

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

**Desenvolvimento de um método para determinação simultânea de compostos carbonílicos tóxicos durante a vinificação e avaliação do risco da exposição a estes compostos**

Daiani Cecchin Ferreira

**Porto Alegre**

**2017**

Daiani Cecchin Ferreira

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO  
SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS TÓXICOS DURANTE A  
VINIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO RISCO DA EXPOSIÇÃO A ESTES  
COMPOSTOS**

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. Dr. Vitor Manfroi

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliane Elisa Welke

**PORTO ALEGRE**

**2017**

### CIP - Catalogação na Publicação

Cecchin Ferreira, Daiani      Desenvolvimento de um método para determinação simultânea de compostos carbonílicos tóxicos durante a vinificação e avaliação do risco da exposição a estes compostos / Daiani Cecchin Ferreira. -- 2017.      102 f.

Orientador: Vitor Manfroi.

Coorientadora: Juliane Elisa Welke.

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, 2017.

1. Compostos tóxicos em vinhos. I. Manfroi, Vitor, orient. II. Elisa Welke, Juliane, coorient. III. Título.

**Desenvolvimento de um método para determinação simultânea de compostos carbonílicos tóxicos durante a vinificação e avaliação do risco da exposição a estes compostos**

Daiani Cecchin Ferreira

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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pela Comissão Examinadora:

Homologada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Por:

---

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Orientador - PPGCTA/UFRGS

---

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/ UFRGS)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliane Elisa Welke

Coorientadora - PPGCTA/UFRGS

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Paula Rossini Augusti

Banca - PPGCTA/UFRGS

---

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosângela Assis Jacques

Banca - PPGQ/UFRGS

---

Prof. Dr. Juliano Garavaglia

Banca - UNISINOS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao professor Dr. Vitor Manfroi pela orientação e a professora Dra. Juliane Elisa Welke pela coorientação, sou grata aos dois pela contribuição, dedicação e incentivo que me deram durante toda essa jornada.

A todos os professores, alunos de pós-graduação e de iniciação científica do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO) que compartilharam os seus conhecimento e me receberam de braços abertos.

Aos professores membros da Banca de Avaliação por aceitar o convite de participação e fazer parte deste trabalho através de suas contribuições.

A minha mãe (Maria Cecchin) e minha irmã (Aline Ferreira) pelo amor, carinho e compreensão prestados todos os dias.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes e me deram força para concluir esta etapa com suas palavras de conforto e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização desse trabalho.

*“Cada um de nós compõe a sua história...  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz”*

*(Almir Sater e Renato Teixeira)*

## RESUMO

Propriedades benéficas são associadas ao consumo moderado de vinho devido à presença dos compostos fenólicos. Uma dose diária de vinho de até 200 ou 300 mL é sugerida para mulheres e homens, respectivamente. Entretanto, dentre os compostos presentes nos vinhos, podem ser encontrados compostos carbonílicos tóxicos, como o formaldeído, acroleína, acetaldeído, furfural e carbamato de etila, os quais tem sido associados a efeitos adversos à saúde humana, incluindo o câncer. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a quantificação simultânea destes compostos tóxicos através da microextração em fase sólida no modo headspace associada à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar no modo de monitoramento de íons selecionados (HS-SPME-GC/qMS-SIM) e caracterizar o risco relacionado à exposição a estes compostos. Quatro etapas da vinificação (uva, mosto, após a fermentação alcoólica e vinho) e vinhos comercialmente disponíveis foram analisados com o uso da GC/qMS-SIM após verificar as coeluições através da cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada ao detector de espectrometria de massas por tempo de voo (GC×GC-TOFMS). O acetaldeído e a acroleína derivatizados coeluíram na primeira dimensão cromatográfica com o limoneno e o hexanoato de metila, respectivamente. Em função disso, foram escolhidos como íons quantificadores na análise por GC/qMS, íons que não foram encontrados no espectro de massas dos compostos coeluídos. Os parâmetros de validação (LOD, LOQ, recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade) mostraram que a HS-SPME-GC/qMS-SIM é adequada para quantificar simultaneamente os cinco compostos tóxicos. A acroleína foi encontrada em concentrações similares na uva e mosto, e não foi detectada após a fermentação alcoólica e no vinho. O acetaldeído foi detectado em menores concentrações no mosto e em maiores níveis após a fermentação alcoólica. A concentração de furfural foi maior nas uvas do que nas demais etapas. O carbamato de etila não foi detectado nas etapas da vinificação e nos vinhos comerciais. Os níveis de formaldeído ficaram entre os valores de LOD e LOQ em todas as etapas da vinificação e nos vinhos comerciais. Além disso, nos vinhos comercialmente disponíveis, a acroleína foi encontrada em 50% das amostras, o acetaldeído e o furfural estavam presentes em todas as amostras. O único composto cuja ingestão pode representar risco a

saúde é a acroleína. Dessa forma, este estudo contribuiu para identificar os pontos críticos de controle relacionados à presença de compostos tóxicos durante a vinificação, incluindo a produção do acetaldeído durante a fermentação alcoólica e a contaminação das uvas com acroleína e furfural através do ar atmosférico. Além disso, os resultados da ocorrência destes compostos tóxicos em vinhos comercialmente disponíveis poderão contribuir para a criação de uma legislação nacional que estabeleça limites dos mesmos nesta bebida.

Palavras-chave: vinho; formaldeído; acroleína; acetaldeído; furfural; carbamato de etila; GC/qMS-SIM; GCxGC-TOFMS.



## ABSTRACT

Beneficial properties are associated with moderate consumption of wine due to the presence of phenolic compounds. A daily intake of wine of up to 200 or 300 mL is suggested for women and men, respectively. However, toxic carbonyl compounds such as formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, furfural and ethyl carbamate can be found among the compounds present in wines, which have been associated with adverse effects on human health, including cancer. The objective of this work was to develop and validate a method for simultaneous quantification of these toxic compounds through headspace solid phase microextraction associated with gas chromatography with quadrupole mass spectrometric detection in selected-ion monitoring mode (HS-SPME-GC/qMS-SIM) and characterize the risk related to exposure to these compounds. Four vinification steps (grape, must, after alcoholic fermentation and wine) and commercially available wine were analyzed using GC/qMS-SIM after checking the coelutions by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS). The derivatized acetaldehyde and acrolein coeluted in the first chromatographic dimension with limonene and methyl hexanoate, respectively. Based on this, were chosen as quantifiers ions in GC/qMS analysis, ions that were not found in the mass spectra of the coeluted compounds. The validation parameters (LOD, LOQ, recovery, repeatability and reproducibility) showed that HS-SPME-GC/qMS-SIM is adequate to simultaneously quantify the five toxic compounds. Acrolein was found at similar concentrations in grape and must, and was not detected after alcoholic fermentation and in wine. Acetaldehyde was detected at lower concentrations in the must and at higher levels after alcoholic fermentation. The concentration of furfural was higher in the grapes than in the other stages. Ethyl carbamate was not detected in the vinification steps and in commercial wine. Formaldehyde levels were between the LOD and LOQ values at all stages of winemaking and commercial wines. In addition, in commercially available wines, acrolein was found in 50% of samples, acetaldehyde and furfural were present in all samples. The only compound whose intake may pose a health risk is acrolein. Thus, this study contributed to identify critical control point related to the presence of toxic compounds during winemaking, including the production of acetaldehyde during alcoholic fermentation and the contamination of grapes with

acrolein and furfural through atmospheric air. In addition, the results of the occurrence of these toxic compounds in commercially available wines may contribute to the creation of national legislation that establishes limits of the same in this drink.

Keywords: wine; formaldehyde; acrolein; acetaldehyde; furfural; ethyl carbamate; GC/qMS-SIM; GC×GC-TOFMS.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3-HPA	3-hidroxi propionaldeído
ADI	Ingestão diária aceitável (do inglês, <i>acceptable daily intake</i> )
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDF	5-butildihidro-2(3H)-furanona (do inglês, <i>5-Butyldihydro-2(3H)-furanone</i> )
BMD	Dose de referência toxicológica (do inglês, <i>benchmark dose</i> )
BMDL10	Limite de confiança inferior desta dose (do inglês, <i>benchmark dose lower confidence limit</i> )
BP	Ponto de ebulição (do inglês, <i>boiling point</i> )
CAS	Registro CAS (do inglês, <i>Chemical Abstracts Service</i> )
CE	Carbamato de etila
<sup>1</sup> D	Primeira dimensão
<sup>2</sup> D	Segunda dimensão
DEDf	5-(1,2-dihidroxi etil)-dihidrofuran-2-ona (do inglês, <i>5-(1,2-Dihydroxyethyl)-dihydrofuran-2-one</i> )
DI-SPME	Microextração em fase sólida por imersão direta (do inglês, <i>direct immersion solid phase microextraction</i> )
DPF	Dihidro-5-pentil-2(3H)-furanona (do inglês, <i>dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone</i> )
DVB/CAR/PDMS	Divinil benzeno-carboxen-polidimetilsiloxano
EC	Carbamato de etila (do inglês, <i>ethyl carbamate</i> )
EDF	5-etoxidiidro-2(3H)-furanona (do inglês, <i>5-ethoxydihydro-2(3H)-furanone</i> )

EDI	Ingestão diária estimada (do inglês, <i>estimated daily intake</i> )
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization</i> )
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> )
FID	Detector de ionização em chama (do inglês, <i>flame ionization detector</i> )
GC	Cromatografia gasosa (do inglês, <i>gas chromatography</i> )
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (do inglês, <i>gas chromatography with flame ionization detector</i> )
GCxGC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (do inglês, <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography</i> )
GC-NPD	Cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (do inglês, <i>gas chromatography nitrogen phosphorus detector</i> )
GCq/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar (do inglês, <i>gas chromatography with mass spectrometry</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> )
GCxGC/TOFMS	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detector</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês, <i>high-performance liquid chromatography</i> )

HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (do inglês: <i>high-performance liquid chromatography with diode array detection</i> )
HPLC-FLD	Cromatografia líquida de alta performance com detector de fluorescência (do inglês, <i>high-performance liquid chromatography with fluorescence detection</i> )
HS-SPME	Microextração em fase sólida no modo headspace (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 combined with gas chromatography mass spectrometry</i> )
HS-SPME/GC-NPD	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> combinada com cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (do inglês, <i>headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography nitrogen phosphorus detector</i> )
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
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 da Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives</i> )
LAB	Bactérias ácido lácticas (do inglês, <i>lactic acid bacteria</i> )
LC	Cromatografia líquida (do inglês, <i>liquid chromatography</i> )
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês, <i>liquid-liquid extraction</i> )

LLE-CG/MS	Extração líquido-líquido combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>liquid-liquid extraction combined with gas chromatography mass spectrometry</i> )
LOAEL	Menor dose na qual o efeito adverso foi observado (do inglês, <i>lowest observed adverse effect level</i> )
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>limit of detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>limit of quantification</i> )
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mini-CE-ED	Eletroforese capilar miniaturizada com detecção eletroquímica (do inglês, <i>miniaturised capillary electrophoresis with electrochemical detection</i> )
MOE	Margem de exposição (do inglês, <i>margin of exposure</i> )
MS	Espectrometria de massa (do inglês, <i>mass spectrometer</i> )
MW	Peso molecular (do inglês, <i>molecular weight</i> )
NOAEL	Maior dose que não causou efeito adverso (do inglês, <i>no observable adverse effect level</i> )
NOEL	Nível de efeito não observado (do inglês, <i>no observed effect level</i> )
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho (do francês, <i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTFCA	ácido 5-oxotetrahidrofurano-2-carboxílico (do inglês, <i>5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid</i> )
PE	Ponto de ebulição
PM	Peso molecular
PFBHA	O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina hidrocloreto

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 intake</i> )
PTWI	Ingestão tolerável semanal provisória (do inglês, <i>provisional tolerable weekly intake</i> )
RI	Índice de retenção (do inglês, <i>retention index</i> )
SIM	Monitoramento de íons selecionados (do inglês, <i>selected ion monitoring</i> )
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>solid-phase extraction</i> )
SPE-GC/MS	Extração em fase sólida combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>solid-phase extraction combined with gas chromatography mass spectrometry</i> )
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês: <i>solid phase microextraction</i> )
<sup>1</sup> t <sub>R</sub>	Tempo de retenção na primeira dimensão
<sup>2</sup> t <sub>R</sub>	Tempo de retenção na segunda dimensão
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico (do inglês, <i>thiobarbituric acid</i> )
TFEH	2,2,2-trifluoroetilhidrazina
TMF	Tetrahydro-5-metil-2- furanmetanol (do inglês, <i>tetrahydro-5-methyl-2-furanmethanol</i> )
TOFMS	Espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, <i>time-of-flight mass spectrometry</i> )
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massa em tandem (do inglês, <i>ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i> )

VCE Epóxido de vinil carbamato (do inglês, *vinyl carbamate epoxide*)

WHO Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*)



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
3.1	Produção e consumo do vinho	17
3.2	Vinificação	19
3.3	Composição do vinho	21
3.4	Compostos carbonílicos tóxicos presentes em vinho	22
3.4.1	Formaldeído	23
3.4.2	Acroleína	24
3.4.3	Acetaldeído	25
3.4.4	Furfural	26
3.4.5	Carbamato de etila	27
3.5	Técnicas de extração e determinação dos compostos tóxicos encontrados na vinificação	28
3.6	Análise do risco da exposição aos compostos tóxicos presentes no vinho	37
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O vinho é a segunda bebida alcoólica mais consumida no mundo, sendo que a cerveja ocupa a primeira posição (OIV, 2015a). Na última década, o consumo de vinho ascendeu cerca de 20 % e sua comercialização vem se difundindo principalmente pelo aumento da produção/oferta e pelos benefícios à saúde que lhe são atribuídos (MAZON *et al.*, 2012; WIM, 2017a).

