

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

Avaliação do efeito do processamento da cerveja nos níveis de compostos tóxicos e de voláteis relacionados ao aroma a partir da incorporação de uma camada extra de polidimetilsiloxano a uma fibra comercial de microextração em fase sólida

Karolina Cardoso Hernandes

Porto Alegre

2018

KAROLINA CARDOSO HERNANDES

Avaliação do efeito do processamento da cerveja nos níveis de compostos tóxicos e de voláteis relacionados ao aroma a partir da incorporação de uma camada extra de polidimetilsiloxano a uma fibra comercial de microextração em fase sólida

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof.^a Dra. Juliane Elisa Welke
Coorientadora: Prof.^a Dra. Claudia Alcaraz Zini

**Porto Alegre
2018**

CIP - Catalogação na Publicação

Hernandes, Karolina Cardoso

Avaliação do efeito do processamento da cerveja nos níveis de compostos tóxicos e de voláteis relacionados ao aroma a partir da incorporação de uma camada extra de polidimetilsiloxano à uma fibra comercial de microextração em fase sólida. / Karolina Cardoso Hernandez. -- 2018.

173 f.

Orientadora: Juliane Elise Welke

Coorientadora: Claudia Alcaraz Zini

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Compostos tóxicos em cervejas. 2. Aroma de cerveja. 3. Microextração em fase sólida no modo headspace. 4. Polidimetilsiloxano. I. Welke, Juliane Elise, orient. II. Zini, Claudia Alcaraz, coorient. III. Título.

Avaliação do efeito do processamento da cerveja nos níveis de compostos tóxicos e de voláteis relacionados ao aroma a partir da incorporação de uma camada extra de polidimetilsiloxano a uma fibra comercial de microextração em fase sólida

Karolina Cardoso Hernandes

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: ____/____/____

Homologada em: ____/____/____

Pela Comissão Examinadora:

Por:

Prof.^a Dra. Juliane Elisa Welke
Orientadora - PPGCTA/UFRGS

Prof Dr. Adriano Brandelli
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/ UFRGS)

Prof.^a Dra. Claudia Alcaraz Zini
Coorientadora - PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

Prof.^a Dra. Paula Rossini Augusti
Banca - PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Banca - PPGCTA/UFRGS

Prof.^a Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba
Banca – PPGQ/UFRGS

Aos meus pais, Carlos e Carla, pela dedicação a mim e à nossa família,

ao meu esposo, Paulo, por não medir esforços para a realização de meus sonhos,

à professora Dra. Juliane Lúcia Welke, pela confiança, incentivo e dedicação,

dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dra. Juliane E. Welke, e à minha coorientadora Prof.^a Claudia. A. Zini, pela orientação, incentivo e paciência dispensados a mim e a este trabalho, bem como, por terem me proporcionado condições de realizar esta pesquisa e serem exemplos de dedicação.

À Dra. Érica A. Souza-Silva, pelos ensinamentos e participação.

À Dra. Carolina F. Assumpção pela parceria e pela disposição em colaborar e responder todas as dúvidas que surgiram ao longo deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO/IQ) e do Laboratório de Toxicologia de Alimentos do ICTA, por me acolherem e compartilharem comigo conhecimentos, experiências, café e momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, seus professores e funcionários, ao ICTA e à Capes pelo suporte financeiro.

À Júlia Maciel pela ajuda com o tratamento de dados.

Aos membros da banca de avaliação por aceitarem o convite de participação e pelas contribuições.

Aos meus pais, Carlos e Carla, pelo apoio, às minhas irmãs, Júlia e Lara.

Ao meu esposo, Paolo, pelo incentivo.

À Heloísa G. Ribeiro pela ajuda.

RESUMO

Na microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME), técnica amplamente utilizada na análise de bebidas alcoólicas, incluindo cerveja, o etanol (composto majoritário nestas matrizes) causa o deslocamento de compostos minoritários, interferindo na performance desta técnica. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de voláteis relacionados ao aroma e de compostos tóxicos [incluindo acetaldeído, acroleína, carbamato de etila (CE), formaldeído, furfural e álcool furfurílico] nas etapas de elaboração da cerveja (mosturação, fervura, fermentação, maturação e pasteurização), através da adição de camada extra de polidimetilsiloxano (PDMS) à uma fibra comercial divinilbenzeno/Carboxen®/polidimetilsiloxano (DVB/Car/PDMS). A fibra revestida com uma camada adicional de PDMS apresentou capacidade extratora superior à fibra comercial, uma vez que extraiu um número maior de compostos (61 *versus* 45) e obteve-se área cromatográfica total 20% superior. O teor de etanol das soluções modelo (0, 4, 8 e 12%) não influenciou significativamente na quantidade de analitos extraída quando a fibra revestida foi utilizada, entretanto, o efeito do etanol foi observado em extrações realizadas pela fibra não modificada. O método apresentou linearidade, sensibilidade, repetibilidade e precisão intermediária adequadas. A mosturação destacou-se em relação às demais etapas pelos maiores teores de álcoois superiores. A fervura foi caracterizada pelos maiores níveis de produtos da reação de Maillard, enquanto que a fermentação, maturação e pasteurização foram discriminadas pela presença majoritária de ésteres. Além disso, alguns terpenos foram incorporados ao mosto durante a fervura ou fermentação. A fibra revestida com PDMS foi utilizada na quantificação simultânea de compostos tóxicos durante a elaboração de cerveja *ale* e *lager*. Acetaldeído, acroleína, formaldeído e álcool furfurílico foram encontrados em todos os estágios da elaboração de ambos tipos de cerveja, enquanto CE e furfural não foram detectados (níveis <LOD: 0,1 e 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). A fervura e a fermentação parecem ser etapas importantes na formação destes compostos, enquanto a maturação e a pasteurização reduzem seus níveis nas cervejas *ale* e *lager*. Além disso, a matéria-prima, a levedura e as condições de fermentação influenciam a formação e redução destes compostos durante a elaboração de cervejas. Entre as 30 amostras de cervejas *ale* e *lager* comercialmente disponíveis e avaliadas neste estudo, o acetaldeído foi encontrado em uma cerveja *ale* (1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$) e duas *lager* (1,3 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Acroleína foi detectada em uma cerveja *ale* (4,1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 8 *lager* (2,5-5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$). Formaldeído estava presente em níveis inferiores ao LOQ (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) em todas as amostras *ale* e superior ao LOQ em uma amostra *lager* (2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$). Furfural foi o composto tóxico

quantificado em níveis mais elevados, detectado em 3 amostras *ale* e 14 *lager*, em níveis variando de 417,7 a 4264,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,15 a 2403,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O álcool furfurílico foi detectado em todas as cervejas *ale* e *lager*, variando de 4,2 a 20,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 5,8 a 30,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Apenas a acroleína foi encontrada em níveis que podem representar risco para a saúde ($\text{MOE} < 10.000$) em uma amostra *ale* e em três amostras *lager*.

Palavras-chave: Cerveja; HS-SPME; PDMS; aroma; compostos carbonílicos.

ABSTRACT

In solid phase microextraction in headspace mode (HS-SPME), a technic widely used for the analysis of alcoholic beverages, including beer, ethanol (the major compound in these matrices) causes the displacement of minority compounds, interfering in the performance of this technic. The objective of this work was to evaluate the volatile levels related to aroma and toxic compounds [including acetaldehyde, acrolein, ethyl carbamate (EC), formaldehyde, furfural and furfuryl alcohol] in brewing stages (mashing, boiling, fermentation, maturation and pasteurization) by the addition of an extra layer of polydimethylsiloxane (PDMS) to a divinylbenzene/Carboxen®/polydimethylsiloxane (DVB/Car/PDMS) commercial fiber. The PDMS-overcoated fiber presented higher extractive capacity than the commercial fiber, since it extracted a greater number of compounds (61 versus 45) and obtained a total chromatographic area of 20% higher. The ethanol content of the model solutions (0, 4, 8 and 12%) did not significantly influence the quantity of analytes extracted when PDMS-overcoated fiber was employed, however, the ethanol effect was observed in extractions performed by the unmodified fiber. The method presented adequate linearity, sensitivity, repeatability and intermediate accuracy. Mashing was highlighted in relation to the other stages due to higher levels of higher alcohols. Boiling was characterized by the higher product levels of the Maillard reaction, while fermentation, maturation and pasteurization were discriminated by the presence of esters. In addition, some terpenes were incorporated into the wort during boiling or fermentation. The PDMS-overcoated fiber was employed in the simultaneous quantification of toxic compounds during ale and lager brewing. Acetaldehyde, acrolein, formaldehyde and furfuryl alcohol were found at all stages of brewing both types of beer, while EC and furfural were not detected (levels <LOD: 0.1 and 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively). Boiling and fermentation appear to be important steps in the formation of these compounds, while maturation and pasteurization reduce their levels in ale and lager beers. In addition, the raw material, yeast and fermentation conditions influence the formation and reduction of these compounds during brewing. Among the 30 samples of ale and lager commercially available and evaluated in this study, acetaldehyde was found in ale (1.8 $\mu\text{g L}^{-1}$) and two lager (1.3 and 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Acrolein was detected in one beer ale (4.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) and 8 lager (2.5-5.4 $\mu\text{g L}^{-1}$). Formaldehyde was present at levels lower than LOQ (1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) in all ale samples and higher than LOQ in one lager sample (2.6 $\mu\text{g L}^{-1}$). Furfural was the toxic compound quantified at higher levels, detected in 3 ale and 14 lager samples, at levels varying from 417.7 to 4264.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1.15 to 2403.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Furfuryl alcohol was detected in all ale and lager beers, ranging from 4.2 to

20.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 5.8 to 30.9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Only acrolein was found at levels which may represent a health risk (MOE <10,000) in 12.5 and 13.6% of ale and lager samples, respectively.

Key-words: Brewing; HS-SPME; PDMS; aroma; carbonyl compounds.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVOS.....	19
2.1.	Objetivo geral.....	19
2.2.	Objetivos específicos.....	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1.	Cerveja – dados de produção e consumo.....	20
3.2.	Classificação da cerveja.....	21
3.3.	Processamento de cerveja.....	24
3.4.	Compostos voláteis relacionados ao aroma de cervejas.....	26
3.4.1.	Compostos do malte.....	32
3.4.2.	Compostos do lúpulo.....	33
3.4.3.	Compostos provenientes da fermentação.....	33
3.5.	Compostos tóxicos encontrados em cerveja.....	36
3.5.1.	Acetaldeído.....	40
3.5.2.	Acroleína.....	41
3.5.3.	Carbamato de etila (CE).....	42
3.5.4.	Formaldeído.....	42
3.5.5.	Furfural.....	43
3.5.6.	Álcool furfúrico.....	44
3.6.	Avaliação do risco relacionado à exposição a compostos tóxicos.....	45
3.7.	Microextração em fase sólida.....	48
3.8.	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	52
4.	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	54
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	153
6.	CONCLUSÃO.....	161
	REFERÊNCIAS.....	162

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Total de cervejarias registradas por ano no Brasil.	21
Figura 2. Etapas de elaboração da cerveja.....	25
Figura 3. Vias anabólicas e catabólicas de formação de aldeídos e álcoois superiores.	34
Figura 4. Via metabólica da fermentação alcoólica a partir do ácido pirúvico com formação de acetaldeído e etanol.	40
Figura 5. Via metabólica de obtenção de acroleína a partir do glicerol.	41
Figura 6. Reação de formação do formaldeído via oxidação do metanol.	43
Figura 7. Etapas da extração por HS-SPME e dessorção térmica no cromatógrafo gasoso....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das cervejas de acordo com o Decreto nº 6871 de 2009 (BRASIL, 2009).....	22
Tabela 2. Método de extração, separação e detecção de compostos voláteis de cervejas com respectivo número de classes químicas e de compostos identificados nessa bebida e parâmetros de validação dos métodos empregados.....	28
Tabela 3. Informações estruturais dos compostos carbonílicos e do álcool furfurílico.	36
Tabela 4. Compostos tóxicos detectados em cervejas comercializadas em diversos locais, técnicas de extração e análise empregadas, parâmetros de validação de métodos analíticos e suas faixas de níveis de concentração detectados.....	38
Tabela 5. Valores de BMDL10 e respectivos efeitos tóxicos observados após exposição oral a alguns compostos genotóxicos que podem ser encontrados na cerveja.	46

LISTA DE ABREVEATURAS

ADI	Ingestão diária aceitável, do inglês: <i>acceptable daily intake</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMD	Dose de referência toxicológica, do inglês: <i>benchmark dose</i>
BMD10	Dose que causou aumento de 10% na incidência de tumores
BMDL10	Limite inferior do intervalo de confiança da dose que causou aumento de 10% na incidência de tumores, do inglês: <i>benchmark dose lower confidence limit</i>
CAR	Carboxen®
CE	Carbamato de etila
CERVBRASIL	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
CT	Concentração aceitável
CW	Carbowax (polietilenoglicol)
DI-SPME	Microextração em fase sólida no modo imersão direta, do inglês: <i>direct immersion solid phase microextraction</i>
DVB	Divinilbenzeno
DVB/Car/PDMS	Divinilbenzeno/Carboxen®/polidimetilsiloxano
EBC	Convenção Européia de Cervejarias, do inglês: <i>European Brewery Convention</i>
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês: <i>Environmental Protection Agency</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GC	Cromatografia gasosa, do inglês: <i>gas chromatography</i>
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês: <i>gas chromatography with mass spectrometric detection</i>
GC/MS-SIM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa no modo de monitoramento seletivo de íons, do inglês: <i>gas chromatography with mass spectrometric 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/MS	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês: <i>headspace solid phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, do inglês: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDE	Ingestão Diária Estimada
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química, do inglês: <i>International Programme on Chemical Safety</i>
IS	Padrão interno, do inglês: <i>internal standard</i>
JECFA	Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e pela Organização Mundial da Saúde, do inglês: <i>Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives</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 de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MOE	Margem de exposição, do inglês: <i>margin of exposure</i>
NOEL	Nível de efeito não observado, do inglês: <i>no observed effect level</i>
PA	Poliacilato
PC	Peso corpóreo
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
PMTDI	Ingestão diária tolerável máxima provisória, do inglês: <i>provisional maximum tolerable daily intake</i>
PTMI	Ingestão tolerável mensal provisória, do inglês: <i>provisional tolerable monthly Intaike</i>
PTWI	Ingestão tolerável semanal provisória, do inglês: <i>provisional tolerable weekly intake</i>
RI	Índice de retenção, do inglês: <i>retention index</i>
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SIM	Monitoramento de íons selecionados, do inglês: <i>selected ion monitoring</i>
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês: <i>solid phase microextraction</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês: <i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida popular e difundida mundialmente. Em 2016, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL, 2016), o setor da cerveja produziu cerca de 14 bilhões de litros, com perspectiva de expansão. De acordo com o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o ano de 2017 foi de grande consolidação do mercado cervejeiro nacional, sendo que o total de cervejarias legalmente registradas e instaladas no país chegou a 679. Neste período, o estado do Rio Grande do Sul ultrapassou São Paulo e se tornou o estado com mais cervejarias registradas, chegando a marca de 142 estabelecimentos. Este crescimento se deve principalmente às novas tendências de consumo, com destaque para as cervejas artesanais, nas quais o consumidor busca experimentar novos sabores e aromas (MAPA, 2018).

A preparação artesanal tem como foco a qualidade dos ingredientes, resultando na produção de diferentes tipos de cerveja com compostos de aroma e sabor variados (AQUILANI et al., 2015). Além disso, apesar do efeito tóxico do etanol (IARC, 1988; LOCONTE et al., 2018), alguns estudos têm relatado benefícios que o consumo moderado de cerveja pode proporcionar ao consumidor devido à presença de compostos benéficos, como os polifenóis (ARRANZ et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2017; SILVA et al., 2017)

Além da presença de compostos com propriedades funcionais, a qualidade da cerveja também está relacionada aos voláteis presentes na bebida, uma vez que estes influenciam no aroma e sabor. Estes compostos de aroma podem ser provenientes tanto da matéria-prima utilizada (RICHTER et al., 2017), quanto dos produtos da fermentação alcoólica (OCVIRK; MLINARIČ; KOŠIR, 2018).

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid phase micro extraction*) tem sido amplamente empregada na extração de compostos voláteis presentes em alimentos e bebidas alcoólicas, como por exemplo, as cervejas (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2016; CASTRO; ROSS, 2015; DA SILVA et al., 2015; RIU-AUMATELL et al., 2014). A SPME se baseia na absorção e/ou adsorção de analitos no revestimento de fibras extratoras, contudo está sujeita a algumas limitações que prejudicam a sua performance. Extrações feitas em matrizes complexas podem ser afetadas pelos constituintes da amostra. No modo *headspace* (HS), os compostos em elevadas concentrações e que possuam alta afinidade pelo revestimento da fibra podem provocar o deslocamento de compostos com menor afinidade pela fase extratora interferindo

no equilíbrio da extração, quando esta fase consiste em um polímero sólido (PAWLISZYN, 2009; RISTICEVIC et al., 2010). Além disso, compostos majoritários podem ser solubilizados na matriz da fase extratora, quando esta for um líquido, de forma a alterar as propriedades físico-químicas do material extrator. No modo de imersão direta (DI, do inglês, *direct immersion*), componentes da matriz, como por exemplo açúcares, ácidos graxos e pigmentos podem causar a incrustação da fase extratora, o que leva não apenas à diminuição da eficiência da extração, mas também reduz a vida útil do revestimento polimérico da fibra (SOUZA-SILVA; PAWLISZYN, 2012). Estas limitações da DI-SPME motivaram a adição de uma camada adicional de polidimetilsiloxano (PDMS) em fibras comerciais, especialmente a fibra de PDMS/divinilbenzeno (PDMS/DVB) e DVB/Carboxen®/PDMS (DVB/Car/PDMS) (SOUZA-SILVA et al., 2016; SOUZA-SILVA; PAWLISZYN, 2012, 2015). Por ser um revestimento líquido e não poroso, o PDMS sofre menos o efeito de incrustação dos componentes da matriz, quando comparado aos revestimentos sólidos (PAWLISZYN, 2009). Além disso, por ser apolar, o PDMS pode barrar a sorção excessiva de compostos altamente polares, deixando livres os sítios ativos dos demais revestimentos para a extração de compostos minoritários.

