas, gerando grande quantidade de empregos, sejam eles diretos ou indiretos. A Serra Gaúcha é a maior produtora de espumantes do Brasil (IBRAVIN, 2017) com exportação para mais de vinte países, como Estados Unidos, Alemanha e Inglaterra, entre outros. Esta abrangência deve-se principalmente ao reconhecimento mundial de que a região é um *terroir* promissor para cultivo de uva para produção de espumantes (DE MELLO, 2011). A Campanha Gaúcha, localizada próxima ao Uruguai, vem ganhando destaque na produção de vinhos. Esta região quando comparada a Serra Gaúcha, apresenta temperaturas médias mais elevadas, reduzido índice pluviométrico e maior incidência solar (GIOVANNINI e MANFROI, 2009).

O Planalto Catarinense destaca-se pela altitude e o solo basáltico que podem conferir complexidade aos vinhos, além das temperaturas baixas (principalmente à noite) que tornam a maturação das uvas mais lenta. A atividade vitivinícola no Vale do São Francisco distingue-se das demais regiões em função do manejo das videiras e clima seco e quente durante o ano todo, produzindo uvas com alto teor de açúcar que resultam em vinhos bastante frutados. No estado do Paraná, a cidade de Toledo detém a produção de cultivares tintas pouco exploradas nas demais regiões do país (como ‘Tempranillo’, ‘Sangiovese’ e ‘Negro Amaro’), as quais vem mostrando ótima adaptação às condições deste *terroir*. Em relação ao Leste de São Paulo, o sistema de produção ainda é bastante tradicional e familiar, e produz tanto uvas de mesa como para produção de vinhos. A viticultura no Sul de Minas Gerais distingue-se na produção

de vinhos de mesa (cultivares ‘Bordô’ e Niágara’), contudo apesar da falta de incentivos locais para o cultivo da uva, o enoturismo vem ganhando destaque (WINES OF BRASIL; IBRAVIN, 2017).

3.2 Cultivares de uva utilizadas na produção de espumantes

Os espumantes podem ser varietais, obtidos de uma única cultivar de uva ou *assemblage*, no qual se faz um corte com duas ou mais variedades de uva (RIBÉREAU-GAYÓN *et al.*, 2003). As cultivares utilizadas na produção de espumantes brancos podem ser brancas ou tintas. Quando se utilizam uvas tintas, as mesmas devem ser vinificadas como vinho branco, conhecido como *blanc de noir*. Em geral, as cultivares são adaptadas em determinadas regiões, de acordo com o tipo de solo e as condições climáticas, conforme mostrado na Tabela 1 (BUXADERAS; LÓPEZ-TAMAMES, 2012).

Tabela 1 - Variedades de uva comumente usadas para a produção de espumante.

Regiões frias	Regiões temperadas	Regiões quentes
Pinot noir (tinta)	Chenin blanc (branca)	Parellada (branca)
Chardonnay (branca)	Chardonnay (branca)	Chardonnay (branca)
Pinot meunier (tinta)	Gamay (tinta)	Xarel ° lo (branca)
Gamay (tinta)	Pinot noir (tinta)	Macabeo (branca)
Pinot blanc (branca)	Pinot meunier (tinta)	Pinot noir (tinta)
Riesling (branca)		Chenin blanc (branca)
		Pinot meunier (tinta)
		Semillón (branca)

Fonte: Buxaderas; López-Tamames, 2012

O Brasil produz espumantes principalmente a partir de duas cultivares de uvas: Chardonnay que confere fineza e suavidade e Pinot Noir que é uma cultivar de uva tinta e é utilizada quando vinificada em branco para conferir maior estrutura e tipicidade à bebida. Além disso, podem ser utilizadas outras cultivares como Riesling, Sauvignon Blanc, Gewürztraminer, Merlot, Cabernet Sauvignon e Prosecco (RIZZON *et al.*, 2000).

3.3 Métodos de elaboração de espumantes

A produção de espumante compreende dois estágios, o primeiro é a elaboração do vinho base e o segundo caracteriza-se pela tomada de espuma (RIBÉREAU-GAYON, *et al.* 2006). A primeira fermentação do mosto ocorre em tanques abertos, normalmente de aço inoxidável, o que origina o vinho base. A segunda fermentação pode ser realizada na garrafa em que o espumante será comercializado (método *Champenoise* ou tradicional) ou em grandes tanques seguido de posterior engarrafamento em condições isobáricas (método Charmat).

3.3.1 Método *Champenoise* ou tradicional

As etapas envolvidas na elaboração de espumante pelo método tradicional são apresentadas no fluxograma da Figura 2. Esse método caracteriza-se pela realização da segunda fermentação em garrafas, após adição do *liqueur de tirage*. De acordo com Buxaderas & López-Tamames (2012), o licor é composto por cerca de 1-2 milhões de células de leveduras, 30 g de sacarose e 0,1-0,2 g de bentonite ou fosfato de amônio por litro. É de suma importância corrigir o conteúdo de açúcar para obter o teor alcóolico adequado, assim como o ajuste da pressão de dióxido de carbono, em torno de 5-6 atm, a 20°C. A quantidade de açúcar deve ser corretamente calculada para evitar que as garrafas quebrem ou perca-se muita espuma no momento de abertura, devido ao excesso de pressão formada. Para o cálculo da quantidade de açúcar necessário, considera-se que 1 atm de pressão forma-se devido a fermentação de 4 g de sacarose. Portanto, para seis atmosferas (visto que ocorrem perdas ao longo do processo), são necessários 24 g/L de sacarose, o que produz um aumento de 1,4% (v/v) do teor alcóolico do vinho (RIZZON *et al.*, 2000). A bentonite e o fosfato de amônio são utilizados para auxiliar a precipitação das células de leveduras ao final do processo fermentativo (Flanzy *et al.*, 1999).

Figura 2 - Fluxograma da elaboração de espumantes através do método tradicional.

Fonte: Adaptado de Buxaderas; López-Tamames, 2012

Após a adição do *liqueur de tirage*, as garrafas são hermeticamente fechadas com uma tampa de metal, e, então dispostas horizontalmente em fileiras alternadas em relação ao bico e o fundo. O ambiente deve possuir condições naturais de temperatura que variam de 10-12°C. A garrafa deve ser de vidro devido a sua resistência a pressão do CO₂ que será produzido durante a segunda fermentação (BUXADERAS; LÓPEZ-TAMAMES, 2012).

A maturação do espumante (*sur lies*) ocorre após o término da segunda fermentação. Neste período o produto se mantém em contato com os sedimentos de leveduras, também conhecidas como borras, os quais foram produzidos durante a segunda fermentação alcoólica. As células das leveduras, após sofrerem autólise, liberam gradativamente ao espumante compostos formadores de aromas e sabores característicos, dependendo do tempo de contato entre o vinho e as borras. O tempo de amadurecimento é de 9 meses, podendo chegar a até dois ou três anos, dependendo das características que se quer adquirir no produto final (RIZZON *et al.*, 2000).

A eliminação das borras é a etapa seguinte à maturação. Um depósito produzido por células de leveduras e outros compostos forma-se no interior das garrafas. Tal precipitado deve ser, aos poucos, direcionado ao bocal da garrafa para ser retirado posteriormente. Este processo é realizado em suportes de madeira, chamados pupitres, nos quais as garrafas são colocadas em um ângulo de 45°, com o gargalo para baixo para facilitar a descida do depósito até o bico. A *remuage* é a etapa seguinte, que consiste em girar as garrafas um quarto de volta em intervalos de tempo regulares por cerca de 30 dias, com o intuito de depositar junto ao gargalo da garrafa as borras que o processo gerou (RIZZON *et al.*, 2000; WINEPROS, 2017).

Quando a *remuage* cessa, ocorre a etapa chama *dégorgement* que consiste na liberação das borras do interior da garrafa. O bico da garrafa é colocado em contato com uma solução de salmoura ou hidroalcoólica a -20°C por alguns minutos a fim de formar um aglomerado de gelo com leveduras e sedimentos. As tampas são removidas e devido a pressão formada dentro da garrafa, o depósito de sedimentos é expulso (WINEPROS, 2017).

Adiciona-se o licor de expedição ao vinho, em uma etapa chamada dosagem. Este licor é produzido com vinho e açúcar. A quantidade de açúcar vai determinar se o espumante será brut nature (sem adição do licor), extra brut, brut, extra-seco, seco, semi-seco ou doce de acordo com a legislação brasileira que será abordada no item 3.4. Esta operação favorece o desenvolvimento dos aromas e características sensoriais do espumante, além de proporcionar harmonia e suavidade (RIZZON *et al.*, 2000; WINEPROS, 2017).

Ao final, as garrafas são tampadas com a rolha tradicional de espumantes, e presas por uma gaiola metálica. Após arrolhamento, as garrafas permanecem na posição vertical por um dia para que a rolha se ajuste ao bico da garrafa. Posteriormente, a garrafa é colocada na posição horizontal a fim de promover contato do líquido com a rolha e evitar contaminação fúngica. Depois do envase o produto é rotulado conforme o tipo de espumante e enviado ao mercado (RIZZON *et al.*, 2000).

3.3.2 Método Charmat

Esse tipo de espumante é produzido seguindo as etapas mostradas no fluxograma da Figura 3, sendo que a segunda fermentação ocorre em tanques de aço inoxidável, também denominados autoclaves ou tanques de pressão. Estes tanques podem suportar até 13 atm a 20°C. O método Charmat foi desenvolvido com objetivo de simplificar e agilizar o processo de separação das borras, quando comparado com o método tradicional. Em geral, é utilizado para variedades de uvas mais aromáticas. O *liqueur de tirage*, que é semelhante ao utilizado no método tradicional, é adicionado ao vinho base contido nos tanques que possuem agitadores e sistemas de controle de temperatura, os quais aceleram o processo de suspensão e autólise das leveduras além de agilizar a etapa da fermentação alcohólica (BUXADERAS; LÓPEZ-TAMAMES, 2012).

Quando a pressão do tanque atingir 4 atm, devido a produção do dióxido de carbono em função da ação das leveduras, a temperatura do tanque é reduzida para 8°C com intuito de cessar o processo fermentativo, quando restam em torno de 10% de açúcares residuais. Esta redução na temperatura promove a decantação das leveduras que ficam depositadas no fundo do tanque. Na etapa seguinte, o espumante é transferido sob pressão para outro tanque para ser estabilizado a frio. Durante o processo de transferência, ocorre uma filtração em condições isobáricas (para não haver perda de pressão) para retirar quaisquer resíduos de borras, reduzindo a turbidez do produto (FLANZY, 2002). Cabe salientar que no método Charmat, assim como no método tradicional, o licor de expedição também é utilizado com a finalidade de obter espumantes com teores de açúcar distintos. Esta solução pode ser adicionada tanto no primeiro como segundo tanque. O engarrafamento deve ser realizado em envasadoras isobáricas apropriadas para que a pressão formada no interior dos tanques não seja perdida (CALIARI *et al.*, 2013).

O método Charmat pode ser curto ou longo. O curto dura em torno de 1-3 meses e o espumante resultante possui aroma frutado, fresco e jovem. No longo, o contato do vinho com

leveduras é aumentado por até 6 meses, resultando em um espumante com características de aroma mais similares dos obtidos pelo método tradicional. (BUXADERAS; LÓPEZ-TAMAMES, 2012).

Figura 3 - Fluxograma da elaboração de espumantes utilizando o método Charmat.



3.4 Legislação brasileira – Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho

A Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprovou as Normas referentes a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Padrões de identidade e qualidade dos espumantes segundo a Portaria Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1988).

Padrões	Mínimo	Máximo
Acidez total (meq/L)	55,0	130,0
Acidez volátil (meq/L)	-	20,0
Extrato seco (g/L)	14,0	-
Relação álcool em peso/extrato seco reduzido	-	6,7
Cinzas (g/L)	1,0	-
Dióxido de carbono (atm a 20°C)	4,0	-
Dióxido de enxofre total (mg/L)	-	350,0
Sulfatos totais (g/L em sulfato de potássio)	-	1,0
Cloretos totais (g/L em cloreto de sódio)	-	0,2
Álcool metílico (mg/L)	-	350,0
Ácido sórbico (mg/L)	-	200,0

Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 1988

O teor alcoólico dos espumantes deve ser de 10 a 13% segundo definido pela Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004 e a classificação dos espumantes quanto ao teor de açúcares totais é dada pelo Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014 conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação dos espumantes produzidos no Brasil de acordo com o teor de açúcares definido pelo Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014 (Brasil, 2014).