As propriedades benéficas conferidas ao vinho, oriundas do consumo moderado do mesmo, são atribuídas à presença de compostos fenólicos e estilbenos que reduzem o risco de doenças cardiovasculares e possuem capacidade antioxidante, anti-inflamatória, entre outras. Como consumo moderado tem-se sugerido uma dose diária de 200 mL a 300 mL de para os homens, e de 100 mL a 200 mL para as mulheres (BOBAN *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2006; WIM, 2017b). Entretanto, dentre os compostos presentes nos vinhos, podem ser encontrados compostos carbonílicos tóxicos como, por exemplo, o formaldeído, acroleína, acetaldeído, furfural e carbamato de etila (CE) (JACKSON, 2008).

A toxicidade destes compostos, presente nos vinhos e em outras bebidas alcoólicas, tem sido associada a necroses na mucosa gástrica (ARKEMAN, 2008), diabetes (FEROE; ATTANASIO; SCINICARIELLO, 2016), aterosclerose (ROM *et al.*, 2016) entre outras doenças, além de serem identificados como genotóxicos e mutagênicos em vários estudos, sendo fígado e o esôfago os órgãos mais atingidos (ARTS *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2016; DEMIR *et al.*, 2013; KAYANI; PARRY, 2010; SEITZ; STICKEL, 2010). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês: *International Agency for Research on Cancer*) classifica o formaldeído e o acetaldeído, ingerido especificamente através das bebidas alcoólica, como carcinogênicos (Grupo 1), e o CE como provavelmente carcinogênico (Grupo 2). A acroleína e o furfural estão no grupo 3, no qual a IARC precisa de mais estudos para classifica-los, no que diz respeito aos efeitos carcinogênicos (IARC, 2017). 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 Committe on Food Additives*) não estabelece parâmetros de ingestão segura para estes compostos, exceto para a soma da exposição ao furfural

e outros compostos que contêm furano na sua estrutura (furfuril álcool, furfuril acetato, furfuril propionato, furfuril pentanoato, furfuril octanoato, furfuril 3-metilbutanoato, metil 2-furoato, propil 2-furoato, amil 2-furoato, hexil 2-furoato e octil 2-furoato). A Ingestão Diária Aceitável para esse grupo de compostos considerados aditivos alimentares (flavorizante) é de 0,5 mg/kg de peso corpóreo (JECFA, 2017).

Dados relativos à quantificação de compostos potencialmente tóxicos produzidos durante a elaboração de vinhos são escassos, e não há legislação brasileira que estabeleça uma concentração máxima dos mesmos nesta bebida. A determinação de compostos tóxicos possivelmente presentes em alimentos e bebidas é essencial para garantir a segurança dos consumidores (PREEDY; WATSON, 2005). Além disso, a investigação destes tóxicos em diferentes etapas da vinificação faz-se necessária, já que estes dados poderão contribuir no controle e prevenção da formação dos mesmos durante a produção do vinho, reduzindo assim a presença no produto final. Ademais, a necessidade do estabelecimento de normas que regulamentem os limites máximos permitidos destes compostos em vinhos torna este estudo ainda mais relevante, no que se diz respeito à geração de dados sobre os seus níveis, bem como da avaliação do risco da exposição a estes compostos através do consumo do vinho. Este é o primeiro estudo focado na quantificação simultânea de formaldeído, acroleína, acetaldeído, furfural e CE em diferentes estágios da vinificação.

Cabe destacar que esta dissertação está organizada em itens, sendo que o item 2 corresponde aos objetivos, no item 3 a revisão bibliográfica foi abordada, no item 4 consta o artigo científico submetido para publicação com descrição dos materiais, métodos, resultados e discussão deste estudo. Além disso, uma discussão geral sobre os principais resultados obtidos nessa pesquisa foi apresentada no item 5 e por fim o item 6 contém a conclusão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método baseado no uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar (GCq/MS, do inglês: *gas chromatography with mass spectrometry*) no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, do inglês: *selected ion monitoring*) para quantificação simultânea de compostos carbonílicos tóxicos durante a vinificação e caracterização do risco relacionado a exposição a estes compostos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método para a quantificação simultânea de cinco compostos tóxicos (formaldeído, acroleína, acetaldeído, furfural e CE) baseado no uso da GCq/MS-SIM após verificar as coeluições através da cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a detector de espectrometria de massas por tempo de voo (GCxGC-TOFMS, do inglês: *comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry*);
- Avaliar a presença dos compostos tóxicos em quatro etapas da vinificação (uva, mosto, após a fermentação alcoólica e vinho) e em vinhos comercialmente disponíveis;
- Verificar as transformações que ocorrem em relação aos compostos tóxicos durante as etapas da vinificação, incluindo a formação de compostos derivados;
- Caracterizar o risco relacionado à exposição aos compostos tóxicos presentes nos vinhos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Produção e consumo do vinho

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. Entende-se como mosto simples de uva um produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva, com a presença ou não de suas partes sólidas. Os vinhos são classificados quanto a sua classe, cor e teor de açúcar. De acordo com a classe, dividem-se em: de mesa, fino, leve, espumante, frisante gaseificado, licoroso e composto (BRASIL, 1988). Os finos são elaborados com uvas de variedades de *Vitis vinifera*, também conhecidas como uvas finas (Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Tannat, etc). Para a elaboração de vinhos de mesa são utilizadas uvas comuns, principalmente das espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina* (GUERRA *et al.*, 2009). Quanto a cor existem três categorias: tinto, rosado e branco. Segundo o teor de açúcar são: nature, seco, meio seco, suave e doce (BRASIL, 1988). Os teores de açúcar são fixados para cada produto em específico, podendo variar de 3 g L<sup>-1</sup> de glicose (nature) para espumante natural até um quantidade superior a 80 g L<sup>-1</sup> de glicose (doce) para vinho composto. Os vinhos finos e de mesa são classificados como: seco, quando contiver até 4 g L<sup>-1</sup> de glicose; meio seco, 4 - 25 g L<sup>-1</sup> de glicose; e suave ou doce, superior a 25 g L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2014).

Em 2015 a produção mundial estimada foi de 275,7 milhões de hectolitros, havendo um aumento de 2 % comparado a produção de 2014. Segundo a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), dez países são responsáveis por 80 % da produção de vinho. A Itália e França disputaram os primeiros lugares com as maiores produções, seguidos pela Espanha, Estados Unidos, Argentina, Chile, Austrália, África do Sul, Alemanha e China (OIV, 2015a, 2015b).

No cenário mundial, o Brasil se encontra na 15<sup>a</sup> posição na produção de vinhos, com 2,7 milhões de hectolitros (OIV, 2015b). Em 2015, a produção nacional de uvas destinadas ao processamento para a elaboração de vinhos, sucos e derivados foi de 781.412 milhões de quilos de uvas, o que representou 52,12% da produção nacional, sendo o restante destinado ao consumo *in natura* (MELLO, 2016). O país se

consolidou também como o quinto maior produtor de vinho no Hemisfério Sul e certamente é um dos mercados que mais cresce mundialmente (IBRAVIN, 2016).

A área de produção vitivinícola no país possui um total de 83,7 mil hectares de uvas de variedades de *Vitis vinifera*, divididos principalmente entre seis regiões: Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste e Campos de Cima da Serra, no Rio Grande do Sul, Planalto Catarinense, em Santa Catarina, e Vale do São Francisco, no Nordeste (IBRAVIN, 2016). Dentre os estados, o Rio Grande do Sul se destaca por ser responsável por cerca de 90 % da produção nacional de vinhos e suco de uvas (MELLO, 2016).

No estado gaúcho, a tradicional região produtora de vinhos é a Serra Gaúcha. A Campanha e a Serra do Sudeste são regiões relativamente novas, e entre as mais recentes está a região dos Campos de Cima da Serra (ALVES; TONIETTO, 2015). A Campanha, localizada na fronteira com o Uruguai, possui o clima e o solo distintos das demais regiões gaúchas, amplitude térmica diária e solo rico em granito e calcário, que beneficiam o cultivo das videiras e conferem potencial à região para a produção de vinhos finos brasileiros (GUERRA *et al.*, 2009; IBRAVIN, 2016). As cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot ocupam a maior parte das áreas dos vinhedos implantados nesta e nas demais regiões do estado (GUERRA *et al.*, 2009; RIZZON; MIELE, 2009).

A cultivar Merlot é originária do Médoc, França, onde é cultivada desde 1850. No Rio Grande do Sul, ela foi inserida através da Estação Agronômica de Porto Alegre de onde foi difundida para a Serra Gaúcha (RIZZON; MIELE, 2009). O vinho tinto elaborado com a uva Merlot apresenta coloração vermelho-violáceo, possuindo aroma frutado, com notas de frutas vermelhas, e gustativamente, destaca-se pelo equilíbrio e maciez (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Em relação ao consumo de vinho, a OIV estimou um consumo mundial entre 235,7 e 248,8 milhões de hectolitros em 2015, sendo que no ano anterior o mesmo foi de 240 milhões de hectolitros. Os principais países consumidores, em volume no ano de 2014, foram os Estados Unidos, França e Itália com 31, 28 e 20 milhões de hectolitros (OIV, 2015a, 2015b).

No Brasil o consumo per capita anual de vinhos em 2015, nacionais mais importados, foi de 1,73 L, dos quais 0,13 L eram de vinhos espumantes (MELLO,

2016). O consumo de vinho na Região Sul é maior do que em outras região do país, entre o ano de 2008 e 2009 o consumo per capita em cada região, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foram de 1,6 L, 0,6 L, 0,5 L, 0,2 L e 0,1L no Sul, Centro-oeste, Sudeste, Norte e Nordeste respectivamente (IBGE, 2011a). Entretanto, o consumo per capita de vinho pelos brasileiros ainda é baixo comparado aos principais países consumidores (BRASIL, 2009).

### 3.2 Vinificação

A vinificação é um conjunto de procedimentos que levam à transformação da uva madura em vinho (Figura 1). Após o recebimento da matéria-prima na vinícola, as uvas passam pelo desengace e esmagamento. O desengace consiste na separação do engaço das bagas, enquanto que o esmagamento tem por finalidade liberar o suco contido na polpa e facilitar a dissolução dos compostos responsáveis pela cor presente na casca da uva (no caso nos vinhos tintos), durante a maceração, formando assim o mosto. Ao mosto são adicionados o dióxido de enxofre (sulfitagem), com finalidade conservante, e leveduras, sendo a mais comum a *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, enzimas pectinolíticas também são adicionadas ao mosto, as quais melhoram a maceração, aumentam da extração de pigmentos, facilitam a clarificação e a filtração do mosto e aumentam a estabilidade do vinho (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

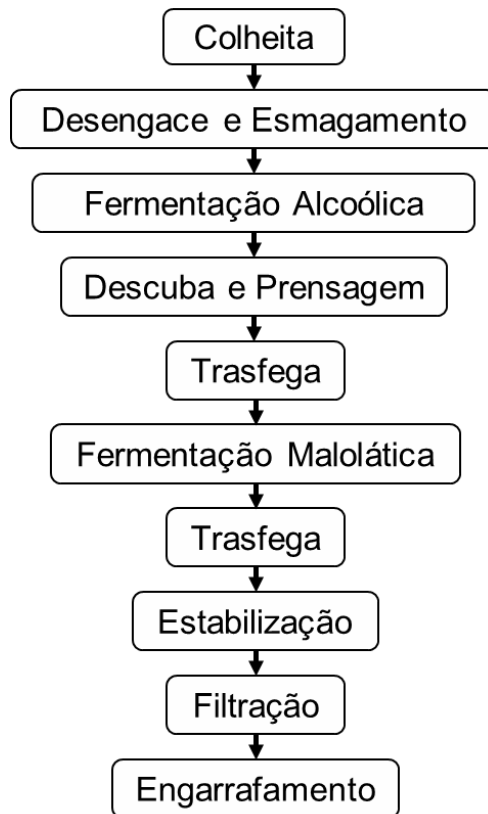


Figura 1- Etapas da elaboração de vinho tinto. Fonte: Adaptado de Ben e Monteiro (2012).

