

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Laura Oliveira Lago

**Compostos Carbonílicos e Furano Formados Durante a Vinificação – Validação
de um Método para Determinação Simultânea Destes Compostos Tóxicos e
Caracterização do Risco da Exposição**

Porto Alegre

2016

Laura Oliveira Lago

**Compostos Carbonílicos e Furano Formados Durante a Vinificação – Validação
de um Método para Determinação Simultânea Destes Compostos Tóxicos e
Caracterização do Risco da Exposição**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra. Juliane Elisa Welke

Porto Alegre

2016

Laura Oliveira Lago

Compostos Carbonílicos e Furano Formados Durante a Vinificação – Validação de um Método para Determinação Simultânea Destes Compostos Tóxicos e Caracterização do Risco da Exposição

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 6 de junho de 2016 .

BANCA EXAMINADORA

Maria Silvana Aranda - Doutora em Química (UFRGS)

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

Juliane Elisa Welke - Doutora em Química (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de fazer o curso de Biomedicina.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Juliane Elisa Welke por me aceitar como sua aluna de iniciação científica. Deu-me a oportunidade de trabalhar em um projeto pioneiro, o que contribuiu muito para a minha realização, conhecimento e confiança em mim mesma em fazer ciência. Muito obrigada pela confiança depositada no meu trabalho, pela orientação, disponibilidade, auxílio e por ser uma excelente professora e pesquisadora.

À Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Alcaraz Zini, responsável pelo Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO), onde as análises foram realizadas. Obrigada por me acolher no laboratório e pelo suporte.

À Doutoranda Karine Nicolli, primeira pessoa do laboratório que conheci e que me acompanhou até agora. Sempre se mostrou disposta a esclarecer minhas dúvidas e me auxiliar no que fosse preciso. Muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos ao longo da minha iniciação científica.

A todos os colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO) por me acolherem no grupo mesmo eu sendo aluna do curso de Biomedicina. Todos sempre se mostraram disponíveis em me auxiliar e esclarecer dúvidas. Muito obrigada pela convivência, pelos momentos de descontração e risos no laboratório e pelo apoio durante a realização do trabalho.

As pessoas mais importantes para mim, meus pais Larry e Elaine, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Sempre proporcionaram recursos e estrutura para que eu tivesse uma educação de qualidade e sempre me incentivaram a estudar. À minha irmã gêmea Bruna que, mesmo estando longe em Santa Cruz do Sul, sempre se preocupa comigo. Foi minha companheira no útero e é na vida, me aconselha, me incentiva nas horas difíceis e me alegra nos momentos de desânimo e cansaço. Sei que sempre posso contar com seu apoio quando preciso.

A minha avó, meus tios, tias, primos e primas, por todo o amor e apoio e que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre entenderam que eu estava me dedicando ao meu futuro como biomédica e sentem orgulho de mim por isso.

A todos os meus colegas da turma 9 da Biomedicina, em especial a Priscila, Juliano, Jéssica, Caroline, Nathalia, Stefani, Emerson e Hegger pela convivência em aula, as risadas e os momentos de descontração compartilhados dentro ou fora da universidade nesses 5 anos de graduação, os quais não teriam sido os mesmos sem a presença de vocês. Muito obrigada pela amizade.

Agradecimento muito especial para a minha colega de curso Vânia que ao longo desses 5 anos da graduação foi minha companheira fiel nas aulas. Proporcionou-me muitas experiências boas, as quais, acredito, não teria vivido se não fosse pelo seu incentivo. Sempre me apoiou e me aconselhou, seja nos assuntos da faculdade e da vida. Foi essencial na minha caminhada e sempre estará presente na minha vida, não importa a distância entre nós.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pelo auxílio financeiro.