Poucos estudos têm se dedicado à quantificação dos compostos identificados na cerveja, sendo que a avaliação quantitativa é importante para determinar quais compostos influenciam no aroma/sabor (CASTRO; ROSS, 2015; MOREIRA et al., 2013). Além disso, o etanol, composto presente em maior concentração em bebidas alcoólicas, tem sido descrito na literatura como um importante interferente para a extração de compostos minoritários através da HS-SPME (CONNER et al., 1998; HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002; PÉREZ-OLIVERO et al., 2014; RODRÍGUEZ-BENCOMO et al., 2002; WHITON; ZOECKLEIN, 2000).

Durante o processamento da cerveja, além dos compostos desejáveis, compostos tóxicos podem estar presentes, os quais comprometem a qualidade desta bebida, bem como a segurança dos consumidores (BARTH, 2013). Em bebidas fermentadas, a presença de compostos carbonílicos é comum, visto que são compostos provenientes da contaminação ambiental dos cereais durante o cultivo, formados durante o metabolismo normal de leveduras ou através de reações que envolvem os compostos produzidos durante a fermentação. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês, *International Agency for Research on Cancer*) classificou, por exemplo, o acetaldeído ingerido especificamente através das bebidas alcoólicas como carcinogênico (grupo 1, evidências suficientes do potencial

carcinogênico em humanos). Semelhantemente, o formaldeído também se encontra no grupo 1, enquanto que o carbamato de etila está classificado como provavelmente carcinogênico (grupo 2A, evidências suficientes da carcinogenicidade em animais) e álcool furfurílico é considerado um possível carcinogênico para humanos (grupo 2B, evidências insuficientes da carcinogenicidade em animais). A IARC reconhece que ainda necessita de mais estudos para classificar a acroleína quanto à sua carcinogenicidade (grupo 3). Segundo informação desta Agência Internacional, a ocorrência de câncer crescerá mais de 75% até 2030 e estima-se que aproximadamente 60% dos casos desta doença estarão vinculados à dieta da população (IARC, 2016). Esta estimativa da IARC também se constitui em uma das motivações deste estudo, visto que existe a necessidade de prever estratégias para reduzir a exposição aos compostos tóxicos através da dieta, de maneira a evitar danos à saúde do consumidor, bem como evitar que o sistema público de saúde seja onerado.

Não há legislação, no Brasil ou em outros países, que estabeleça a concentração máxima dos compostos anteriormente citados em cerveja. A necessidade de estabelecimento de normas que regulamentem os limites máximos permitidos destes compostos em bebidas alcoólicas, incluindo a cerveja, torna esta área de pesquisa ainda mais relevante no que diz respeito à geração de dados sobre os níveis destes compostos, bem como no que tange à avaliação do risco de exposição através do consumo de bebidas alcólicas. Além dos dados relativos à quantificação de compostos potencialmente tóxicos produzidos durante a elaboração de cerveja serem escassos, até o momento, não há estudos dedicados a avaliar o risco da exposição a estes compostos através do consumo de cerveja.

Considerando que a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida e cuja produção têm aumentado no Brasil; existe a possibilidade de exposição aos compostos tóxicos em níveis superiores aos indicados como seguros à saúde humana; o aroma é um dos principais atributos relacionados à qualidade da cerveja; e o etanol pode prejudicar a extração de compostos da cerveja, verifica-se a necessidade de desenvolver um método analítico baseado na técnica de HS-SPME, que comporte uma camada adicional de PDMS aderida a uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS) para avaliar os compostos relacionados ao aroma e os compostos tóxicos presentes nessa bebida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito das etapas de elaboração da cerveja nos níveis de compostos tóxicos e de voláteis relacionados ao aroma através da adição de uma camada extra de PDMS à uma fibra comercial de SPME.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de uma fibra comercial de SPME na qual uma camada extra de PDMS foi adicionada para minimizar o efeito do etanol na extração de compostos voláteis;
- Verificar o efeito de 5 etapas da produção de cerveja artesanal (mosturação, fervura, fermentação, maturação e pasteurização) nos níveis de compostos voláteis que conferem aroma e de compostos carbonílicos e álcool furfurílico que apresentam potencial tóxico;
- Investigar se a exposição aos compostos carbonílicos e álcool furfurílico presentes nas amostras avaliadas representa risco para a saúde do consumidor.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cerveja – dados de produção e consumo

Segundo a legislação brasileira, cerveja é definida como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e de água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009). Esta bebida é o resultado da transformação de açúcares do malte em etanol, gás carbônico e centenas de outros compostos relacionados a aroma e sabor (PRIEST; STEWART, 2006).

Dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) mostram que a cerveja é a quinta bebida mais consumida no mundo, cujo consumo situa-se atrás apenas do chá, bebidas gaseificadas, leite e café (FAOSTAT, 2018). A cerveja é considerada uma bebida popular e seu consumo é atrativo devido as suas propriedades organolépticas e baixo custo, que pode ser menor do que o de outros tipos de bebidas alcoólicas como, por exemplo, o vinho (AQUILANI et al., 2015; BAMFORTH; RUSSELL; STEWART, 2009).

O brasileiro consome em média 62 litros de cerveja por ano, ocupando a 17ª posição no *ranking* mundial, que tem a República Tcheca em 1º lugar, com 143 litros per capita. O Brasil é o terceiro produtor mundial desta bebida (14 bilhões de litros por ano), atrás apenas dos Estados Unidos e China e superando Rússia e Alemanha. Cabe salientar que as cervejas artesanais têm conquistado cada vez mais espaço no mercado brasileiro, pois enquanto o mercado de cervejas produzidas em larga escala cresce à taxa média de 5% ao ano, o de cervejas artesanais cresce pelo menos 20% anualmente (SICOBÉ, 2016).

Na última década, verificou-se o crescimento exponencial no número de cervejarias registradas junto ao MAPA (Figura 1). Apenas entre 8 de abril e 17 de maio de 2016, o número de cervejarias registradas aumentou de 320 para 397 (MAPA, 2016). Em 2017, esse número apresentou um crescimento de 71%, passando para 679 estabelecimentos. A distribuição geográfica das cervejarias permanece concentrada na região Sul e Sudeste, com 287 e 279 registros, respectivamente. O estado do Rio Grande do Sul é o que apresenta o maior número de cervejarias registradas (142 estabelecimentos), seguido por São Paulo (124), Minas Gerais (87), Santa Catarina (78), Paraná (67) e Rio de Janeiro (57) (MAPA, 2018).

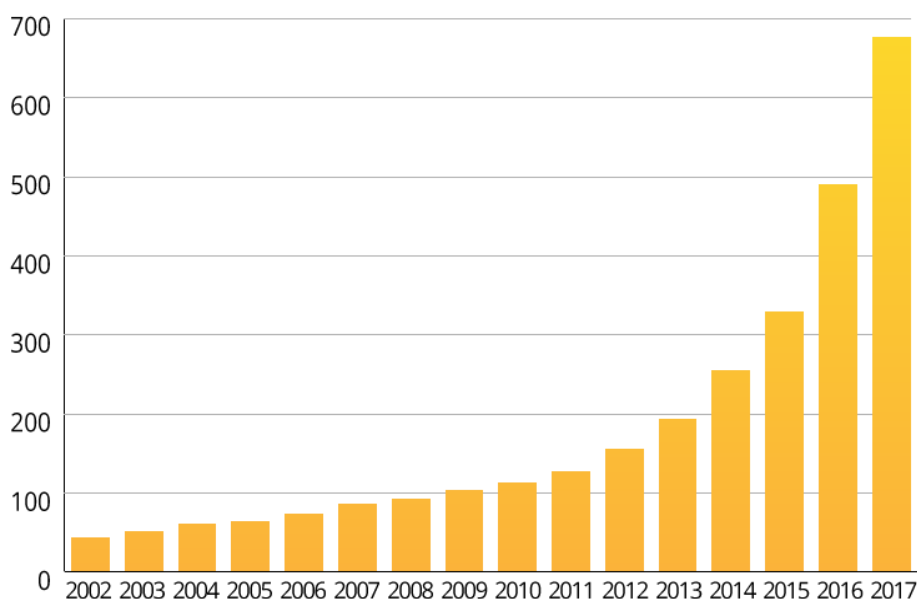


Figura 1. Total de cervejarias registradas por ano no Brasil.

Fonte: (MARCUSO; MULLER, 2018)

O aumento do número de cervejarias deve-se especialmente ao crescente consumo de cervejas artesanais produzidas em microcervejarias. Cabe destacar que se enquadram como microcervejarias, os estabelecimentos que possuem produção anual de até 10 milhões de litros (BRASIL, 2015). Segundo o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), a matéria-prima é o grande diferencial das cervejas artesanais e também um grande desafio, pois as grandes indústrias absorvem a cevada nacional, sendo que cerca de 90% da matéria-prima (malte) utilizado na produção das cervejas artesanais é importada (SEBRAE, 2016). Aquilani et al. (2015) verificaram que a cerveja artesanal é percebida pelos consumidores como sendo de qualidade superior à cerveja produzida em larga escala.

3.2. Classificação da cerveja

Há várias formas de se classificar uma cerveja. A Tabela 1 mostra a classificação da cerveja de acordo com características do processamento e do produto acabado, de acordo o Decreto nº 6871 de 2009 do governo brasileiro. Este decreto regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas (BRASIL, 2009). Esta classificação se aplica tanto às cervejas produzidas em larga escala quanto às cervejas artesanais e se baseia nos seguintes

critérios: extrato primitivo (quantidade de substâncias presentes no mosto que deu origem à cerveja), cor, teor alcoólico, fermentação e proporção de malte. Tais parâmetros são importantes tanto para o produtor da cerveja quanto para o consumidor, uma vez que auxiliam no controle e na padronização da bebida.

Tabela 1. Classificação das cervejas de acordo com o Decreto nº 6871 de 2009 (BRASIL, 2009).

Extrato primitivo	
Leve	Acima de 5,0% até 10,5% em massa
Comum	Acima 10,5% até 12,5% em massa
Extra	Acima de 12,5% até 14,0% em massa
Forte	Acima de 14,0% em massa
Cor	
Clara	Menos de 20 unidades EBC (<i>European Brewery Convention</i>)
Escura	20 ou mais unidades EBC
Teor alcoólico	
Sem álcool	Menos de 0,5% em volume de etanol
Alcoólica	Igual ou maior do que 0,5% em volume de etanol
Fermentação	
Alta fermentação (12-15 °C)	
Baixa fermentação (5-10 °C)	
Proporção de malte de cevada	
Cerveja de puro malte	100% em peso de malte de cevada
Cerveja	pelo menos 50% em peso de malte de cevada
Cerveja de ... (nome do vegetal predominante)	Quando a cerveja possuir proporção de malte de cevada entre 20 e 50% em peso, além de outro tipo de cereal maltado. Ex: trigo

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2009)

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus*, são utilizadas para a elaboração de cervejas de alta fermentação (chamadas de *Ale*) e baixa fermentação (nomeadas como *Lager*) (ESSLINGER, 2009). Nas cervejas de alta fermentação, as leveduras *S. cerevisiae* permanecem flutuando no topo do tanque de fermentação durante o processo, que ocorre em temperaturas entre 15 e 25 °C, por período de 3 a 6 dias. Como resultado obtém-se uma bebida mais encorpada, com sabores e aromas mais perceptíveis. Nas cervejas de baixa fermentação, o processo ocorre por um período maior (variando de 5 a 10 dias) em temperaturas entre 7 e 14 °C. Nessa condição as leveduras *S. pastorianus* ficam depositadas no fundo do tanque de

fermentação, resultando em cervejas leves e de coloração clara (BUGLASS, 2011; BUIATTI, 2009).

Dentro da definição de cerveja, diferentes estilos da bebida podem ser encontrados. Além do tipo de fermentação, o método de produção e a variedade do malte, do lúpulo e de outros ingredientes que possam ser empregados na elaboração da cerveja irão conferir características próprias à cada estilo da bebida. As principais diferenças entre os estilos de cerveja se referem quanto à cor, ao aroma e ao teor alcoólico da bebida (PREEDY, 2009; PRIEST; STEWART, 2006). Dentre os principais estilos de cervejas disponíveis, pode-se destacar:

- *Pilsener (pilsen ou pils)* - é a mais conhecida e consumida no mundo. Tem sabor delicado e leve, é clara (o malte não é torrado e não se empregam aditivos escuros como o caramelo) e de teor alcoólico entre 3,0 e 5,0 %.
- *Bock* – tem sabor mais pronunciado e encorpado e é geralmente de cor escura por usar malte torrado e caramelado. É originária da cidade de Einbeck, na Alemanha. Tem teor alcoólico mais elevado frente à Pilsener (4,0 – 6,0%).
- *Malzbier* – cerveja escura e doce, de graduação alcoólica entre 3,0 e 4,5 %. Na Alemanha, país de origem, é hoje tratada como bebida energética. Após a filtração, são adicionados caramelo e xarope de açúcar, responsáveis pela coloração escura e pelo sabor adocicado, respectivamente.
- *Munchner Dunkel* – cerveja escura/avermelhada (a coloração é proveniente do malte tostado), produzida originalmente em Munique, de onde vem o seu nome. Era a única cerveja da região da Baviera (Alemanha) antes da chegada das tecnologias que tornaram possível a criação de cervejas claras.
- *Bitter* - cerveja de cor de cobre a ouro, com amargor médio, caráter frutado, corpo leve a médio e doçura de malte residual baixa a média.
- *Pale Ale* – cerveja cuja cor varia do dourado profundo ao cobre. O lúpulo de variedade americana é usado para produzir característico amargor, sabor e aroma. O sabor e o aroma de ésteres frutados são de moderados a fortes.
- *Stout* - originária da Irlanda, ela é feita com malte torrado, o que explica sua cor escura e possui um sabor que associa o amargo do lúpulo ao adocicado do malte. É elaborada com extrato primitivo de 15 % e possui teores de etanol de 4,0 a 6,0%.

- *Porter* - é uma cerveja mais suave que a Stout e também é elaborada com malte torrado, entretanto contém de 1,0 a 2,0 % a menos de etanol.
- *Weiss* - é feita à base de trigo, mas pode conter milho e até mesmo frutas. É característica do sul da Alemanha (Baviera). São cervejas claras, bastante refrescantes e de graduação alcoólica na faixa de 5,0 a 6,0%. São opacas porque normalmente não são filtradas após a fermentação e a maturação. Produzem, em geral, uma espuma densa e persistente (PREEDY, 2009; PRIEST; STEWART, 2006).

3.3. Processamento de cerveja

As etapas da produção de cerveja estão representadas esquematicamente na Figura 2 e incluem: moagem do malte; brasagem (que é dividida em mosturação e fervura), filtração, fermentação, maturação, envase e pasteurização.

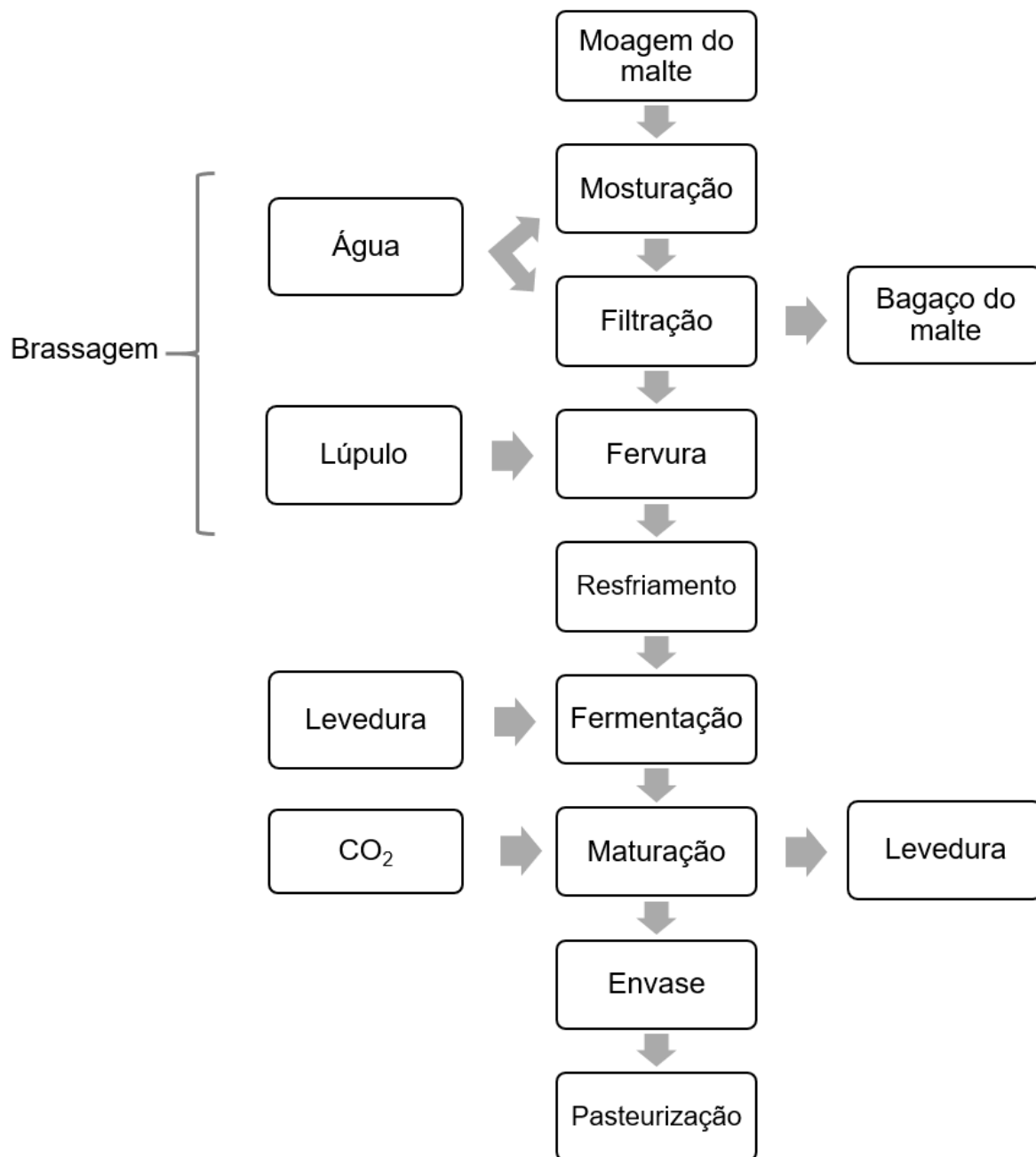


Figura 2. Etapas de elaboração da cerveja.