A fermentação alcoólica ocorre na presença das cascas e nesta etapa os compostos contidos nas partes sólidas da uva são extraídos para o mosto (maceração). A descuba consiste na separação da parte líquida do fermentado da fase sólida, seguida da prensagem do bagaço, visando o aumento do rendimento. A trasfega, que consiste em transferir o vinho de um recipiente para outro, têm por finalidade separar os sólidos insolúveis (borras) que sedimentam ao final da fermentação e/ou promover a aeração do vinho, reequilibrando assim seu potencial de oxido-redução. A fermentação malolática trata-se da transformação do ácido málico em ácido láctico, pela ação de bactérias lácticas, podendo ocorrer espontaneamente ou através da inoculação dessas bactérias ao vinho. Na estabilização feitas em baixas temperaturas são neutralizados e/ou induzidos à sedimentação diversos elementos originários da uva (polifenóis e ácido tartárico), ocorre a autólise das leveduras e então o vinho pode ser filtrado e engarrafado (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; SILVEIRA; GARRIDO; HOFFMANN, 2015)



### 3.3 Composição do vinho

As principais substâncias do vinho são água, açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos, compostos nitrogenados, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis (ésteres, aldeídos, cetonas, terpenos, entre outros), vitaminas, sais de ácidos minerais e orgânicos (SOUZA *et al.*, 2006). As substâncias químicas presentes no vinho podem ter diversas origens, ou seja, podem ser provenientes das uvas, ser metabólitos produzidos por micro-organismos durante a fermentação alcoólica e malolática, ou ainda serem constituintes da madeira utilizada nas barricas, onde a bebida pode ser acondicionada para o envelhecimento (JACKSON, 2000).

Compostos fenólicos, incluindo os flavonóides e estilbenos, são associadas às propriedades benéficas oriundas do consumo moderado de vinho. Tais propriedades incluem a atividade antioxidante/antiflamatória e redução do risco de doenças cardiovasculares. Assim, para o consumo moderado de vinho associado com um menor risco destas doenças, tem-se sugerido um consumo diário de 100 mL a 200 mL (aproximadamente 10 a 20 g de etanol) e 200 mL a 300 mL (cerca de 20 a 30 g de etanol) para mulheres e homens, respectivamente (BOBAN *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2006; WIM, 2017b).

Além de compostos benéficos, podem ser encontrados compostos tóxicos como a ocratoxina A, aminas biogênicas e pesticidas podem estar presentes no vinho. Ocratoxina A é uma micotoxina produzida naturalmente por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, sua presença em vinhos ocorre devido à contaminação fúngica das uvas (GENTILE *et al.*, 2016; RODRÍGUEZ-CABO *et al.*, 2016). Esta micotoxina tem efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos, imunotóxicos e teratogênicos (GAYATHRI *et al.*, 2015), e foi classificada, em 1993, como uma possível substância cancerígena para humanos segundo a IARC (IARC, 2017).

Aminas biogênicas são compostos nitrogenados formados a partir de descarboxilação de aminoácidos ou transaminação de aldeídos durante a fermentação do mosto pela leveduras e por bactérias lácticas (MANETTA *et al.*, 2016). Sua ingestão excessiva tem implicações toxicológicas como, por exemplo, reações alérgicas, necrose, apoptose, hipertensão, enxaqueca e taquicardia. Além disso,

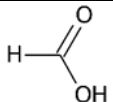
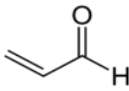
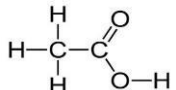
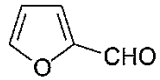
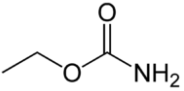
peessoas que tem baixa atividade das enzimas aminooxidasas podem ser sensíveis aos efeitos tóxicos das amins biogências (LINARES *et al.*, 2016).

Os pesticidas são utilizados no cultivo convencional de uvas, a fim de proteger as videiras de doenças causadas por insetos, fungos e outros agentes, e assim aumentar o rendimento do vinhedo (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Entretanto, resíduos desses produtos têm sido encontrados nos vinhos (ANJOS; ANDRADE, 2015; CHEN *et al.*, 2016; PELAJIC *et al.*, 2016). A exposição a esses compostos pode estar relacionada à efeitos tóxicos ao sistema nervoso central e o periférico, incluindo o aumento do risco de doença de Parkinson e vários tipos de câncer, tais como câncer de mama, de próstata, de pulmão, cerebral, testicular, pâncreas, esôfago, estômago e pele (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; TAWATSIN; THAVARA; SIRIYASATIEN, 2015). Outros compostos tóxicos podem estar presentes nos vinhos e são alvo desse estudo, incluindo o formaldeído, acroleína, acetaldeído, furfural e CE (JACKSON, 2008).

### **3.4 Compostos carbonílicos tóxicos presentes em vinho**

A Tabela 1 apresenta algumas características incluindo registo CAS (CAS, do inglês: *Chemical Abstracts Service*), peso molecular, fórmula molecular, estrutura química, densidade e ponto de ebulição do formaldeído, acroleína, acetaldeído, furfural e CE. Esses compostos apresentam em comum a presença do grupamento carbonila (C=O) em sua estrutura química, possuem peso molecular entre 30,03 g mol<sup>-1</sup> e 96,07 g mol<sup>-1</sup> e ponto de ebulição entre -19,3 °C e 182 °C.

Tabela 1 - Características físico-químicas dos compostos tóxicos cuja presença em vinho foi avaliada neste estudo.

Analito	CAS <sup>a</sup>	PM (g mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Fórmula molecular	Estrutura química	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	PE (°C) <sup>c</sup>
Formaldeído	50-00-0	30,03	CH <sub>2</sub> O		0,001	-19,3
Acroleína	107-02-8	56,06	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub>		0,841	53
Acetaldeído	75-07-0	44,05	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O		0,788	20,2
Furfural	98-01-1	96,07	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		1,160	162
Carbamato de etila	51-79-6	89,08	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>		1,056	182

<sup>a</sup> Chemical Abstracts Service; <sup>b</sup> peso molecular, <sup>c</sup> ponto de ebulição.

### 3.4.1 Formaldeído

O formaldeído é a forma mais simples de um aldeído (Tabela 1). Além disso, é volátil a temperatura ambiente, inflamável, incolor e reativo (ARKEMAN, 2008). A presença deste composto em bebidas alcoólicas pode ocorrer através da oxidação do metanol durante o processo de fermentação alcoólica (Figura 2) (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

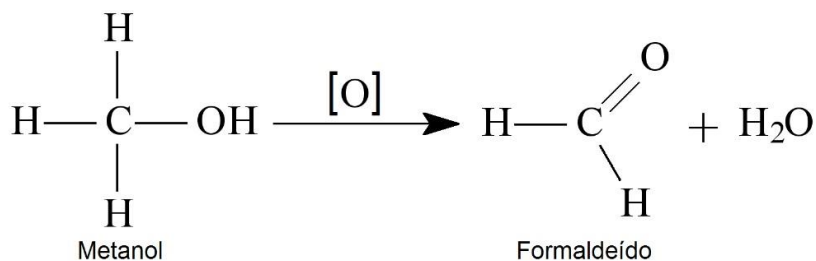


Figura 2- Reação de formação do formaldeído via oxidação do metanol.

Os efeitos tóxicos do formaldeído podem ser atribuídos a seu caráter eletrofílico, assim como dos demais compostos carbonílicos em estudo, que leva à danos a componentes das células (SZENDE; TYIHÁK, 2010; ZERIN *et al.*, 2015). A ingestão deste aldeído está relacionada a necrose das camadas superficiais da mucosa gástrica, úlceras e papilomas (ARKEMAN, 2008). A citotoxicidade do formaldeído baseia-se na sua capacidade para formar adutos com DNA, RNA e proteínas, sendo que a formação de adutos com DNA é um evento chave na iniciação da carcinogênese (SZENDE; TYIHÁK, 2010). A IARC classifica o formaldeído como carcinogênico para humanos (Grupo 1) (IARC, 2017).

O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, do inglês: *International Programme on Chemical Safety*) da Organização Mundial da Saúde estabeleceu uma concentração tolerável de  $2600 \mu\text{g L}^{-1}$  com base no nível de efeito não observado (NOEL, do inglês: *no observed effect level*) de  $260 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$  para danos histopatológicos na via oral e mucosa gástrica de ratos (IPCS, 2002). No entanto, para bebidas alcoólicas não há legislação nacional e internacional que estabeleça limites máximos para este composto.

#### 3.4.2 Acroleína

A acroleína é conhecida também como aldeído acrílico ou 2-propenal (Tabela 1). A acroleína é formada a partir do glicerol que é um dos mais importantes produtos da fermentação alcoólica realizada pelas leveduras a partir da glicose (Figura 3). Durante a fermentação, o glicerol é convertido a 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) pela enzima glicerol desidratase, sendo subseqüentemente reduzido a 1,3-propanodiol ou espontaneamente transformado por desidratação para acroleína, esta última reação é favorecida por pH baixo, que é o caso dos vinhos (pH em torno de 3,5) (BAUER; KOSSMANN, 2010; POPESCU-MITROI; RADU; STOICA, 2014).

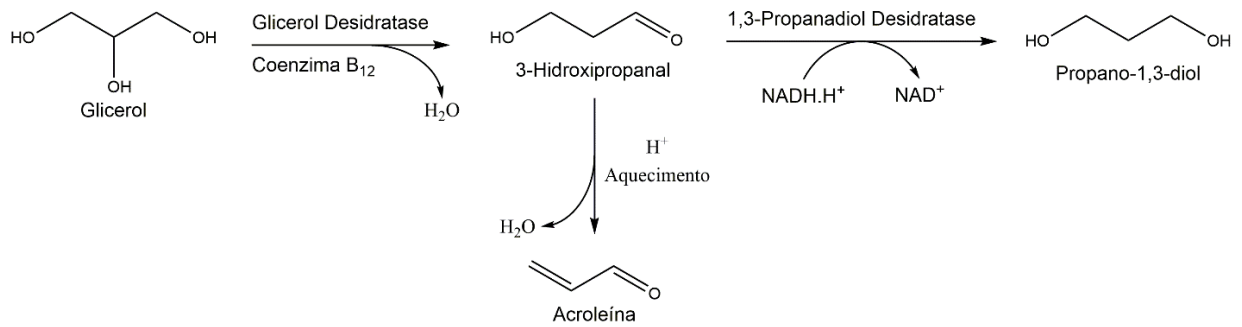


Figura 3- Via metabólica de formação da acroleína a partir do glicerol proveniente da fermentação alcoólica da glicose realizada pelas leveduras; Fonte: Adaptado de Azevedo *et al.* (2007a).

A toxicidade da acroleína tem sido associada a diabetes (FEROE; ATTANASIO; SCINICARIELLO, 2016), aumento do risco de doença cardiovascular (DEJARNETT *et al.*, 2014) e doença de Alzheimer em humanos (DANG *et al.*, 2010), e a aterosclerose em estudo com ratos (ROM *et al.*, 2016). Além disso, a presença deste composto em bebidas alcoólicas pode alterá-las sensorialmente. Em cidras, sua presença provoca uma alteração indesejada conhecida por “*piqûre acroleique*”, responsável pelo aroma de pimenta. Nos vinhos pode resultar no desenvolvimento de amargor mediante combinação com os polifenóis presentes no mesmo (BAUER; KOSSMANN, 2010; SAUVAGEOT *et al.*, 2000). A legislação brasileira estabelece o limite máximo de acroleína de 5 mg/100ml de álcool anidro em aguardente de cana (BRASIL, 2005). Nos vinhos, não há legislação nacional ou internacional que estabeleça concentração máxima para este tóxico.

### 3.4.3 Acetaldeído

O acetaldeído é também conhecido como etanal (Tabela 1). A formação deste composto tóxico em bebidas alcoólicas pode ocorrer por meio da fermentação (Figura 4) ou oxidação do etanol e de compostos fenólicos por leveduras e acetobactérias. As acetobactérias, são originárias de uvas e equipamentos vinícolas, e podem oxidar o etanol a acetaldeído, em condições aeróbias, podendo afetar negativamente as propriedades organolépticas do vinho. A concentração deste composto pode variar consideravelmente dependendo das condições de fermentação, tais como

temperatura, os níveis de oxigênio e dióxido de enxofre, pH, e disponibilidade de nutrientes para levedura (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015).

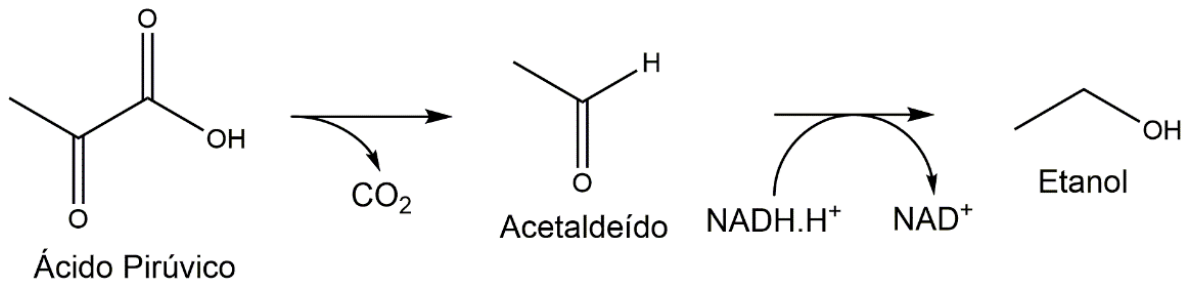


Figura 4- Via metabólica da fermentação alcoólica a partir do ácido pirúvico com formação de acetaldeído e etanol; Fonte: Adaptado de Azevedo *et al.* (2007a).