A todas as vinícolas que colaboraram com o fornecimento de amostras para a execução deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Semiárido.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Localização das regiões vitivinícolas brasileiras	19
Figura 2 – Etapas da análise e avaliação do risco	22
Figura 3 – Mecanismos de formação e principais precursores do carbamato de etila em bebidas alcoólicas	31
Figura 4 – Metabolismo do carbamato de etila em camundongos	35
Figura 5 – Metabolismo do etanol e do acetaldeído	39
Figura 6 – Metabolismo do formaldeído	42
Figura 7 – Via metabólica de formação da acroleína a partir do glicerol	44
Figura 8 – Destino metabólico da acroleína	45
Figura 9 – Biotransformação do furano	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de vinho nos principais países produtores	17
Tabela 2 - Consumo mundial de vinho em milhões de hectolitros	18
Tabela 3 - Consumo de vinho classificado por consumo per capita em 2014	18
Tabela 4 - Características físico-químicas dos compostos tóxicos presentes em vinhos e que foram avaliados neste estudo	29
Tabela 5 - Teores de carbamato de etila estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida	36
Tabela 6 - Compostos tóxicos quantificados em vinhos produzidos em vários locais do mundo e analisados através dos métodos descritos abaixo com seus respectivos limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), níveis de recuperação e níveis encontrados	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-HPA	3-hidroxiopropanal
3-HPMA	S-(3-hidroxiopropil)-N-acetilcisteína
ADH	álcool desidrogenase (do inglês, <i>alcohol dehydrogenase</i>)
ADI	arginina desiminase (do inglês, <i>arginine deiminase</i>)
ALARA	tão baixo quanto razoavelmente possível (do inglês, <i>as low as reasonably achievable</i>)
ALDH	aldeído desidrogenase (do inglês, <i>aldehyde dehydrogenase</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	bactérias ácido lácticas
BDA	cis-2-buteno-1,4-dial
BMD	dose de referência (do inglês, <i>Benchmark Dose</i>)
BMDL10	limite de confiança inferior desta dose (do inglês, <i>benchmark dose lower confidence limit</i>)
CE	carbamato de etila
CEMA	ácido mercaptúrico-2-carboxietilo
DEPC	dietil pirocarbonato
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>)
FDH	formaldeído desidrogenase (do inglês, <i>formaldehyde dehydrogenase</i>)
FGH	S-formilglutamina hidrolase
FID	detector de ionização em chama (do inglês, <i>flame ionization detector</i>)
FM	fermentação maloláctica
GC	cromatografia gasosa (do inglês, <i>gas chromatography</i>)
GCxGC	cromatografia gasosa bidimensional abrangente (do inglês, <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography</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>
GRAS	geralmente reconhecido como seguro (do inglês, <i>Generally Recognised As Safe</i>)
GSH	glutathiona
HPLC	cromatografia líquida de alta performance (do inglês, <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HS-SPME	microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> (do inglês, <i>headspace solid phase micro extraction</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
IDA	ingestão diária aceitável
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química (do inglês, <i>International Programme on Chemical Safety</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</i>)
LLE	extração líquido-líquido (do inglês, <i>liquid-liquid extraction</i>)
LOAEL	menor dose na qual o efeito adverso foi observado (do inglês, <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>)
LOD	limite de detecção (do inglês, <i>limit of detection</i>)
LOQ	limite de quantificação (do inglês, <i>limit of quantification</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MOE	margem de exposição (do inglês, <i>margin of exposure</i>)
MS	espectrometria de massa (do inglês, <i>mass spectrometer</i>)
NOAEL	maior dose que não causou efeito adverso (do inglês, <i>No Observable Adverse Effect Level</i>)
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho (do francês, <i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>)
OPMA	S-(3-oxopropil)-N-acetilcisteína
PMTDI	ingestão diária tolerável máxima provisória (do inglês, <i>Provisional</i>

	<i>Maximum Tolerable Daily Intake)</i>
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
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>
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
SAR	relação estrutura e atividade (do inglês, <i>Structure-Activity Relationship)</i>
SPE	extração em fase sólida (do inglês, <i>solid-phase extraction)</i>
TOFMS	espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, <i>time-of-flight mass spectrometry)</i>
TTC	limiar de risco toxicológico (do inglês, <i>threshold of toxicological concern)</i>
UADT	tratoaero digestivo superior (do inglês, <i>upper aero digestive tract)</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization)</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.3.1 Vinho – Produção e consumo	15
1.3.2 Efeitos associados ao consumo de vinho	20
1.3.3 Avaliação de risco relacionado à exposição aos compostos tóxicos	22
1.3.4 Compostos tóxicos produzidos durante a vinificação	28
1.3.4.1 Carbamato de etila (CE)	29
1.3.4.1.1 <i>Mecanismos de formação em bebidas</i>	29
1.3.4.1.2 <i>Aspectos toxicológicos e legislação</i>	33
1.3.4.1.3 <i>Estratégias na diminuição do CE em bebidas</i>	36
1.3.4.2 Acetaldeído	37
1.3.4.2.1 <i>Mecanismos de formação em bebidas</i>	37
1.3.4.2.2 <i>Aspectos toxicológicos e legislação</i>	37
1.3.4.2.3 <i>Estratégias na diminuição do acetaldeído em bebidas</i>	39
1.3.4.3 Formaldeído	40
1.3.4.3.1 <i>Mecanismos de formação em bebidas</i>	40
1.3.4.3.2 <i>Aspectos toxicológicos e legislação</i>	41
1.3.4.3.3 <i>Estratégias na diminuição do formaldeído em bebidas</i>	43
1.3.4.4 Acroleína	43
1.3.4.4.1 <i>Mecanismos de formação em bebidas</i>	43
1.3.4.4.2 <i>Aspectos toxicológicos e legislação</i>	44