Fonte: Autoral

(i) O malte utilizado na elaboração de cervejas artesanais deve ser moído para promover o aumento da superfície de contato entre o grão e a água no preparo do mosto. A **moagem** ocorre até que o malte fique descascado, com a parte do amido exposta, para facilitar as próximas etapas da produção;

(ii) A primeira etapa da **brasagem** é chamada de **mosturação** (fase de preparo do mosto), que consiste em misturar o malte moído com água a 68 °C, promovendo a hidratação do grão e a ativação enzimática. O objetivo principal desta etapa é a transformação do amido em açúcares fermentáveis, como maltose e glicose.

(iii) Posteriormente, ocorre a **filtração** para separar a fase sólida (bagaço) e líquida (mosto).

(iv) A **fervura** é a etapa seguinte, que é realizada para promover a esterilização do mosto contra micro-organismos que possam competir com a levedura e causar sabores e aromas indesejáveis e também para provocar a coagulação de proteínas e taninos, que possam interferir na estabilidade da bebida. Além disso, o aquecimento promove a concentração de açúcares e remoção de voláteis indesejáveis por evaporação. Nesta etapa, o lúpulo é adicionado com a finalidade de conferir amargor e aroma à cerveja;

(v) Depois do **resfriamento**, o mosto segue para a **fermentação**, na qual leveduras são adicionadas ao líquido para conversão de parte dos açúcares em álcool e gás carbônico.

(vi) A etapa seguinte é a **maturação**, que é realizada a baixas temperaturas para que ocorra a decantação de impurezas e neutralização de compostos indesejáveis, contribuindo para a clarificação da cerveja e melhoria do seu sabor. Neste período, CO₂ é inserido nos tanques.

(vii) Por fim, o material decantado é retirado, o **envase** é realizado em garrafas, que passam por pasteurização, ou em barris (AQUARONE; ALMEIDA LIMA; BORZANI, 1983; BAMFORTH, 2007; BUGLASS, 2011; PRIEST; STEWART, 2006).

Uma vez que as etapas de produção da cerveja são as mesmas para todos os tipos desta bebida, o diferencial entre um produto e outro consiste, basicamente, na matéria prima empregada (tipo, origem, quantidade). Nesse sentido, além das matérias-primas obrigatórias, definidas no Decreto nº 6871 de 2009 (BRASIL, 2009), outros ingredientes podem ser utilizados na elaboração da cerveja, como frutas, ervas e especiarias, que podem conferir sabor, aroma e características específicas à bebida (SEBRAE, 2016).

3.4. Compostos voláteis relacionados ao aroma de cervejas

A qualidade de bebidas alcoólicas, em geral, é influenciada por atributos de aroma, considerados críticos para a aceitação global da bebida pelos consumidores (PLUTOWSKA; WARDENCKI, 2008). O aroma é determinado por compostos voláteis percebidos pelo olfato e a sua percepção é resultado de múltiplas interações entre compostos químicos e receptores

sensoriais (FISK, 2015). A intensidade de uma sensação olfativa não depende apenas da concentração dessas substâncias na fase líquida, mas também da sua volatilidade e de seu limiar de percepção olfativo (a concentração mínima na qual uma substância odorífera é detectada) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999).

A composição do aroma da cerveja depende da qualidade e tipo das matérias-primas, bem como das condições de processamento (PLUTOWSKA; WARDENCKI, 2008). Centenas de voláteis têm sido detectados em cervejas (Tabela 2), incluindo compostos pertencentes a classes dos ésteres, álcoois, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos, compostos contendo furano, compostos aromáticos, heterocíclicos e compostos que contém enxofre (ALVIM et al., 2017; ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2016a; CASTRO; ROSS, 2015; CASTRO; ROSS; VIXIE, 2015; DA SILVA et al., 2015; DONG et al., 2015; HE et al., 2018; MOREIRA et al., 2013; NEŠPOR et al., 2018; OCVIRK; MLINARIČ; KOŠIR, 2018; PLUTOWSKA; WARDENCKI, 2008; RIU-AUMATELL et al., 2014; SAISON et al., 2009a). Estes estudos têm sido focados principalmente em cervejas produzidas em larga escala (Tabela 2).

Castro et al. (2015), por exemplo, identificaram 105 compostos voláteis, entre ésteres, álcoois, terpenos, aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos e cetonas em cervejas (sem especificar o tipo de cerveja) comercializadas nos Estados Unidos. Riu-Aumatell et al. (2014), no estudo de cervejas com diferentes graduações alcoólicas comercializadas na Espanha identificaram 59 compostos voláteis. Ésteres, álcoois e ácidos estavam presentes em maiores quantidades em cervejas com graduação alcoólica entre 4,5% e 5,5%. As cervejas livres de álcool (menos de 1% de etanol) e com baixo teor alcoólico (menos de 3,0% de etanol) foram caracterizadas pela presença majoritária de compostos derivados da torrefação do malte, incluindo pirazinas e furanos, e compostos voláteis derivados do óleo essencial do lúpulo, como por exemplo, os terpenos. Alvim et al. (2017), identificaram 109 compostos, entre álcoois, ésteres, cetonas, aldeídos, ácidos e terpenos, em diferentes cervejas *lager* e *ale* brasileiras. A análise dos componentes principais (PCA) mostrou que as cervejas possuem perfil volátil semelhante, com predominância de ésteres e álcoois superiores. Além disso, não foram observados compostos presentes exclusivamente em cervejas *ale* ou *lager*.

Tabela 2. Método de extração, separação e detecção de compostos voláteis de cervejas com respectivo número de classes químicas e de compostos identificados nessa bebida e parâmetros de validação dos métodos empregados.

Procedência e tipo das amostras	Tipo de produção	Extração ^h	Separação e detecção ⁱ	Número de compostos e classes químicas identificadas	Concentração detectada e validação do método				Referência	
					Conc. ^j (mg L ⁻¹)	LOD ^L (mg L ⁻¹)	LOQ ^m (mg L ⁻¹)	Recup. ⁿ (%)		
Brasil	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	24	NQ	-	-	-	Alvim et al., 2017
				Álcoois	12					
				Ácidos	9					
				Aldeídos	8					
				Cetonas	4					
				Terpenos	38					
Hidrocarbonetos	4									
Slováquia	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Álcoois	9	NQ	-	-	-	Ocvirk; Mlinarič; Košir, 2018
				Ésteres	9					
				Outros	33					
China	Escala Laboratorial	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	4	0,4-14,4	NI	NI	NI	He et al., 2018
				Álcoois	4	20,1-80,9				
				Aldeídos	1	9,4				
República Tcheca	NI	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	10	0,05-22,01	0,0003-0,1190	0,008-0,5778	91,0-104,9	Nešpor et al., 2018
				Ácidos	3	5,76-13,01	0,0058-0,0425	0,0515-0,2293	86,5-102,0	
				Álcoois	5	6,01-24,23	0,0345-0,2595	0,0903-1,2379	89,5-95,6	
				Terpenos	1	0,02-0,06	0,0018	0,0048	89,7	
Espanha ^a	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Aldeído	8	0,05-229,0	NI	NI	NI	Andrés-Iglesias et al., 2016
				Cetona	2	7,17-252,76				
República Tcheca ^a	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Aldeído	8	0,11-174,39	NI	NI	NI	Andrés-Iglesias et al., 2016
				Cetona	2	2,25-345,64				
Estados Unidos ^a	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Éster	2	NQ	0,17	NI	85,62-96,28	Castro; Ross, 2015
				Hidrocarboneto	1		0,21		97,41	
				Aldeído Aromático	1		0,23		83,24	
Estados Unidos ^a	Larga escala	SBSE	GC/FID	Éster	2	NQ	0,07-0,09	NI	90,07-102,18	Castro; Ross, 2015
				Hidrocarboneto	1		0,11		99,91	
				Aldeído Aromático	1		0,08		98,9	
Estados Unidos –	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	9	NQ	-	-	-	Castro; Ross; Vixie, 2015
				Álcoois	5					

Cerveja tipo <i>Ale</i> ^b				Ácidos	3					
				Hidrocarbonetos	3					
				Aldeídos	1					
				Alicíclicos	7					
				Aromáticos	5					
				Cetonas	1					
Estados Unidos - Cerveja tipo <i>Lager</i> ^c	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	11					
				Álcoois	7					
				Ácidos	3					
				Hidrocarbonetos	2					
				Aldeídos	1	NQ	-	-	-	Castro; Ross; Vixie, 2015
				Alicíclicos	13					
				Aromáticos	8					
				Cetonas	2					
				Compostos de enxofre	1					
				Compostos heterocíclicos	2					
Estados Unidos – Cerveja de Trigo ^d	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	14					
				Álcoois	3					
				Ácidos	2					
				Hidrocarbonetos	3	NQ	-	-	-	Castro; Ross; Vixie, 2015
				Compostos alicíclicos	5					
				Compostos aromáticos	3					
				Compostos heterocíclicos	1					
Estados Unidos – Cerveja tipo <i>IPA</i> ^e	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	18					
				Álcoois	7					
				Ácidos	3	NQ	-	-	-	Castro; Ross; Vixie, 2015
				Hidrocarbonetos	8					
				Compostos alicíclicos	11					
				Compostos aromáticos	3					
Estados Unidos – Cerveja tipo <i>Stout</i> ^f	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	12					
				Álcoois	4					
				Ácidos	3					
				Hidrocarbonetos	6	NQ	-	-	-	Castro; Ross; Vixie, 2015
				Aldeídos	1					
				Compostos alicíclicos	6					
				Compostos aromáticos	3					
				Compostos heterocíclicos	1					
Portugal – Cerveja tipo <i>Lager</i> ^c	NI	HS-SPME	GC/MS	Alcanos	8	0,083-10,6	0,003-0,054	0,011-0,164		Moreira et al., 2013
				Alcenos	4	0,010-4,61	0,009-0,510	0,010-1,55	NI	
				Aldeídos de Strecker	6	0,592-25,6	0,029-0,059	0,087-0,180		

				Dialdeídos	3	2,12-38,4	0,020-0,046	0,061-0,140		
				Cetonas	5	0,022-0,931	0,009-0,025	0,026-0,076		
				Furanos	3	1,68-2109	1,54-3,44	4,58-10,4		
Portugal - Cerveja tipo 100% malte ^g	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres alifáticos	27					
				Álcoois	8					
				Aldeídos	8					
				Cetonas	6					
				Ácidos	6					
				Éteres	4	NQ	-	-	-	Pinho; Ferreira; Santos, 2006
				Hidrocarbonetos	11					
				Compostos de enxofre	1					
				Compostos alicíclicos	8					
				Compostos aromáticos	16					
				Compostos hetrocíclicos	7					
Portugal – Cerveja de trigo ^d	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres alifáticos	21					
				Alcóis	10					
				Aldeídos	8					
				Cetonas	7					
				Ácidos	6	NQ	-	-	-	Pinho; Ferreira; Santos, 2006
				Éteres	3					
				Hidrocarbonetos	15					
				Compostos alicíclicos	8					
				Compostos aromáticos	17					
				Compostos hetrocíclicos	8					
				Portugal – Cerveja de trigo ^d	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres alifáticos	23	
Alcóis	11									
Aldeídos	11									
Cetonas	5									
Ácidos	5									
Éteres	3	NQ	-					-	-	Pinho; Ferreira; Santos, 2006
Hidrocarbonetos	13									
Compostos sulfúricos	2									
Compostos alicíclicos	7									
Compostos aromáticos	18									
Compostos hetrocíclicos	26									
Portugal – Cerveja de trigo sem álcool ^d	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres alifáticos	16				Pinho; Ferreira; Santos, 2006	
				Álcoois	7					
				Aldeídos	11	NQ	-	-	-	
				Cetonas	7					
				Ácidos	9					
				Éteres	1					

				Hidrocarbonetos	13					
				Compostos alicíclicos	3					
				Compostos aromáticos	13					
				Compostos hetrocíclicos	7					
Portugal – Cerveja tipo 100% malte sem álcool ^g	Larga escala	HS-SPME	GC/MS	Ésteres	12					
				Álcoois	6					
				Aldeídos	6					
				Cetonas	5					
				Ácidos	10	NQ	-	-	-	Pinho; Ferreira; Santos, 2006
				Éteres	1					
				Hidrocarbonetos	5					
				Compostos alicíclicos	1					
				Compostos aromáticos	9					
				Compostos hetrocíclicos	7					

Fonte: Autoral

Notas:

^a Tipo de cerveja não informado pelos autores; ^b Cerveja de alta fermentação; ^c Cerveja de baixa fermentação; ^d Cerveja de alta fermentação à base de trigo, de coloração clara e teor alcoólico médio; ^e Cerveja de alta fermentação, com maior adição de lúpulo e teor alcoólico, de sabor amargo e aromática; ^f Cerveja de coloração escura, geralmente de baixa fermentação dotada de forte sabor de chocolate, café e malte torrado, com pouca carbonatação e teor alcoólico elevado; ^g Cerveja de baixa fermentação sem adição de adjuntos substituintes ao malte, possuem sabor e amargor um pouco mais acentuados, com leves notas de lúpulo; ^h Métodos de extração: HS-SPME: microextração em fase sólida no modo headspace; SBSE: extração sortiva em barra de agitação; ⁱ Métodos de separação e detecção: GC/MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; GC-FID: cromatografia gasosa com detector por ionização de chama; ^j Concentração, NQ: Não quantificado; ^L Limite de Detecção; ^m Limite de Quantificação; ⁿ Recuperação; NI: não informado pelos autores.

3.4.1. Compostos do malte

A influência da matéria-prima na qualidade da cerveja é importante, uma vez que seus constituintes atuam como precursores da formação de compostos voláteis. O aroma e sabor dos produtos de malte derivam da composição química da cevada e do modo como é processada durante a malteação (transformação do grão de cereal em malte) (BARTH, 2013).

A malteação pode ser dividida em três etapas consecutivas: maceração, germinação e secagem. A maceração tem por finalidade fornecer aos grãos a umidade necessária para estimular a germinação do embrião, aumentando o teor de água de 13-15% para 43-46%. Durante a maceração, e principalmente durante a germinação, os grãos de cevada produzem enzimas hidrolíticas (β -glucanases e amilases) que levam a modificações na estrutura do grão, tornando-o mais macio e solúvel em água (MAYOLLE et al., 2012). A hidrólise do amido é necessária para que a fermentação alcoólica ocorra a partir de açúcares fermentáveis, como glicose e maltose. As condições de temperatura, umidade e aeração são controladas e o processo é interrompido tão logo o grão tenha iniciado o desenvolvimento de uma nova planta. O grão de cereal germinado é denominado de malte verde. Na etapa seguinte, o malte verde é seco (ou torrado) para reduzir o teor de água para 4,0–5,0%, o que interrompe as reações bioquímicas (PRIEST; STEWART, 2006). Dong et al. (2013) identificaram 47 compostos voláteis no malte seco, incluindo aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos e furanos. Os níveis de 2-metil propanal (aroma de solvente), 3-metil butanal (aroma de malte), 2-metil butanal (aroma de coco) e 2-nonenal (aroma de gordura, pepino e papel) aumentaram na torrefação do malte, enquanto a concentração de hexanal (aroma de grama e gordura) e 2-hexenal (aroma verde e maçã) diminuíram nesta etapa.

O grau de coloração do malte adquirido durante a secagem se correlaciona positivamente com a formação de quantidades crescentes de produtos de reação de Maillard (HUGHES, 2009). Esta reação ocorre entre açúcares e aminoácidos livres em temperaturas superiores a 60 °C e leva à formação de compostos derivados do furano, como furfural e álcool furfurílico (VANDERHAEGEN et al., 2004). Além disso, durante a reação de Maillard, o oxigênio dos anéis de furano pode ser substituído por enxofre ou nitrogênio, levando à formação dos tiofenos e pirróis, respectivamente. Tais compostos apresentam aroma característico de cebola, sendo assim, são indesejados em cervejas (HUGHES, 2009). Além disso, a torrefação do malte, em temperatura superior a 200 °C, leva à degradação térmica do ácido ferúlico a 4-vinilguaiacol

(aroma característico de queimado ou cravo) (COGHE et al., 2004). Assim, ao mesmo tempo em que a torrefação é responsável pelo aumento de aroma indesejáveis, ela é crucial para o desenvolvimento de aromas adocicados e torrados, que são de grande interesse em alguns estilos de cerveja, como por exemplo Bock e Stout.