Classificação	Teor de açúcares (gramas de glicose por litro)
Nature	Até 3
Extra-brut	3,1 – 8
Brut	8,1 – 15
Sec ou seco	15,1 – 20
Demi-sec	20,1 – 60
Doce	Acima de 60,1

Fonte: Brasil, 2014

3.5 Composição e efeitos à saúde relacionados ao consumo do espumante

O espumante é composto por: etanol, gás carbônico, açúcares, glicerol, ácido tartárico, ácido láctico, proteínas, polissacarídeos, polifenóis, aminoácidos, compostos voláteis, lipídeos, minerais, entre outros. As quantidades destes componentes podem variar de acordo com o método de fabricação e/ou condições de processamento/armazenamento (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

As segunda fermentação e o período de maturação, em que o espumante permanece em contato com as borras por meses (ou até anos, no caso do método tradicional) sob condições anaeróbicas, são decisivas para a qualidade da bebida produzida. Na etapa de maturação, por exemplo, ocorre a autólise das leveduras, na qual enzimas hidrolíticas atuam na membrana citoplásmica destes microrganismos liberando compostos como peptídeos, ácidos graxos, nucleotídeos, aminoácidos, glucanos e manoproteínas (ALEXANDRE & GUILLOUX-BENATIER, 2006).

O efeito da segunda fermentação e maturação nos compostos relacionados ao aroma dos espumantes foi estudado por Pozo-Bayon *et al.* (2003). Os autores mostraram que a segunda fermentação e a maturação afetam a concentração dos compostos voláteis relacionados ao aroma de espumantes brancos e rosés, com destaque para o aumento dos níveis de C13-norisoprenoides devido a ação das enzimas liberadas durante autólise das leveduras. Estas enzimas atuam sobre os carotenoides hidrolisando esses compostos com

formação de β -damascenona, β -ionona, vitispirano e TDN, sendo que a formação deste último aumenta durante o envelhecimento de *Cavas* (RIU-AUMATELL *et al.*, 2006). O aumento da concentração dessa classe de compostos está relacionado à percepção sensorial de notas descritas como doce, frutada e/ou floral (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Além da autólise das leveduras, outros aspectos relacionados à produção do espumante também podem ter um grande efeito no perfil volátil. De fato, a capacidade da levedura em adsorver compostos voláteis pode diminuir a intensidade do aroma de espumantes (CARIDI, 2006). A utilização de agentes clarificantes para auxiliar a floculação e eliminação das borras, ao final da etapa de envelhecimento, também pode resultar na redução da percepção do aroma dos espumantes (POZO-BAYÓN *et al.*, 2003).

Várias pesquisas têm sido focadas nos benefícios relacionados ao consumo moderado de vinhos (ARTERO *et al.*, 2015; ABU-AMERO; KONDKAR; CHALAM, 2016; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2016). Este interesse surgiu na década de 1990, quando o consumo de vinho foi associado a baixa taxa de mortalidade cardiovascular na França em comparação às pessoas que viviam em outros países que apresentavam consumo semelhante de gorduras saturadas, o que foi chamado de "paradoxo francês" (ARTERO *et al.*, 2015). O efeito benéfico relacionado ao consumo do vinho tem sido relacionado principalmente ao resveratrol, que é um composto fenólico com atividade biológica associada a uma diminuição na incidência de doenças cardiovasculares (SAIKO *et al.*, 2008; JAMROZ *et al.*, 2001).

A expressão “vinho e saúde”, comumente utilizada por pesquisadores tem ganhado destaque devido aos resultados positivos e promissores obtidos nos estudos, principalmente os relacionados ao combate do estresse oxidativo das células, a partir do consumo moderado de vinho. Dentre os benefícios é possível citar: (i) estimulação da angiogênese (processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos em um novo tecido vivo, a partir dos já existentes, para garantir que haja fluxo sanguíneo, vital para o crescimento e manutenção de um tecido recém formado, além disso, a angiogênese é necessária para reparar feridas), (ii) efeito vasodilatador, (iii) auxílio na redução da hipertensão arterial, (iv) redução na incidência de arritmias, (v) estímulo na produção de lipoproteína de alta densidade (HDL do inglês: *high density lipoprotein*) popularmente conhecida como “colesterol bom” e (vi) redução dos efeitos da lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês: *low density lipoprotein*), popularmente chamada de “colesterol ruim” e redução da peroxidação lipídica (ARTERO *et al.*, 2015; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2016). Além disso, compostos fenólicos presentes nos vinhos tem mostrado ação anticoagulante, antienvelhecimento e

neuroprotetor, além de auxiliar na ativação metabólica, diminuindo os riscos de diabetes e obesidade (DAS *et al.*, 2010; LIBERALE *et al.*, 2017).

Em relação ao espumante, poucos estudos têm relacionado seu consumo a benefícios à saúde (AUGER *et al.*, 2005; SATUÉ-GRACIA *et al.*, 1999; VAUZOUR *et al.*, 2007; VÁZQUEZ-AGELL *et al.*, 2007). Satué-Gracia *et al.* (1999) analisaram *Cavas* (espumante com Denominação de Origem produzido na região da Catalunha, Espanha) e espumantes produzidos Brasil e concluíram que os mesmos foram eficientes na inibição da peroxidação lipídica *in vitro*.

Auger *et al.* (2005) avaliaram o efeito do consumo de espumante por hamsters machos da raça Syrian Golden submetidos a uma dieta aterogênica por 12 semanas. Essa dieta contribuiu para o desenvolvimento e aceleração da aterosclerose, processo caracterizado pela formação de placas de ateromas (gordura) sobre a parede das artérias. Os autores verificaram que o consumo de 7,14 mL por kg de peso corpóreo por dia resultou em um efeito protetor contra a aterosclerose, pois o consumo de espumantes aumentou a capacidade antioxidante plasmática, além do aumento da concentração de vitamina A e vitamina E no plasma sanguíneo, o que pode ser positivo para a saúde.

A atividade ateroprotetora de espumantes também foi verificada por Vázquez-Agell *et al.* (2007). A concentração sérica dos biomarcadores inflamatórios circulantes da aterosclerose (E-selectina, P-selectina) diminuiu após o consumo de espumantes provavelmente devido ao seu teor de polifenóis. Vauzour *et al.* (2007) verificaram a atividade neuroprotetiva *in vitro* do extrato acetílico de espumante. A proteção contra lesões oxidativas induzidas por peroxinitrito (espécie reativa de oxigênio) em células neurais podem ter ocorrido devido ao tirosol, ácido cafeico e ácido gálico, que foram os fenólicos majoritários dos espumantes avaliados.

Estes efeitos benéficos podem ocorrer quando o consumo dos vinhos/espumantes ocorre moderadamente, não ultrapassando a exposição diária a 30 g de etanol, o que, no caso do espumante equivale a cerca de 300 mL (IARD, 2017; VÁZQUEZ-AGELL *et al.* 2007; WIM, 2017). O etanol, quando consumido em excesso pode ocasionar irritabilidade, sonolência, tontura, náuseas, vômitos, perda de consciência e, em casos extremos coma e até morte (GIGLIOTTI & BESSA, 2004). O consumo de doses elevadas pode causar disfunções no sistema cognitivo, reduzindo o desempenho do usuário na realização de atividades que envolvam memória de trabalho e/ou de longa duração, além de potencializar a incidência de úlcera péptica, cirrose, câncer, dentre outras doenças (CAHILL & REDMOND, 2012; KOELEGA, 1995; SETH *et al.*, 2011; SINFORIANIET *et al.*, 2011).

Entretanto, o consumo de derivados de uvas, incluindo o espumante pode expor o consumidor à compostos tóxicos como micotoxinas, em especial a ocratoxina A, pesticidas e aminas biogênicas. Ocratoxina A é um metabólito secundário produzido por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* quando submetidos a condições de estresse. O efeito tóxico da ocratoxina A está relacionado especialmente à nefrotoxicidade (GENTILE *et al.*, 2016; RODRÍGUEZ-CABO *et al.*, 2016).

O uso de pesticidas contra a ação de insetos, fungos e outros agentes indesejáveis, a fim de manter o vigor e integridade das videiras, assim como incrementar a produtividade é feito pelos produtores adeptos ao cultivo convencional (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Contudo, o desrespeito ao período de carência e/ou aplicação exagerada desses compostos pode colocar em risco a saúde dos consumidores. A exposição a estes compostos pode causar danos ao sistema nervoso central, aumento da incidência de risco de câncer (mama, próstata, pâncreas, estômago, pulmão e pele) e mal de Parkinson (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; TAWATSIN; THAVARA; SIRIYASATIEN, 2015).

As aminas biogênicas fazem parte do grupo de compostos nitrogenados e resultam do processo de descarboxilação de aminoácidos ou transaminação de aldeídos causados pela ação das leveduras e bactérias lácticas ao longo da fermentação do mosto (MANETTA *et al.*, 2016). Quando a exposição a esses compostos ocorre em quantidade acima daquela que cada indivíduo consegue metabolizar, pode-se verificar enxaqueca, taquicardia, reações alérgicas, hipertensão, entre outros sintomas. Indivíduos que possuem atividade insuficiente das enzimas aminooxidases tendem a ser mais vulneráveis às implicações tóxicas provocadas pelas aminas biogênicas (LINARES *et al.*, 2016).

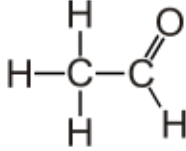
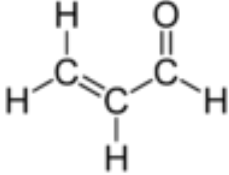
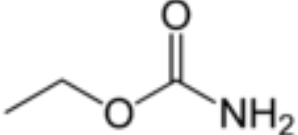
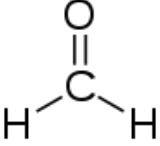
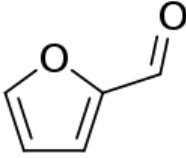
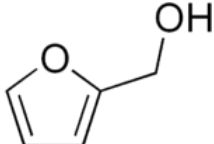
Juntamente às substâncias citadas acima, deve-se considerar a possível presença de compostos carbonílicos e furfuril álcool que podem ocorrer devido a (i) contaminação ambiental das uvas durante o cultivo e/ou (ii) produção durante a vinificação devido ao metabolismo natural das leveduras ou por meio de reações que utilizam como substrato alguns compostos resultantes da etapa de fermentação (CHUNG *et al.*, 2015; JEONG *et al.*, 2015; KÄCHELE *et al.*, 2014; NÓBREGA *et al.*, 2015; PERESTRELO *et al.*, 2015).

3.6 Compostos carbonílicos e furfuril álcool

No grupo dos compostos carbonílicos estão incluídos o acetaldeído, acroleína, CE, formaldeído e furfural, além do furfuril álcool. Os compostos carbonílicos apresentam o

grupamento carbonila (C=O), conforme mostrado na Tabela 4, juntamente com o peso molecular e o registro CAS (do inglês: *Chemical Abstracts Service*).

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos compostos tóxicos que podem ser encontrados nos espumantes.

Composto	CAS ^a	PM (g/mol) ^b	Fórmula estrutural
Acetaldeído	75-07-0	44,05	
Acroleína	107-02-8	56,06	
Carbamato de etila	51-79-6	89,08	
Formaldeído	50-00-0	30,03	
Furfural	98-01-1	96,07	
Furfuril álcool	98-00-0	98,10	

Fonte: Autoral

Notas:

^a CAS – Chemical Abstracts Service, ^b peso molecular, ^c ponto de ebulição

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês: *International Agency of Research on Cancer*) classifica o acetaldeído e o formaldeído, ingerido especificamente através de bebidas alcoólicas, como cancerígenos para os seres humanos (grupo 1), o CE é classificado como provável causador de efeitos cancerígenos (grupo 2A, limitadas evidências de carcinogenicidade em humanos, mas suficientes em animais), o furfuril álcool é considerado como possível carcinogênico (grupo 2B, limitadas evidências de carcinogenicidade em humanos e insuficientes em animais) para humanos, e a acroleína e o

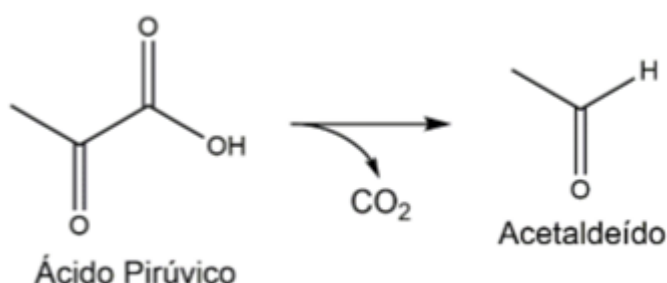
furfural estão no grupo 3, o que indica que a IARC necessita de estudos mais aprofundados para classificar estes compostos quanto aos efeitos cancerígenos (IARC, 2017).

Em relação a ingestão segura, o Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde (JECFA, do inglês: *Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives*) não estipula limites para estes compostos, com exceção quando houver exposição ao furfural simultânea a outros compostos que possuem furano em sua estrutura como furfural álcool, furfural acetato, furfural propionato, furfural pentanoato, furfural octanoato, furfural 3-metilbutanoato, metil 2-furoato, propil 2-furoato, amil 2-furoato, hexil 2-furoato e octil 2-furoato. Esse grupo de compostos, quando utilizados na forma de aditivos alimentares, possuem uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,5 mg/kg de peso corpóreo por dia (p.c/dia) (JECFA, 2017).