1.3.4.4.3 <i>Estratégias na diminuição da acroleína em bebidas</i>	46
1.3.4.5 Furano	46
1.3.4.5.1 <i>Mecanismos de formação em bebidas</i>	47
1.3.4.5.2 <i>Aspectos toxicológicos e legislação</i>	48
1.3.4.5.3 <i>Estratégias na diminuição do furano em bebidas</i>	49
1.3.4.6 Furfural	50
1.3.4.6.1 <i>Mecanismo de formação em bebidas</i>	50
1.3.4.6.2 <i>Aspectos toxicológicos e legislação</i>	51
1.3.4.6.3 <i>Estratégias na diminuição do furfural em bebidas</i>	51
1.3.5 Métodos para extração e determinação dos compostos tóxicos produzidos durante a vinificação	52
2 ARTIGO CIENTÍFICO	58
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A – ORIENTAÇÕES DA REVISTA FOOD CHEMISTRY	101

RESUMO

O vinho tem propriedades benéficas oriundas do consumo moderado desta bebida devido à presença de compostos fenólicos. Entretanto, dentre os compostos presentes em vinhos, encontram-se os seguintes compostos tóxicos: acetaldeído, formaldeído, carbamato de etila, furfural, acroleína e furano. Estes compostos são hepatotóxicos e, inclusive, alguns desses têm associação com o câncer. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica, por exemplo, o formaldeído e o acetaldeído associado ao consumo de bebidas alcoólicas como carcinogênicos para os seres humanos, o carbamato de etila como provável carcinogênico, o furano como possível carcinogênico e a acroleína e o furfural como não classificáveis como carcinogênicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi (i) validar um método para determinação simultânea de seis compostos tóxicos (formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furano, furfural e acroleína) presentes em vinhos através do uso da microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) acoplada à cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por espectrometria de massas por tempo de voo (GC×GC/TOFMS); (ii) verificar a influência do estágio de maturação e tempo de maceração das uvas Syrah utilizadas na vinificação, (iii) determinar a estimativa de exposição e caracterizar o risco da exposição a estes compostos tóxicos através do consumo de vinho. O uso da GC×GC/TOFMS foi importante para a correta identificação e quantificação do acetaldeído e acroleína que co-eluíram na primeira dimensão cromatográfica (1^oD) com outros compostos presentes nos vinhos Syrah. O avanço do grau de maturação e prolongamento do tempo de maceração das uvas são pontos críticos relacionados à formação de compostos tóxicos. Essas etapas estão relacionadas ao aumento da concentração de compostos no mosto/vinho que podem atuar como precursores da formação dos tóxicos. O formaldeído (23,4-205,91 µg/L), o acetaldeído (51,49-961,98 µg/L), a acroleína (8,43-410,38 µg/L), o furano (47,08-295,19 µg/L) e o furfural (51,19-1715,29 µg/L) foram encontrados em todas as amostras avaliadas. O carbamato de etila (<0,3 – 242,3 µg/L) foi encontrado em 89,5% das amostras avaliadas. A exposição ao furano, acroleína e carbamato de etila através do consumo de vinho representa risco para a saúde dos consumidores, pois os valores da margem de exposição para estes compostos foram menores do que o parâmetro estabelecido como seguro pela Organização Mundial da Saúde (menor do que

10.000) para todas as amostras em que estes compostos foram detectados. O formaldeído, o acetaldeído e o furfural não representam risco para a saúde do consumidor. Estratégias para a redução da formação destes compostos tóxicos devem ser desenvolvidas, especialmente em relação ao furano, acroleína e carbamato de etila que foram os compostos que indicaram risco para a saúde dos consumidores. Além disso, os dados gerados neste trabalho poderão contribuir no estabelecimento de programas que visem o controle da formação destes compostos e de normas regulamentadoras relacionadas aos limites máximos permitidos para estes compostos.