O acetaldeído possui aroma frutado, mas pode se tornar desagradável quando em concentração superior a  $2 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$  (AZEVEDO *et al.*, 2007a; JEONG *et al.*, 2015). Em relação aos efeitos tóxicos, tem sido relatado que este aldeído pode aumentar o risco de câncer no trato aerodigestivo superior (cavidade oral, faringe, laringe e esôfago), fígado, intestino grosso e mama (SEITZ; STICKEL, 2010). A exposição ambiental ou ocupacional ao acetaldeído foi classificada, em 1999, como provavelmente carcinogênica (Grupo 2B) pela IARC, e quando presente em bebidas alcoólicas, foi classificado, em 2012, como carcinogênico para humanos (Grupo 1) (IARC, 2017).

A legislação brasileira estabelece limites máximos de aldeídos totais em bebidas destiladas, expressos acetaldeído por etanol anidro, para bebidas como: aguardente de cana ( $300 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ), conhaque ( $400 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ), destilado simples de uva ( $400 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ), graspa ( $800 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ) e pisco ( $200 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ) (BRASIL, 2005, 2010). No entanto, não há legislação nacional e internacional que estabeleça limites máximos para o acetaldeído em vinhos.

#### 3.4.4 Furfural

O furfural é um aldeído heterocíclico e aromático, conhecido também como 2-furanocarboxialdeído, furaldeído, 2-furalaldeído, fural e furfuraldeído (Tabela 1). Este

composto é formado devido à hidrólise de pentosanas (xilanas, arabinanas e poliuronídeos) durante o tratamento térmico dos barris de carvalho que podem ser usados para a maturação dos vinhos. A concentração de furfural no vinho depende da idade do barril e o do grau de queima da madeira (JACKSON, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2016). Além disso, um aumento na concentração deste composto pode ser notado quando há um acréscimo na temperatura (de 30 °C á 45 °C, por exemplo) durante o processo de vinificação (PEREIRA *et al.*, 2011).

A relevância toxicológica do furfural não está totalmente elucidada, no entanto em testes de toxicidade subaguda oral, realizado com ratos, este composto levou a um aumento no peso do fígado e rins destes animais (ARTS *et al.*, 2004). Além disso, estudos com ratos e camundongos mostraram que o furfural pode induzir necrose e inflamação crônica do fígado e adenoma e carcinoma hepatocelulares (LAKE *et al.*, 2001).

A legislação brasileira estabelece limites máximos para o furfural em conhaque, destilado alcoólico simples de vinho, destilado alcoólico simples de bagaço de uva e pisco de 5 mg/100 ml de álcool anidro (BRASIL, 2010). Para aguardente de cana este limite máximo é estabelecido para a soma de furfural e hidroximetilfurfural (BRASIL, 2005). Com relação ao vinho, não há limites máximos estabelecidos no Brasil ou legislação internacional de outros países.

#### 3.4.5 Carbamato de etila

O CE, conhecido também como uretana (Tabela 1), é o éster etílico do ácido carbâmico cristalino, incolor e inodoro (BUDAVARI, 2001 *apud* MASSON, 2009). Em bebidas alcoólicas sua formação, geralmente envolve a reação entre etanol e precursores nitrogenados, tais como aminoácidos, ureia (Figura 5), fosfato de carbamila e cianeto. A ureia pode ser formada durante a fermentação alcoólica pela enzima arginase das leveduras mediante a metabolização da arginina, um dos aminoácidos predominantes da uva (GALINARO; FRANCO, 2011; ZIETSMAN; VILJOEN; VUUREN, 2000).

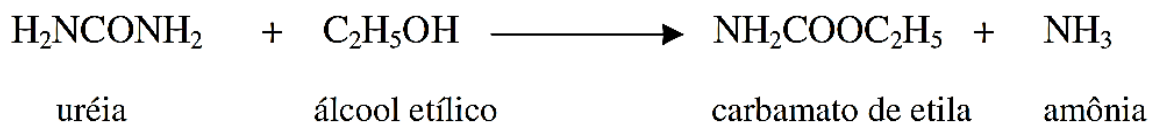


Figura 5- Reação de formação do carbamato de etila via reação entre ureia e etanol; Fonte: Masson (2009).

Esta substância foi classificada, em 2010, como provavelmente carcinogênica para humanos (Grupo 2A) pela IARC (2017). Em testes de toxicidade, o CE demonstrou ser genotóxico, carcinogênico, imunossupressor, sendo o fígado um dos órgãos-alvo do efeito tóxico (CUI *et al.*, 2016). Após a ingestão, o CE é oxidado a epóxido de vinil carbamato (VCE) altamente reativo. Esta espécie eletrofílica reage com o DNA para formar adutos e, portanto, tem fortes propriedades mutagênicas e carcinogênicas (LAJOVIC *et al.*, 2015).

Com relação a legislação, o nível máximo para este composto no Brasil é regulamentado apenas para aguardente de cana ( $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (BRASIL, 2005). No Canadá são estabelecidos os teores máximos de CE para vinhos ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ), vinhos fortificados ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), destilados de frutas ( $400 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e outras bebidas destiladas ( $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (ZHAO; JIANG, 2015). A União Europeia e os Estados Unidos aceitam valores máximos de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos (FRANCISQUETTI *et al.*, 2002; NÓBREGA *et al.*, 2015).

### 3.5 Técnicas de extração e determinação dos compostos tóxicos encontrados na vinificação

Dentre os métodos de extração de compostos carbonílicos tóxicos estão a destilação (JENDRAL; MONAKHOVA; LACHENMEIER, 2011), a extração líquido-líquido (LLE, do inglês: *liquid-liquid extraction*) (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006), extração em fase sólida (SPE, do inglês: *solid phase extraction*) (NÓBREGA *et al.*, 2015) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês: *solid phase microextraction*) (PAIANO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016b). A Tabela 2 apresenta estudos de quantificação de compostos tóxicos em vinhos de várias origens, utilizando diferentes



métodos de preparo e análise de amostras, com seus respectivos limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), níveis de recuperação e concentrações encontradas.

A LLE baseia-se na transferência de analitos da amostra aquosa para um solvente orgânico imiscível em água. Uma desvantagem deste método é a necessidade de evaporação de solvente, o que, em alguns casos, resulta na perda ou degradação de alguns dos componentes de interesse. Além disso, é uma operação demorada e que requer alto consumo de solventes orgânicos, muitas vezes tóxicos, gerando uma elevada quantidade de resíduos (HELLÉ; MARIET; COTE, 2015; HERNANZ *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2016).

Neste sentido, a SPE oferece vantagens em comparação com a LLE, tais como menor tempo de preparação da amostra e redução da quantidade de solventes orgânicos utilizada (GOUDA; GHANNAM, 2016; PYRZYNSKA; KUBIAK; WYSOCKA, 2016). Na SPE, a amostra aquosa é percolada por um cartucho contendo o sorvente, onde os analitos são retidos e posteriormente eluídos com uma pequena quantidade de solvente orgânico (CALDAS; GONÇALVES; PRIMEL, 2011). No entanto, os adsorventes devem ser embalados em um cartucho de SPE, o que pode tornar este método trabalhoso, além da possibilidade de obstrução do cartucho durante a extração (SHI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016).

Na SPME utiliza-se uma fibra de sílica fundida recoberta por polímero que é incorporada a um suporte semelhante a seringa modificada. Uma grande variedade de fibras está disponível, sendo que as características físico-químicas dos analitos da amostra determinam o tipo de revestimento que deve ser empregado (BOSCH-FUSTE *et al.*, 2007; CANUTO, 2011; WANG *et al.*, 2016d). O mecanismo desta técnica baseia-se no equilíbrio dos analitos entre a amostra e o revestimento de fibra (WANG *et al.*, 2016a, 2016d). A SPME é uma técnica que integra amostragem, a extração, e concentração em uma única etapa. Em comparação com os métodos tradicionais de preparação de amostra, como a LLE e SPE, a SPME apresenta vantagens, tais como rapidez, simplicidade de operação, isenção do uso de solventes orgânicos e não requer qualquer passo de concentração antes da determinação (GUAN *et al.*, 2016; MIN *et al.*, 2015; PERESTRELO *et al.*, 2010). Sem uso de solventes orgânicos tóxicos, a SPME está entre as técnicas analíticas mais ecológicas disponíveis atualmente (GUAN *et al.*, 2016; NACCARATO; PAWLISZYN, 2016).

Tabela 2 - Compostos tóxicos quantificados em vinhos produzidos em diversos países e analisados através de diferentes métodos com seus respectivos limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), níveis de recuperação e níveis encontrados.

Tóxico	Método	Derivati- zante	Extração	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	Recuperação (%)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	Procedência das amostras	Referência
Formaldeído	mini-CE-ED <sup>d</sup>	TBA <sup>e</sup>	- <sup>f</sup>	9,1	NI <sup>g</sup>	98,8-106,0 <sup>h</sup>	tinto: ND <sup>i</sup> branco: 4830 <sup>j</sup>	China	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	Espectro- fotometria UV	- <sup>k</sup>	Destilação	NI	NI	NI	130 <sup>j</sup>	Alemanha	Jendral <i>et al.</i> , 2011
	GC-MS <sup>l</sup>	-	-	5000	15000	NI	ND	Coréia do Sul	Chung <i>et al.</i> , 2015
Acetaldeído	mini-CE-ED	TBA	-	16,0	NI	98,9-105,0 <sup>h</sup>	tinto: 20700 <sup>j</sup> branco: 67500 <sup>j</sup> tinto e branco: 0,0-211,0 $\times 10^3$ (média: 34,0 $\times 10^3$ ) fortificados: 12,0 $\times 10^3$ -800,0 $\times 10^3$ (média: 118,0 $\times 10^3$ )	China	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	GC-MS	-	-	NI	NI	NI	tinto: 18,1 $\times 10^3$ -477,0 $\times 10^3$ (média: 55,8 $\times 10^3$ ) branco: 24,7 $\times 10^3$ -171,0 $\times 10^3$ (média: 67,0 $\times 10^3$ ) rosé: 71,9 $\times 10^3$ -110,0 $\times 10^3$ (média: 81,7 $\times 10^3$ )	Europa	Lachenmeier <i>et al.</i> , 2008
	GC-MS	PFBHA <sup>m</sup>	HS-SPME <sup>n</sup>	0,2	NI	NI	branco: 71,9 $\times 10^3$ -110,0 $\times 10^3$ (média: 81,7 $\times 10^3$ )	Itália	Paiano <i>et al.</i> , 2014
	GC-FID <sup>o</sup>	PFBHA	HS-SPME	25,0	NI	91	branco: 9000 <sup>j</sup>	Canadá	Wang <i>et al.</i> , 2005
	GC-MS	-	LLE <sup>p</sup>	NI	NI	NI	fortificado envelhecido 1 ano: 15,6 $\times 10^3$ -27,2 $\times 10^3$ <sup>q</sup> 11 anos: 37,2 $\times 10^3$ -91,1 $\times 10^3$ <sup>q</sup> 25 anos: 57,8 $\times 10^3$ -116,9 $\times 10^3$ <sup>q</sup>	Portugal	Câmara <i>et al.</i> , 2006
Carbamato de etila	GC-MS	-	SPE <sup>q</sup>	0,6	1,9	105,9-103,0	5,2-29,4	Brasil	Nóbrega <i>et al.</i> , 2015
	GCxGC- TOFMS <sup>r</sup>	-	HS-SPME	seco: 4,3 suave: 2,8	seco: 14,4 suave: 9,2	seco: 88,6 suave: 99,4	seco: 54,1-146,2 suave: 64,2-162,5	Portugal	Perestrelo <i>et al.</i> , 2010
	HPLC-FLD <sup>s</sup>	9-xantidrol e ácido clorídrico	-	4,8	16,0	tinto: 99,5-101,0	tinto: ND-22,4 (média: 13,7)	China	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	GC-NPD <sup>t</sup>	-	HS-SPME	NI	34,0	NI	50,7-106,6	China	Ye <i>et al.</i> , 2011
	GC-MS	-	-	NI	NI	94,9	1,0-39,1	Brasil	Francisquetti <i>et al.</i> , 2002

	HPLC-FLD	9-xantidrol	-	3,0	NI	98,5	4,9-39,9 (média: 17,7)	Hungria	Ajtony <i>et al.</i> , 2013
	UHPLC-MS/MS <sup>u</sup>	-	-	1,8	4,0	107,2-110,9	32,1-94,2 (média: 57,3)	China	Zhao & Jiang, 2015
Furfural	HPLC-DAD <sup>v</sup>	-	-	1200	3700	99,0	seco: ND-7000 <sup>i</sup> suave: ND-8500 <sup>i</sup>	Portugal	Pereira <i>et al.</i> , 2011
	HPLC-DAD	-	-	0,7	1,9	NI	800-8800	Portugal	Ho <i>et al.</i> , 1999
	GC-MS	-	LLE	NI	NI	NI	fortificado: 200-24100	Portugal	Câmara <i>et al.</i> , 2006
	GC-MS	-	HS-SPME	NI	NI	90,0-110,0	ND-1400 (média: 149,0)	Austrália	Wang <i>et al.</i> , 2016b
	GC-MS	-	HS-SPME	NI	NI	NI	ND-961,0 (média: 192,0)	Austrália, China, França	Wang <i>et al.</i> , 2016c
Acroleína	GC-MS	-	HS-SPME	14,0	40,0	90,2-94,7	0,7 <sup>j</sup>	Alemanha	Kächele <i>et al.</i> , 2014
	GCxGC-TOFMS	-	HS-SPME	19600	59400	NI	ND	África do Sul	Bauer <i>et al.</i> , 2012

<sup>a</sup> LOD: limite de detecção; <sup>b</sup> LOQ: limite de quantificação; <sup>c</sup> Intervalo de concentração encontrado nas amostras; <sup>d</sup> Eletroforese capilar miniaturizada com detecção eletroquímica (mini-CE-ED, do inglês: *miniaturised capillary electrophoresis with electrochemical detection*); <sup>e</sup> TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico; <sup>f</sup> Etapa de extração não realizada; <sup>g</sup> NI: não informado; <sup>h</sup> O ensaio de recuperação não foi feito para o vinho, apenas para o licor; <sup>i</sup> ND: não detectado; <sup>j</sup> Apenas valores médios de concentração foram informados; <sup>k</sup> Não passou por derivatização; <sup>l</sup> GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; <sup>m</sup> PFBHA: O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina hidrocloreto; <sup>n</sup> HS-SPME: microextração em fase sólida no modo headspace; <sup>o</sup> Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID, do inglês: *gas chromatography with flame ionization detector*); <sup>p</sup> LLE: extração líquido-líquido; <sup>q</sup> SPE: extração em fase sólida; <sup>r</sup> GCxGC-TOFMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo; <sup>s</sup> Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD, do inglês: *high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*); <sup>t</sup> Cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (GC-NPD, do inglês: *gas chromatography nitrogen phosphorus detector*); <sup>u</sup> Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massa em tandem (UHPLC-MS/MS, do inglês: *ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*); <sup>v</sup> Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, do inglês: *high-performance liquid chromatography with diode array detection*).