3.6.1 Acetaldeído

Em bebidas alcólicas, este aldeído pode ser produzido durante a fermentação a partir do ácido pirúvico, conforme mecanismo ilustrado na Figura 4. A oxidação do etanol e de compostos fenólicos por leveduras e acetobactérias também pode levar a formação do acetaldeído. As acetobactérias, são originárias das uvas e/ou equipamentos vinícolas, e podem oxidar o etanol a acetaldeído, em condições aeróbias, afetando negativamente as propriedades organolépticas do vinho (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015).

Figura 4 - Mecanismo de formação do acetaldeído a partir do ácido pirúvico durante a fermentação alcóolica.



Fonte: Adaptado de Azevedo *et al.*, 2007

O consumo de etanol resulta na produção imediata de pequenas quantidades de acetaldeído na cavidade oral devido aos microrganismos presentes na saliva (YOKOYAMA

et al., 2008; PAIANO *et al.*, 2014). Além disso, no fígado, o etanol pode ser oxidado em acetaldeído através da enzima álcool desidrogenase (ADH).

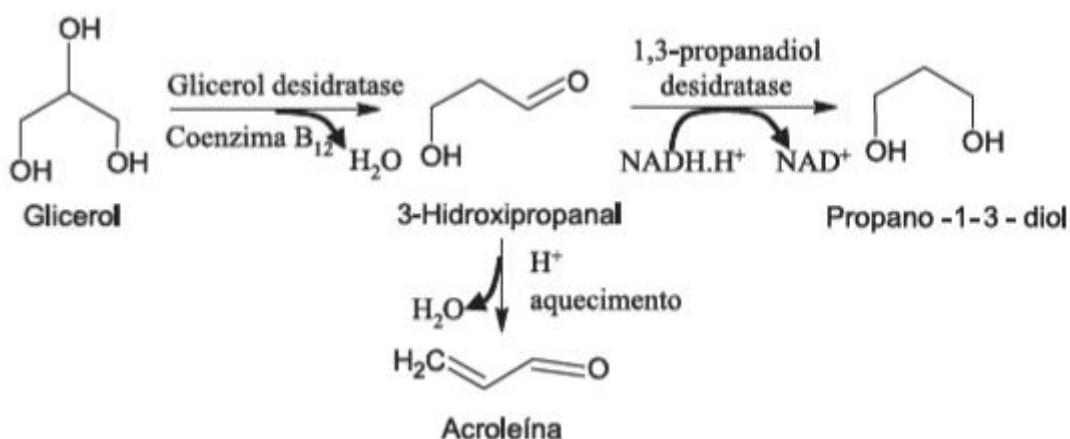
O acetaldeído presente nas bebidas alcoólicas pode ocasionar sintomas relacionados à dores de cabeça, queda da pressão sanguínea e náuseas (LACHENMEIER, KANTERES, REHM, 2009). Ainda em relação a toxicidade, Seitz & Stickel (2010) relataram que a exposição ao acetaldeído pode aumentar o risco de incidência de câncer no trato aerodigestivo superior (cavidade oral, faringe, laringe e esôfago), fígado, intestino grosso e mama.

A legislação brasileira estabelece o limite máximo para aldeídos totais em bebidas alcoólicas, expressos em acetaldeído por 100 mL de etanol anidro, que contempla as seguintes bebidas: aguardente de cana (30 mg), conhaque (40 mg), graspa (80 mg), destilado simples de uva (40 mg) e pisco (200 mg) (BRASIL, 2005, 2010). Contudo, não há legislação nacional e internacional que estabeleça limites máximos para o acetaldeído em espumantes.

3.6.2 Acroleína

A acroleína, também chamada de aldeído acrílico ou 2-propenal, é produzida a partir do glicerol, conforme ilustrado na Figura 5. O glicerol, que é um dos principais compostos resultantes da fermentação alcoólica pela ação das leveduras, é transformado a 3-hidroxiopropanal (3-HPA) pela enzima glicerol desidratase; em seguida ocorre a redução a 1-3-propanodiol ou conversão a acroleína devido ao pH baixo do vinho (em torno de 3,5) (DE AZEVÊDO *et al.*, 2007).

Figura 5 - Via metabólica de formação da acroleína com o glicerol como precursor.



A exposição à acroleína por via oral pode causar mal-estar abdominal, diarreia e vômito (DE AZEVÊDO *et al.*, 2007; FAROON *et al.*, 2008). Este aldeído, assim como os demais compostos carbonílicos, pode formar adutos com o DNA, RNA e proteínas devido ao seu perfil eletrofílico. Além disso, os efeitos tóxicos da acroleína podem ter relação com o mal de Alzheimer (DANG *et al.*, 2010), diabetes (FEROE; ATTANASIO; SCINICARIELLO, 2016) e potencializar o risco de incidência de doenças cardiovasculares (DEJARNETT *et al.*, 2014).

No Brasil, apenas a cachaça (bebida obtida a partir da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com graduação alcoólica de 38 a 48%) e a aguardente (denominação dada para o destilado da cana com teor alcoólico diferente daquele definido para cachaça), apresentam regulamentação para a presença de acroleína. Para estas bebidas, o MAPA definiu o limite de 5 mg de acroleína por 100 mL de álcool (BRASIL, 2005). No caso de espumantes, não existe legislação que contemple os limites máximos para esse composto, tanto no âmbito nacional como internacional.

3.6.3 Carbamato de etila (CE)

O CE, também chamado de uretana, é o éster etílico do ácido carbâmico. A formação deste éster ocorre através da reação entre o etanol e ureia ou outros compostos nitrogenados, tais como resíduos de aminoácidos. A via mais comum de formação do CE em bebidas fermentadas ocorre a partir da ureia. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz arginase, enzima capaz de catabolizar a arginina das uvas, resultando na formação da ureia (EFSA, 2007).

Cui *et al.* (2016) verificaram que o CE é genotóxico e carcinogênico. Os autores observaram que no fígado, o CE pode ser oxidado pelas enzimas do citocromo P450, transformando-se em epóxido de vinil carbamato. Esta forma biotransformada do CE é altamente reativa e eletrofílica, o que potencializa a possibilidade de formação de adutos com DNA e consequente carcinogênese (LAJOVIC *et al.*, 2015).

Segundo pesquisas do JECFA, a população mundial expõe-se diariamente ao CE através do consumo de produtos como pão, produtos lácteos fermentados e molho de soja em um nível de até 15 mg/kg, enquanto que, quando ocorre a ingestão de bebidas alcólicas somadas ao consumo desses outros alimentos, a exposição diária é de cerca de 80 mg/kg de peso corpóreo (p.c) (JECFA, 2016).

Assim como para a acroleína, a legislação brasileira estabelece limite máximo para CE apenas em aguardente e cachaça (210 µg/L) (BRASIL, 2014). Os Estados Unidos da América e a União Europeia permitem o valor máximo de 15 µg/L de CE em vinhos. O Canadá fixou limites máximos deste éster para vinhos (30 µg/L), vinhos fortificados (100 µg/L), destilados de frutas (400 µg/L) e outras bebidas destiladas (150 µg/L) (EFSA, 2007).

3.6.4 Formaldeído

O formaldeído, conhecido também por metanal, formol e aldeído fórmico, é considerado a forma mais simples de um aldeído. Esse composto forma-se a partir da fotoxidação do metano e está naturalmente presente no ambiente urbano, pois é liberado em processos de combustão, escapamentos automotivos e atividades industriais (principalmente as relacionadas com fabricação de resinas). Pode ser facilmente detectado no ar após ocorrência de incêndios florestais e emissão de gases vulcânicos. Além disso, a fumaça de cigarro, o consumo de bebidas alcólicas e o uso de fluidos de embalsamento em laboratórios de patologia são considerados fontes de exposição ao formaldeído (WHO, 2002).

O formaldeído presente nas bebidas alcólicas, pode ser formado durante a fermentação alcóolica através da oxidação do metanol, que é formado a partir da hidrólise da pectina. Os antissépticos que contêm aldeídos na formulação e são usados para sanitização dos equipamentos vitícolas ou como alternativa para inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis durante a fermentação, também podem ser via de exposição ao formaldeído (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Atribui-se à natureza eletrofílica do formaldeído a manifestação de sua toxicidade nos seres humanos. Este composto é considerado genotóxico devido a sua capacidade em formar adutos com o DNA, RNA e proteínas (SZENDE; TYIHÁK, 2010; ZERIN *et al.*, 2015). Ladeira *et al.* (2011) comprovaram o poder genotóxico do formaldeído ao utilizar linfócitos humanos para determinar ligações cruzadas com DNA-proteína, aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e micronúcleos. Estudos relacionaram a exposição ao formaldeído por via oral com a ocorrência de úlceras no trato gastrintestinal e a inalação que pode causar alterações respiratórias como irritação da mucosa bucal, olhos e nariz (NAYA e NAKANISHI, 2005; NORLIANA *et al.*, 2009).

Arkeman (2008) associou a ingestão do formaldeído à necrose das camadas superficiais da mucosa gástrica, alteração da espessura da camada da mucosa gástrica e

ocorrência de úlceras em fêmeas adultas de camundongos da espécie Sprague-Dawley, as quais foram expostas ao formaldeído através da água por um período de 12 semanas.

Em 2002, o Programa Nacional de Segurança Química (IPCS, do inglês: *International Programme on Chemical Safety*) da Organização Mundial da Saúde definiu um limite de concentração tolerável (CT) de 2600 µg/L para alimentos e bebidas alcoólicas. Este limite foi baseado no nível de efeito não observado (NOEL, do inglês: *no observed effect level*) de 260.000 µg/L, que foi estabelecido considerando a ocorrência de danos histopatológicos em ratos expostos por via oral ao formaldeído (IPCS, 2002). Entretanto, no Brasil e restante do mundo não há legislação que determine os níveis máximos para o formaldeído em bebidas.

3.6.5 Furfural

É um aldeído heterocíclico e aromático, também denominado por 2-furanocarboxialdeído, furaldeído, 2-furaldeído, fural e furfuraldeído. Este composto forma-se a partir da hidrólise de pentosanas (xilanas, arabinanas e poliuronídeos) no decorrer do tratamento térmico realizado nos barris de carvalho comumente utilizados para maturação dos vinhos, por exemplo. Fatores como a idade do barril e o grau de queima da madeira utilizada na fabricação do mesmo, contribuem para as variações de concentração do furfural (JACKSON, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2016).

Em relação à toxicidade, Arts *et al.* (2004) realizaram testes de toxicidade subaguda em ratos e concluíram que o furfural foi responsável pelo aumento do peso do fígado e rins dos animais. Lake *et al.* (2001) associaram a exposição ao furfural em ratos e camundongos à necrose e inflamação crônica do fígado, além da ocorrência de adenoma e carcinoma hepatocelulares.

3.6.6 Furfuril álcool

O furfuril álcool é também conhecido por álcool furfurílico, 2-furilmetanol e 2-furancarbinol. Este álcool ocorre em alimentos processados termicamente como resultado da redução enzimática ou química de furfural. Sua detecção já foi verificada em café, sucos de frutas, alimentos cozidos, bebidas alcoólicas armazenadas em barricas de madeira, como vinhos, aguardentes e whiskies. (PERÉZ-PRIETO, *et al.*, 2003; SPILLMAN *et al.*, 1998; MOCHIZUKI e KITABATAKE, 1997). O furfuril álcool também pode ser intencionalmente

adicionado na forma de aditivo em alimentos, incluindo a manteiga e o caramelo, nos quais é usado como agente aromatizante (NAS, 1965).

O principal mecanismo de formação do furfural é através da degradação térmica da frutose e glicose (SACHSE, *et al.*, 2017), que ocorre durante o aquecimento (cozimento, assamento, torrefação) (MONAKHOVA e LACHENMEIER, 2012; MARTINS *et al.*, 2001; VANDERHAEGEN *et al.*, 2007; WANG e KAYS, 2000; SWASTI e MURKOVIC, 2012). Em condições ácidas, o álcool furfurílico polimeriza-se resultando na coloração marrom dos alimentos (SWASTI & MURKOVIC, 2012).

A ingestão do furfural pode provocar dor de cabeça, náuseas e irritação da boca e do estômago (CDC, 2016). O efeito mutagênico desse álcool foi primeiramente relatado por Stich (1981), quando um aumento do número de aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs foi observado nas células dos ovários de hamster chinês (CHO, do inglês: *Chinese hamster ovary*).