3.4.2. Compostos do lúpulo

O lúpulo utilizado na fabricação de cerveja é a flor seca da planta fêmea de uma trepadeira pertencente ao gênero *Humulus*, com ocorrência natural em zonas temperadas da Europa, dos Estados Unidos e da China. A presença do lúpulo é essencial para as características organolépticas da cerveja (aroma), estabilidade do sabor e retenção da espuma (BUGLASS, 2011). O lúpulo é adicionado ao mosto durante a fervura e transfere a este, compostos como os terpenos e α -ácidos. Enquanto os terpenos conferem à cerveja o aroma típico de lúpulo, os α -ácidos isomerizados são responsáveis pelo amargor (BAMFORTH, 2007; OBERHOLSTER; TITUS, 2016).

Na cerveja, o aroma de lúpulo é influenciado pela origem (solo e clima), cultivar, e por biotransformações que ocorrem durante a fermentação (KISHIMOTO et al., 2006; PRAET et al., 2012). A biotransformação de terpenos é dependente da sua concentração no lúpulo e da atividade metabólica da cepa de levedura utilizada. De acordo com King e Dickison (2003), tanto as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* (usadas para produzir cervejas *ale* e *lager*, respectivamente) podem transformar linalol (aroma floral) e nerol (aroma fresco, verde) em α -terpineol (aroma de pêsego); e geraniol (aroma floral) em citronelol (aroma frutado e floral). Entretanto, apenas as leveduras *lager* têm a capacidade de transformar geraniol e citronelol nos seus respectivos ésteres terpenóides; acetato de geranilo e acetato de citronelilo (ambos de aroma frutado e floral) (KING; DICKINSON, 2003).

3.4.3. Compostos provenientes da fermentação

Durante a fermentação, as leveduras produzem compostos relacionados ao aroma e sabor da cerveja. O teor desses compostos depende das condições do processamento (BAMFORTH; RUSSELL; STEWART, 2009), sendo que as principais classes de produtos da fermentação incluem: álcoois, ésteres, ácidos, aldeídos e cetonas.

O etanol produzido pelas leveduras durante a fermentação é o composto volátil majoritário das cerveja alcoólicas (AQUARONE; ALMEIDA LIMA; BORZANI, 1983). Este composto está presente nas cervejas alcoólicas em níveis pelo menos duas ordens de grandeza maiores do que qualquer outro álcool. Além disso, o etanol pode influenciar na percepção do aroma de outros componentes da bebida (HUGHES, 2009). Além do etanol, outros álcoois podem ser formados pelas vias metabólicas das leveduras, mostradas na Figura 3. Na produção de álcoois superiores (álcoois com massa molecular superior à do etanol) pela via catabólica de Ehrlich, aminoácidos sofrem uma desaminação, com transferência do grupamento amino para os α -cetoácidos. Em seguida, o α -cetoácido é descarboxilado ao seu respectivo aldeído e reduzido a álcool (Figura 3). Pela via anabólica, α -cetoácidos são formados quando carboidratos são catabolizados em aminoácidos. Após descarboxilação e redução, os α -cetoácidos são transformados nos álcoois superiores correspondentes (PIRES et al., 2014). Os álcoois superiores mais importantes na composição do aroma de bebidas fermentadas, incluindo a cerveja, são: álcool isoamílico (aroma alcoólico, banana), propílico (aroma alcoólico), isobutílico (solvente) e o 2-fenil-etanol (aroma doce, rosa). Além de contribuírem para o aroma da cerveja, os álcoois superiores também são precursores de ésteres (SAERENS et al., 2008).

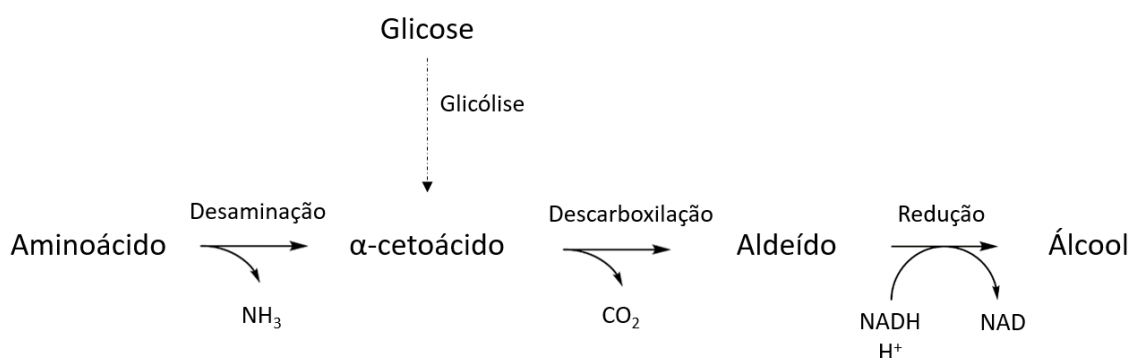


Figura 3. Vias anabólicas e catabólicas de formação de aldeídos e álcoois superiores e etanol.

Adaptado de: Pires et al. (2014).

Os ésteres são formados pela condensação enzimática de ácidos orgânicos e álcoois. A contribuição deste grupo para o sabor e aroma de bebidas é grande, uma vez que são caracterizados, principalmente, pelo odor de frutas, com destaque para acetato de isoamila (aroma de banana), acetato de isobutila (aroma frutado), fenil acetato de etila (rosas e aroma de

mel), hexanoato de etilo (aroma de maçã doce) e octanoato de etila (aroma de maçã azeda) (VERSTREPEN et al., 2003).

Os ácidos podem ser derivados do mosto e podem ser produzidos durante a fermentação como resultado do metabolismo da levedura. Ácidos orgânicos de cadeia curta ($< C_6$) são produzidos por leveduras a partir de aminoácidos. Os ácidos graxos de cadeia média (C_6 - C_{12}) resultam do anabolismo de ácidos graxos de cadeia longa sob condições anaeróbicas e/ou são liberados pelo mecanismo de autólise celular. Os ácidos graxos de cadeia longa ($> C_{12}$) da cerveja se originam principalmente do mosto (BRÁNYIK et al., 2008).

Os ácidos podem contribuir tanto positiva quanto negativamente no aroma de cervejas. Os ácidos graxos de cadeia média, como os ácidos hexanoico, octanoico e decanoico são descritos por suas características de aroma rançoso (PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006), enquanto que para o ácido nonanoico foi atribuído aroma floral, frutado e doce (NICOLLI et al., 2018).

Os aldeídos podem ser formados durante a preparação do mosto, a partir da reação de Maillard e de oxidação lipídica, ou a partir de vias metabólicas da síntese de etanol, durante a fermentação, como produto intermediário (BAERT et al., 2012). O acetaldeído (aroma de maçã verde, frutado) é o principal aldeído presente na cerveja devido à sua importância como intermediário na formação de etanol e acetato (PRIEST; STEWART, 2006). Pode-se destacar ainda outros aldeídos com importância para o aroma, como por exemplo (*E*)-2-nonenal (papelão, pepino), hexanal (enjoado), fenilacetaldéído (floral) e benzaldeído (amêndoa).

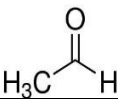
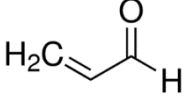
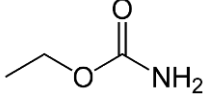

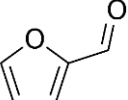
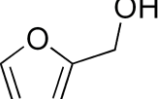
As cetonas são formadas através da descarboxilação oxidativa não enzimática de ácidos intermediários na via de biossíntese da valina e da isoleucina (ROSSI et al., 2014). Apesar das concentrações de cetonas serem geralmente muito baixas em cerveja fresca, estes compostos tem uma contribuição importante e principalmente indesejada para o perfil de aroma por causa de seus descritores sensoriais (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2016a). O diacetil (2,3-butanodiona) e a 2,3-pentanodiona, também chamadas de dicetonas vicinais, são consideradas as cetonas mais importantes em cervejas e apresentam aroma amanteigado, rançoso e mofado (KROGERUS; GIBSON, 2013).

3.5. Compostos tóxicos encontrados em cerveja

Na elaboração da cerveja, além dos voláteis relacionados ao aroma, outros compostos também podem ser formados, incluindo os compostos carbonílicos (acetaldeído, formaldeído, carbamato de etila, furfural e acroleína) e o álcool furfurílico que têm sido descritos como tóxicos (CARRILLO; BRAVO; ZUFALL, 2011; GONÇALVES et al., 2010; HU; WANG, 2015; LACHENMEIER et al., 2010; LI et al., 2009; MOREIRA et al., 2013; SAISON et al., 2008, 2009a; TIAN, 2010; VANDERHAEGEN et al., 2003; ZHAO et al., 2015).

A Tabela 3 apresenta a fórmula molecular e estrutural, bem como a massa molecular dos compostos carbonílicos e álcool furfurílico. A toxicidade destes compostos pode ser atribuída a sua natureza eletrofílica, e conseqüente possibilidade de interagir com os sítios nucleofílicos do DNA, o que caracteriza a genotoxicidade (BELAND et al., 2005; CHURCHWELL et al., 2015; COSTA et al., 2015; DING et al., 2012; JANZOWSKI et al., 2003; LACHENMEIER; MONAKHOVA, 2011; NOMURA et al., 1996; WANG et al., 2009, 2012).

Tabela 3. Informações estruturais dos compostos carbonílicos e do álcool furfurílico.

Composto	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	MM (g/mol) ^a
Acetaldeído	C ₂ H ₄ O		44,05
Acroleína	C ₃ H ₄		56,06
Carbamato de etila	C ₃ H ₇ NO ₂		89,08
Formaldeído	CH ₂ O		30,03
Furfural	C ₅ H ₄ O ₂		96,07
Álcool furfurílico	C ₅ H ₆ O ₂		98,10

^a Massa molecular

A Tabela 4 apresenta os níveis detectados de compostos tóxicos em cervejas de diferentes estilos e procedências, as técnicas de extração, de separação e de detecção, bem como os parâmetros de validação dos métodos analíticos empregados. Não foram encontrados na literatura, estudos que avaliaram estes compostos tóxicos em cervejas artesanais e/ou em cervejas brasileiras. Estudos têm sido conduzidos com cervejas provenientes da China, Venezuela e países da Europa (CARRILLO; BRAVO; ZUFALL, 2011; GONÇALVES et al., 2010; MOREIRA et al., 2013; RIU-AUMATELL et al., 2014; SAISON et al., 2009b; VANDERHAEGEN et al., 2003), sendo o furfural o composto mais avaliado em cervejas. Além disso, os estudos desenvolvidos até o momento são voltados para a avaliação do efeito do envelhecimento de cervejas sobre os níveis de compostos carbonílicos e derivados do furano (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2016a; GONÇALVES et al., 2010; MIKYŠKA et al., 2011; MOREIRA et al., 2013). A HS-SPME e a cromatografia gasosa acoplada ao detector espectrométrico de massas (GC/MS) foram as técnicas de extração e quantificação mais empregadas, respectivamente. É importante registrar que nenhum estudo desenvolvido até o momento objetivou determinar simultaneamente os compostos com potencial genotóxico que podem ser encontrados na cerveja, incluindo os carbonílicos, furfural e álcool furfurílico, embora determinações de alguns destes compostos, individualmente, em cerveja já tenham sido reportadas (DENG et al., 2016; KÄCHELE et al., 2014; KUCHARCZYK; TUSZYNSKI, 2016; LI et al., 2017, 2009; LIU et al., 2018; TIAN, 2010; TSAI; KAO, 2012; ZHAO et al., 2015).

Tabela 4. Compostos tóxicos detectados em cervejas comercializadas em diversos locais, técnicas de extração e análise empregadas, parâmetros de validação de métodos analíticos e suas faixas de níveis de concentração detectados.

Tipo de cerveja	Tipo de produção	Procedência das amostras	Técnica de extração ^f	Método de separação e detecção ^g	Parâmetros de validação			Níveis detectados ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
					LOD ⁱ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^j ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recup ^l (%)		
Furfural									
NI	Larga escala	China	SPE	HPLC	5	NI	99.7–100.1	10 - 90	Li; Yang; Yang, 2009
Várias marcas ^{a,b}	Larga escala	Portugal	GDME	HPLC–UV	1,5	4,9	NI	NQ	Gonçalves et al., 2010
<i>Pilsner</i> ^b <i>Amber</i> ^c	NI	Bélgica	HS-SPME	CG/MS	2,791	9,304	NI	20,9 – 282,2 62,43 – 346,0	Saison et al., 2008
<i>Blond</i> ^c <i>Pilsner</i> ^b	Larga escala	Venezuela	SPME	GC/MS	1,60	5,20	97-102	43,53 – 522,76 25,7 – 59,3	Carrillo; Bravo; Zufall, 2011
NI Baixo teor de álcool ^d Sem álcool ^e <i>Ale</i> ^c	Larga escala	Espanha	HS-SPME	CG/MS	NI	NI	NI	0,87 ± 0,73 2,04 ± 0,97	Riu-aumatell et al., 2014
	NI	Bélgica	P&T	GC/MS	NI	NI	NI	3,53 ± 1,41 48 - 2535	Vanderhaegen et al., 2003
Álcool furfurílico									
NI Baixo teor de álcool ^d Sem álcool ^e <i>Ale</i> ^c	Larga escala	Espanha	HS-SPME	CG/MS	NI	NI	NI	0,95 ± 0,17 0,78 ± 0,45	Riu-Aumatell et al., 2014
	NI	Bélgica	P&T	GC/MS	NI	NI	NI	1,16 ± 0,20 2342 - 4321	Vanderhaegen et al., 2003
Acetaldeído									
Várias marcas ^{a,b}	Larga escala	Portugal	GDME	HPLC–UV	12,3	41	NI	NQ	Gonçalves et al., 2010
<i>Ale</i> ^c	NI	Bélgica	P&T	GC/MS	NI	NI	NI	1052-3961	Vanderhaegen et al., 2003
Acroleína									
<i>Lager</i> ^b	NI	Portugal	HS-SPME	GC/MS	0,510	1,55	NI	0,976 – 4,61	Moreira et al., 2013
<i>Lager</i> ^b	NI	Bélgica	HS-SPME	GC/MS	0,24	0,81	NI	1,37 ± 0,13	Saison et al., 2009
Carbamato de etila									

<i>Lager</i> ^b	NI	China	SPE	GC/MS	NI	NI	NI	2 - 3	Wu et al., 2012
Formaldeído									
<i>Lager</i> ^b	Larga escala	China	SD	HPLC	< 3	NI	NI	0,062 - 0,453	Hu; Wang, 2015
NI	Larga escala	China	SPE	HPLC-DAD	0,016	0,042	91,3-104,3	NQ	Zhao et al., 2015

Fonte: Autoral

Notas:

^a Marcas: Pilsner Urquell, Bud-Weiser Budvar, Staropramen, Stella Artois, Zatec Xantho E Heineken; ^b Cerveja de baixa fermentação; ^c Cerveja de alta fermentação; ^d Cerveja de baixo teor alcoólico (<3% etanol); ^e Cerveja sem álcool (<1% etanol); ^f Método de extração: SPE: Extração em fase sólida; GDME: Microextração por difusão gasosa; HS-SPME: Microextração em fase sólida no modo *headspace*; P&T: Extração e concentração por purga e armadilha; SD: Destilação por arraste de vapor; ^g Separação e detecção: HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; HPLC–UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta; CG/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; HPLC-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de diodos;^h Derivatizante: PFBHA: O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride; DNPH: 2,4-Dinitrophenylhydrazine; EAHC: Ethoxyamine hydrochloride; ND: Não derivatizado; NI: Não informado pelos autores; NQ: Não quantificado; ⁱ Limite de detecção; ^j Limite de quantificação; ^l Recuperação.

3.5.1. Acetaldeído

Em bebidas alcólicas, este aldeído pode ser produzido durante a fermentação a partir da descarboxilação do ácido pirúvico, proveniente da glicólise. A oxidação do etanol e de compostos fenólicos por ação das leveduras também pode levar à formação do acetaldeído (PAIANO et al., 2014).

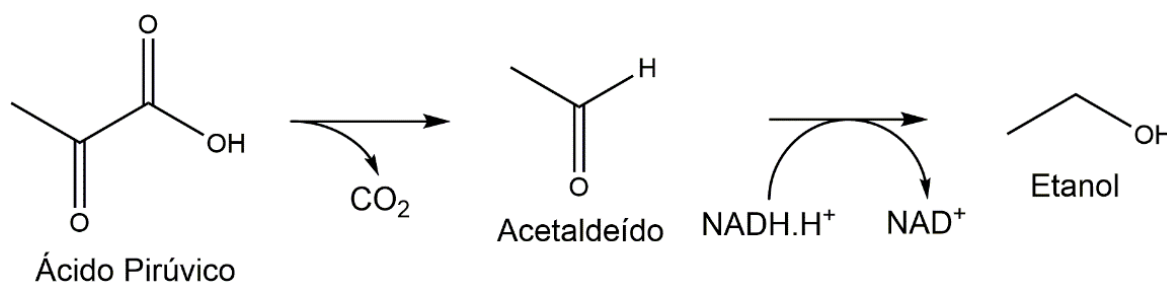


Figura 4. Via metabólica da fermentação alcoólica a partir do ácido pirúvico com formação de acetaldeído e etanol.
 Fonte: Adaptado de Azevêdo et al. (2007)

O consumo de etanol resulta na produção imediata de pequenas quantidades de acetaldeído na cavidade oral devido aos microrganismos presentes na saliva. Além disso, etanol pode ser oxidado a acetaldeído no fígado através da enzima álcool desidrogenase (ADH) (LACHENMEIER; KANTERES; REHM, 2009) e no cérebro, através de vias que envolvem a catalase, o citocromo CYP2E1 e a ADH (HERNÁNDEZ; LÓPEZ-SÁNCHEZ; RENDÓN-RAMÍREZ, 2016).