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 (MIN *et al.*, 2015). A SPME pode ser totalmente automatizada e combinada com instrumentação analítica, como o cromatógrafo a gás, onde os analitos sorvidos pela fibra são dessorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo (BOSCH-FUSTE *et al.*, 2007; NACCARATO; PAWLISZYN, 2016).

Alguns estudos apresentados na Tabela 2 não realizaram extração dos compostos no preparo das amostras. Chung *et al.* (2015) e Lachenmeier & Sohnius (2008) determinaram formaldeído e acetaldeído, respectivamente, por injeção direta do vinho no cromatógrafo gasoso com detecção por espectrometria massas. O LOD e LOQ para o formaldeído foi  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $15000 \mu\text{g L}^{-1}$  (CHUNG *et al.*, 2015), e para o acetaldeído esses limites não foram informados (LACHENMEIER; SOHNIUS, 2008). Para quantificação de furfural, os vinhos foram analisados após injeção direta da amostra no cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos por Pereira *et al.* (2011) e Ho *et al.* (1999). Pereira *et al.* (2011) encontraram valores de LOD e LOQ ( $1200 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $3700 \mu\text{g L}^{-1}$ ) superiores a Ho *et al.* (1999) ( $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Zhang *et al.* (2011) determinaram o formaldeído em vinhos através da eletroforese capilar miniaturizada com detecção eletroquímica (mini-CE-ED, do inglês: *miniaturised capillary electrophoresis with electrochemical detection*), com um passo prévio de derivatização com ácido 2-tiobarbitúrico, filtragem e posterior diluição da amostra. De forma semelhante, Zhang *et al.* (2014) e Ajtony *et al.* (2013) analisaram CE derivatizado com 9-xantidrol em vinhos após a injeção da amostra no cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência.

Na preparação de amostras, as reações de derivatização podem ser utilizadas, quando necessário, a fim de converter os analitos em compostos que apresentem melhor resposta no detector do equipamento em que a análise é realizada (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016). Diversos trabalhos têm utilizado a derivatização para a determinação de aldeídos, como formaldeído, acroleína e acetaldeído em bebidas alcoólicas (PAIANO *et al.*, 2014; SOWINSKI; WARDENCKI; PARTYKA, 2005; WANG; REILLY; PAWLISZYN, 2005; WARDENCKI; SOWINSKI; CURYLO, 2003; ZHANG *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015). Estes compostos são altamente voláteis (PE:  $-19,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

53 °C e 20,2 °C, respectivamente) e reativos, devido ao caráter eletrofílico (SZENDE; TYIHÁK, 2010), o que dificulta a sua determinação analítica. Dessa forma, a reação de derivatização pode ser empregada para melhorar a estabilidade destes aldeídos e obter níveis de recuperação e sensibilidade satisfatórias (KÄCHELE *et al.*, 2014; VANDERHAEGEN *et al.*, 2006; WANG; REILLY; PAWLISZYN, 2005). Para detecção de aldeídos e acetona em água, por exemplo, a derivatização com 2,2,2-trifluoroetilhidrazina (TFEH) tem se mostrado vantajosa, uma vez que o produto desta reação é suficientemente volátil para ser extraído pela HS-SPME e determinado por cromatografia gasosa (GC, do inglês: *gas chromatography*) (LIM; SHIN, 2012).

Com relação à determinação dos compostos carbonílicos tóxicos em vinhos, diversas técnicas analíticas têm sido utilizados para este fim, tais como a eletroforese, espectrofotometria ultravioleta (UV), HPLC e a GC, sendo a última a técnica mais utilizada (Tabela 2).

A eletroforese é definida como uma técnica de separação que baseia-se na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis, em um meio condutor líquido, na presença de um campo elétrico. O sistema eletroforético onde a separação é conduzida em colunas capilares é denominado eletroforese capilar. Esta técnica é compatível com vários detectores permitindo, dessa forma, ser empregada na separação de uma grande variedade de espécies químicas. Embora seja um método versátil, a eletroforese tem como principal desvantagem a falta de habilidade para dissipar o calor, tendo como consequência o aquecimento da solução que contém os analitos, possibilitando a sua degradação térmica (MARRA, 2014; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; ZHANG *et al.*, 2011).

A espectrofotometria UV é uma técnica analítica versátil e relativamente mais simples. A determinação da concentração de uma substância é realizada pela medida da absorção de luz em condições bem definidas, tomando como referência a absorbância da substância em uma concentração conhecida. No entanto, as baixas concentrações de muitos analitos em amostras complexas dificultam a determinação direta por esta técnica. Além disso, pode apresentar limitada seletividade decorrente das interferências espectrais que resultam em faixas de absorção amplamente sobrepostas (ABADI *et al.*, 2012; KAKHKI; NEJATI-YAZDINEJAD; KAKEH, 2013; SANTOS; DEMIATE; NAGATA, 2010; SILVA; SANTOS; BATISTUTI, 2013).

A cromatografia é um método físico-químico de separação, que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A ampla variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna esta técnica versátil e de grande aplicação (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A cromatografia líquida (LC, do inglês: *liquid chromatography*) divide-se em cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência. Na primeira, a fase móvel é eluída através da coluna cromatográfica (fase estacionária) apenas pela força da gravidade. Na LC de alta eficiência, fases estacionárias de partículas menores são utilizadas e faz-se necessário o uso de uma bomba de elevada pressão para a eluição da fase móvel. A HPLC apresenta como vantagens a alta velocidade de análise, desempenho e resolução. Esta técnica é indicada para determinação de compostos não voláteis e termicamente instáveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; TETTE *et al.*, 2016).

Na GC os compostos são transportados ao longo da fase estacionária por uma fase móvel gasosa. A fase móvel é chamada gás de arraste, uma vez que se trata de um gás inerte, em relação à fase estacionária, e de alta pureza. Os gases mais utilizados são o hidrogênio, nitrogênio e hélio. A GC é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, comumente aplicada para compostos voláteis, semi-voláteis e compostos termicamente estáveis. Além disso, possui um alto poder de resolução e possibilita a detecção de compostos presentes em baixas concentrações (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; SKOOG *et al.*, 2008; TETTE *et al.*, 2016). Esta técnica pode ser empregada no modo monodimensional, em que apenas uma coluna cromatográfica é usada, ou multidimensional, em que duas ou mais colunas em série constituem o sistema cromatográfico.

Algumas amostras são complexas e a separação de seus componentes em apenas uma fase estacionária, usada na GC monodimensional, é difícil de ser alcançada (ZINI, 2009). Dessa forma, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC) surgiu como uma alternativa para analisar amostras complexas, proporcionando melhor resolução através da separação adequada dos analitos para obter os melhores resultados em termos de identificação/quantificação dos compostos alvo (HERRERO *et al.*, 2009).

A GCxGC é caracterizada pelo uso de duas colunas cromatográficas unidas por modulador, assim as amostras são submetidas a análise em duas dimensões, segundo diferentes mecanismos de separação em cada coluna. As colunas devem proporcionar mecanismos de separação diferentes, independentes um do outro, a fim de que se alcance o melhor resultado ao final do processo cromatográfico. Se empregada uma coluna apolar, os componentes serão separados de acordo com sua volatilidade. Em uma coluna polar ou mediantemente polar, a seletividade se baseia primordialmente em interações intermoleculares do tipo  $\pi$ - $\pi$ , ligações de hidrogênio, van der Waals entre outras. A primeira coluna apresenta comprimento de 30m a 60m e a segunda coluna cromatográfica é mais curta (em torno de 1-2m). Inicialmente, a amostra é submetida à separação na primeira coluna, posteriormente ingressa no modulador, o qual concentra e libera as frações da mesma, enviando-as para a segunda coluna, sendo que a separação ocorre de forma independente da que ocorreu na primeira coluna. A modulação é a chave do processo, uma vez que o sistema de modulação proporciona a amostragem da banda cromatográfica que elui da primeira dimensão (<sup>1</sup>D) direcionando-a para uma rápida separação na segunda dimensão (<sup>2</sup>D) (ZINI, 2009).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção. Um detector é posicionado ao final da coluna cromatográfica para registrar o sinal do analito eluído da coluna, permitindo sua análise qualitativa e/ou quantitativa. Dentre os detectores que podem ser utilizados, o espectrômetro de massas tem se destacado pela sua versatilidade de uso com ambas as técnicas (GC e LC). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) combina a alta capacidade de separação da GC com a alta seletividade e sensibilidade da MS, consistindo em uma técnica poderosa para a determinação quantitativa de baixos níveis de contaminantes em matrizes complexas (CALDAS; GONÇALVES; PRIMEL, 2011; CHEN *et al.*, 2016; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009; SKOOG *et al.*, 2008; TETTE *et al.*, 2016). Além disso, este detector pode ser usado em dois modos: SCAN ou SIM. No primeiro, o detector registra todos os íons obtidos e pode ser utilizado para obtenção do espectro de massas individual de cada composto alvo que se espera encontrar em uma determinada matriz. A partir da avaliação desse espectro de massas, os íons mais abundantes e característicos dos compostos são selecionados no modo SIM para serem registrados pelo detector (LOPES, 2011).

Diversas técnicas têm sido propostas para a quantificação de compostos carbonílicos tóxicos em vinhos. Em um estudo realizado por Jendral *et al.* (2011) a presença de formaldeído foi encontrada em uma concentração média de  $130 \mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos da Alemanha após destilação e determinação espectrofotométrica. Contrariamente, Zhang *et al.* (2011) não detectaram este aldeído em vinhos tintos da China, utilizando a mini-CE-ED (sem extração prévia dos compostos). Chung *et al.* (2015) também não detectaram o formaldeído e acetaldeído em vinhos da Coreia do Sul injetados no CG/MS sem método de extração prévio.

Em relação ao acetaldeído, Paiano *et al.* (2014) encontraram uma concentração média de  $558000 \mu\text{g L}^{-1}$  de acetaldeído em vinhos tintos consumidos na Itália, avaliados por HS-SPME-GC/MS. O nível médio deste aldeído detectado através da GC/MS em vinhos fortificados foi de  $118000 \mu\text{g L}^{-1}$  (LACHENMEIER; SOHNIUS, 2008). Câmara *et al.* (2006) avaliaram, através da LLE-CG/MS, a evolução da composição volátil dos vinhos Madeira de quatro variedades Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho produzidos em Portugal. Os valores médios de acetaldeído encontrados em cada variedade foram de  $61170 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $55770 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $52263 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $44753 \mu\text{g L}^{-1}$  para Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho respectivamente.

A presença da acroleína e furfural em vinhos também tem sido relatada (Tabela 2). Kächele *et al.* (2014), ao analisarem vinhos da Alemanha por HS-SPME-GC/MS, encontraram um valor médio de  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  de acroleína. O furfural foi detectado na concentração média de  $192 \mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos rosé produzidos na Austrália, China e França, avaliados por meio da HS-SPME/GC-MS (WANG *et al.*, 2016b). Este composto tóxico foi encontrado também em vinhos portugueses fortificados (concentração média:  $4320 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Ho *et al.*, 1999) e vinhos Madeira (concentração média  $7875 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Câmara *et al.*, 2006).

A quantificação de CE foi realizada em vinhos chineses por Ye *et al.* (2011), mediante o uso da HS-SPME/GC-NPD, e a concentração média deste éster foi de  $85,8 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nóbrega *et al.* (2015) propuseram a utilização da SPE-GC/MS no modo SIM para a determinação de CE em vinhos comercializados no Brasil. Os níveis médios deste composto para vinhos Chenin blanc, Syrah e Merlot foram de  $12,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $21,8 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. Ainda em vinhos brasileiros analisados por GC/MS (sem extração prévia), Francisquetti *et al.* (2002) detectaram um valor médio



de 6,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  na variedade Merlot. A presença do CE vem sendo relatada também em vinhos tintos da Hungria (concentração média: 17,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Ajtony *et al.*, 2013) e da China (concentração média: 13,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Zhang *et al.*, 2014), aos quais utilizaram a HPLC com detecção de fluorescência (FLD, do inglês: *fluorescence detection*). Zhao & Jiang (2015) evidenciaram uma concentração média de 57,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  deste composto em vinhos tintos chineses, através cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massa em tandem (UHPLC-MS/MS, do inglês: *ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*).