O Programa Nacional de Toxicologia (NTP) (NTP, do inglês: *National Toxicology Program*), foi estabelecido nos Estados Unidos em 1978 para coordenar pesquisas e testes de toxicologia, além de fornecer informações sobre substâncias químicas potencialmente tóxicas para as agências de pesquisa e órgãos reguladores da saúde, comunidade científica, médicas e população (NTP, 2017). No ano de 1999, publicou um relatório afirmando que a exposição de camundongos machos a 60 mg/kg p.c/dia (SACHSE *et al.*, 2016) de furfural induziu a tumores no epitélio tubular renal. O mecanismo postulado de carcinogenicidade do composto se dá através da ativação por sulfotransferases resultando na formação de um aduto de 2-metilfuranil-DNA (SACHSE, *et al.*, 2014 e 2016).

A exposição ocupacional ao álcool furfurílico, pelo fato de ser utilizado para manufatura de adesivos, selantes químicos e resinas furânicas (Merck, 1976), pode ocorrer por inalação e contato dérmico com este composto nos locais de trabalho onde o mesmo é produzido ou usado. Os dados de monitoramento indicam que a população em geral pode estar exposta a substância por inalação do ar ambiente, ingestão de alimentos e contato dérmico com este composto e outros produtos contendo álcool furfurílico, já que é amplamente detectado nos alimentos (NIH, 2017).

Okaru e Lachenmeier (2017), avaliaram a ocorrência de furfural em vários alimentos e bebidas e verificaram que o café apresenta elevada concentração (67 mg/kg no pó solúvel instantâneo), sendo atribuível ao processo de torrefação (SWASTI & MURKOVIC, 2012). Entre as bebidas, maiores concentrações de álcool furfurílico, decorrentes do envelhecimento em barricas de carvalho (CARRILLO; GARRIDO-LÓPEZ; TENA, 2006),

foram encontradas em aguardentes (10 mg/L) do que no vinho (1,5 - 3,4 mg/L). No entanto, o conteúdo era menor em relação ao pão, produtos cozidos, peixe e café.

No ano de 2000, o JECFA estabeleceu uma IDA de 0,5 mg/kg p.c para compostos que contém furano na sua estrutura como (furfural, furfural álcool, acetato de furfural, propionato de furfural, pentanoato de furfural, octanoato de furfural, 3-metilbutanoato de furfural, 2-furoato de metil, 2-furoato de propil, 2-furoato de amil, 2-furoato de hexil e 2-furoato de octil) e sugeriu que o composto não era motivo de preocupação nos níveis atuais de ingestão, quando usado como aromatizante (WHO, 2001). A legislação brasileira não estabelece limites máximos para a presença de furfural álcool em alimentos e bebidas. Entretanto, a IARC classificou recentemente o furfural álcool como possível carcinogênico para humanos, cuja monografia está em fase de preparação (IARC, 2017).

3.7 Avaliação do risco relacionado à exposição aos compostos tóxicos

A avaliação da exposição à compostos tóxicos constitui-se em uma estimativa da ingestão de substâncias que possam representar perigo à saúde humana. Nesta etapa, dados de consumo alimentar são combinados com informações sobre a concentração do composto presente no alimento/bebida, de modo a permitir uma comparação com os parâmetros de ingestão segura estabelecidos pelo JECFA para substâncias não genotóxicas e, assim, possibilitar a caracterização do risco deste tipo de composto tóxico (ANVISA, 2013; DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura para as substâncias que não são genotóxicas, estão a ingestão diária aceitável (IDA), a ingestão diária tolerável máxima provisória (PMTDI, do inglês: *provisional maximum tolerable daily intake*), a ingestão tolerável semanal provisória (PTWI, do inglês: *provisional tolerable weekly intake*) e a ingestão tolerável mensal provisória (PTMI do inglês: *provisional tolerable monthly intake*). Esses parâmetros representam a quantidade de uma substância que pode ser consumida diariamente (IDA e PMTDI), semanalmente (PTWI) ou mensalmente (PTMI) ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde. Para compostos intencionalmente adicionados nos alimentos (aditivos, resíduos de pesticidas e de medicamentos de uso veterinário), aplica-se a IDA. Os parâmetros de ingestão tolerável provisória (PMTDI, PTWI e PTMI) são definidos para os contaminantes, sendo que a PMTDI é definida para substâncias que não se acumulam no organismo. A PTWI e PTMI são usadas para compostos que tem potencial de acumulação no organismo, sendo que para aquelas substâncias que têm vida longa no

organismo utiliza-se a PTMI. Com relação a caracterização do risco da exposição humana a substâncias não genotóxicas, a ingestão é comparada ao parâmetro de ingestão segura, sendo assim pode haver risco quando a ingestão calculada ultrapassar esse parâmetro (JARDIM & CALDAS, 2009).

No caso das substâncias genotóxicas, a caracterização do risco à exposição é feita através do cálculo da margem de exposição (MOE, do inglês: *margin of exposure*) (JARDIM & CALDAS, 2009). A MOE pode ser usada para classificar substâncias genotóxicas de acordo com o risco, indicando o nível de preocupação para estabelecer prioridades de ações para os gerenciadores de risco e para subsidiar os indivíduos a tomar decisões pessoais de estilo de vida. Um valor de MOE maior ou igual a 10.000 tem sido proposto como uma indicação de uma situação de risco pouco preocupante sob a ótica de saúde pública (BARLOW *et al.*, 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A microextração em fase sólida no modo *headspace* e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar no modo SIM (SIM do inglês: *selected ion monitoring*), denominada de HS-SPME-GC/qMS-SIM foi utilizada para a identificação do acetaldeído, acroleína, CE, formaldeído, furfural e furfural álcool em espumantes. Estas análises foram feitas no Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química da UFRGS.

4.1 Amostras

Dezessete amostras de espumantes disponíveis comercialmente, produzidos por vinícolas localizadas no estado do Rio Grande do Sul, no período de 2011 a 2014 foram avaliadas em triplicata. Os espumantes foram elaborados com uvas das cultivares Chardonnay, Pinot Noir, Riesling, Sauvignon Blanc, Merlot, Gewürztraminer e Prosecco, pelo método Champenoise/Tradicional (11 amostras) e método Charmat (6 amostras) e possuíam teor alcoólico de 11,5 a 12,5% (v/v). As amostras foram fornecidas pelo Instituto Brasileiro do Vinho – IBRAVIN. Informações sobre o teor alcoólico, cultivar, safra, método e tipo de cada amostra estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Informações sobre as amostras de espumante avaliadas neste estudo.

Amostra	Teor alcoólico (%)	Cultivar	Safra	Método	Tipo
1	12,5	Chardonnay	2014	Tradicional	Extra Brut
2	12,5	Chardonnay Pinot Noir	2012	Tradicional	Extra Brut
3	12,5	Chardonnay Pinot Noir	2011	Tradicional	Extra Brut
4	12,5	Chardonnay	2014	Tradicional	Brut
5	12,4	Chardonnay Pinot Noir	2011	Tradicional	Brut
6	12,5	Chardonnay, Sauvignon Blanc	2014	Tradicional	Brut
7	11,5	Chardonnay, Pinot Noir	2013	Tradicional	Brut
8	12,5	Gewürztraminer Pinot Noir	2014	Tradicional	Brut
9	12,5	Gewürztraminer Pinot Noir	2012	Tradicional	Brut
10	12,4	Chardonnay Merlot	2013	Tradicional	Brut
11	12,5	Merlot, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir	2014	Tradicional	Brut
12	12,0	Gewürztraminer Chardonnay	2014	Charmat	Brut
13	12,0	Chardonnay Riesling	2011	Charmat	Brut
14	12,5	Chardonnay Riesling	2011	Charmat	Brut
15	12,5	Chardonnay, Riesling, Pinot Noir	2014	Charmat	Brut
16	11,5	Prosecco	2016	Charmat	Brut
17	12,0	Prosecco	2016	Charmat	Brut

Fonte: Autoral

4.2 Determinação da acidez total e pH

A determinação da acidez total e pH foi realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. Estes parâmetros foram verificados pois podem influenciar na eficiência da extração por HS-SPME (PAWLISZYN, 2012) e por isso foram considerados no

preparo da solução modelo de espumante empregada na elaboração da curva de calibração. As amostras foram desgaseificadas em ultrassom por 15 minutos e analisadas em triplicata.

4.2.1 Determinação da acidez total

A acidez total engloba todos os ácidos orgânicos tituláveis, estejam eles dissociados ou não dissociados, presentes em determinada amostra, tais como: ácido tartárico, cítrico, láctico, acético, succínico e málico (MARTINS, 2007). O método para determinação da acidez baseia-se na titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de hidróxido de sódio e utilizando o indicador fenolftaleína até o ponto de viragem (AOAC, 1995; IAL, 2008).

A amostra (10 mL) foi transferida para o Erlenmeyer de 250 mL, seguido da adição de 50 mL de água destilada e 3 gotas da solução de fenolftaleína 1% (preparada em álcool etílico 95%). A titulação foi feita com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M contido em bureta de 25 mL, sob agitação constante até coloração rósea persistente por 30 segundos. O volume de NaOH utilizado em cada titulação foi usado na equação a seguir:

$$\text{Acidez total} = \frac{V \times f \times M \times 100}{P} = \text{meq/L}$$

Onde:

V = quantidade em mL da solução de hidróxido de sódio gasta na titulação;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio que foi previamente padronizada com biftalato de potássio. A padronização consiste em dissolver 0,5 g de biftalato de potássio $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{H})(\text{CO}_2\text{K})$ em 75 mL de água destilada e adicionar 2 gotas de fenolftaleína 1%, seguida da titulação com hidróxido de sódio (0,1 M) até o aparecimento de coloração rósea persistente por cerca de 30 segundos.

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio;

P = volume de amostra pipetado (mL).

4.2.2 Determinação do pH

O pH de amostras líquidas é determinado pela atividade dos íons hidrogênio, ou seja, corresponde à concentração de íons de hidrogênio dissolvidos na amostra. Um pHmetro (Hanna Instruments, modelo HI 2221, Woonsocket, EUA) foi utilizado para a medida do pH.

Em um béquer de 100mL foi colocado um volume de espumante suficiente para que o eletrodo do pHmetro entrasse em contato com a amostra. O pHmetro foi previamente calibrado com as soluções-tampão de pH 4,0 e pH 7,0 (IAL, 2008).

4.3 Reagentes e padrões químicos

Os compostos padrão dos analitos, com pureza superiores a 98%, foram preparados em etanol de Pureza Analítica (P.A, Nuclear, São Paulo, Brasil). Soluções-estoque individuais de formaldeído (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), acetaldeído (Fluka, Ronkonkoma, EUA), acroleína, CE e furfural (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram preparadas na concentração de 1000 mg/L. Os padrões internos (PI), 2-octanona e o furfural-tiol (Sigma-Aldrich) também foram preparados em etanol (10 mg/L). Os PI foram adicionados (10 µL) em cada frasco de vidro que continha as amostras e nas soluções padrão destinadas a construção das curvas de calibração.

Preparou-se também uma solução modelo de espumante com características semelhantes às amostras avaliadas. Ácido tartárico (5 g/L, Synth São Paulo) foi dissolvido em água deionizada MilliQ (sistema de purificação Millipore, Bedford, EUA) e o pH foi ajustado para 3,1 com hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Além disso, etanol (12 mL) foi adicionado. Esta solução apresentou acidez total de 108 meq/L e foi usada nas análises pois a eficiência da extração por HS-SPME depende da acidez, pH e teor alcóolico da amostra (WELKE *et al.*, 2012). A solução modelo foi utilizada na construção das curvas de calibração necessárias para quantificação dos compostos tóxicos presentes nos espumantes.

O agente derivatizante 2,2,2-Trifluoroetil hidrazina (TFEH, Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi preparado em solução aquosa (MilliQ) (10.000 mg/L) e 100 µL desta solução derivatizante foi adicionada a cada amostra de espumante antes da extração e para elaboração das curvas de calibração. O cloreto de sódio (NaCl, 0,3 g, grau analítico, Nuclear, São Paulo, Brasil) foi utilizado nas amostras para aumentar a força iônica da solução e, conseqüentemente, melhorar a extração de analitos. O NaCl foi previamente seco a 100°C durante 1h e armazenado num dessecador até a sua utilização (LAGO *et al.*, 2017).

A fibra utilizada na SPME foi 50/30 de divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) StableFlex 2 cm (Supelco, Bellefonte, EUA). Antes da primeira utilização, a fibra foi condicionada durante 1h a 270°C, conforme recomendado pelo

fabricante. Os frascos de vidro (*vials*) do tipo *headspace* com 20 mL e tampa com septo também foram obtidos da Supelco.

4.4 Determinação dos compostos tóxicos através da HS-SPME-GC/qMS-SIM

Para a extração dos compostos tóxicos através da HS-SPME, 1 mL de amostra foi transferido para o frasco de SPME contendo 0,3 g de NaCl. A extração ocorreu por 60 minutos a 55°C, de acordo com as diretrizes otimizadas e relatadas em um estudo anterior (WELKE *et al.*, 2012). A derivatização com TFEH, do acetaldeído (ponto de ebulição, PE: 20,2 °C), formaldeído (PE: -19,3 °C) e acroleína (PE: 53 °C) foi realizada como descrito na seção 4.2, visando transformar esses analitos altamente voláteis em compostos termicamente estáveis para posterior análise no GC (GC, do inglês: *gas chromatograph*).