O acetaldeído presente nas bebidas alcólicas pode ocasionar sintomas relacionados à dores de cabeça, queda da pressão sanguínea e náuseas (LACHENMEIER; KANTERES; REHM, 2009). Seitz e Stickel (2010), ao revisarem estudos sobre os mecanismos de mutagenicidade e carcinogenicidade do acetaldeído, relataram que a exposição a este composto pode aumentar o risco de câncer no trato aerodigestivo superior (cavidade oral, faringe, laringe e esôfago), fígado, intestino grosso e mama (SEITZ; STICKEL, 2010).

Na indústria de bebidas, é importante conhecer as concentrações de acetaldeído, pois este tem papel central na manifestação da intoxicação alcoólica. Não há legislação nacional, nem internacional que estabeleça limites máximos para o acetaldeído em

cerveja. Contudo, para bebidas destiladas no Brasil, admite-se valores máximos de aldeídos totais, expressos em quantidade de acetaldeído em cada 100 mL de etanol anidro: aguardente 30 mg, conhaque 40 mg, graspa 80 mg, destilado simples de uva 40 mg e pisco 200 mg (BRASIL, 2005, 2010).

3.5.2. Acroleína

A acroleína, também chamada de aldeído acrílico ou 2-propenal, é produzida a partir do glicerol, conforme ilustrado na Figura 5. O glicerol, um dos principais compostos resultantes da fermentação alcoólica pela ação das leveduras, é transformado a 3-hidróxipropanal (3-HPA) pela enzima glicerol desidratase; em seguida ocorre a redução a 1-3-propanodiol ou conversão à acroleína (AZEVEDO et al., 2007).

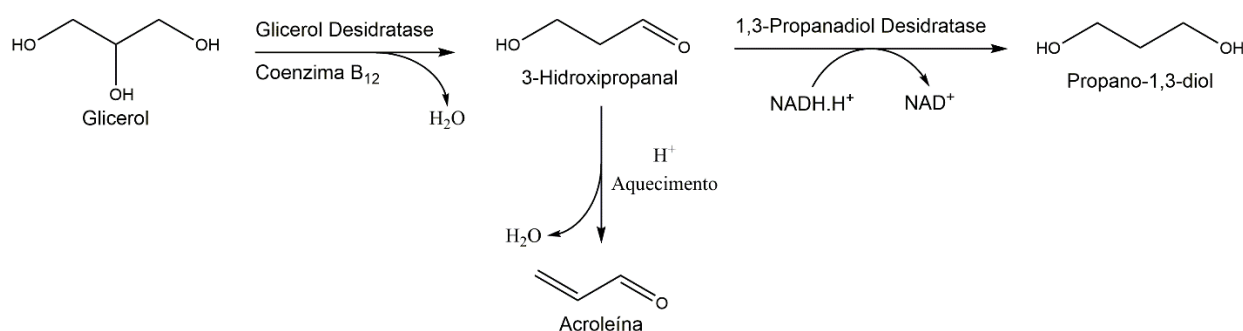


Figura 5. Via metabólica de obtenção de acroleína a partir do glicerol.

Fonte: Azevêdo et al. (2007)

A exposição à acroleína por via oral pode causar mal-estar abdominal, diarreia e vômito (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, a exposição à acroleína pode ter relação com a ocorrência do Mal de Alzheimer (NAN; ARSENEAULT; RAMASSAMY, 2010), diabetes (FEROE; ATTANASIO; SCINICARIELLO, 2016) e potencializar o risco de incidência de doenças cardiovasculares (DEJARNETT et al., 2014).

3.5.3. Carbamato de etila (CE)

O CE, também chamado de uretano, 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. Entretanto, a via mais comum de formação em bebidas fermentadas ocorre a partir da ureia. A levedura *S. cerevisiae* produz arginase, enzima capaz de catabolizar a arginina do malte, resultando na formação da ureia (EFSA, 2007).

Cui et al. (2016) verificaram que no fígado, o CE pode ser oxidado pelas enzimas do citocromo P450, transformando-o em epóxido de vinil carbamato, o que caracteriza a genotoxicidade deste éster. A 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 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*), 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⁻¹, enquanto que, quando ocorre a ingestão de bebidas alcólicas somadas ao consumo desses outros alimentos, a exposição diária pode chegar a 80 mg kg⁻¹ de PC (JECFA, 2016).

3.5.4. Formaldeído

O formaldeído, conhecido também por metanal, formol e aldeído fórmico, é considerado a forma mais simples de um aldeído (CH₂O). Esse composto forma-se a partir da foto-oxidação do metano (Figura 6) e está naturalmente presente no ambiente urbano, pois é liberado em processos de combustão, incluindo escapamentos automotivos e atividades industriais. Incêndios florestais e erupções vulcânicas também estão relacionados à emissão de formaldeído para o ambiente. 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).

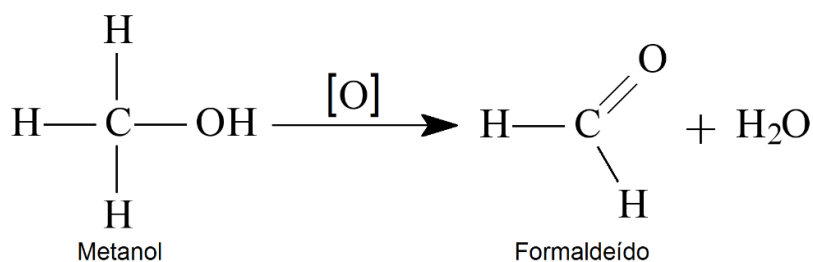


Figura 6. Reação de formação do formaldeído via oxidação do metanol.

Fonte: autoral (2018)

O formaldeído presente nas bebidas alcóolicas, pode ser formado durante a fermentação alcóolica através da oxidação do metanol, que se origina da hidrólise da pectina (IPCS, 2002). Este composto, assim como os demais compostos carbonílicos que podem ser encontrados na cerveja, tem capacidade em formar adutos com o DNA, RNA e proteínas (SZENDE; TYIHÁK, 2010; ZERIN et al., 2015). Estudos relacionaram a exposição ao formaldeído por via oral com à ocorrência de úlceras no trato gastrointestinal e a sua inalação pode causar alterações respiratórias como irritação da mucosa bucal, olhos e nariz (NAYA; NAKANISHI, 2005; NORLIANA et al., 2009). Arkeman (2008) associou a ingestão do formaldeído à necrose das camadas superficiais 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 (ARKEMAN; ARKEMAN, 2008).

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 de 2600 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a presença de formaldeído em alimentos e bebidas alcóolicas. Este limite foi baseado no nível de efeito não observado (NOEL, do inglês: *no observed effect level*) de 260.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, que foi estabelecido, considerando-se a ocorrência de danos histopatológicos em ratos expostos por via oral ao formaldeído (IPCS, 2002).

3.5.5. Furfural

O furfural é um aldeído heterocíclico e aromático, também denominado 2- furano carboxialdeído, furaldeído, 2-furanaldeído, fural e furfuraldeído. Resulta da desidratação

de pentoses e é produzido durante a reação Maillard. Sua formação está correlacionada com a cor da cerveja, sendo que quanto maior for a concentração do furfural, mais escura é a cerveja (VANDERHAEGEN et al., 2007).

Em relação à toxicidade, Lake et al. (2001) associaram a exposição oral diária ao furfural via gavagem (administração de composto através de um tubo até o estômago) à necrose e inflamação crônica do fígado, além da ocorrência de adenoma e carcinoma hepatocelulares, em ratos e camundongos.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não reconhece o uso do furfural e do álcool furfurílico como aditivos alimentares. Além disso, não há legislação que estabeleça níveis máximos destes compostos em cervejas. Apenas para aguardente composta são previstos valores máximos do somatório de furfural e hidróxi metil furfural de 5 mg em cada 100 mL de álcool anidro (MAPA, 2010).

3.5.6. Álcool furfurílico

O álcool furfurílico é também conhecido por furfural álcool, 2-furilmetanol e 2-furancarbinol. Este álcool ocorre em alimentos processados termicamente, como resultado da redução enzimática ou química do furfural. O principal mecanismo de formação do álcool furfurílico em cervejas é através da degradação térmica da maltose via reações de Maillard, durante a secagem e torrefação do malte e durante a fervura do mosto (VANDERHAEGEN et al., 2004). Em condições ácidas, o álcool furfurílico se polimeriza resultando na coloração marrom dos alimentos (SWASTI; MURKOVIC, 2012).

A exposição por inalação ao álcool furfurílico pode provocar dor de cabeça, náuseas e irritação na boca e no estômago (CDC, 2018). 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 em culturas de células dos ovários de hamster. O mecanismo postulado de carcinogenicidade do composto se dá através da ativação por sulfotransferases, resultando na formação de um aduto de 2-metilfuranil-DNA, conforme verificado em ratos submetidos a doses de 400 mg kg⁻¹ de peso corpóreo via injeção intraperitoneal (SACHSE et al., 2014, 2016).

Em cervejas, Riu-Aumatell et al. (2004) encontraram níveis de álcool furfurílico entre 0,78 e 1,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ e Vanderhaegen et al. (2004) demonstraram o efeito da reação de Maillard durante o armazenamento desta bebida ao verificar um aumento de 93% nos níveis de álcool furfurílico nas cervejas após esta etapa. Embora em 2017 a IARC tenha classificado o álcool furfurílico como possível carcinogênico para humanos, cuja monografia está em fase de preparação, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos considera o consumo do álcool furfurílico e de derivados furanos como seguro quando usados como flavorizantes em alimentos (EFSA, 2016).

3.6. Avaliação do risco relacionado à exposição a compostos tóxicos

A avaliação do risco causado pela exposição humana às substâncias tóxicas presentes na dieta é amplamente reconhecida como um processo fundamental no desenvolvimento de padrões alimentares seguros. Esta ferramenta é importante para o processo de tomada de decisão sobre questões relacionadas à segurança dos alimentos, através da qual pode-se identificar um problema potencial, avaliar a probabilidade da sua ocorrência, estimar o seu impacto e sugerir medidas para solucioná-lo (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008; LIU et al., 2013).

A avaliação da exposição aos compostos tóxicos ingeridos através do consumo de cerveja pode ser feita através do cálculo da ingestão diária estimada (IDE) segundo a equação 1:

$$IDE(\mu\text{g kg}^{-1} \text{ PC dia}^{-1}) = \frac{\text{concentração do composto } (\mu\text{g mL}^{-1}) \times \text{consumo de cerveja } (\text{mL dia}^{-1})}{\text{peso do indivíduo } (\text{kg})}$$

Equação 1

A determinação experimental da concentração de um composto tóxico é o primeiro passo para avaliar o risco da exposição relacionado ao consumo da cerveja. Como dados de consumo da cerveja, pode-se considerar o consumo moderado dessa bebida que têm sido associado na literatura à efeitos benéficos, como sendo de até 1 dose de 300 mL de cerveja (~13,5 g de etanol) para mulheres e duas doses para homens por dia (POLI et al., 2013). Cabe ressaltar que o conceito de consumo moderado é relativo e discutido entre

os pesquisadores, variando de um copo (250 mL) até uma garrafa por dia (600 mL) (ARRANZ et al., 2012; NARDINI et al., 2006). O peso corpóreo médio de 60 kg pode ser utilizado para expressar os resultados em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PC.

A caracterização do risco relacionado à exposição aos compostos genotóxicos é feita através do cálculo da margem de exposição (MOE, do inglês: *margin of exposure*) segundo a equação 2:

$$MOE = \frac{\text{referência toxicológica}}{\text{exposição}} = \frac{BMDL10 (\mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1})}{IDE (\mu\text{g kg}^{-1} \text{ pc dia}^{-1})}$$

Equação 2

Para fins de cálculo da MOE, é adotado que a exposição ao composto genotóxico equivale à sua IDE (equação 1). A dose que causou um aumento de 10% na incidência de um efeito tóxico (BMD10, do inglês, *benchmark dose lower confidence limit*) relacionado à exposição oral de animais a um determinado composto tem sido usada na literatura como referência toxicológica para calcular a MOE (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de BMDL10 e respectivos efeitos tóxicos observados após exposição oral a alguns compostos genotóxicos que podem ser encontrados na cerveja.

Composto	BMDL10 (mg kg^{-1} de PC dia ⁻¹)	Efeito tóxico	Referência
Formaldeído	28	Gastrite crônica em ratos	Monakhova; Jendral; Lachenmeier, 2012
Acetaldeído	56	Tumores em ratos (mamários, estomacais, intestinais, testiculares)	Lachenmeier; Kanteres; Rehm, 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; Dinovi; Setzer, 2010

A MOE pode ser usada para classificar substâncias genotóxicas de acordo com o risco, indicando o nível de preocupação para estabelecimento de 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 igual ou maior que 10.000 tem sido proposto como uma indicação de uma situação de risco pouco preocupante sob a ótica de saúde pública (BENFORD et al., 2010; BOOBIS et al., 2013).

A caracterização do risco da exposição humana a substâncias não genotóxicas é realizada pela comparação entre a IDE (calculada de acordo com a equação 1) e o parâmetro de ingestão segura determinado pelo JECFA. Estima-se risco quando a IDE ultrapassa esse parâmetro (BOOBIS et al., 2013; JARDIM; CALDAS, 2009).

Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura, para as substâncias que não são genotóxicas, estão a ingestão diária aceitável (ADI, do inglês: *acceptable daily intake*), 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 (ADI 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 ADI. 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 (JARDIM; CALDAS, 2009).

O JECFA estabeleceu uma ADI de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de PC para compostos que contém furano na sua estrutura como furfural, álcool furfúrico, acetato de furfurila, propionato de furfurila, pentanoato de furfurila, octanoato de furfurila, 3-metil butanoato de furfurila, 2-furoato de metila, 2-furoato de propila, 2-furoato de amila, 2-furoato de hexila e 2-furoato de octila, 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 álcool furfurílico e furfural em alimentos e bebidas. Entretanto, a IARC classificou recentemente o álcool furfurílico como possível carcinogênico para humanos, cuja monografia está em fase de preparação (IARC, 2017), o que resultará possivelmente em mudança no parâmetro de ingestão segura estabelecido para este composto pelo JECFA.

3.7. Microextração em fase sólida

Técnicas apropriadas de preparação de amostras devem ser suficientemente rápidas, de fácil manipulação, baixo custo e compatíveis com instrumentos analíticos diversos. A microextração em fase sólida (SPME, do inglês: *solid phase microextraction*) tem sido aplicada com sucesso à análise de voláteis relacionados ao aroma, bem como na determinação de contaminantes em diversos tipos de amostras (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015). Esta técnica se baseia no estabelecimento de um equilíbrio entre o analito e um revestimento de fase extratora, que pode ser um polímero, um sorvente sólido ou a combinação de ambos, que se encontra sobre uma fibra de sílica fundida. A SPME combina a extração e a concentração dos analitos em uma única etapa, dispensa o uso de solventes e requer uma pequena quantidade de amostra, diminuindo o tempo de extração e reduzindo custos, além de ser considerada ambientalmente correta (PAWLISZYN, 2009).

O procedimento de extração e dessorção da amostra por SPME é mostrado Figura 7. Semelhantemente a uma seringa, uma fibra SPME consiste em uma haste de sílica fundida ligada a um êmbolo de aço inoxidável. A ponta da haste de sílica é revestida com um polímero e é protegida dentro de uma agulha oca. Quando o êmbolo é pressionado, a haste e o respectivo polímero são expostos e a amostra é coletada por absorção e/ou adsorção, dependendo do tipo de revestimento. Após um tempo de exposição adequado, a fibra é retraída para dentro do êmbolo metálico e em seguida é inserida no injetor do cromatógrafo, quando o êmbolo é novamente pressionado para expor o polímero contendo os analitos. Uma vez no injetor aquecido, os compostos extraídos são dessorvidos termicamente e arrastados pela fase móvel do cromatógrafo para a coluna de separação (ORMSBY, 2005; RISTICEVIC et al., 2010)

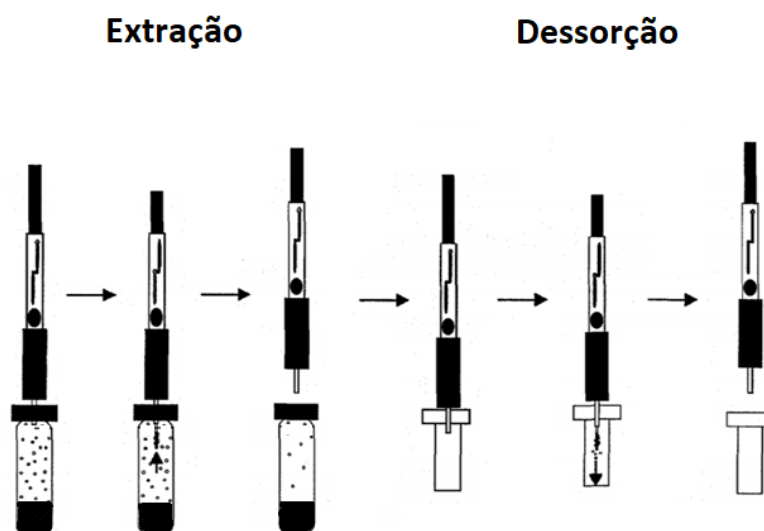


Figura 7. Etapas da extração por HS-SPME e dessorção térmica no cromatógrafo gasoso.