Estes estudos (Tabela 2) mostram que os compostos carbonílicos tóxicos têm sido individualmente determinados através técnicas cromatográficas, espectrométricas ou eletroforéticas e os níveis encontrados em vinhos variam na ordem de ng a mg por litro. Além disso, cabe ressaltar que alguns métodos reportados na literatura têm sido aplicados na quantificação destes compostos sem prévia validação do método, pois não mencionam os limites de detecção/quantificação e recuperação.

### **3.6 Análise do risco da exposição aos compostos tóxicos presentes no vinho**

A Figura 6 mostra as etapas envolvidas na análise do risco relacionado à exposição à um composto tóxico. A análise de risco (Etapa 1 da Figura 5) é uma ferramenta para o processo de tomada de decisão sobre questões de segurança dos alimentos, através dela pode-se identificar um problema potencial, avaliar a probabilidade da sua ocorrência, estimar o seu impacto e sugerir medidas para solucioná-lo. Neste processo, além da avaliação de risco (Etapa 2.1 da Figura 5), estão inclusos também outros dois componentes: gerenciamento de risco e comunicação de risco (Etapas 2.2 e 2.3 da Figura 5, respectivamente) (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008; LIU *et al.*, 2013). O gerenciamento do risco abrange a tomada de decisões pelas agências reguladoras que levam em consideração as informações técnicas relacionadas ao dano à saúde e ao risco, fatores políticos, sociais e econômicos. A comunicação do risco engloba a troca das informações obtidas da avaliação e do gerenciamento do risco, entre avaliadores, gerenciadores,

mídia, grupos de interesse e público em geral (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008; JARDIM; CALDAS, 2009; LIU *et al.*, 2013).

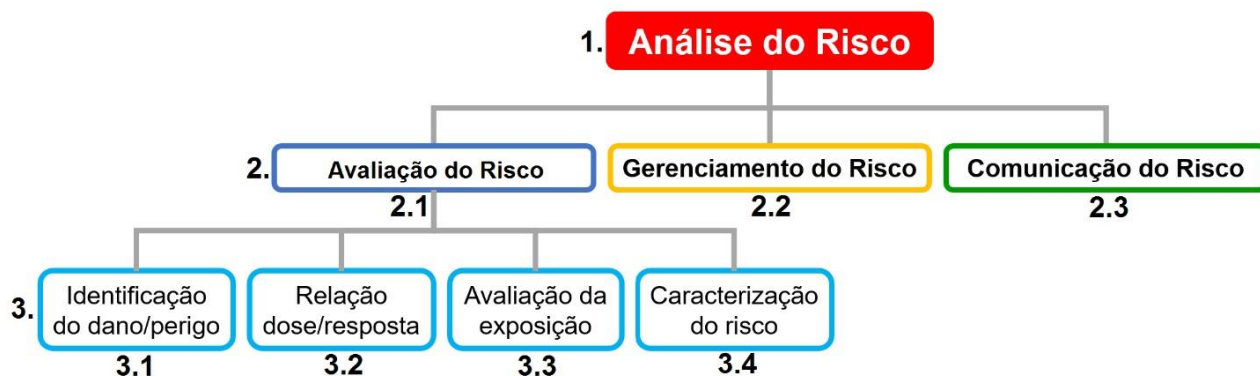


Figura 6- Etapas da análise do risco; Fonte: Adaptado de Jardim e Caldas (2009).

O processo de avaliação do risco é constituído de quatro fases: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (Etapa 3 da Figura 5) (ANVISA, 2013).

Na etapa de identificação do dano/perigo (Etapa 3.1 da Figura 5), são identificados os agentes biológicos, químicos ou físicos capazes de causar efeitos adversos à saúde humana. A relação entre a estrutura molecular do composto e sua atividade tóxica, absorção, metabolização, biotransformação, acumulação e eliminação podem ser utilizadas como fontes de informações nesse processo através de estudos *in vitro* e com animais de laboratório (ANVISA, 2013; DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

O estabelecimento de uma relação dose/resposta (Etapa 3.2 da Figura 5) é feita a partir de dados provenientes de diferentes tipos de estudos científicos (estudos de toxicidade animal, de exposição humana e dados epidemiológicos procedentes de pesquisas sobre a ocorrência de doenças) e devem proporcionar a identificação de uma relação de causa e efeito entre a exposição ao composto e determinada resposta adversa (ANVISA, 2013; DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

Na definição da relação dose/resposta são estimadas, por exemplo, (i) a maior dose que não causa efeito adverso nos animais testados (NOAEL, do inglês: *no*

*observed adverse effect level*) e (ii) a menor dose na qual o efeito adverso foi observado (LOAEL, do inglês: *lowest observed adverse effect level*). A dose de referência toxicológica (BMD, do inglês: *benchmark dose*) é uma alternativa ao uso do NOAEL e do LOAEL para derivação dos níveis seguros de exposição humana à compostos tóxicos. A estimativa de BMD envolve modelagem matemática da curva de dose-resposta para interpolar uma dose estimada que corresponda a um nível particular de resposta. A incerteza desta interpolação também é estimada e o limite de confiança inferior desta dose é denominado BMDL (do inglês: *benchmark dose lower confidence limit*). Essas medidas podem ser utilizadas no cálculo dos parâmetros seguros de ingestão crônica e aguda para o homem (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 (BOOBIS *et al.*, 2013; GALLI; MARINOVICHA; LOTTI, 2008; JARDIM; CALDAS, 2009; REYES, 2012). Com relação aos compostos tóxicos alvo deste estudo, o JECFA estabelece para a soma da ingestão de furfural, furfural (álcool, acetato, propionato, pentanoato, octanoato, 3-metilbutanoato) e 2-furoato (metil, propil, amil, hexil, and octil) uma ADI de 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal por dia (JECFA, 2017). O formaldeído, acetaldeído, CE e acroleína não possuem parâmetros de ingestão segura, pois são compostos genotóxico.

A avaliação da exposição (Etapa 3.3 da Figura 5), é definida como a estimativa da ingestão de substâncias que possam representar perigo à saúde humana. Nesta etapa, dados de consumo alimentar são combinados com informações sobre concentração do composto tóxico presente no alimento, de modo a permitir uma comparação com os parâmetros de ingestão segura, quando existentes, e, assim, possibilitar a caracterização do risco (ANVISA, 2013; DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

Na caracterização do risco (Etapa 3.4 da Figura 5), são integrados os resultados procedentes das outras três fases processo de avaliação do risco (identificação do perigo, relação dose/resposta e avaliação da exposição), incluindo as incertezas, para gerar uma estimativa da probabilidade da ocorrência e da gravidade de um efeito adverso (ANVISA, 2013). A metodologia utilizada na caracterização do risco depende do fato do composto apresentar ou não genotoxicidade. Para caracterização do risco da exposição humana a substâncias carcinogênicas e genotóxicas pode ser utilizado o cálculo da margem de exposição (MOE, do inglês: *margin of exposure*) (JARDIM; CALDAS, 2009).

A MOE pode ser usada para classificar substâncias genotóxicas de acordo com o risco, indicando o nível de preocupação para estabelecer prioridades de ações para os gerenciadores de risco e para subsidiar os indivíduos a tomar decisões pessoais de estilo de vida. Um valor de MOE 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. Com relação a caracterização do risco da exposição humana a substâncias não genotóxicas, a ingestão é comparada ao parâmetro de ingestão segura, sendo assim pode haver risco quando a ingestão calculada ultrapassa esse parâmetro (BARLOW *et al.*, 2006; JARDIM; CALDAS, 2009).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável, no Brasil, pela condução de avaliação do risco da exposição humana a contaminantes em alimentos. Internacionalmente, procedimentos de avaliação do risco são realizados pelos comitês científicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês: *Food and Agriculture Organization*) (JARDIM; CALDAS, 2009).

## 4 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo teve como objetivo desenvolver um método baseado no uso da HS-SPME-GC/MS-SIM para a determinação simultânea de compostos carbonílicos tóxicos (formaldeído, acetaldeído, acroleína, CE e furfural) durante a vinificação e avaliar o risco da exposição a estes compostos. O acetaldeído, acroleína e formaldeído foram derivatizados com TFEH, para melhorar a estabilidade térmica destes compostos e permitir a sua detecção através da GC. O TFEH reage com a carbonila dos compostos tóxicos formando uma hidrazona com a liberação de uma molécula de água. O furfural e o CE não reagiram com o agente derivatizante, uma vez que a carbonila destes compostos não possui carga parcial positiva, o que impede a reação. Na estrutura do furfural, pois a carga parcial negativa do oxigênio da carbonila é estabilizada pelo seu anel aromático, e no CE, a amida presente na sua estrutura estabiliza a carga parcial positiva do carbono da carbonila. Além disso, esses compostos apresentam estabilidade/volatilidade adequada para a análise através da GC.

Coeluições foram observadas em um trabalho anterior quando a GCxGC/TOFMS foi usada para a quantificação simultânea destes compostos tóxicos em vinhos Syrah (LAGO *et al.*, 2017). Nesta abordagem bidimensional, o acetaldeído e a acroleína derivatizados coeluíram na <sup>1</sup>D com o 4-metil-pentanoato de etila/limoneno e o hexanoato de metila respectivamente, sendo que estas coeluições ocorreram em todas as amostras de Syrah. Nos vinhos Merlot em estudo, a GCxGC/TOFMS também revelou a ocorrência de coeluições envolvendo as formas derivatizadas do acetaldeído e acroleína que foram separadas do limoneno e hexanoato de metila na <sup>2</sup>D. O íon mais intenso das formas derivatizadas do acetaldeído (m/z 71) e da acroleína (m/z 83) foram utilizadas no modo SIM para obter as curvas analíticas e quantificar estes compostos através da GC/MS-SIM. Estes íons quantificadores não foram encontrados no MS dos compostos coeluídos (limoneno e hexanoato de metilo).

A HS-SPME-GC/MS-SIM mostrou ser adequada para quantificar simultaneamente os cinco compostos tóxicos. As curvas de calibração realizadas em soluções modelo de mosto e vinho apresentaram boa linearidade, o que pode ser

observado através dos valores do coeficiente de determinação que variaram de 0,9612 a 0,9940 para CE e formaldeído, respectivamente. Os valores LOD e LOQ mostram que o método é suficientemente sensível para quantificar os cinco compostos nessas matrizes. O menor e maior valor de LOD foi encontrado para o formaldeído e furfural ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e acetaldeído ( $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ), respectivamente. O menor LOQ foi encontrado para o formaldeído ( $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e o acetaldeído apresentou maior LOQ ( $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Além disso, os valores de recuperação variaram de 90 % a 102 % e os coeficientes de variação obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 11,8 %, demonstrando a eficiência do método proposto para ambas as matrizes.

Os valores de alguns parâmetros de validação foram ligeiramente melhores para a solução modelo de mosto do que de vinho, incluindo menores valores de LOD/LOQ e menor desvio padrão relativo nos ensaios de repetibilidade/precisão intermediária. Esta diferença pode estar relacionada com o efeito do etanol, contido no vinho e ausente no mosto, que compete com os analitos pelos locais de ligação do revestimento da fibra de SPME (WELKE *et al.*, 2012a). No entanto, deve-se ressaltar que essas diferenças são sutis, uma vez que o uso de padrão interno ajudou a compensar o efeito da matriz.

Os níveis dos compostos tóxicos verificados nas vinificações realizadas a partir das uvas cultivadas em solo arenoso (A) e argiloso (B) foram estatisticamente semelhantes ao nível de confiança de 95 %, dessa forma os valores encontrados nas diferentes etapas da vinificação (uva, mosto, após a fermentação alcoólica e vinho) foram representados através média entre estas vinificações. O CE não foi detectado nas etapas das vinificações (concentração inferior ao LOD;  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  para a solução modelo de mosto e vinho, respectivamente).

O formaldeído foi detectado, mas não quantificado, uma vez que seus níveis foram inferiores ao LOQ em todos os estágios da vinificação, portanto, a concentração deste aldeído está entre  $0,1$  e  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  (valores do LOD e LOQ, respectivamente) em uva e mosto, e entre  $0,4$  e  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  nas amostras após a fermentação alcoólica e no vinho. Os valores encontrados durante a vinificação para este tóxico foram inferiores a concentração estabelecida como segura ( $2600 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para exposição oral pela IPCS (IPCS, 2002). A presença do formaldeído em todas as etapas da vinificação pode ocorrer principalmente devido à hidrólise da pectina, um polissacarídeo presente

na uva que contém em sua estrutura unidades de ácido galacturônico parcialmente esterificadas com metanol. Após a hidrólise da pectina, seja durante a maturação da uva ou pelas ação pectinases adicionadas ao mosto, este álcool é liberado e sua oxidação produz formaldeído (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). No entanto, os baixos níveis de formaldeído encontrados em todas as etapas da vinificação podem ser explicados pela alta volatilidade, reatividade, e possíveis ligações deste aldeído com compostos fenólicos e/ou SO<sub>2</sub> conforme previamente demonstrado por Azevedo *et al.* (2007b), Frivik; Ebeler (2003), Pissarra *et al.* (2003).