Os compostos extraídos por HS-SPME foram dessorvidos termicamente no injetor automático (CTC CombiPAL, Zwingen, Suíça) do GC/MS (Shimadzu, modelo QP2010, Kyoto, Japão) a 250 °C por 15 minutos. Os analitos foram separados em uma coluna polar (polietilenoglicol, DB-Wax, 30m x 0,25mm x 0,25µm, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, EUA). A programação de temperatura utilizada no forno do GC foi: 35°C por 5 minutos, aquecimento a 3°C/min até 140°C, seguido da taxa de 20°C/min até atingir a temperatura final de 250°C, na qual o sistema foi mantido por 10 minutos. O gás hélio (pureza analítica de 99,999%, Linde Gases, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil) foi usado como gás carreador (fluxo de 1 mL/min). A ionização eletrônica usada no MS foi 70 eV e a temperatura da fonte de íons foi de 250°C.

O modo SIM foi utilizado para identificar e quantificar os compostos de acordo com íons qualificadores e quantificadores mostrados na Tabela 6. Os mesmos foram identificados comparando-se os tempos de retenção (t_R) e os espectros de massa dos compostos desconhecidos com os parâmetros dos compostos padrão co-injetados. A fim de refinar a etapa de identificação, os espectros de massa obtidos foram comparados com os disponíveis na biblioteca espectral de massas da NIST (2005).

Tabela 6 - Compostos tóxicos e seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons monitorados e o padrão interno utilizados na quantificação por HS-SPME-GC/qMS-SIM.

	t_R (min) ^a	Íons qualificadores	Íon quantificador	Padrão interno	
Compostos tóxicos	Acetaldeído	13,9	71; 140	71	2-Octanona
	Acroleína	13,6	83; 55; 152	83	2-Octanona
	Carbamato de etila	36,4	62; 74; 89	62	2-Octanona
	Formaldeído	12,9	57; 126	57	2-Octanona
	Furfural	25,9	96; 95	96	Furfuril tiol
	Furfuril álcool	29,3	98; 81; 53	98	Furfuril tiol
Padrões internos	2-Octanona	18,8	58; 71	58	-
	Furfuril tiol	28,8	81; 53	81	-

Fonte: Autoral

^a Tempo de retenção (minutos)

Os parâmetros de validação do método HS-SPME-GC/qMS-SIM incluíram linearidade, recuperação, precisão intermediária (quatro análises realizadas em quatro dias diferentes, $n = 16$), repetibilidade (sete análises realizadas no mesmo dia, $n = 7$), limite de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) que foram verificados de acordo com a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, do inglês: *International Conference on Harmonisation*) (ICH, 1996).

4.5 Avaliação do risco da exposição aos compostos carbonílicos tóxicos através do consumo de espumante

O cálculo da ingestão diária estimada (IDE) dos compostos tóxicos encontrados nos espumantes, expresso em $\mu\text{g}/\text{kg p.c}/\text{dia}$ foi realizado a partir da seguinte equação:

$$IDE = \frac{\text{consumo de espumante } \left(\frac{\text{mL}}{\text{dia}}\right) \times \text{concentração do analito na amostra } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{peso corpóreo}}$$

O consumo de espumante utilizado no cálculo da IDE foi 300 mL, considerando que: (i) a ingestão diária máxima de álcool não deve ultrapassar cerca de 30 g, conforme estabelecido pelas Agências de Saúde de diversos países, incluindo Estados Unidos da América, França, Macedônia, Nova Zelândia, Romênia, Suíça e Uruguai, e divulgado pela Aliança Internacional para o Consumo Consciente (IARD, 2017) e (ii) 1 g de etanol equivale a 1,30 mL deste álcool e que os espumantes avaliados apresentaram conteúdo de álcool entre 11,5 e 12,5% (v/v). Vázquez-Agell *et al.* (2007) verificaram que o consumo diário de 300 mL de espumante elaborado com uvas Chardonnay pode prevenir a aterosclerose. Além disso, o consumo desta mesma quantidade de vinho também tem sido proposto pela Organização Internacional de Produtores desta bebida chamada “Wine in Moderation”, considerando que o consumo moderado de bebidas alcoólicas está associado a redução do risco de doença cardiovascular (WIM, 2017).

A concentração dos compostos carbonílicos tóxicos foi obtida como descrito na seção 4.4 e o peso corpóreo médio dos brasileiros, de 66,5 kg, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foram utilizados no cálculo da IDE (IBGE, 2011).

Em relação à caracterização do risco da exposição, duas abordagens foram utilizadas de acordo com a genotoxicidade do composto tóxico. Acetaldeído (ERIKSSON, 2015), acroleína (ATSDR, 2017), carbamato de etila (CUI *et al.*, 2016) e formaldeído (ARKEMAN, 2008) são compostos cuja genotoxicidade é reconhecida pelo JECFA. A caracterização do risco relacionada a esses compostos foi feita a partir do cálculo da MOE. Utilizou-se como dose de referência a BMDL10, definida como o limite inferior do intervalo de confiança da dose que causou o aumento de 10% na incidência de um determinado efeito tóxico (BMDL10, do inglês: *benchmark dose lower confidence limit*). Os valores de BMDL10 de cada composto tóxico estão na Tabela 7. Com relação a MOE, valores abaixo de 10.000

indicam que o composto apresenta risco potencial à saúde pública quando associado a exposição humana perante determinada substância tóxica (WHO, 2010).

Tabela 7 - Valores de BMDL10 e efeitos tóxicos observados após exposição oral de animais ao acetaldeído, acroleína, carbamato de etila e formaldeído

Composto	BMDL10 (mg/kg peso corpóreo/dia)	Efeito tóxico	Referência
Acetaldeído	56	Tumores em ratos (mamários, estomacais, intestinais, testiculares)	LACHENMEIER <i>et al.</i> (2009)
Acroleína	0,36	Hiperplasia epitelial escamosa em estomago de ratos	ATSDR (2007)
Carbamato de etila	0,25	Neoplasia alveolar e bronquiolar em ratos machos e fêmeas	SCHLATTER <i>et al.</i> (2010)
Formaldeído	28	Gastrite crônica em ratos	MONAKHOVA, JENDRAL e LACHENMEIER (2012)

Fonte: Autoral

O JECFA classifica o furfural como não genotóxico e este composto pode ser utilizado como aromatizante na indústria de alimentos, deste modo o composto possui um nível de ingestão segura (JECFA, 2000). Para o furfural, furfuril (álcool, acetato, propionato, pentanoato, octanoato e 3-metilbutanoato) e compostos do grupo 2-furoato (metil, propil, amil, hexil e octil), a ingestão diária aceitável (IDA) é de 500 µg/kg p.c/dia, considerando que esse valor corresponde à soma da exposição ao grupo de compostos citados acima. Neste caso, a caracterização do risco foi avaliada comparando-se a IDE desses compostos com a IDA, com a ressalva de que o risco ocorre somente se a quantia consumida exceder a IDA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Acidez total e pH

A Tabela 8 apresenta os valores médios para acidez total e pH das amostras de espumante. A acidez total variou de 77,9 a 125,1 meq/L com mediana de 108,3 meq/L, portanto, todas as amostras estão de acordo com a legislação brasileira que permite variação entre 55,0 e 130,0 meq/L para este parâmetro (BRASIL, 1988). Pode-se considerar que variações na acidez total são consequência do grau de maturação da uva, na qual ocorre a redução do ácido málico, que posteriormente é degradado devido ao processo respiratório da uva. Portanto, quanto menor o grau de acidez, mais madura é a uva que foi utilizada na vinificação (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2003).

Tabela 8 - Acidez total e pH das amostras de espumantes produzidas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2011 a 2014.

Amostra	Acidez total (meq/L)	pH
1	115,9 ± 1,3	3,1
2	109,6 ± 3,3	3,1
3	80,4 ± 4,2	3,2
4	117,7 ± 8,0	3,1
5	108,3 ± 1,4	3,3
6	112,9 ± 4,4	3,2
7	96,3 ± 2,9	3,0
8	102,9 ± 2,9	2,9
9	99,4 ± 7,1	3,2
10	102,8 ± 2,2	3,0
11	86,6 ± 5,2	3,0
12	109,9 ± 7,2	3,0
13	77,9 ± 3,4	2,9

Tabela 8 - Acidez total e pH das amostras de espumantes produzidas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2011 a 2014.

(continuação)

Amostra	Acidez total (meq/L)	pH
14	119,5 ± 2,9	3,1
15	98,7 ± 2,6	3,3
16	113,5 ± 0,6	2,9
17	125,1 ± 2,2	2,6

Fonte: Autoral

Notas:

* Resultados expressos através da média da avaliação em triplicata de cada amostra ± desvio padrão

Os valores de pH dos espumantes variaram de 2,9 a 3,3, com mediana de 3,1. A legislação brasileira não estabelece regulamentação para o pH desta bebida, entretanto, o pH abaixo de 3,5 é desejável, pois aumenta a longevidade do espumante, a estabilização e a ação do SO₂, diminuindo riscos microbiológicos e conferindo melhor estabilidade microbiológica (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2004).

Os valores medianos de acidez total (108 meq/L) e pH (3,1) verificados nas amostras de espumantes em estudo foram considerados para a preparação da solução modelo usada na obtenção das curvas analíticas. Este procedimento é importante para minimizar efeitos de matriz na quantificação dos analitos (WELKE *et al.*, 2012)

5.2 Validação do método HS-SPME-GC/qMS-SIM

A Tabela 9 apresenta a performance analítica do método HS-SPME-GC/qMS-SIM utilizado para determinar simultaneamente os seis compostos tóxicos em espumantes. As curvas de calibração mostraram boa linearidade, verificada através dos valores de coeficiente de determinação (r^2) que ficaram entre 0,9632 e 0,9951 para o furfuril álcool e o CE, respectivamente. A partir dos baixos valores de LOD e LOQ obtidos, pode-se concluir que o método é suficientemente sensível para a quantificação destes compostos. Em relação ao LOD, o mais baixo valor entre os compostos avaliados foi encontrado para o acetaldeído (0,001 µg/L), enquanto que o mais alto refere-se ao furfuril álcool (0,5 µg/L). A respeito do LOQ, o acetaldeído também apresentou o menor valor (0,004 µg/L), ao passo que o furfuril álcool apresentou o maior valor (1,7 µg/L). Além disso, o percentual de recuperação variou de

90 a 105% e os coeficientes de variação obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 14%, demonstrando a eficiência do método utilizado.

Tabela 9 - Parâmetros de validação do método de HS-SPME-GC/qMS-SIM para quantificação de compostos carbonílicos e furfural álcool em espumantes.

Composto	Variação (µg/L)	Equação da regressão	r ² ^a	LOD (µg/L) ^b	LOQ (µg/L) ^c	Conc. (µg/L) ^d	Rec. (%) ^e	RSD Rep. (%) ^f	RSD Prec. (%) ^g
Acetaldeído	1-25	y = 32852x + 910106	0,9731	0,001	0,004	1,5	98	6,3	11,5
						73	91	5,2	9,8
						146	95	9,0	7,0
Acroleína	2,5-100	y = 175,21x + 7740,7	0,9948	0,321	1,070	2,5	91	8,2	10,9
						10	90	1,0	10,5
						100	96	0,9	8,3
Carbamato de etila	1-100	y = 789,28x + 9278	0,9951	0,121	0,402	1,0	98	6,9	13,6
						10	97	0,9	11,0
						100	100	2,9	9,1
Formaldeído	1-100	y = 1347,3x + 134500	0,9945	0,004	0,014	1,0	105	5,3	7,8
						10	100	12,0	10,8
						100	90	5,6	7,4
Furfural	1-100	y = 852,94x + 35579	0,9917	0,013	0,043	1,0	98	3,7	3,6
						70	100	7,4	9,8
						140	93	3,1	7,0
Furfural álcool	2,5-100	y = 170.054x + 1.339,3	0,9632	0,503	1,676	2,5	100	2,8	4,2
						10	94	11,1	10,7
						100	94	5,5	9,2

Fonte: Autoral

Notas:

^a r²: Coeficiente de determinação; ^b LOD: Limite de detecção; ^c LOQ: Limite de quantificação; ^d Conc.: Concentração correspondente a menor, média e mais alta concentração de cada composto tóxico na curva analítica, utilizada para determinar a porcentagem de repetibilidade, precisão intermediária e recuperação; ^e Rec.: Recuperação; ^f Rep.: Repetibilidade (n=7): coeficiente de variação de sete ensaios independentes realizados no mesmo dia sob as mesmas condições analíticas; ^g Prec.: Precisão Intermediária (n=16): coeficiente de variação de quatro ensaios independentes realizados em quatro dias diferentes sob as mesmas condições analíticas.