Adaptado de: Ormsby, (2005)

A extração dos constituintes da matriz da amostra via SPME pode ser realizada por imersão direta (DI-SPME, do inglês, *direct immersion solid phase microextraction*) ou por *headspace* (HS-SPME, do inglês, *headspace solid phase microextraction*). Na DI-SPME a fibra é diretamente imersa na amostra líquida e na HS-SPME a fibra é exposta sob a amostra. Para a análise de compostos voláteis em uma amostra em matriz complexa, a HS-SPME é o modo de amostragem mais adequado, uma vez que a fibra é colocada na atmosfera que se encontra acima da amostra líquida ou sólida e não está em contato com a amostra. Por outro lado, no modo de amostragem DI-SPME, a fibra é inserida diretamente na amostra fazendo com que a sua vida útil diminua (INAMADDIN; MOHAMMAD, 2014; MIN et al., 2015). A HS-SPME tem sido a técnica escolhida por vários pesquisadores para a extração de compostos voláteis relacionados ao aroma de cerveja, conforme mostrado na Tabela 2. Diversos tipos de recobrimentos extratores, de diferentes espessuras, polaridades e tamanho de poro, estão disponíveis comercialmente, mostrando grande seletividade para diferentes analitos. Os revestimentos de fibra mais utilizados para análise de alimentos são polidimetilsiloxano (PDMS), poliácilato (PA), Carboxen® (CAR), divinilbenzeno (DVB) e Carbowax (CW; polietilenoglicol). A escolha do revestimento de fibra depende principalmente da natureza dos analitos (GÓRECKI; YU; PAWLISZYN, 1999). Uma opção apropriada para extrair analitos com

diferentes características físico-químicas são misturas de revestimento (BALASUBRAMANIAN; PANIGRAHI, 2011). DVB/Car/PDMS tem sido o recobrimento mais utilizado na análise de compostos relacionados ao aroma de cerveja (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2016b; GONÇALVES et al., 2014; RODRIGUES; CALDEIRA; CÂMARA, 2008; SVOBODA et al., 2011).

Existe uma diferença substancial entre o desempenho de revestimentos líquidos e sólidos. Nos revestimentos líquidos, os analitos se dispersam pela fase extratora, na qual as moléculas são solvatadas pelas moléculas de revestimento. O coeficiente de difusão no revestimento líquido permite que as moléculas penetrem em todo o volume da fase, dentro de um tempo razoável de extração. Os sorventes sólidos têm uma estrutura cristalina vítrea ou bem definida, que reduz substancialmente os coeficientes de difusão dentro da estrutura. Em tempos reduzidos de extração, a sorção ocorre apenas na superfície porosa do revestimento (PAWLISZYN, 2009). Durante a extração de matrizes complexas, quando um dos analitos está presente em concentrações muito superiores aos demais, os compostos com baixa afinidade pela fase extratora sólida são frequentemente deslocados por analitos que apresentam maior afinidade pela mesma. Isso ocorre porque apenas uma área de superfície limitada é disponível para adsorção. Se esta área estiver ocupada, a competição ocorre, interferindo no equilíbrio entre analitos e fase extratora (PAWLISZYN, 2009; RISTICEVIC et al., 2010).

Segundo Risticovic e Pawliszyn (2013), extrações em matrizes complexas com DVB/Car/PDMS estão sujeitas ao efeito de deslocamento dos analitos com uma menor afinidade pelo revestimento. O etanol, composto presente em maior concentração em bebidas alcoólicas, tem sido descrito na literatura como uma importante interferência para a extração de compostos minoritários, especialmente durante o procedimento HS-SPME (CONNER et al., 1998; HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002; PÉREZ-OLIVERO et al., 2014; RODRÍGUEZ-BENCOMO et al., 2002; WHITON; ZOECKLEIN, 2000).

Para monitorar mudanças no tipo e quantidade de compostos aromáticos produzidos durante a fermentação alcoólica de mosto de uvas, Zhang et al. (2011) avaliaram o impacto do etanol sorvido na fibra DVB/Car/PDMS. Nesse caso, influência do etanol é,

provavelmente, devida a dois aspectos: inchamento da fibra por absorção e disputa pelos sítios de adsorção. Padrões analíticos de álcoois, ésteres, ácidos e monoterpenos foram usados para preparar sete conjuntos de soluções modelo de vinho (que é uma solução que visa simular a matriz da amostra analisada, contendo em quantidades correspondentes, os principais componentes do vinho, 7 g L⁻¹ de ácido tartárico e pH 3,3) contendo diferentes quantidades de etanol (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14%) e 4-metil-2-pentanol foi usado como padrão interno. Os resultados mostraram que a eficiência de extração do HS-SPME foi afetada pelo etanol. Quanto maior a concentração de etanol na solução, menores eram as quantidades de compostos extraídos pela fibra. Além disso, o uso do padrão interno não foi suficiente para evitar o efeito do etanol na extração. Os autores também sugerem que é possível minimizar o efeito do etanol na HS-SPME, usando-se curvas de calibração contendo a quantidade de etanol correspondente à encontrada na amostra (ZHANG et al., 2011).

Limitações relacionadas à realização de SPME no modo de imersão direta (DI) em matrizes complexas motivaram o desenvolvimento de revestimento de fibra modificada através da implementação de uma camada PDMS adicional em fibras comerciais (SOUZA-SILVA et al., 2016; SOUZA-SILVA; PAWLISZYN, 2012, 2015). Uma desvantagem do DI-SPME está relacionada com a ligação de componentes da matriz, principalmente açúcares, aminoácidos e compostos coloridos, na superfície do revestimento polimérico. Essas macromoléculas podem causar a incrustação da fase extratora que leva não apenas à diminuição da eficiência da extração, mas também reduz a vida útil da fibra (SOUZA-SILVA; PAWLISZYN, 2012). Por ser um revestimento líquido não poroso, o PDMS sofre menos o efeito de incrustação dos componentes da matriz quando comparado aos revestimentos sólidos (PAWLISZYN, 2009).

Souza-Silva e Pawliszyn (2012) acrescentaram uma camada PDMS externa a uma fibra comercial PDMS/DVB para extrair pesticidas em uvas, o que não alterou os parâmetros cinéticos nem termodinâmicos de extração desses compostos hidrofóbicos quando comparados aos parâmetros do revestimento original (SOUZA-SILVA; PAWLISZYN, 2012). Além disso, a fibra revestida com PDMS apresentou uma taxa de absorção mais lenta apenas para compostos mais polares (pertencentes a classe dos pesticidas, produtos químicos industriais e produtos farmacêuticos com coeficiente de

partição inferior a 3) extraídos da água (SOUZA-SILVA et al., 2017) ou de polpa de uvas (SOUZA-SILVA; PAWLISZYN, 2015). O número de extrações aumentou de 60 para 100 quando uma fibra revestida com PDMS foi usada, melhorando significativamente a vida útil da mesma, quando a extração de pesticidas em suco de uva foi realizada (SOUZA-SILVA et al., 2016). Além disso, o revestimento modificado permitiu a obtenção de coeficientes de variação inferiores a 20 % entre réplicas de extração, mesmo na presença de pigmentos (antocianinas) e alto teor de açúcar (cerca de 20 %) encontrados no suco de uva (SOUZA-SILVA et al., 2016).

Gionfriddo et al. (2015) compararam o desempenho de fibras com revestimento extra de PDMS (PDMS-PDMS/DVB e PDMS-DVB/Car/PDMS) as suas análogas comerciais não modificadas (PDMS/DVB e DVB/Car/PDMS) na extração de analitos de diferentes hidrofobicidades ($\log P$ entre 1,3 e 4,4), pesos moleculares (variando entre 78,1 e 136,2 g mol⁻¹) e classes químicas (entre álcoois, cetonas, ésteres, terpenos e compostos aromáticos). Verificaram que a camada extra de PDMS possibilitou a redução dos fenômenos de deslocamento de analitos em comparação com os revestimentos comerciais (GIONFRIDDO; SOUZA-SILVA; PAWLISZYN, 2015). Esses resultados abrem uma nova possibilidade para a aplicação de revestimentos modificados por PDMS para análise de matrizes complexas por HS-SPME.

3.8. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

O princípio básico da cromatografia é a partição dos analitos entre duas fases: móvel e estacionária. Diferentes constituintes da amostra são fisicamente separados com base em suas volatilidades e afinidade em relação à fase estacionária. A taxa de distribuição de um analito depende de sua interação com as moléculas nas duas fases. Poucas interações ocorrem entre os analitos e a fase móvel, que é um gás inerte. Compostos com baixa volatilidade e forte interação com a fase estacionária são retidos na coluna cromatográfica e se movem ao longo da mesma, enquanto que compostos com pouca afinidade se movem mais rapidamente, separando-se ao longo da corrida cromatográfica (HEFTMANN, 2004).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) tem sido o método analítico empregado para a determinação de compostos relacionados ao aroma e

compostos tóxicos de cerveja, conforme mostrado nas Tabelas 2 e 4, respectivamente. Após a separação dos analitos na coluna cromatográfica, estes compostos são bombardeados por elétrons dentro do espectrômetro de massas sob condições de vácuo, o que resulta na ionização das moléculas. Os íons formados são instáveis e rapidamente se dividem em fragmentos menores à medida que as ligações químicas são quebradas, em um processo chamado de fragmentação. As massas dos íons e dos fragmentos são então determinadas à medida que os íons são acelerados para fora da fonte. Os íons são separados de acordo com a razão entre a massa (m) e a carga (z) em um campo eletrostático e são subsequentemente medidos com o detector, gerando um espectro de massas (GAUGLITZ; MOORE, 2014; SKOOG; WEST; HOLLER, 2008).

Um composto desconhecido pode ser identificado por comparação de seu espectro de massas ao espectro de massas de uma substância de referência, além da comparação do tempo de retenção do composto presente na amostra com aquela obtido na análise do padrão analítico (HANSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2015; MELLON, 2003). Quando os padrões analíticos não estão disponíveis, a identificação pode ser feita através da comparação do espectro de massas do composto desconhecido com os espectros de uma biblioteca aliada à determinação dos índices de retenção, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares. O índice de retenção de um componente é um número, obtido por interpolação, que relaciona o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse. Dessa forma, a determinação do índice de retenção fornece informação sobre o comportamento de retenção do composto que, ao ser comparada com dados existentes na literatura, pode ser usada para a identificação tentativa de compostos (RUBIOLO et al., 2010).

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos usados nesta dissertação, bem como os resultados obtidos, foram descritos nos artigos científicos apresentados a seguir. No **artigo I**, a adição de uma camada extra de PDMS a uma fibra de SPME comercial de DVB/Car/PDMS foi avaliada com o objetivo de minimizar o efeito de deslocamento do etanol sobre compostos voláteis minoritários verificados em 5 etapas da elaboração de cerveja *lager*.

No **artigo II**, a fibra revestida com PDMS foi aplicada para a quantificação simultânea de compostos carbonílicos e derivados de furano potencialmente tóxicos nas etapas de elaboração de cervejas *ale* e *lager* e em cervejas comerciais. Além disso, a avaliação do risco da exposição aos compostos tóxicos através do consumo das cervejas em estudo foi verificada. Os parâmetros de validação dos respectivos métodos de HS-SPME-GC/MS usados na quantificação dos voláteis e dos compostos tóxicos foram apresentados em ambos artigos.

5. DISCUSSÃO GERAL

A adição de uma camada extra de PDMS a uma fibra comercial de DVB/Car/PDMS foi avaliada com o objetivo de minimizar o efeito do etanol, que é o composto majoritário de cervejas, em relação à extração de compostos voláteis minoritários. Além disso, o efeito de 5 etapas da produção de cerveja (mosturação, fervura, fermentação, maturação e pasteurização) sobre os níveis de compostos voláteis, que conferem aroma a cervejas artesanais, e de compostos carbonílicos e álcool furfúrico potencialmente tóxicos em cervejas foi verificado. A avaliação do risco da exposição aos compostos tóxicos através do consumo moderado de cervejas comercialmente disponíveis também foi investigada de acordo com protocolos de estimativa de risco da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Na primeira etapa deste estudo, a performance de uma fibra DVB/Car/PDMS comercial e de sua versão revestida com PDMS foram comparadas. Os efeitos do tempo de extração (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min) e do teor de etanol (0, 4, 8 e 12%) sobre a extração de 12 compostos voláteis de cerveja de diferentes classes químicas (entre ácidos, ésteres, álcoois, aldeídos e terpenos), pesos moleculares (de 60,0 a 270,4 g mol⁻¹) e polaridades (log P entre -0,2 e 7,4) foram avaliados.

Apesar dos compostos polares (log P < 2) apresentarem menor afinidade pela camada extra de PDMS (apolar), que compostos de média polaridade e apolares (2 < log P < 4 e log P > 4, respectivamente), diferenças significativas (p < 0,05) nas áreas extraídas entre a fibra modificada e não modificada foram verificadas apenas para os tempos de extração de 15 e 30 min. Para tempos de extração superiores a 45 min, não houve diferença entre as fibras (p > 0,05). Para compostos de média polaridade e apolares, a fibra PDMS-modificada apresentou um aumento na capacidade extratora quando comparada à fibra não modificada. Além disso, foi verificado que o equilíbrio é atingido com 60 min de extração tanto para compostos polares quanto apolares.

Em relação ao efeito da concentração do etanol na extração de compostos voláteis, verificou-se que a adição da camada extra de PDMS impediu o efeito do deslocamento do etanol sobre os compostos polares (log P < 2), visto que não houveram diferenças entre as áreas extraídas com o aumento da concentração do etanol das soluções modelo contendo os padrões analíticos. Além disso, um ganho na capacidade extratora de compostos de média polaridade e

apolares foi verificado quando a fibra modificada foi utilizada em todas as concentrações de etanol (0, 4, 8 e 12%) avaliadas.

O perfil volátil de uma cerveja *lager* avaliado por meio da HS-SPME-GC/MS usando ambas fibras foi determinado. A capacidade extratora da fibra revestida com PDMS foi superior à versão comercial, o que foi verificado pelo número de compostos extraídos (61 e 45, respectivamente) e pelo aumento em 20% na área cromatográfica total obtida pela fibra revestida com PDMS comparada à sua versão não modificada. O desempenho superior da fibra PDMS-modificada em comparação com a fibra comercial foi verificado principalmente em relação aos compostos apolares (18 e 8 compostos extraídos, respectivamente) e de média polaridade (25 e 19 compostos extraídos, respectivamente), mostrando que estes compostos possuem maior afinidade pela camada extra de PDMS.

Entre os 16 compostos extraídos exclusivamente pela fibra revestida com PDMS (10 apolares e 6 de média polaridade), pode-se destacar compostos que impactam tanto positiva quanto outros que tiveram contribuição negativa para o aroma de cervejas. Entre os ésteres, nonanoato de etila (odor descrito como frutado), hexadecanoato de metila (frutado), 9-octanoato de metila (verde/doce), 9-hexadecenoato de etila (frutado), hexadecanoato de etilo (frutado), cinamato de etila (morango/doce) e acetato de octila (flor de laranjeira/jasmim) foram extraídos exclusivamente pela fibra modificada com PDMS. Os ésteres são o maior grupo de compostos identificado na cerveja e são destacados especialmente pelas notas frutadas, florais e/ou doces de aroma e, portanto, constituem um importante grupo de compostos com influência positiva para a qualidade da cerveja (OCVIRK; MLINARIČ; KOŠIR, 2018). Alguns terpenos, incluindo τ -cadinol, β -farneseno, farnesol, α -humuleno epóxido II e carvona, também foram extraídos exclusivamente pela fibra modificada com PDMS. Estes compostos são derivados do lúpulo e podem conferir propriedades organolépticas desejáveis à cerveja (PRIEST; STEWART, 2006). Entre os demais compostos extraídos exclusivamente pela fibra revestida, a 2-octanona apresenta contribuição positiva para a percepção sensorial com um aroma descrito como floral, verde ou frutado (FENG et al., 2015), assim como o 2-undecanol, cujo aroma é frutado. No entanto, a presença de ácido heptanoico e ácido 2-etil-hexanoico pode ser indesejável, uma vez que ambos os ácidos apresentam um odor descrito como de suor (MALFONDET et al., 2016).

O método HS-SPME-GC/MS utilizado para quantificação de voláteis presentes em diferentes estágios da elaboração de cervejas, utilizando a fibra revestida com PDMS mostrou parâmetros de validação adequados. As curvas analíticas apresentaram linearidade satisfatória com coeficientes de determinação (r^2) variando de 0,98 para o hexadecanoato de metila a 0,99 para os demais compostos. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) demonstraram a sensibilidade do método, em que os menores valores de LOD ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$) foram obtidos para o benzaldeído e o dodecanoato de etila e os menores valores de LOQ ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) para ácido octanoico, dodecanoato de etila, hexanoato de etila e octanoato de etila. Além disso, os coeficientes de variação relacionados aos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 12,4 e 14,9%, respectivamente, e as recuperações variaram de 92 a 100%, demonstrando a eficiência do método proposto. Deve-se destacar que apenas uma curva analítica foi construída para cada composto, uma vez que a adição da camada extra de PDMS permitiu a quantificação de amostras com diferentes teores de etanol, dispensando a necessidade de preparação de curvas com teores de etanol semelhantes aos encontrados nas amostras analisadas.

Setenta e seis compostos foram positiva (18) ou tentativamente (58) identificados ao longo dos estágios de elaboração de cerveja *lager*, sendo 23 ésteres, 20 álcoois, 11 terpenos, 9 ácidos, 4 fenóis, 2 compostos derivados de furano, 2 lactonas, 2 cetonas, 1 pirazina, 1 aldeído e 1 composto sulfurado. As razões de Fisher foram calculadas considerando os compostos voláteis quantificados nas cinco etapas da produção de cerveja. Quarenta e oito compostos que apresentaram razão de Fisher correspondente a pelo menos 15% do valor do coeficiente Fisher do composto mais discriminante (2-octenol, razão Fisher: 399) foram selecionados para traçar o mapa de calor com agrupamento hierárquico.