O acetaldeído, acroleína e furfural também foram encontrados em todas as etapas da vinificação. O acetaldeído foi encontrado na uva (35,8 µg kg<sup>-1</sup>) e no vinho (35,5 µg L<sup>-1</sup>) em concentração estatisticamente similar de acordo com o teste de Tukey (p <0,05). No entanto, os níveis encontrados deste aldeído nas uvas foram estatisticamente diferentes daqueles detectados no mosto (27,7 µg L<sup>-1</sup>) e após a fermentação alcoólica (66,8 µg L<sup>-1</sup>). Nas uvas, o acetaldeído é formado a partir do piruvato durante a respiração anaeróbica pela ação da piruvato descarboxilase (PESIS, 2005). No preparo do mosto, o SO<sub>2</sub> é adicionado como conservante e os compostos fenólicos presentes na casca da uva começam a ser transferidos para o mosto. Da mesma forma que o formaldeído, o acetaldeído também pode reagir com os fenólicos conforme demonstrado por Sheridan & Elias (2016), Pissarra *et al.* (2003), Zea *et al.* (2015), diminuindo assim a concentração de acetaldeído livre capaz de ser detectado por HS-SPME-GC/MS-SIM. Após a fermentação alcoólica, os níveis deste aldeído aumentaram, o que pode indicar que a álcool desidrogenase da *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de reduzir o acetaldeído a etanol, que é o principal produto da fermentação alcoólica (LIU; PILONE, 2000). Outra via de formação do acetaldeído é a auto-oxidação de compostos fenólicos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Os níveis de acetaldeído nos vinhos (35,5 µg L<sup>-1</sup>) foram estatisticamente inferiores aos níveis encontrados após a fermentação alcoólica (66,8 µg L<sup>-1</sup>). A diminuição nas concentrações deste aldeído pode ocorrer devido as possíveis ligações com flavonóides (SHERIDAN; ELIAS, 2016), assim como verificado na preparação do mosto. Além disso, o acetaldeído pode ser precursor para a síntese de outros compostos incluindo acetais (como o 1,1-dietoxietano), sotolon (3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona), diacetil (2,3-butanodiona) e acetoína (3-hidroxi-butanona), os quais podem ser encontrado em vinhos (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015).

A acroleína foi encontrada em maiores níveis nas uvas ( $47,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), que não foram estatisticamente diferentes do mosto ( $44,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Entretanto, este tóxico não foi detectado após a fermentação alcoólica e no vinho (níveis inferiores ao LOD,  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A ocorrência deste aldeído no ar atmosférico pode justificar a sua presença nas uvas e, portanto, no mosto. A acroleína pode ser liberada para o meio ambiente através da queima da madeira (BURCHAM, 2017; VRIES *et al.*, 2016), usada em lareiras e fogões/fornos a lenha, que são utilizados com frequência em áreas frias, como Campanha Gaúcha, onde as uvas deste estudo foram cultivadas. Além disso, a geração de calor através da queima da madeira é feita em torno do vinhedo para protegê-lo da geada. Nas duas últimas etapas da vinificação (após a fermentação e no vinho), a não detecção da acroleína pode ser explicada devido a interação deste aldeído com compostos fenólicos, assim como mencionado acima para o formaldeído e o acetaldeído (BAUER; KOSSMANN, 2010; LOPACHIN; GAVIN, 2014).

O furfural foi encontrado em concentrações maiores nas uvas ( $130,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) diferindo estatisticamente ( $p > 0,05$ ) das outras etapas da vinificação. Os níveis deste aldeído encontrados no mosto ( $6,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e após a fermentação alcoólica ( $5,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram estatisticamente similares, e estes foram estatisticamente diferentes dos níveis encontrados no vinho ( $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Nas uvas, o furfural pode ocorrer devido à sua presença no ar atmosférico, que pode estar relacionada com a queima da madeira (KENNISON *et al.*, 2007), assim como a acroleína. A concentração de furfural diminuiu ao longo das etapas da vinificação, e outros seis compostos que contêm furano (dihidro-5-pentil-2(3H)-furanona, ácido 5-oxotetrahydrofurano-2-carboxílico, 5-etoxidiidro-2(3H)-furanona, 5-(1,2-dihidroxiethyl)-dihydrofuran-2-ona, 5-butildihidro-2(3H)-furanona e tetrahydro-5-metil-2-furanmetanol) foram encontrados desde o mosto até o vinho, portanto, o furfural detectado em uvas pode sofrer transformações durante a vinificação, dando origem a estes compostos derivados.

O conhecimento da origem destes tóxicos na vinificação pode contribuir para o controle e prevenção da formação dos mesmos em estudos futuros. Existem trabalhos que já se dedicaram a redução de alguns destes compostos em bebidas alcoólicas (DAHABIEH; HUSNIK; VUUREN, 2010; WANG *et al.*, 2006). Dahabieh *et al.* (2010) e Wang *et al.* (2006) obtiveram a redução de CE em fermentado de arroz e acetaldeído em cerveja, respectivamente, por meio do melhoramento genético da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Métodos físicos, químicos e enzimáticos também



podem ser utilizados para a redução de carbamato de etila em bebidas alcoólicas (ZHAO *et al.*, 2013).

Com relação aos vinhos Merlot comercialmente disponíveis, os compostos tóxicos quantificados foram a acroleína, acetaldeído e furfural. O carbamato de etila não foi detectado (valores inferiores ao LOD,  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e os níveis de formaldeído estavam entre o LOQ e o LOD ( $0,4$  e  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente). A acroleína foi encontrada em 50 % dos vinhos em concentração variando de  $0,8$  a  $29,8 \mu\text{g L}^{-1}$  (mediana de  $15,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ). O acetaldeído e o furfural foram detectados em todas as amostras em níveis variando entre  $1,6$  a  $113,5$  e  $1,6$  a  $227,9 \mu\text{g L}^{-1}$  com mediana de  $16,6$  e  $30,9 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Além destes, outros 16 compostos contendo furano (dihidro-5-pentil-2-furanona, 5-butildihidro-2(3H)-furanona, ácido 5-oxotetrahidrofurano-2-carboxílico, tetrahidrofurano, 2,5-dimetilfurano, 5-Metilfurfural, 2-Furanmetanol, pantolactona, difurfuril éter, 1-(2-furanil)-etanona, 2-furoato de etilo, 2-pentilfurano, oaklactona, 2(5H)-furanona,  $\gamma$ -valerolactona e 2-metilfurano) foram encontrados em alguns destes vinhos comerciais. Os níveis médios dos compostos tóxicos detectados nos vinhos comerciais foram maiores do que os encontrados nos estágios da vinificação, mostrados anteriormente. Portanto, o armazenamento também pode desempenhar um papel importante na formação desses compostos.

Através do cálculo da ingestão diária estimada (EDI, do inglês: *estimated daily intake*) dos compostos tóxicos em estudo, verificou-se que a maior exposição ocorreu em relação ao furfural ( $101,3$  e  $128,8 \text{ ng kg}^{-1}$  de peso corporal (p.c) para mulheres e homens, respectivamente), seguido do acetaldeído ( $45,7$  e  $58,1 \text{ ng kg}^{-1}$  de p.c para mulheres e homens, respectivamente) e acroleína ( $35,7$  e  $45,4 \text{ ng kg}^{-1}$  de p.c para mulheres e homens, respectivamente). Os valores EDI indicaram que a exposição ao furfural através do consumo de vinho, juntamente aos demais compostos contendo furano, não representam risco para ambos os sexos, visto que o EDI não excedeu a ingestão diária aceitável para soma da ingestão de compostos furfurais, furfuril e furoato ( $500 \times 10^4 \text{ ng kg}^{-1}$  de peso molecular) estabelecido pelo (JECFA, 2000). A exposição dos homens (ingestão diária recomendada de 300 mL de vinho) à acroleína pode representar risco para a saúde do consumidor, uma vez que os valores do MOE foram inferiores a 10.000 em 7 de um total de 10 amostras em que esse composto foi quantificado. Para mulheres (ingestão diária recomendada de 200 mL de vinho), a exposição à acroleína também pode representar risco para a saúde, já que os valores

do MOE foram inferiores a 10.000 em 5 destas amostras. A exposição ao acetaldeído não apresenta risco à saúde para ambos os sexos, visto que os valores de MOE foram superiores a 10.000 em todas as amostras.

## 5 CONCLUSÃO

O uso da GC×GC/TOFMS foi importante para verificar possíveis coeluições entre os compostos tóxicos alvos deste estudo e outros compostos voláteis presentes no vinho. Após identificar as coeluições, íons apropriados foram selecionados para a quantificação do formaldeído, acroleína, acetaldeído, furfural e CE por GC/qMS-SIM. Os parâmetros de validação, incluindo LOD, LOQ, repetibilidade e reprodutibilidade, mostraram que a HS-SPME-GC/MS-SIM é adequada para determinar simultaneamente os cinco compostos tóxicos em diferentes estágios de vinificação da produção de vinho Merlot e em vinhos comerciais.

Na determinação dos compostos tóxicos, o CE não foi detectado e o formaldeído foi encontrado em concentrações superiores ao LOD e inferiores ao LOQ em todas as etapas da vinificação e nos vinhos comerciais. Acroleína e furfural foram encontrados nas uvas e seus níveis reduziram ao longo da vinificação. O furfural parece ser um precursor para outros compostos contendo furano formados durante a vinificação. O acetaldeído foi detectado em todas as etapas, sendo que as maiores concentrações foram após a fermentação alcoólica. A eletrofilicidade desses aldeídos tóxicos pode levá-los a reagir com compostos nucleofílicos, como os fenólicos e SO<sub>2</sub>, o que pode explicar redução dos mesmo ao longo da vinificação. Estes resultados contribuíram para identificar os pontos críticos de controle relacionado à presença de compostos tóxicos durante as etapas da vinificação de vinho Merlot, incluindo a produção do acetaldeído durante a fermentação alcoólica, bem como a contaminação das uvas com acroleína e furfural através do ar atmosférico.

Além disso, este trabalho contribuiu para geração de dados sobre os níveis destes compostos em vinhos comercialmente disponíveis, que poderão servir como base para a criação de uma legislação nacional que estabeleça limites dos mesmos nesta bebida. Foram encontrados nos vinhos comerciais a acroleína, o acetaldeído e o furfural, mas apenas a exposição à acroleína pode representar risco para a saúde

do consumidor através do consumo destas bebidas. A redução dos níveis da acroleína é necessária para proteger os consumidores dos de seus possíveis efeitos tóxicos, já que está associada a diabetes, doença de Alzheimer e aumento do risco de doença cardiovascular. Como os maiores valores ocorreram nas uvas, a redução da emissão de acroleína para o ambiente pode ser conseguida através da substituição da queima de madeira por outra fonte de calor em lareiras e na proteção do vinhedo da geada.

## REFERÊNCIAS

ABADI, M. D. M. *et al.* An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1–12, 2012.

AJTONY, Z. *et al.* Determination of ethyl carbamate in wine by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1301–1305, 2013.

ALVES, M. E. B.; TONIETTO, J. Condições Meteorológicas e sua Influência na Safra Vitícola de 2015 em Regiões Produtoras de Vinhos Finos do Sul do Brasil. **Embrapa Uva e Vinho**, p. 1–16, 2015.

AMARAL, U.; BRIXNER, G. F.; MARTINS, C. R. **Performance produtiva de videiras “Cabernet Sauvignon” safra 2006/2007 em vinhedos da Fronteira Oeste do RS.** IX Salão de Iniciação Científica PUCRS. **Anais...Uruguaiana: Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, PUCRS, 2008

ANJOS, J. P. DOS; ANDRADE, J. B. DE. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME / GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 120, p. 69–76, 2015.

ANVISA. **Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes.** Brasília/DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária Guia, 2013.

ARKEMAN, D. H. Evaluation of the oral toxicity of formaldehyde in rats. **Universa Medicina**, v. 27, n. 3, p. 4–10, 2008.

ARTS, J. H. E. *et al.* Subacute (28-day) toxicity of furfural in Fischer 344 rats : a comparison of the oral and inhalation route. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1389–1399, 2004.

ATSDR. Toxicological profile for acrolein. **U.S. Department of Health and Human Service**, 2007.

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

AZEVEDO, L. C. DE *et al.* Evaluation of the Formation and Stability of Hydroxyalkylsulfonic Acids in Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8670–8680, 2007b.

BARLOW, S. *et al.* Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic. Report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1636–1650, 2006.

BAUER, R. *et al.* Acrolein Dimer as a Marker for Direct Detection of Acrolein in Wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 33, n. 1, p. 72–79, 2012.

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

BEN, R. L.; MONTEIRO, R. **Vinificação de uvas tintas| Vinificação de uvas brancas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012.

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

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**, v. 57, p. 106–118, 2013.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário oficial da união**, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. **Diário oficial da união**, p. Seção 1, n. 124., 2005.

BRASIL. **Presidência da República. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. Relatório brasileiro sobre drogas**. Brasília: SENAD, 2009.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário oficial da união**, 2014.