5.3 Determinação da concentração dos compostos tóxicos presentes em espumantes

Os compostos carbonílicos e o furfural álcool foram encontrados em todas as amostras de espumante avaliadas, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Níveis ($\mu\text{g/L}$) dos compostos tóxicos detectados em espumantes avaliados através da HS-SPME-GC/qMS-SIM.

Amostra	Acetaldeído ^a	Acroleína ^b	Carbamato de etila ^c	Formaldeído ^d	Furfural ^e	Furfural álcool ^f
1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	15,8±2,0
2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11,1±0,1
3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	12,9±0,01	42,0±3,9
4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14,4±0,8
5	12,4±0,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,7±1,4
6	50,5±1,7	33,1±1,7	<LOQ	<LOQ	15,6±3,3	15,8±1,7
7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14,4±1,7
8	37,9±3,7	33,4±0,0	<LOQ	<LOQ	41,0±0,0	13,9±0,8
9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11,9±0,7
10	31,1±0,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	32,1±0,0	17,9±0,5
11	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,4±0,3
12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	16,2±0,6
13	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,6±0,2
14	30,5±8,3	28,0±1,8	<LOQ	<LOQ	14,4±3,0	15,5±0,6
15	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	21,9±1,7
16	5,2±1,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	17,8±0,3
17	15,1±0,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14,2±1,0

Fonte: Autoral

Notas:

LOQ - Limites de quantificação do método: ^a 0,004; ^b 1,07; ^c 0,4; ^d 0,04; ^e 1,7.

O acetaldeído foi encontrado em 44% das amostras (7 amostras) em concentração variando de 12,4 a 50,5 $\mu\text{g/L}$, média e mediana de 26,1 e 30,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Os níveis médios deste composto tóxico avaliado em outros vinhos será mencionado a seguir, já que a mediana da concentração raramente é reportada na literatura. Além disso, cabe salientar que esses compostos foram quantificados pela primeira vez em espumantes, por isso dados da ocorrência foram comparados com vinhos tranquilos. O acetaldeído também foi detectado em

outros vinhos brasileiros, incluindo vinhos Merlot da Campanha Gaúcha (16,6 µg/L) (LAGO *et al.*, 2017) e Syrah do Vale do São Francisco (213 µg/L) (FERREIRA *et al.*, 2017). Outros vinhos apresentaram concentração superiores deste aldeído, incluindo vinhos tintos de várias cultivares de uva (55.800 µg/L) produzidos na Itália (PAIANO *et al.*, 2014); vinhos brancos de Portugal (53.489 µg/L) (CÂMARA *et al.*, 2006) e da China (67.500 µg/L) (ZHANG *et al.*, 2011).

A acroleína foi detectada em 19% das amostras (3 espumantes) em níveis de 28 a 33 µg/L, média e mediana de 31,5 e 33,1 µg/L, respectivamente. Em vinhos Merlot brasileiros, 50% das amostras continham este aldeído, variando de 1,0 a 29,8 µg/L (média de 15,4 µg/L) (FERREIRA *et al.*, 2017). Os níveis médios encontrados em vinhos Syrah, também do Brasil, foram superiores aos detectados nos espumantes do presente estudo (72 µg/L) (LAGO *et al.*, 2017). Estes valores são consideravelmente superiores aos relatados por Kächele *et al.* (2014) para vinhos da Alemanha de diferentes cultivares (0,7 µg/L).

O CE foi detectado em todos os espumantes em concentrações inferiores ao LOQ do método (0,4 µg/L). Da mesma forma, Ferreira *et al.* (2017) não detectaram o composto nos vinhos Merlot brasileiros. No entanto, os valores obtidos para o CE neste estudo foram consideravelmente inferiores aos detectados em vinhos da China (137 µg/L) (Zhang *et al.*, 2014), Portugal (54,1 µg/L) (PERESTRELO *et al.*, 2010) e Brasil (100 µg/L) (LAGO *et al.*, 2017).

O formaldeído foi encontrado em todas as amostras em níveis baixos (inferiores ao LOQ do método: 0,04 µg/L). Ferreira *et al.* (2017) também detectaram este composto em todos os vinhos Merlot comerciais produzidos na Campanha Gaúcha, em concentrações abaixo do LOQ do método (1,0 µg/L). O formaldeído foi encontrado em maiores níveis em vinhos tintos produzidos na Alemanha (130 µg/L) (JENDRAL *et al.*, 2011), vinho branco da China (4.830 µg/L) (ZHANG *et al.*, 2011) e vinhos Syrah do Brasil (64 µg/L) (LAGO *et al.*, 2017).

Furfural foi detectado em 31% das amostras (5 espumantes), em concentrações variando de 12,9 a 41,0 µg/L, média e mediana de 23,2 e 15,6 µg/L, respectivamente. Estes níveis foram inferiores aos detectados em outros vinhos elaborados no Brasil, incluindo Merlot (58,2 µg/L) (FERREIRA *et al.*, 2017) e Syrah (184 µg/L) (LAGO *et al.*, 2017). O furfural também foi relatado em vinhos brancos portugueses maturados em barril de carvalho em níveis de 7.900 µg/L (CÂMARA *et al.*, 2006) e 876 µg/L (PERESTRELO *et al.*, 2015).

O furfural álcool foi encontrado em todas as amostras analisadas, em níveis entre 11,1 e 42,0 µg/L, com média e mediana de 16,7 e 14,4 µg/L, respectivamente. Okaru e Lechenmeier (2017) avaliaram vinhos cujas cultivares e local de produção não foram

informados no estudo, e verificaram que os níveis detectados nessas amostras foram inferiores ao limite de detecção do método de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (3,2 mg/L).

Os níveis dos compostos tóxicos analisados divergiram entre as amostras, o que pode ter ocorrido devido as condições de processamento ou armazenamento, entre outros fatores relacionados a safra, cultivares de uva, práticas de cultivo, localização do vinhedo e tempo de envelhecimento que precisam ser detalhadamente estudadas. Perestrelo *et al.*, (2015) verificaram que durante o armazenamento, por exemplo, a temperatura e posição da garrafa são fatores que podem estar relacionados aos níveis de compostos furânicos tóxicos.

5.4 Ingestão estimada e avaliação do risco relacionado à exposição aos compostos tóxicos através do consumo de espumante

A Tabela 11 apresenta os dados de IDE dos compostos que foram encontrados em níveis superiores ao LOQ do método, incluindo acetaldeído, acroleína, furfural e furfuril álcool. O formaldeído e CE não estão na Tabela 11, pois esses compostos não foram detectados em níveis quantificáveis, (LOQ de 0,04 e 0,4 µg/L, respectivamente).

Tabela 11 - Ingestão diária estimada (IDE) em µg/kg de peso corpóreo por dia calculada para as amostras em que o acetaldeído, acroleína, furfural e furfuril álcool foram detectados em níveis acima do LOQ do método.

Amostra	Acetaldeído	Acroleína	Furfural	Furfuril álcool
1	NC	NC	NC	0,07
2	NC	NC	NC	0,05
3	NC	NC	0,06	0,19
4	NC	NC	NC	0,06
5	0,06	NC	NC	0,06
6	0,23	0,15	0,07	0,07
7	NC	NC	NC	0,06
8	0,17	0,15	0,18	0,06
9	NC	NC	NC	0,05
10	0,14	NC	0,14	0,08
11	NC	NC	NC	0,06
12	NC	NC	NC	0,07

Tabela 11 - Ingestão diária estimada (IDE) em $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo por dia calculada para as amostras em que o acetaldeído, acroleína, furfural e furfuril álcool foram detectados em níveis acima do LOQ do método.

(continuação)

13	NC	NC	NC	0,06
14	0,14	0,13	0,06	0,07
15	NC	NC	NC	0,10
16	0,02	NC	NC	0,08
17	0,07	NC	NC	0,06

Fonte: Autoral

Notas:

NC: IDE não calculada pois as concentrações encontradas foram inferiores ao LOQ do método.

Os compostos apresentaram em geral valores baixos de IDE, incluindo o acetaldeído (0,02 a 0,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c/dia), acroleína (0,13 a 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c/dia), furfural (0,06 a 0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c/dia) e furfuril álcool (0,05 a 0,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c/dia).

A avaliação do risco relacionado à exposição ao furfural e furfuril álcool foi feita através da comparação da IDE com a IDA, pois esses compostos são considerados aditivos alimentares. A IDE de ambos compostos foi inferior ao parâmetro de ingestão segura de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c/dia estabelecido pelo JECFA (2000), o que indica que a exposição a esses compostos não representa risco.

Os demais compostos são compostos genotóxicos, logo a caracterização do risco foi realizada através do cálculo da MOE, que foi apresentada na Tabela 12. Considerou-se como referência toxicológica os valores de BMDL10 relacionados aos efeitos tóxicos expostos na Tabela 7. O carbamato de etila e o formaldeído não constam na Tabela 12 pois estes compostos não foram quantificados (detectados em níveis abaixo do LOQ de 0,4 e 0,04 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectivamente).

Tabela 12 - Margem de exposição (MOE) do acetaldeído e acroleína considerando os dados de ocorrência desses compostos (Tabela 10) e de IDE (Tabela 11). As amostras que representam risco à saúde (MOE < 10.000) estão destacadas em vermelho.

Amostra	Acetaldeído	Acroleína
BMDL10^a	56 ^b	0,36 ^c
1	NC	NC
2	NC	NC
3	NC	NC
4	NC	NC
5	1.001.075	NC
6	245.809	2.411
7	NC	NC
8	327.529	2.389
9	NC	NC
10	399.143	NC
11	NC	NC
12	NC	NC
13	NC	NC
14	406.995	2.850
15	NC	NC
16	2.387.179	NC
17	822.075	NC

Fonte: Autoral

Notas:

^a Valor de BMDL10 conforme especificado na Tabela 7;

^b LACHENMEIER et al. (2009);

^c ATSDR (2007).

NC: MOE não calculada, pois nessas amostras o composto tóxico não foi quantificado (níveis abaixo do LOQ)

A exposição à acroleína a partir do consumo de 300 mL/dia de espumante pode representar risco à saúde para as três amostras em que o este aldeído foi detectado (Tabela 12), visto que a MOE calculada para o composto foi de 2.389 a 2.850. As amostras em que o acetaldeído foi quantificado não representam risco para a saúde, pois os valores de MOE foram inferiores 10.000 (245.809 a 2.387.179).

Estratégias focadas em minimizar a ocorrência da acroleína, a qual pode representar riscos para a saúde do consumidor devem ser avaliadas, como a identificação dos pontos críticos de controle nos processos de elaboração dos espumantes. A manutenção do pH do vinho entre 3-4 reduz a multiplicação bacteriana e o acúmulo do 3-HPA, que é um precursor da formação deste aldeído (BAUER *et al.*, 2010). Além disso, cabe ressaltar que Burcham (2017) e Vries *et al.*, (2016) verificaram que este composto pode ser formado durante a queima da madeira utilizada em fornos/fogões a lenha. Esta prática é comum especialmente durante o inverno na Serra e Campanha Gaúcha (principais regiões produtoras de uvas e espumantes do Brasil). O uso do fogo próximo ao vinhedo como alternativa para proteção do mesmo contra os efeitos da geada, também pode ser uma via de contaminação ambiental das uvas e conseqüentemente do vinho com acroleína. Uma alternativa para a redução dos níveis de acroleína nas uvas seria a substituição da madeira como combustível por outra fonte menos poluidora, bem como a proteção das videiras contra geada pelo uso de estufas. Os moradores próximos ao vinhedo também devem evitar a queima de vegetação e lixo, contribuindo para a diminuição da concentração deste composto no ambiente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros de validação do método, incluindo LOD, LOQ, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária mostraram que o método baseado no uso da HS-SPME-GC/qMS-SIM foi adequado para a quantificação simultânea do acetaldeído, acroleína, carbamato de etila, formaldeído, furfural e furfural álcool. Os compostos tóxicos foram detectados em todas as amostras avaliadas e seus níveis divergiram consideravelmente entre os espumantes. A avaliação do risco revelou que a exposição à acroleína, através do consumo das amostras avaliadas pode representar risco para a saúde do consumidor. O fato dos espumantes serem produzidos a partir de dois processos fermentativos pode contribuir para os níveis de acroleína verificados neste estudo, para a qual existe a possibilidade de contaminação das uvas durante o cultivo devido a queima da madeira próximo ao vinhedo.

Este trabalho contribuiu para geração de dados sobre os níveis destes compostos em espumantes comercialmente disponíveis, que poderão servir de subsídio para a criação futura de uma legislação nacional que estabeleça limites para a presença dos mesmos nesta bebida. Além disso, estratégias focadas na redução da ocorrência da acroleína devem ser estudadas.

REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (method 942.15 A). Arlington; Chapter 37. p. 10, 1995.
- ABU-AMERO, K.K; KONDKAR, A.A.; CHALAM, K.V. Resveratrol and Ophthalmic Diseases. *Nutrients*; v. 8, n. 200, 2016.
- ALEXANDRE, H., & GUILLOUX-BENATIER, M. Yeasts autolysis in sparkling wine – A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*; v. 12, p. 119-127, 2006.
- ANVISA. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Brasília/DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária Guia, 2013.
- ARKEMAN, D. H. Evaluation of the oral toxicity of formaldehyde in rats. *Universa Medicina*; v. 27, n. 3, p. 4–10, 2008.
- ARTERO, A. *et al.* The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*; v. 80, 1º ed., p. 3-13, 2015.
- ARTS, J. H. E. *et al.* Subacute (28-day) toxicity of furfural in Fischer 344 rats: A comparison of the oral and inhalation route. *Food and Chemical Toxicology*; v. 42, p. 1389-1399, 2004.
- ATSDR. Toxicological profile for acrolein. U.S. *Department of Health and Human Service*, Public Health Service, Atlanta, Georgia, EUA, Aug. 2007.
- AUGER, C. *et al.* Polyphenols-enriched chardonnay white wine and sparkling pinot noir red wine identically prevent early atherosclerosis in hamsters. *J. Agric. Food. Chem.*; v. 53, p. 9823–9829, 2005.
- AZEVEDO, L. C. DE *et al.* Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova*; v. 30, n. 8, p. 1968–1975, 2007.
- BAFFA-JÚNIOR, J. C. *et al.* Ethyl-carbamate determination by gas chromatography–mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. *Food Chemistry*; v. 129, n. 4, p. 1383–1387, 2011.
- BARCELOS, L. V. F. *et al.* Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de minas gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. *Química Nova*; v. 30, n. 4, p. 1009-1011, 2007.
- BARLOW, S. *et al.* Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe; *Food Chem Toxicol.*; v. 44, n.10, p. 1636-1650, 2006.
- BAUER, R. *et al.* Acrolein dimer as a marker for direct detection of acrolein in wine. *South African Journal for Enology and Viticulture*; v. 33, p. 72-79, 2012.

BAUER, R.; DU TOIT, M.; KOSSMANN, J. Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*; v. 137, issue 1, p. 28-31, 2010.

BOBAN, M. *et al.* Drinking pattern of wine and effects on human health: why should we drink moderately and with meals? *Food & Function*; v. 7, p. 2937–2942, 2016.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*; v. 8, n. 5, 2016.

BOSCH-FUSTE, J. *et al.* Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*; v. 105, p. 428–435, 2007.

BRASIL. Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Congresso Nacional, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produto Vegetal. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova as Normas referentes a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho. Diário Oficial da União, Gabinete do Ministro, Brasília, DF, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 259, de 31 de maio de 2010. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 28, de 8 de agosto de 2014. Alteração do limite máximo permitido para acroleína em aguardente e cachaça definido pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005.

BURCHAM, P. C. Acrolein and Human Disease: Untangling the Knotty Exposure Scenarios Accompanying Several Diverse Disorders. *Chemical Research in Toxicology*; v. 30, n. 1, p. 145–161, 2017.

BUXADERAS, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E. Sparkling Wines: Features and Trends from Tradition. [s.l: s.n.]. *Advances in Food and Nutrition Research*; v. 66, ch. 1, 2012.

CAHILL, P. A., REDMOND, E. M., Alcohol and cardiovascular disease-modulation of vascular cell function. *Nutrients*; v. 4, n. 4, p. 297-318, 2012.

CALIARI, V., ROSIER, J. P., BORDIGNON-LUIZ, M. T. Vinhos espumantes: métodos de elaboração. Review. *Evidência*; v. 13, n.1, p. 65-77, 2013.

CÂMARA, J. S.; ALVES, M. A.; MARQUES, J. C. Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta*; v. 563, p. 188–197, 2006.

CARIDI, A. Enological functions of parietal yeast mannopro- teins. Antonie Van Leeuwenhoek International. *Journal of General and Molecular Microbiology*; v. 89, n. 3-4, p. 417-422, 2006.

CARRILLO J. D., GARRIDO-LÓPEZ Á., TENA M.T. Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*; v. 1102, p. 25–36, 2006.

CDC (2016). Centers for Disease Control and Prevention; National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Furfuryl alcohol. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/niosh/>> Acesso em: 20/10/2017.

CHIVA-BLANCH, G. *et al.* Effects of Wine, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease Risk Factors: Evidences from Human Studies. *Alcohol and Alcoholism*; v. 48, n. 3, p. 270–277, 2013.

CHUNG, H. *et al.* Evaluation of volatile organic compounds in alcoholic beverages consumed in Korea. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*; v. 58, n. 3, p. 423–432, 2015.

COSTA, S. *et al.* Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*, v. 252, p. 40–48, 2008.

CUI, X. *et al.* *In vitro* toxicological evaluation of ethyl carbamate in human HepG2 cells. *Toxicology Research*, v. 5, p. 697-702, 2016.

DAHABIEH, M. S. *et al.* Functional enhancement of Sake yeast strains to minimize the production of ethyl carbamate in Sake wine. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 963–973, 2010.

DANG, T. *et al.* Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer’s disease. *Current Molecular Pharmacology*, v. 3, n. 2, p. 66–68, 2010.

DAS, D.K.; MUKHERJEE, S. & RAY, D. Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Fail. Rev.* v. 15, p. 467-477, 2010.

DE AZEVÊDO, L. *et al.* Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1968-1975, 2007.

DUBUGRAS, M. T. B.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, E. Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2008.

EFSA (European Food Safety Authority). Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. *EFSA Journal*, v. 551, pp. 1-44, 2007.

EREN, B. *et al.* Evaluation of potential salivary acetaldehyde production from ethanol in oral cancer patients and healthy subjects. *Hippokratia - Quarterly Medical Journal*; v. 18, p. 269-274, 2014.

ERIKSSON, C. J. P. Genetic-Epidemiological Evidence for the Role of Acetaldehyde in Cancers Related to Alcohol Drinking. In: VASILIOU, V. *et al.* (Eds.); *Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer*. New York: Springer, 2015.

FAROON, O. *et al.* Acrolein Health Effects. *Toxicology and Industrial Health*, v. 24, n. 7, p. 447-490, 2008.

FEROE, A. G.; ATTANASIO, R.; SCINICARIELLO, F. Acrolein metabolites, diabetes and insulin resistance. *Environmental Research*, v. 148, p. 1-6, 2016.

FERREIRA, D. C., *et al.* Simultaneous quantification of toxic carbonyl compounds in samples from distinct stages of vinification and exposure risk assessment through wine consumption. *Food Chemistry* (submetido), 2017.

FLANZY, C. Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. Madri: *Mundiprensa*, 2002.

FLANZY, C. *et al.* In "Oenology: Fondements scientifiques et technologiques", (C. Flanzy, Ed.), p.497-516. *Technique et Documentation*, Paris, France, 1999.

GABBARDO, M., CELOTTI, E. Physicochemical characterization of brazilian sparkling wines. Nota técnica. *Ciência Téc. Vitiv*, v. 30, n. 2, p. 94-101, 2015.

GEISSE, M. A Champanhização. Revista Adega, Edição 4, Dezembro, 2005. Disponível em: <<http://revistaadega.uol.com.br/Edicoes/4/artigo13035-1.asp/>> Acesso em: 12/11/2017.

GENTILE, F. *et al.* Organic wine safety: UPLC-FLD determination of Ochratoxin A in Southern Italy wines from organic farming and winemaking. *Food Control*, v. 59, p. 20-26, 2016.

GIGLIOTTI, A., BESSA, M. A. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos. *Rev. Bras. Psiquiatr.*; v. 26 (Supl I), p.11-14, 2004.

GIOVANNINI E., MANFROI V. Viticultura e enologia: Elaboração dos grandes vinhos nos terroirs brasileiros. 344p., Bento Gonçalves, IFRS, 2009.

GUO, X.W. *et al.* Reduced production of ethyl carbamate for wine fermentation by deleting *CAR1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 43, issue 5, p. 671-679, 2016.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed., 1. ed digital. São Paulo: *Instituto Adolfo Lutz*, p. 1020, 2008.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: **IMESP**, p. 183, 1985.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-119 (2017). Disponível em: http://www.monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List_of_Classifications.pdf/ Acesso em: 23/10/2017.

IARD. International Alliance for Responsible Drinking. Disponível em: <http://www.iard.org/policy-tables/drinking-guidelines-general-population/> Acesso em 15/11/2017.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Coordenação de Trabalho e Rendimento, 150 p., Rio de Janeiro, 2011.

IBRAVIN (2017). Comercialização de espumantes - empresas do Rio Grande do Sul – Brasil – comparativo 2006-2016. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/> Acesso em: 20/10/2017.

IBRAVIN (2017). Regiões Produtoras. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/Regioes-Produtoras> Acesso em: 15/11/2017.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology.

JACKSON, R.S. Wine Science: Principles and Applications, 3rd ed. **Elsevier**: Amsterdam, 2008.

JACKSON, R.S. Wine Science: Principles and Applications, 4rd ed. **Elsevier**: Amsterdam, 2014.

JAMROZ, A., BELTOWSKI, J. Antioxidant capacity of selected wines. **Med. Sci. Monit.**; v. 7, p. 1198–1202, 2001.

JARDIM, A. N. O., CALDAS, E. D. Chemical dietary exposure and the risks to human health. **Química Nova**, v.32, n.7, p. 1898-1909, São Paulo, 2009.

JARDIM, A.; CALDAS, E. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898–1909, 2009.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluations of the JECFA (2016). Disponível em: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx#/>. Acesso em: 23/10/2017.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2000). Furfural. <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3695> Acesso em: 12/11/2017.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Monographs & Evaluations (2017). Disponível em: <<http://www.inchem.org/pages/jecfa.html>>. Acesso em: 23/10/2017.

JENDRAL, J. A; MONAKHOVA, Y. B.; LACHENMEIER, D. W. Formaldehyde in alcoholic beverages: large chemical survey using purpald screening followed by chromotropic Acid spectrophotometry with multivariate curve resolution. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2011, p. 797604, 2011.

JEONG, H. *et al.* Validation and Determination of the Contents of Acetaldehyde and Formaldehyde in Foods. *Toxicological Research*, v. 31, n. 3, p. 273–278, 2015.

JEZIORNY, D.L. & ORTEGA, A.C. Inovação e performance competitiva na indústria vitivinícola brasileira (2012). Disponível em: <<http://www.fee.tche.br/sitefee/>> Acesso em: 18/10/2017.

JONKER, D. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with micro-encapsulated furfural. Unpublished report V99.520 from TNO, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by the *Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States*, 2000.

KÄCHELE, M. *et al.* NMR investigation of acrolein stability in hydroalcoholic solution as a foundation for the valid HS-SPME/GC-MS quantification of the unsaturated aldehyde in beverages. *Analytica Chimica Acta*, v. 820, n. July 2013, p. 112–118, 2014.

KOELEGA, H. S. Alcohol and vigilance performance: a review. *Psychopharmacology (Berl)*; v. 118, n. 3, p. 233-249, 1995.

LACHENMEIER, D. W. *et al.* Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: A risk factor for oral cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 125, p. 730-735, 2009.

LACHENMEIER, D. W., PRZYBYLSKI, M. C., REHM, J. Comparative risk assessment of carcinogens in alcoholic beverages using the margin of exposure approach. *International Journal of Cancer*, v. 131, n. 6, p. 995-1003, 2012.

LACHENMEIER, D. W.; KANTERES, F.; REHM, J. Carcinogenicity of acetaldehyde in alcoholic beverages: risk assessment outside ethanol metabolism. *Addiction*, v. 104, n. 4, p. 533-550, 2009.

LADEIRA, C. *et al.* Genotoxicity biomarkers in occupational exposure to formaldehyde - The case of histopathology laboratories. *Mutation Research*, v. 721, n. 1, p. 15-20, 2011.

LAGO, L. O. *et al.* Influence of ripeness and maceration of the grapes on levels of furan and carbonyl compounds in wine – Simultaneous quantitative determination and assessment of the exposure risk to these compounds. *Food Chemistry*; v. 230, p. 594-603, 2017.

LAJOVIC, A. *et al.* Carcinogenesis of Urethane: Simulation versus Experiment. *Chemical Research in Toxicology*, v. 28, n. 4, p. 691–701, 2015.

LAKE, B. G. *et al.* Lack of effect of furfural on unscheduled DNA synthesis in the in vivo rat and mouse hepatocyte DNA repair assays and in precision-cut human liver slices. *Food and Chemical Toxicology*, v. 39, n.10, p. 999-1011, 2001.

LIBERALE, L. *et al.* Impact of red wine consumption on cardiovascular health. *Current Medicinal Chemistry*; v. 24, 2017.

LINARES, D. M. *et al.* Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chemistry*, v. 197, p. 658–663, 2016.