Através destas técnicas quimiométricas, foi possível verificar que a mosturação destacou-se em relação às demais etapas pelos maiores teores de álcoois, como 2-octenol, 2-heptanol, 1-octen-3-ol, 2-etil-1-hexanol, 1-nonanol, 2,3 -butanodiol e 2-octanol. Esses álcoois podem ser formados por anabolismo ou catabolismo (via Ehrlich) de aminoácidos (HUGHES; BAXTER, 2001). Além disso, uma diminuição dos níveis destes compostos foi observada após a etapa de fervura, seja devido sua volatilidade ou às reações que sofrem para formar outros compostos (STEWART; RUSSELL; ANSTRUTHER, 2018).

A fervura foi caracterizada pelos maiores níveis de produtos da reação de Maillard (2-furanometanol, 2,3-dihidrobenzofurano e tetrametilpirazina) e γ -nonalactona. Esses compostos podem ter origem na malteação de cereais e são liberados para o mosto durante aquecimento (YU et al., 2014).

A fermentação, maturação e pasteurização foram discriminadas das demais etapas pela presença majoritária de ésteres. A formação de ésteres durante estas etapas de processamento através da condensação de ácidos e etanol pode resultar em uma mudança positiva no aroma, uma vez que o caráter gorduroso/rançoso dos ácidos é então substituído pelas características frutadas de seus ésteres correspondentes (STEWART; RUSSELL; ANSTRUTHER, 2018). Além disso, terpenos são incorporados ao mosto durante a fervura (β -mirceno, linalol, α -humuleno e α -cadinol) ou fermentação (τ -cadinol, carvona, nerolidol, farnesol e nerol) e a concentração destes compostos permanece semelhante nas etapas subsequentes da elaboração da cerveja.

Uma vez que a adição de uma camada extra de PDMS em uma fibra DVB/Car/PDMS comercial mostrou-se ser uma alternativa promissora na mitigação do efeito de deslocamento de etanol na extração de voláteis durante os estágios de elaboração de cerveja por HS-SPME, esta abordagem foi empregada na determinação quantitativa de compostos tóxicos na elaboração de cervejas do tipo *ale* (alta fermentação) e *lager* (baixa fermentação), bem como em cervejas comerciais.

Neste estudo, a cerveja *ale* foi fermentada a 20 °C pela levedura *Belgian Strong Ale* (*S. cerevisiae* var. *diastaticus*), enquanto que a cerveja *lager* foi fermentada a 12 °C pela levedura *S. cerevisiae*. Além disso, a elaboração das cervejas *ale* e *lager* diferiu quanto ao tempo de fervura (60 e 90 min, respectivamente) e ao malte empregado: a cerveja *ale* foi produzida usando maltes de cevada e trigo (66 e 34%, respectivamente), enquanto que na cerveja *lager* foi utilizado malte de cevada e melanoidina (95 e 5%, respectivamente). Ainda, a cerveja *ale* foi produzida com 25% de lúpulo a mais do que o usado na *lager*.

A quantificação de compostos carbonílicos e derivados do furano é desafiadora devido às suas baixas concentrações, altas volatilidades e reatividades, além da presença de outros compostos em maiores níveis. Devido à essas dificuldades, um método baseado no uso da HS-SPME-GC/MS-SIM para a determinação simultânea de compostos tóxicos (acetaldeído, acroleína, carbamato de etila, formaldeído, furfural e álcool furfurílico) previamente

desenvolvido para análise de vinhos (FERREIRA et al., 2018) foi avaliado quanto sua aplicabilidade na análise de cervejas.

O desempenho do método HS-SPME-GC/MS-SIM utilizado para a quantificação simultânea de tóxicos durante a elaboração de cervejas *ale* e *lager* utilizando a fibra recoberta por uma camada extra de PDMS também apresentou parâmetros de validação adequados, assim como comentado anteriormente para os compostos voláteis. As curvas analíticas apresentaram linearidade com r^2 variando de 0,9731 a 0,9960 para acetaldeído e CE, respectivamente. O LOD mais baixo foi encontrado para o acetaldeído ($0,03 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto o menor valor de LOQ ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foi verificado tanto para o acetaldeído, quanto CE, formaldeído e furfural. Além disso, os ensaios de repetibilidade e precisão obtiveram desvios padrão relativos inferiores a 12,0 e 11,5%, respectivamente, e as recuperações variaram de 90 a 100%.

CE e furfural não foram detectados ao longo da elaboração das cervejas *ale* e *lager* (valores inferiores ao LOD do método para estes compostos: $0,1$ e $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). Enquanto que acetaldeído, acroleína, formaldeído e álcool furfúrico foram encontrados em todos os estágios de fabricação de ambas as cervejas.

Na cerveja *ale*, o acetaldeído foi encontrado em níveis estatisticamente maiores ($p < 0,05$) após a fermentação ($15,2 \mu\text{g L}^{-1}$) do que os demais estágios ($2,2$; $< 1,0$; $1,5$ e $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ após fervura, maturação e pasteurização, respectivamente). Entretanto na cerveja *lager*, os níveis deste aldeído após a fermentação ($1,3 \mu\text{g L}^{-1}$) foram estatisticamente semelhantes aos encontrados nos estágios pré-fermentativos (mosturação e fervura: $< 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), bem como nos estágios subsequentes à fermentação (maturação e pasteurização: $2,0$ e $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). É importante ressaltar que os níveis deste aldeído após fermentação foram estatisticamente maiores na *ale* ($15,2 \mu\text{g L}^{-1}$) do que na cerveja *lager* ($1,3 \mu\text{g L}^{-1}$, $p = 0,02$ de acordo com o teste t), indicando que as condições de fermentação (cepa de levedura e temperatura) desempenham um papel importante na formação deste composto. Além disso, após a maturação da cerveja *ale*, verificou-se redução significativa (em torno de 90%) nos níveis de acetaldeído ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) em relação a etapa anterior (fermentação: $15,2 \mu\text{g L}^{-1}$). Este comportamento não foi verificado após a maturação da cerveja *lager*, o que indica que além das condições de fermentação (temperatura e levedura), a matéria-prima também desempenha um papel importante tanto na formação quanto na redução deste composto (ŠIMIĆ et al., 2017).

Os níveis de acroleína encontrados após a mosturação e a fervura tanto na cerveja *ale* (6,1 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) quanto na *lager* (24,8 e 17,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) foram superiores aos demais estágios e apresentaram uma redução significativa após a pasteurização (4,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). As etapas de mosturação e fervura, nas quais ocorre o aquecimento do malte, podem resultar na formação de acroleína proveniente da degradação térmica de aminoácidos, carboidratos e triglicerídeos (BURCHAM, 2017), aumentando os níveis deste composto. Enquanto que a ligação da acroleína a outros compostos da cerveja, como aminoácidos e compostos fenólicos, pode ocorrer, o que pode justificar a diminuição dos níveis desse composto ao longo dos estágios de elaboração da cerveja (PRAET et al., 2014; ZAMORA et al., 2016).

O formaldeído foi encontrado em níveis estatisticamente semelhantes ao longo dos estágios da produção da cerveja *ale* (de 1,5 a 2,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). Na cerveja *lager*, níveis significativamente mais elevados foram encontrados após a fervura (4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) do que nas demais etapas (2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ após os estágios de mosturação e fermentação; 2,8 e <1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ após a maturação e pasteurização). O aumento significativo nos níveis de formaldeído após a fervura em relação ao estágio anterior (mosturação) na cerveja *lager* não foi verificado na produção de cerveja *ale* e pode ocorrer devido a diferenças na duração da fervura. O maior tempo de fervura da cerveja *lager* (90 min) pode resultar em níveis mais elevados deste aldeído do que *ale* (60 min). Consequentemente, níveis distintos de precursores de formaldeído podem ser verificados, incluindo aminoácidos e ácidos graxos poliinsaturados, que através das reações de degradação e oxidação, respectivamente, dão origem ao formaldeído (JEONG et al., 2015). No último estágio da produção de cerveja (pasteurização), os níveis de formaldeído foram significativamente reduzidos (níveis inferiores ao LOQ do método, 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), provavelmente devido à alta reatividade deste composto, que podem prontamente reage com compostos fenólicos, como foi relatado ocorrer em vinho (ALEIXANDRE-TUDO et al., 2016).

Furfural foi detectado em níveis menores que o LOQ (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) em todos os estágios de elaboração tanto da cerveja *ale* quanto da *lager*, enquanto o álcool furfurílico foi encontrado em todas as etapas em níveis variando de 6,9 a 21,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 4,7 a 9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ na produção *ale* e *lager*, respectivamente. Segundo Vanderhaegen et al. (2004), o furfural é formado através da reação de Maillard durante a produção de malte e a redução desse aldeído durante a fermentação aumenta o teor de álcool furfurílico. A fervura parece desempenhar um papel importante na formação de álcool furfurílico, uma vez que os níveis deste composto foram

significativamente maiores após esta etapa (9,0 e 21,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cerveja *lager* e *ale*, respectivamente) do que na etapa anterior (mosturação; 4,7 e 8,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *lager* e *ale*, respectivamente) e etapas subsequentes (fermentação, maturação e pasteurização; níveis nestas etapas variando de 5,0 a 6,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 6,9 a 8,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *lager* e *ale*, respectivamente). Além disso, os níveis de álcool furfurílico foram significativamente maiores em todos os estágios da cerveja *ale* do que na *lager*, indicando que as diferenças entre as matérias-primas utilizadas nestes dois tipos de cerveja podem influenciar os níveis deste composto. O malte melanoidina, usado na cerveja *ale*, é rico em produtos da reação de Maillard, incluindo compostos contendo furano (CARVALHO et al., 2014).

Amostras de cervejas comerciais, do tipo *ale* (n=8) e *lager* (n=22), também foram avaliadas, em relação à ocorrência de compostos carbonílicos e derivados do furano. O risco da exposição a esses compostos através do consumo moderado (600 mL para homens e 300 mL para mulheres) das cervejas em estudo, foi avaliado através da determinação da IDE e da MOE.

Nas amostras de cerveja, nas quais o CE foi encontrado, os níveis foram menores que o LOQ do método (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). A ocorrência de CE foi verificada em apenas uma cerveja *ale* (4,5% das amostras deste tipo em estudo) e em duas cervejas *lager* (9,0%). Acetaldeído, acroleína, formaldeído e álcool furfurílico foram detectados em todas as amostras avaliadas. Os acetaldeído foi encontrado em níveis quantificáveis (superiores ao LOQ, 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) em 12,5% das amostras *ale* (1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$) e em 9,0% das amostras *lager* (1,3 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Acroleína foi encontrada em uma amostra de cerveja *ale* (4,1 $\mu\text{g L}^{-1}$). Em 36,4% das amostras *lager*, a acroleína foi detectada em níveis variando de 2,5 a 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. O formaldeído foi detectado, mas não quantificado, em todas as amostras de cerveja *ale*, uma vez que os níveis encontrados foram inferiores ao LOQ (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Em cervejas *lager*, este aldeído foi quantificado em apenas 4,5% das amostras *lager* (2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$).

O álcool furfurílico foi quantificado em todas as amostras de *ale* e *lager* em níveis variando de 4,2 a 20,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,8 a 30,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Furfural foi o composto tóxico encontrado em maiores concentrações nos dois tipos de cervejas, sendo detectado em 37,5% das cervejas *ale* em níveis entre 523,1 e 4264,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e em 81,8% das amostras *lager* em níveis que variaram de 1,15 a 4116,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além de furfural e álcool furfurílico, outros quatro compostos contendo furano (5-metil-2-furanmetanotiol, acetilfurano, 5-metilfurfural e γ -nonalactona) foram encontrados em cervejas *ale* e *lager* comerciais. A γ -nonalactona foi o

composto contendo furano mais frequentemente detectado, encontrado em 75 e 95,4% das cervejas *ale* e *lager*, respectivamente.

O furfural apresentou o maior valor de IDE (12,6 e 5,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PC para homens e mulheres, respectivamente), seguido pela acroleína (2,9 e 2,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PC para homens e mulheres, respectivamente), álcool furfurílico (0,1 e 0,06 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PC para homens e mulheres, respectivamente), acetaldeído (0,03 e 0,02 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PC para homens e mulheres, respectivamente) e formaldeído (0,03 e 0,008 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PC para homens e mulheres, respectivamente). IDE para CE não foi calculado, uma vez que este composto não foi detectado em níveis superiores ao LOQ do método (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Os valores IDE indicaram que a exposição ao furfural e ao álcool furfurílico através do consumo moderado de cerveja, juntamente aos demais compostos contendo furano, não representam risco para ambos os sexos, visto que a IDE não excedeu a ingestão diária aceitável (500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de PC) estabelecido pelo JECFA (2000).

Como o acetaldeído, acroleína, CE e formaldeído são compostos genotóxicos, a caracterização do risco foi realizada através da determinação do MOE. A exposição à acroleína quantificada em quatro amostras (níveis variando entre 3,8 E 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) pode representar risco para a saúde do consumidor, considerando o consumo dos homens, visto que a MOE foi de 6679 a 9556 (um valor de MOE igual ou inferior a 10.000 têm sido proposto como uma indicação de situação de risco sob a ótica da saúde pública). Por outro lado, os níveis de acetaldeído, CE e formaldeído quantificados nas amostras em estudo não representam risco à saúde do consumidor. Contudo, é importante notar que outros alimentos e bebidas, além da contaminação ambiental, podem ser fonte de exposição a estes compostos.

6. CONCLUSÃO

A adição de uma camada extra de PDMS a uma fibra comercial de DVB/Car/PDMS foi uma importante alternativa para minimizar o efeito do deslocamento causado pelo etanol na extração de compostos voláteis minoritários e tóxicos por HS-SPME nas etapas de elaboração de cervejas. A modificação na fibra de SPME permitiu a análise quantitativa e simultânea destes compostos de forma mais rápida e mais simples, diminuindo o número de análises, bem como o custo.

Os parâmetros de validação dos dois métodos (validados para a determinação dos compostos voláteis e dos tóxicos), incluindo LOD, LOQ, recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade, mostraram que o uso da fibra PDMS-modificada e o método HS-SPME-GC/MS são adequados para a determinação e monitoramento do perfil volátil de cervejas, bem como dos níveis de compostos tóxicos.

A mosturação destacou-se em relação às demais etapas pelos maiores teores de álcoois superiores. A fervura foi caracterizada pelos maiores níveis de produtos da reação de Maillard, enquanto que a fermentação, maturação e pasteurização foram discriminadas pela presença majoritária de ésteres e incorporação de alguns terpenos ao mosto. Além disso, a fervura e a fermentação parecem ser etapas importantes na formação dos compostos tóxicos avaliados, enquanto a maturação e a pasteurização reduzem seus níveis nas cervejas *ale* e *lager*.

A avaliação do perfil volátil e dos níveis de compostos potencialmente tóxicos durante as etapas de elaboração de cervejas *ale* e *lager* permitiu a identificação dos pontos críticos da produção desta bebida, bem como para a geração de dados que poderão servir como base para a criação de uma legislação nacional que estabeleça limites máximos para os níveis dos compostos tóxicos avaliados. Cabe ressaltar que apenas a acroleína foi detectada em níveis suficientes para causar risco para a saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

- ALEIXANDRE-TUDO, J. L. et al. Effect of acetaldehyde addition on the phenolic substances and volatile compounds of red Tempranillo wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 22, n. 2, p. 205–214, 2016.
- ALVIM, R. P. R. et al. Identification of volatile organic compounds extracted by headspace solid-phase microextraction in specialty beers produced in Brazil. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 2, p. 219–225, 2017.
- ANDRÉS-IGLESIAS, C. et al. Comparison of carbonyl profiles from Czech and Spanish lagers: Traditional and modern technology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 390–397, 2016a.
- ANDRÉS-IGLESIAS, C. et al. Volatile Compound Profiling in Commercial Lager Regular Beers and Derived Alcohol-Free Beers After Dealcoholization by Vacuum Distillation. **Food Analytical Methods**, p. 1–12, 2016b.
- AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1983.
- AQUILANI, B. et al. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 214–224, abr. 2015.
- ARKEMAN, D.; ARKEMAN, H. Evaluation of the oral toxicity of formaldehyde in rats UNIVERSA MEDICINA. **Univ Med**, v. 27, n. 3, p. 106–112, 2008.
- ARRANZ, S. et al. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 759–781, 2012.
- AZEVÊDO, 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.
- BAERT, J. J. et al. On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11449–11472, 2012.
- BALASUBRAMANIAN, S.; PANIGRAHI, S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 1, p. 1–26, 2011.
- BAMFORTH, C. W. **Food, Fermentation and Micro-organisms**. 1 st ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2007.
- BAMFORTH, C. W.; RUSSELL, I.; STEWART, G. **Beer A Quality Perspective A volume in Handbook of Alcoholic Beverages**. 1 st ed. Burlington, USA: Elsevier, 2009.
- BARTH, R. **The Chemistry of Beer: The Science in the Suds**. 1 st. ed. New Jersey: Wiley Blackwell, 2013. v. 9781118674
- BELAND, F. A. et al. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in

B6C3F1 mice. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 43, n. 1, p. 1–19, jan. 2005.

BENFORD, D. et al. Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. S2–S24, 1 jan. 2010.

BOOBIS, A. et al. Interpretation of the margin of exposure for genotoxic carcinogens - elicitation of expert knowledge about the form of the dose response curve at human relevant exposures. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 57, p. 106–18, jul. 2013.