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.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

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

CANUTO, K. M. Microextração em Fase Sólida: Método Analítico Prático para Extração de Compostos Voláteis de Frutas. **Embrapa**, 2011.

CHEN, B. *et al.* Determination of 27 pesticides in wine by dispersive liquid - liquid microextraction and gas chromatography - mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 415–422, 2016.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006.

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

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

DAHABIEH, M. S.; HUSNIK, J. I.; VUUREN, H. J. J. VAN. Functional enhancement of Sake yeast strains to minimize the production of ethyl carbamate in Sake wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 963–973, 2010.

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

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia - Um breve ensaio. **Química Nova**, n. 7, 1998.

DEJARNETT, N. *et al.* Acrolein Exposure Is Associated With Increased Cardiovascular Disease Risk. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 4, 2014.

DEMIR, E. *et al.* Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in Drosophila. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 221–227, 2013.

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.

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

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITEDNATIONS). **World Reference Base for Soil Resources**. Disponível em: <[www.fao.org/3/a-i3794e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i3794e.pdf)>.

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

FRANCISQUETTI, E. L. *et al.* Ethyl carbamate content in wines produced and commercialized in Southern Brazil. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 201–204, 2002.

FRIVIK, S. K.; EBELER, S. E. Influence of Sulfur Dioxide on the Formation of Aldehydes in White Wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 54, n. 1, p. 31–38, 2003.

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

GALLI, C. L.; MARINOVICHA, M.; LOTTI, M. Is the acceptable daily intake as presently used an axiom or a dogma? **Toxicology Letters**, v. 180, p. 93–99, 2008.

GAYATHRI, L. *et al.* Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin , alone and in combination , and protective effect of vitamin E : In vitro study in HepG2 cell. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 151–163, 2015.

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

GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J. *et al.* Assessment of colour and aroma in white wines vinifications : Effects of grape maturity and soil type. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 758–764, 2007.

GOUDA, A. A.; GHANNAM, S. M. AL. Impregnated multiwalled carbon nanotubes as efficient sorbent for the solid phase extraction of trace amounts of heavy metal ions in food and water samples. **Food Chemistry**, v. 202, p. 409–416, 2016.

GUAN, W. *et al.* Efficacy of head space solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry method for determination of the trace extracellular hydrocarbons of cyanobacteria. **Journal of Chromatography B**, v. 1029-1030, p. 113–120, 2016.

GUERRA, C. C. *et al.* Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. **Embrapa Uva e Vinho**, n. 21, p. 69, 2009.

HELLÉ, G.; MARIET, C.; COTE, G. Liquid-liquid extraction of uranium (VI) with Aliquat 336 from HCl media in microfluidic devices : Combination of micro-unit operations and online ICP-MS determination. **Talanta**, v. 139, p. 123–131, 2015.

HERNANZ, D. *et al.* Comparison of the effectiveness of solid-phase and ultrasound-mediated liquid-liquid extractions to determine the volatile compounds of wine. **Talanta**, v. 76, p. 929–935, 2008.

HERRERO, M. *et al.* Multidimensional chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7110–7129, 2009.

HO, P.; HOGG, T. A.; SILVA, M. C. M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. **Food Chemistry**, v. 64, p. 115–122, 1999.

IARC. **International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.** Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil.** Rio de Janeiro: IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento, 2011a.

IBGE. **Brazilian Institute of Geography and Statistics. Family Budget Research.** Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/)>. Acesso em: 26 fev. 2017b.

IBRAVIN. **Instituto Brasileiro do Vinho. Vinhos do Brasil.** Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/index.php>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

IPCS. **Formaldehyde.** Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/publications/en/>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

JACKSON, R. S. **Wine Science Principles, Practice, Perception**. 2<sup>a</sup>. ed. Ontario: ACADEMIC PRESS, 2000.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.

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.

JECFA. **Furfural**. Disponível em: <<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3695>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

JECFA. **Monographs & Evaluations**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/pages/jecfa.html>>. Acesso em: 31 mar. 2017.

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

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

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

KAKHKI, R. M.; NEJATI-YAZDINEJAD, M.; KAKEH, F. Extraction and determination of Rose Bengal in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to UV-Vis spectrophotometry. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

KAYANI, M. A.; PARRY, J. M. Toxicology in Vitro The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 56–60, 2010.

KENNISON, K. R. *et al.* Smoke-derived Taint in Wine: Effect of Postharvest Smoke Exposure of Grapes on the Chemical Composition and Sensory Characteristics of Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10897–10901, 2007.

LACHENMEIER, D. W.; SOHNIUS, E. The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: Evidence from a large chemical survey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2903–2911, 2008.

LAGO, L. O. *et al.* Influence of ripeness and maceration of the grapes on levels of furan and carbonyl compounds in wine- Simultaneous quantitative determination



and assessment of the exposure risk to these compounds. **Food Chemistry**, v. 230, p. 594–603, 2017.

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

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

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente “ compatíveis ”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LIM, H. H.; SHIN, H. S. Simple determination of acrolein in surface and drinking water by headspace SPME GC-MS. **Chromatographia**, v. 75, n. 15-16, p. 943–948, 2012.

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

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

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

LOPACHIN, R. M.; GAVIN, T. Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 1081–1091, 2014.

LOPES, E. D. L. **Estudo e determinação das condições experimentais da reação de silição utilizada na análise multirresíduo de antiinflamatórios não-esteroides em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, 2011.

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

MARRA, M. C. **Aplicação da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo aspirina ou dipirona em combinação com outros princípios ativos.** [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

MASSON, J. **Determinação dos teores de carbamato de etila e acroleína em aguardentes de cana produzidas em Minas Gerais.** [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2009.

MAZON, E. M. DE A. *et al.* Avaliação da rotulagem de alguns vinhos brasileiros Evaluation of the quality of labels on some of the Brazilian wines samples. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 405–409, 2012.

MELLO, L. M. R. DE. Vitivinicultura brasileira: panorama 2015. **Embrapa Uva e Vinho**, p. 1–5, 2016.

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

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

NACCARATO, A.; PAWLISZYN, J. Matrix compatible solid phase microextraction coating, a greener approach to sample preparation in vegetable matrices. **Food Chemistry**, v. 206, p. 67–73, 2016.

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

OIV. **International Organisation of Vine and Wine. World vitiviniculture situation**. Disponível em: <[http://www.oiv.int/oiv/info/en-Bilan\\_OIV\\_Mainz\\_2015](http://www.oiv.int/oiv/info/en-Bilan_OIV_Mainz_2015)>. Acesso em: 19 jan. 2016a.

OIV. **International Organisation of Vine and Wine. 2015 Global economic vitiviniculture data**. Disponível em: <<http://www.oiv.int/oiv/info/enconjoncture>>. Acesso em: 19 jan. 2016b.

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.

PELAJIC, M. *et al.* Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography – mass spectrometry and solid phase extraction. **Food Chemistry**, v. 200, p. 98–106, 2016.

PEREIRA, V. *et al.* Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 71–76, 2011.

PERESTRELO, R. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction as a powerful tool for quantification of ethyl carbamate in fortified wines. The case study of Madeira wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3441–3445, 2010.

PERESTRELO, R.; SILVA, C. L.; CÂMARA, J. S. Quantification of furanic derivatives in fortified wines by a highly sensitive and ultrafast analytical strategy based on digitally controlled microextraction by packed sorbent combined with ultrahigh pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1381, p. 54–63, 2015.

PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v. 37, p. 1–19, 2005.

PISSARRA, J. *et al.* Reaction Between Malvidin 3-Glucoside and (+) -Catechin in Model Solutions Containing Different Aldehydes. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 2, 2003.

POPESCU-MITROI, I.; RADU, D.; STOICA, F. The study of glycerol metabolism in the malolactic fermentation of red wines. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 19, n. 1, p. 9019–9027, 2014.

PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. **Reviews in Food and Nutrition Toxicity**. 4. ed. Oxford: Taylor & Francis, 2005.

PYRZYNSKA, K.; KUBIAK, A.; WYSOCKA, I. Application of solid phase extraction procedures for rare earth elements determination in environmental samples. **Talanta**, v. 154, p. 15–22, 2016.

REYES, F. G. R. **Princípios Associados a Segurança Alimentar**. XVIII MET – Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios. **Anais...** Salvador: 2012

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

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

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Características analíticas de vinhos Merlot da Serra Gaúcha. **Ciência Rural**, v. 29, n. 6, p. 1913–1916, 2009.

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

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

SANTOS, M. E. DOS; DEMIATE, I. M.; NAGATA, N. Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 903–909, 2010.

SAUVAGEOT, N. *et al.* Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 167–170, 2000.

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

SHAH, V. H. *et al.* Liquid-Liquid Extraction for Recovering Low Margin Chemicals: Thinking beyond the Partition Ratio. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, p. 1731–1739, 2016.

SHERIDAN, M. K.; ELIAS, R. J. Reaction of Acetaldehyde with Wine Flavonoids in the Presence of Sulfur Dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 45, p. 8615–8624, 2016.

SHI, Y. *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC-FLD. **Food Chemistry**, v. 199, p. 75–80, 2016.

SILVA, W. M.; SANTOS, F. R. DOS; BATISTUTI, J. P. Validação de um novo método analítico para quantificação de ácido fólico por espectrofotometria-UV. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 3, p. 275–282, 2013.

SILVEIRA, S. V.; GARRIDO, L. DA R.; HOFFMANN, A. Produção integrada de uva para processamento: processos de elaboração de sucos e vinhos, BPA e PPHO. In: **Descrição dos processos de elaboração**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2015. v. 5p. 16–23.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

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

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

SOUZA, G. G. DE *et al.* A uva roxa, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). **Natureza on line**, v. 4, p. 80–86, 2006.

SOWINSKI, P.; WARDENCKI, W.; PARTYKA, M. Development and evaluation of headspace gas chromatography method for the analysis of carbonyl compounds in spirits and vodkas. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 17–22, 2005.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

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

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

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

TETTE, P. A. S. *et al.* Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, v. 149, p. 124–141, 2016.

VANDERHAEGEN, B. *et al.* The chemistry of beer aging - a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357–381, 2006.

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

WANG, D. *et al.* Disruption of brewer's yeast alcohol dehydrogenase ii gene and reduction of acetaldehyde content during brewery fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 64, n. 4, p. 195–201, 2006.

WANG, F. *et al.* Hierarchical Graphene coating for highly sensitive solid phase microextraction of organochlorine pesticides. **Talanta**, v. 160, p. 217–224, 2016a.

WANG, J. *et al.* Rosé wine volatile composition and the preferences of Chinese wine professionals. **Food Chemistry**, 2016b.

WANG, J. *et al.* Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. **Food Chemistry**, v. 196, p. 682–693, 2016c.

WANG, Q.; REILLY, J. O.; PAWLISZYN, J. Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 147–154, 2005.

WANG, W. *et al.* A novel Schiff base network-1 nanocomposite coated fiber for solid-phase microextraction of phenols from honey samples. **Talanta**, v. 161, p. 22–30, 2016d.

WARDENCKI, W.; SOWINSKI, P.; CURYLO, J. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 984, p. 89–96, 2003.

WELKE, J. *et al.* Volatile characterization by multivariate optimization of headspace-solid phase microextraction and sensorial evaluation of Chardonnay base wines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 678–687, 2012a.

WELKE, J. E. *et al.* Understanding wine aroma: challenges posed by chromatographic coelutions of volatile compounds. **Journal of Chromatography A**, n. submitted, [s.d.].

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

WHO. **Human Health Risk Assessment Toolkit: Chemical Hazards**. Disponível em: <[http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/ra\\_toolkit/en/](http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/ra_toolkit/en/)>. Acesso em: 11 jan. 2017.

WIM. **Wine & Health**. Disponível em: <<http://www.wineinformationcouncil.eu/>>. Acesso em: 31 mar. 2017a.

WIM. **Que quantidade considerar como moderada?** Disponível em: <<https://www.wineinmoderation.eu/pt/content/Quanto-vinho-demasiado.66/>>. Acesso em: 31 mar. 2017b.

XU, M. *et al.* Magnetic solid-phase extraction of phthalate esters (PAEs) in apparel textile by core-shell structured Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> silica triblock-copolymer magnetic microspheres. **Talanta**, v. 150, p. 125–134, 2016.

YE, C. *et al.* Multiple headspace solid-phase microextraction of ethyl carbamate from different alcoholic beverages employing drying agent based matrix modification. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 31, p. 5063–5070, 2011.

ZEA, L.; SERRATOSA, P.; JULIETA, M. Acetaldehyde as Key Compound for the Authenticity of Sherry Wines : A Study Covering 5 Decades. **Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 681–693, 2015.

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

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

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

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

ZHAO, X. *et al.* Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, n. 2, p. 97–107, 2013.

ZHAO, X.; JIANG, C. Determination of ethyl carbamate in fermented liquids by ultra high performance liquid chromatography coupled with a Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 177, p. 66–71, 2015.

ZIETSMAN, A.; VILJOEN, M.; VUUREN, H. VAN. **Preventing Ethyl Carbamate Formation in Wine.** Disponível em: <<http://www.wineland.co.za/technical/preventing-ethyl-carbamate-formation-in-wine>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

ZINI, C. A. Cromatografia Gasosa Bidimensional. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 31–49, 2009.