LIPPI, G. *et al.* Moderate Red Wine Consumption and Cardiovascular Disease Risk: Beyond the “French Paradox”. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. v. 36, n. 1, p. 59-70, 2010.

LIU, S. Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 35, issue 1, p. 49–61, 2000.

MANETTA, A. C. *et al.* Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. *Food Control*, v. 62, p. 351–356, 2016.

MARTÍNEZ-GARCÍA, R. *et al.* Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO₂ pressure in sealed bottle. *Food Chemistry*, v. 237, p. 1030–1040, 2017.

MARTINS, P. A. Análises físico-químicas utilizadas nas empresas de vinificação necessárias ao acompanhamento do processo de elaboração de vinhos brancos. Trabalho de conclusão de curso. *Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves*, Bento Gonçalves, 2007.

MARTINS, S.I., JONGEN, W.M., BOEKEL, M.A. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.* v. 11, p. 364–373, 2001.

MELLO, DE R. M. L. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2011-2012. 1p. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf>>. Acesso em: 15/10/2017.

MELLO, L. M. R. DE. Panorama da produção de uvas e vinhos no Brasil. Informe Técnico. Embrapa Uva e Vinho, p. 1–3, 2017.

MENEGUZZO J. Caracterização físico-química e sensorial dos vinhos espumantes da Serra Gaúcha. Tese de doutorado. *Universidade de Caxias do Sul*, Caxias do Sul, 2010.

MERCK & Co, WINDHOLZ, M. The Merck Index: na encyclopedia of chemicals and drugs. 9 ed., 1952 p., USA, 1976.

MOCHIZUKI N., KITABATAKE K. Analysis of 1-(2-furyl)propane-1,2-diol, a furfural metabolite in beer. *J. Ferment. Bioeng.* v. 83, p. 401–403, 1997.

MONAKHOVA, Y. B., JENDRAL, J. A., LACHENMEIER, D. W. The margin of exposure to formaldehyde in alcoholic beverages. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. v. 63, n. 2, p. 227-237, 2012.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 268, n. 2, p. 157–177, 2013.

NAS. National Research Council (U.S.) Chemicals used in Food Processing. *National Academy of Sciences*; Washington DC, USA: 1965.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NAS). Toxicology and carcinogenesis studies of furfuryl alcohol (CAS No. 98-00-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). *Natl. Toxicol. Program Tech Rep Ser 482*, p.1–248, 1999.

NAYA, M.; NAKANISHI, J. Risk assessment of formaldehyde for the general population in Japan. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 43, n. 3, p. 232-248, 2005.

NIH (2017). U.S. National Library of Medicine (Toxnet). Furfuryl alcohol. Disponível em: <<http://www.toxnet.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 19/10/2017.

NÓBREGA, I. C. C. *et al.* Ethyl carbamate in cachaça (Brazilian sugarcane spirit): Extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation. *Food Chemistry*; v. 127, p. 1243-1247, 2011.

NÓBREGA, I. C. C. *et al.* Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions. *Food Chemistry*; v. 117, n. 4, p. 693-697, 2009.

NÓBREGA, I. C. C. *et al.* Improved sample preparation for GC–MS–SIM analysis of ethyl carbamate in wine. *Food Chemistry*, v. 177, p. 23–28, 2015.

NORLIANA, S. *et al.* The Health Risk of Formaldehyde to Human Beings. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. v. 4, n. 3, p. 98-106, 2009.

NTP (2017). U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/about/org/index.html>> Acesso em: 19/10/2017.

OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino). El mercado de los vinos espumosos; p. 1-9, Paris, France, 2014. Disponível em: <<http://www.oiv.int>> Acesso em: 18/10/2017.

OKARU, A. O., LECHENMEIER, D. W. The food and beverage occurrence of furfuryl alcohol and myrcene - two emerging potential human carcinogens? *Toxics*; v. 5, n. 1, p. 9, 2017.

PAIANO, V. *et al.* Risk assessment for the Italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages. *Food Chemistry*, v. 154, p. 26-31, 2014.

PAWLISZYN, J. Handbook of Solid Phase Microextraction. London: *Elsevier*, 2012.

PERESTRELO, R.; SILVA, C. L.; CÂMARA, J. S. Quantification of furanic derivatives in fortified wines by a highly sensitive and ultrafast analytical strategy based on digitally

controlled microextraction by packed sorbent combined with ultrahigh pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1381, p. 54–63, 2015.

PÉREZ-PRIETO L. J. *et al.* Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *J. Agric. Food Chem.* v. 51, p. 5444–5449, 2003.

POZO-BAYÓN, M. A. *et al.* Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51 n.7, p. 2089-2095, 2003.

RIBEIRO, P. R. *et al.* Furfural- Da biomassa ao laboratório de química orgânica. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1046–1051, 2012.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications. 2. ed. England: *John Wiley & Sons Ltd*, 2006.

RIBÉREAU-GAYÓN, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., & DUBOURDIEU, D. Tratado de enología: Microbiología del vino – vinificaciones y química del vino – estabilización y tratamientos. Buenos Aires: *Editorial Hemisferio Sur*; 1. Ed. p. 1.184, 2003.

RIU-AUMATELL, M., BOSCH-FUSTÉ, J., LÓPEZ-TAMAMES, E., & BUXADERAS, S. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*; v. 95, p. 237-242, 2006.

RIZZON L.A., MENEGUZZO J., ABARZUA C. Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola. 24 p. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2000.

RODRÍGUEZ-CABO, T. *et al.* Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry selective determination of ochratoxin A in wine. *Food Chemistry*, v. 199, p. 401–408, 2016.

ROM, O. *et al.* Acrolein increases macrophage atherogenicity in association with gut microbiota remodeling in atherosclerotic mice: protective role for the polyphenol - rich pomegranate juice. *Archives of Toxicology*, 2016.

SACHSE, B. *et al.* A hemoglobin adduct as a biomarker for the internal exposure to the rodent carcinogen furfuryl alcohol. *Arch. Toxicol.*, 2017.

SACHSE, B. *et al.* Bioactivation of food genotoxicants 5-hydroxymethylfurfural and furfuryl alcohol by sulfotransferases from human, mouse and rat: a comparative study. *Arch. Toxicol.*, v. 90, p. 137–148, 2016c.

SACHSE, B. *et al.* Ethanol and 4-methylpyrazole increase DNA adduct formation of furfuryl alcohol in FVB/N wild-type mice and in mice expressing human sulfotransferases 1A1/1A2. *Carcinogenesis*, v. 37, p. 314–319, 2016b.

SACHSE, B. *et al.* The effect of knockout of sulfotransferases 1a1 and 1d1 and of transgenic human sulfotransferases 1A1/1A2 on the formation of DNA Adducts from furfuryl alcohol in mouse models. *Carcinogenesis*, v. 35, p. 2339–2345, 2014.

SAIKO, P. *et al.* Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.*; 658, p. 68–94, 2008.

SATUÉ-GARCIA, M. T. *et al.* Spanish sparkling wines (Cavas) as inhibitors of in vitro human lowdensity lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 2198–2202, 1999.

SCHLATTER, J., DINOVI, M., SETZER, R. W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic Example: Ethyl carbamate. *Food and Chemical Toxicology*; v. 48, p. 63-68, 2010.

SEITZ, H. K., & STICKEL, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: Role of genetics in ethanol metabolism. *Genes & Nutrition*, v. 5, p. 121-128, 2010.

SETH, D. *et al.* Pathogenesis of alcohol-induced liver disease: classical concepts and recent advances. *J. Gastroenterol. Hepatol.*; v. 26, n. 7, p. 1089-1105, 2011.

SHEN, J. *et al.* Mediterranean Dietary Patterns and Cardiovascular Health. *Annual Review of Nutrition*; v. 35; p. 425-449, 2015.

SINFORIANI, E. *et al.* The effects of alcohol on cognition in the elderly: from protection to neurodegeneration. *Funct. Neurol.*, v. 26, v. 2, p. 103-106, 2011.

SOARES, R. D. *et al.* Monitoring the evolution of volatile compounds using gas chromatography during the stages of production of Moscatel sparkling wine. *Food Chemistry*; v. 183, p. 291–304, 2015.

SPILLMAN P. J. *et al.* Formation and degradation of furfuryl alcohol, 5-Methylfurfuryl alcohol, vanillyl alcohol, and their ethyl ethers in barrel-aged wines. *J. Agric. Food Chem.*; v. 46, p. 657–663, 1998.

STICH, H. F. Clastogenic activity of caramel and caramelized sugars. *Mutation Res.*, v. 91, p. 129-136, 1981.

SWASTI Y. R., MURKOVIC M. Characterization of the polymerization of furfuryl alcohol during roasting of coffee. *Food Funct.*; v. 3, p. 965–969, 2012.

SZENDE, B.; TYIHÁK, E. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. *Cell Biology International*, v. 34, p. 1273–1282, 2010.

TAMAMES, E. & BUXADERAS, S. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*; v. 105, n.1, p. 428-435, 2007.

TAO, Y. *et al.* A preliminary study about the influence of high hydrostatic pressure processing in parallel with oak chip maceration on the physicochemical and sensory properties of a young red wine. *Food Chemistry*; v. 194, p. 545–554, 2016.

TAKI, N. *et al.* Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*; v. 38, p. 498-505, 1992.

TAWATSIN, A.; THAVARA, U.; SIRIYASATIEN, P. Pesticides used in thailand and toxic effects to human health. *Medical Research Archives*, n. 3, p. 1–10, 2015.

VANDERHAEGEN, B. *et al.* Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry*; v.103, p. 404–412, 2007.

VAUZOUR, D. *et al.* Champagne wine polyphenols protect primary cortical neurons against peroxynitrite-induced injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; v. 55, p. 2854-2860, 2007.

VÁZQUEZ-AGELL, M. *et al.* Inflammatory markers of atherosclerosis are decreased after moderate consumption of Cava (sparkling wine) in men with low cardiovascular risk. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 10, p. 2279-2284, 2007.

VRIES, C. J. DE, *et al.* Determination of Volatile Phenol in Cabernet Sauvignon Wines, Made from Smoke-affected Grapes, by using HS-SPME GC-MS. *South African Journal of Enology and Viticulture*; v. 37, n. 1, p. 15–21, 2016.

WANG Y., KAYS S. J. Contribution of volatile compounds to the characteristic aroma of baked “Jewel” sweetpotatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*; v. 125, p. 638–643, 2000.

WELKE, J. E. *et al.* Main differences between volatiles of sparkling and base wines accessed through comprehensive two dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection and chemometric tools. *Food Chemistry*; v. 164, p. 427–437, 2014.

WELKE, J. E. *et al.* Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*; v. 1226, p. 124-139, 2012.

WHO Food Additives. Furfural (addendum) Series 46. Australia - New Zealand Food Authority, Canberra, Australia (2002). Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/>> Acesso em 18/11/2017.

WHO. Self-help strategies for cutting down or stopping substance use: a guide. France, 2010.

WHO. World Health Organization. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Geneva, Switzerland; 55th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001.

WHO/IPCS. Formaldehyde – Concise International Chemical Assessment Document 40. Geneva, 2002.

WIM. Wine in Moderation, 2017. Wine in Moderation. Disponível em: <<https://www.wineinmoderation.eu.>> Acesso em 15/11/2017.

WINEPROS (2017). Vincylopedia. Disponível em: <<http://www.winepros.org>> Acesso em: 20/10/2017.

WINES OF BRASIL (2017). Regiões. Disponível em: <<http://www.winesofbrasil.com/pt/brasilian-wine/region>> Acesso em: 15/11/2017.

YOKOYAMA, A. *et al.* Salivary Acetaldehyde Concentration According to Alcoholic Beverage Consumed and Aldehyde Dehydrogenase-2 Genotype. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 32, n. 9, 2008.

ZEA, L., SERRATOSA, M. P., JULIETA, M., MOYANO, L. Acetaldehyde as Key Compound for the Authenticity of Sherry Wines: A Study Covering 5 Decades. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; v. 12, n. 6, p. 681-693, 2015.

ZERIN, T. *et al.* Effects of formaldehyde on mitochondrial dysfunction and apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Cell Biology and Toxicology*; n. 31, p. 261–272, 2015.

ZHANG, D. *et al.* A novel miniaturised electrophoretic method for determining formaldehyde and acetaldehyde in food using 2-thiobarbituric acid derivatisation. *Food Chemistry*, v. 129, n. 1, p. 206–212, 2011.

ZHANG, J. *et al.* Simultaneous Determination of Ethyl Carbamate and Urea in Alcoholic Beverages by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, p. 2797–2802, 2014.

ZHAO, X. *et al.* Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends in Food Science and Technology*, Cambridge v. 32, p. 97-107, 2013.

ZHAO, J. *et al.* Development of a Novel Derivate Assay for Formaldehyde Determination by HPLC in Beer Samples. *Food Analytical Methods*, n. 229, 2015.