BRÁNYIK, T. et al. **A review of flavour formation in continuous beer fermentations** *Journal of the Institute of Brewing*, 2008. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-43249086941&partnerID=tZOtx3y1>>

BRASIL. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça**, 2005.

BRASIL. Decreto nº6871 de 4 de Junho de 2009. 2009.

BRASIL. **Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho.**, 2010.

BRASIL. **DECRETO Nº 8.442, DE 29 DE ABRIL DE 2015**, 2015. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>

BUGLASS, A. J. **Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects, Volume I and II - Wiley Online Library**. 1 st ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2011.

BUIATTI, S. **Beer in Health and Disease Prevention**. 1st. ed. Burlington, USA: Elsevier, 2009.

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.

CARRILLO, G.; BRAVO, A.; ZUFALL, C. Application of factorial designs to study factors involved in the determination of aldehydes present in beer by on-fiber derivatization in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4403–4411, 2011.

CASTRO, L. F.; ROSS, C. F. Determination of flavour compounds in beer using stir-bar sorptive extraction and solid-phase microextraction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 197–203, 2015.

CASTRO, L. F.; ROSS, C. F.; VIXIE, K. R. Optimization of a Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE) Method for Beer Volatile Profiling. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 2115–2124, 2015.

CERVBRASIL. Anuário 2016. **Associação brasileira da indústria da cerveja**, p. 1–62, 2016.

CHURCHWELL, M. I. et al. Evaluation of serum and liver toxicokinetics for furan and liver DNA adduct formation in male Fischer 344 rats. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 86, p. 1–8, dez. 2015.

COGHE, S. et al. Sensory and Instrumental Flavour Analysis of Wort Brewed with Dark Specialty Malts. p. 94–103, 2004.

CONNER, J. M. et al. Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n. 1, p. 121–126, 1998.

COSTA, S. et al. Increased levels of chromosomal aberrations and DNA damage in a group of workers exposed to formaldehyde. **Mutagenesis**, v. 30, n. 4, p. 463–473, 2015.

CUI, X. et al. In vitro toxicological evaluation of ethyl carbamate in human HepG2 cells. **Toxicology Research**, v. 5, n. 2, p. 697–702, 2016.

DA SILVA, G. C. et al. Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. **Food chemistry**, v. 167, p. 71–7, 15 jan. 2015.

DEJARNETT, N. et al. Acrolein exposure is associated with increased cardiovascular disease risk. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 4, p. 1–12, 2014.

DENG, Z. et al. On-cartridge derivatisation using a calixarene solid-phase extraction sorbent for facile, sensitive and fast determination of formaldehyde in beer. **Food Chemistry**, v. 211, p. 314–319, 15 nov. 2016.

DING, W. et al. In vivo genotoxicity of furan in F344 rats at cancer bioassay doses. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 261, n. 2, p. 164–71, 1 jun. 2012.

DONG, L. et al. Characterization of volatile aroma compounds in different brewing barley cultivars. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 95, n. 5, p. 915–21, 30 mar. 2015.

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. Safety and efficacy of furfuryl and furan derivatives belonging to chemical group 14 when used as flavourings for all animal species and categories. **EFSA Journal**, v. 14, n. 2, p. 4389, 2016.

ESSLINGER, H. M. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. v. 1

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistic Division**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>.

- FAROON, O. et al. Acrolein health effects. **Toxicology and Industrial Health**, v. 24, n. 7, p. 447–490, 2008.
- FENG, Y. et al. Comparative study of aromatic compounds in fruit wines from raspberry, strawberry, and mulberry in central Shaanxi area. **Food and Nutrition Research**, v. 59, 2015.
- FEROE, A. G.; ATTANASIO, R.; SCINICARIELLO, F. Acrolein metabolites, diabetes and insulin resistance. **Environmental Research**, v. 148, p. 1–6, 1 jul. 2016.
- FERREIRA, D. C. et al. Carbonyl compounds in different stages of vinification and exposure risk assessment through Merlot wine consumption. 2018.
- FISK, I. D. **Aroma release**. 1. ed. Cambrige: Elsevier Ltd., 2015.
- GAUGLITZ, G.; MOORE, D. S. **Handbook of Spectroscopy**. 2a. ed. Weinhein: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.
- GIONFRIDDO, E.; SOUZA-SILVA, É. A.; PAWLISZYN, J. Headspace versus direct immersion solid phase microextraction in complex matrixes: investigation of analyte behavior in multicomponent mixtures. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 16, p. 8448–56, 2015.
- GONÇALVES, J. L. et al. A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. **Food Chemistry**, v. 160, p. 266–280, 1 out. 2014.
- GONÇALVES, L. M. et al. Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 24, p. 3717–22, 11 jun. 2010.
- GÓRECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. **Analyst**, v. 124, n. 5, p. 643–649, 1999.
- HANSEN, S. H.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. **Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry**. 1. ed. Hoboken: Wiley, 2015.
- HARTMANN, P. J.; MCNAIR, H. M.; ZOECKLEIN, B. W. Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 4, p. 285–288, 2002.
- HE, Y. et al. Analysis of flavour compounds in beer with extruded corn starch as an adjunct. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 1, p. 9–15, 2018.
- HEFTMANN, E. **Chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 2004.
- HERNÁNDEZ, J. A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R. C.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. Table 1, 2016.

HU, W.; WANG, H. HPLC method for determining the formaldehyde content of beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, n. 2, p. 124–129, 2015.

HUGHES, P. **Beer A Quality Perspective A volume in Handbook of Alcoholic Beverages**. 1. ed. Cambridge: Elsevier, 2009.

HUGHES, P. S.; BAXTER, E. D. **Beer: quality, safety and nutritional aspects**. 1st. ed. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2001.

IARC. **Alcohol drinking Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans**. Lyon, France: [s.n.]. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>>.

IARC. **IARC Monographs- Classifications**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>>.

INAMADDIN; MOHAMMAD, A. **Green Chromatographic Techniques - Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2014.

IPCS. **Formaldehyde**.

IRWIN, R. Toxicology and Carcinogenesis Studies of 5- (Hydroxymethyl) -2-Furfural in F344 / N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). **Technical Report Series**, n. 67, p. 196, 2008.

JANZOWSKI, C. et al. Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. **Mutagenesis**, v. 18, n. 5, p. 465–470, 2003.

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

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, p. 112–8, 11 abr. 2014.

KING, A. J.; DICKINSON, J. R. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. v. 3, p. 53–62, 2003.

KISHIMOTO, T. et al. Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8855–8861, 2006.

KROGERUS, K.; GIBSON, B. R. Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6919–6930, 2013.

KUCHARCZYK, K.; TUSZYNSKI, T. Effect of wort filling time on fermentation, maturation and acetaldehyde content in beer. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 34, n. 3, p. 265–270, 2016.

LACHENMEIER, D. W. et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **BMC cancer**, v. 10, p. 266, 2010.

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.

LACHENMEIER, D. W.; MONAKHOVA, Y. B. Short-term salivary acetaldehyde increase due to direct exposure to alcoholic beverages as an additional cancer risk factor beyond ethanol metabolism. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 30, n. January, p. 3, 2011.

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

LAKE, B. . 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, 1 out. 2001.

LI, G. et al. A survey of ethyl carbamate in beer from Chinese market. **Food Control**, v. 79, p. 254–257, 2017.

LI, M. et al. Determination of Furfural in Beer by High Performance Liquid Chromatography with Solid Phase Extraction. **Journal of the Institute of Brewing**, p. 14–16, 2009.

LIU, C. et al. Simultaneous determination of diethylacetal and acetaldehyde during beer fermentation and storage process. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. September 2017, 2018.

LIU, S. et al. Risk assessment in Chinese food safety. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 162–167, 2013.

LOCONTE, N. K. et al. Alcohol and cancer: A statement of the American society of clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 1, p. 83–93, 2018.

MALFONDET, N. et al. Aroma characterization of freshly-distilled French brandies; their specificity and variability within a limited geographic area. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 5, p. 361–376, 2016.

MAPA. **Instrução Normativa nº 35, De 16 De Novembro De 2010**, 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas-arquivos/in-no-35-de-16-de-novembro-de-2010.pdf>>

MAPA. **Ministério da Agricultura**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/05/registro-de-ervejarias-sobe-de-320-para-397-em-pouco-mais-de-um-mes>>.

MAPA. **A Cerveja no Brasil — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 09/01/2018, 2018.

MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. A CERVEJA NO BRASIL: O ministério da agricultura informando e esclarecendo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2018.

MAYOLLE, J. E. et al. Water diffusion and enzyme activities during malting of barley grains: A relationship assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 358–365, 2012.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 1999.

MELLON, F. A. Combined Chromotography and Mass Spectrometry. n. 1992, p. 1294–1301, 2003.

MIKYŠKA, A. et al. The influence of hopping on formation of carbonyl compounds during storage of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 1, p. 47–54, 2011.

MIN, L. et al. A rapid space-resolved solid-phase microextraction method as a powerful tool to determine contaminants in wine based on their volatility. **Food Chemistry**, v. 176, p. 12–16, 2015.

MONAKHOVA, Y.; JENDRAL, J.; LACHENMEIER, D. The margin of exposure to formaldehyde in alcoholic beverages. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 63, n. 2, p. 227–237, 2012.

MOREIRA, N. et al. Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. **Talanta**, v. 117, p. 523–31, 15 dez. 2013.

MÜLLER, C. V.; MARCUSSO, E. F. Anuário Da Cerveja No Brasil. p. 2015–2017, 2017.

NAN, D. T.; ARSENEAULT, M.; RAMASSAMY, V. M. AND C. **Potential Role of Acrolein in Neurodegeneration and in Alzheimers Disease** **Current Molecular Pharmacology**, 2010. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/93839/article>>

NARDINI, M. et al. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 14–22, jan. 2006.

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, 1 dez. 2005.

NEŠPOR, J. et al. Application of response surface design to optimise the chromatographic analysis of volatile compounds in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, n. July 2017, 2018.

NICOLLI, K. P. et al. Sensory, olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography analyses as appropriate tools to characterize the effects of vine management on wine aroma. **Food Chemistry**, v. 243, p. 103–117, 15 mar. 2018.

NOGUEIRA, L. C. et al. Moderate Alcoholic Beer Consumption: The Effects on the Lipid Profile and Insulin Sensitivity of Adult Men. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 7, p. 1720–1725, 2017.

NOMURA, T. et al. Cytogenotoxicities of sublimed urethane gas to the mouse embryo. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 369, n. 1–2, p. 59–64, jul. 1996.

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.

OBERHOLSTER, A.; TITUS, B. M. Annals of Food Processing and Preservation Review: Impact of Dry Hopping on Beer Flavor Stability. **Ann Food Process Preserv**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2016.

OCVIRK, M.; MLINARIČ, N. K.; KOŠIR, I. J. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 3627–3635, 2018.

ORMSBY, M. Analysis of Laminated Documents Using Solid-Phase Microextraction. **Journal of the American Institute for Conservation**, v. 44, n. 1, p. 13–26, 2005.

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**. Waterloo: Chemical Industry Press of China, 2009.

PÉREZ-OLIVERO, S. J. et al. Determination of lactones in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, 2014.

PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; SANTOS, L. H. M. M. L. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of chromatography. A**, v. 1121, n. 2, p. 145–53, 2006.

PIRES, E. J. et al. **Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 449–463, mar. 2008.

POLI, A. et al. Moderate alcohol use and health: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 6, p. 487–504, 1 jun. 2013.

PRAET, T. et al. Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation. **Cerevisia**, v. 36, n. 4, p. 125–132, 2012.

PRAET, T. et al. Comprehensive characterisation of the hop-derived sesquiterpenoid fingerprint of American kettle hopped lager beers. **BrewingScience**, v. 67, n. 11–12, p. 183–194, 2014.

PREEDY, V. R. **Beer in health and disease prevention**. London: Academic Press, 2009.

PRIEST, F.; STEWART, G. **Handbook of Brewing**. 2nd. ed. Boca Raton, EUA: Taylor & Francis, 2006.

RICHTER, T. M. et al. Comparison of four extraction methods for analysis of volatile hop-derived aroma compounds in beer. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 22, p. 4366–4376, 2017.

RISTICEVIC, S. et al. Protocol for solid-phase microextraction method development. **Nature protocols**, v. 5, n. 1, p. 122–139, 2010.

RIU-AUMATELL, M. et al. Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME–GC-MS. **Food Research International**, v. 57, p. 196–202, mar. 2014.

RODRIGUES, F.; CALDEIRA, M.; CÂMARA, J. S. Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC–qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, n. 1, p. 82–104, 18 fev. 2008.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J. et al. Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1–2, p. 213–223, 2002.

ROSSI, S. et al. Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 5, p. 919–928, 2014.

RUBIOLO, P. et al. Essential oils and volatiles: Sample preparation and analysis. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 282–290, 2010.

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, n. 10, p. 2339–2345, 2014.

SACHSE, B. et al. Bioactivation of food genotoxicants 5-hydroxymethylfurfural and furfuryl alcohol by sulfotransferases from human, mouse and rat: a comparative study. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 137–148, 2016.

SAERENS, S. M. G. et al. Ethyl ester production during brewery fermentation: a review. **Cerevisia**, v. 2, n. 33, 2008.

SAISON, D. et al. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1190, n. 1–2, p. 342–9, 9 maio 2008.

SAISON, D. et al. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 26, p. 5061–5068, 2009a.

SAISON, D. et al. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1206–1215, 2009b.

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 (CAS 51-79-6). **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48 Suppl 1, p. S63-8, jan. 2010.

SEBRAE. Microcervejarias no brasil. **Sebrae**, p. 1–20, 2016.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: Role of genetics in ethanol metabolism. **Genes and Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 121–128, 2010.

SICOBÉ. **Sistema de Controle de Produção de Bebidas – SICOBÉ**. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/PessoaJuridica/Bebidas/SistContrProdSicobe.htm>>.

SILVA, A. P. et al. Cheers, proost, saúde: Cultural, contextual and psychological factors of wine and beer consumption in Portugal and in the Netherlands. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 1340–1349, 2017.

ŠIMIĆ, G. et al. Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of malting and hullless barley grain and malt extracts. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 35, n. 1, p. 73–78, 2017.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOUZA-SILVA, É. A. et al. Methodical evaluation and improvement of matrix compatible PDMS-overcoated coating for direct immersion solid phase microextraction gas chromatography (DI-SPME-GC)-based applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 920, p. 54–62, 2016.

SOUZA-SILVA, É. A. et al. Insights into the Effect of the PDMS-layer on the Kinetics and Thermodynamics of Analyte Sorption onto the Matrix-Compatible SPME Coating. **Analytical Chemistry**, p. acs.analchem.6b04442, 2017.

SOUZA-SILVA, É. A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 236–248, 2015.

SOUZA-SILVA, É. A.; PAWLISZYN, J. Optimization of fiber coating structure enables direct immersion solid phase microextraction and high-throughput determination of complex samples. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 16, p. 6933–6938, 2012.

SOUZA-SILVA, É. A.; PAWLISZYN, J. Direct immersion solid-phase microextraction with matrix-compatible fiber coating for multiresidue pesticide analysis of grapes by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (DI-SPME-GC-ToFMS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 18, p. 4464–4477, 2015.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; ANSTRUTHER, A. (EDS.). **Handbook of Brewing**. 3rd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2018.

SVOBODA, Z. et al. Optimization of modern analytical SPME and SPDE methods for determination of Trans-2-nonenal in barley, malt and beer. **Chromatographia**, v. 73, n. SUPPL. 1, p. 157–161, 2011.

SWASTI, Y. R.; MURKOVIC, M. Characterization of the polymerization of furfuryl alcohol during roasting of coffee. **Food and Function**, v. 3, n. 9, p. 965–969, 2012.

SZENDE, B.; TYIHÁK, E. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. **Cell Biology International**, v. 34, n. 12, p. 1273–1282, 2010.

TIAN, J. Application of static headspace gas chromatography for determination of acetaldehyde in beer. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 5, p. 475–479, 2010.

TSAI, S.; KAO, K. Determination of furfural in beers, vinegars and infant formulas by solid-phase microextraction and gas chromatography / mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 76–84, 2012.

VANDERHAEGEN, B. et al. Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6782–6790, 2003.

VANDERHAEGEN, B. et al. Influence of the brewing process on furfuryl ethyl ether formation during beer aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6755–6764, 2004.

VANDERHAEGEN, B. et al. Aging characteristics of different beer types. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 404–412, 2007.

VERSTREPEN, K. J. et al. Flavor-Active Esters : Adding Fruitiness to Beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, 2003.

WANG, H. T. et al. Mutagenicity and sequence specificity of acrolein-DNA adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 511–517, 2009.

WANG, H. T. et al. Effect of carcinogenic acrolein on DNA repair and mutagenic susceptibility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 15, p. 12379–12386, 2012.

WHITON, R. S.; ZOECKLEIN, B. W. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds. **American Society for Enology and Viticulture**, v. 51, n. 4, p. 379–382, 2000.

WHO. **Concise International Chemical Assessment Document 40: Formaldehyde** **IPCS Concise International Chemical Assessment Documents**. Geneva: [s.n.].

WU, P. et al. A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 286–288, 2012.

YU, J. et al. The influence of LOX-less barley malt on the flavour stability of wort and beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 2, p. 93–98, 2014.

ZAMORA, R. et al. Toxicologically Relevant Aldehydes Produced during the Frying Process Are Trapped by Food Phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 27, p. 5583–5589, 2016.

ZERIN, T. et al. Effects of formaldehyde on mitochondrial dysfunction and apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 261–272, 2015.

ZHANG, M. et al. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 743–749, 2011.

ZHAO, J. et al. Development of a Novel Derivate Assay for Formaldehyde Determination by HPLC in Beer Samples. **Food Analytical Methods**, n. 229, p. 156–163, 2015.