Palavras-chave: vinho; avaliação de risco; carbamato de etila; formaldeído; acetaldeído; acroleína; furano, furfural.

ABSTRACT

The wine has beneficial properties derived from the moderate consumption of this drink due to the presence of phenolic compounds and stilbene. However, among the compounds present in wine, are the following toxic volatile compounds: acetaldehyde, formaldehyde, ethyl carbamate, furfural, furan and acrolein. These compounds are hepatotoxic and even some of these are associated with cancer. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies, for example, formaldehyde and acetaldehyde associated with alcohol consumption as carcinogenic to humans, ethyl carbamate as a probable carcinogen, furan as a possible carcinogen and acrolein and furfural non-classifiable as to carcinogenic. The objective of this study was (i) to validate a method for simultaneous determination of six toxic compounds (formaldehyde, acetaldehyde, ethyl carbamate, furan, furfural and acrolein) present in wines through the use of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) coupled to the comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detector (GCxGC/TOFMS); (ii) to evaluate the influence of maturation stage and maceration time of Syrah grapes used in winemaking, (iii) to determine the estimated exposure and characterize the risk of exposure to these toxic compounds through the wine consumption. The use of GCxGC/TOFMS was important for the identification and quantification of acetaldehyde and acrolein that co-eluted in the first chromatographic dimension (¹D) with other compounds present in Syrah wines. The advance of ripeness and extension of the grape maceration time are critical points related to the formation of toxic compounds. These steps are related to the concentration of compounds in the must/wine which can act as precursors to the formation of toxic substances. Formaldehyde (23,4-205,91 µg/L), acetaldehyde (51,49-961,98 µg/L), acrolein (8,43-410,38 µg/L), furan (47,08-295,19 µg/L) and furfural (51,19-1715,29 µg/L) were found in all samples. The ethyl carbamate (<0,3 – 242,3 µg/L) was found in 89,5% of the samples. Exposure to furan, acrolein and ethyl carbamate through wine consumption poses a risk to the health of consumers as the margin of exposure values for these compounds were smaller than the parameter established as safe by the World Health Organization (lower than 10.000) for all samples in which these compounds were detected. Formaldehyde, acetaldehyde and furfural pose no risk to consumer health. Strategies for reducing the formation of these toxic compounds to be developed,

especially in relation to furan, acrolein and ethyl carbamate that have the indicated risk to consumer health. Furthermore, the data generated in this study may contribute to the establishment of programs to control the formation of these compounds and regulatory standards related to the maximum allowable limits for these compounds.

Keywords: wine; risk assesment; ethyl carbamate; formaldehyde; acetaldehyde; acrolein; furan; furfural.

1 INTRODUÇÃO

O vinho tem propriedades benéficas oriundas do consumo moderado desta bebida. Estes efeitos são observados, principalmente, devido à presença dos compostos fenólicos que reduzem o risco de doenças cardiovasculares e possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, entre outras (LIPPI *et al.*, 2010; CHIVA-BLANCH *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2015). Entretanto, dentre os compostos presentes em vinhos, encontram-se os seguintes compostos tóxicos: acetaldeído, formaldeído, carbamato de etila, furfural, acroleína e furano. A presença destes compostos em bebidas fermentadas é comum, uma vez que são formados durante o metabolismo normal dos micro-organismos ou através de reações que envolvem os compostos produzidos durante a fermentação (LIU e PILONE, 2000; KÄCHELE *et al.*, 2014; CHUNG *et al.*, 2015; JEONG *et al.*, 2015; NÓBREGA *et al.*, 2015; PERESTRELO; SILVA; CÂMARA, 2015).

Os efeitos tóxicos da ingestão aguda destes compostos presentes nas bebidas alcoólicas estão relacionados com sintomas como náuseas, vômito, inquietação, suor, confusão, queda na pressão e dores de cabeça (DE AZEVÊDO *et al.*, 2007). O acetaldeído, por exemplo, desempenha um papel importante na carcinogenicidade do trato aerodigestivo superior do qual fazem parte a cavidade oral, faringe, laringe e esôfago (EREN *et al.*, 2014).

A IARC classifica as substâncias tóxicas em quatro grupos, de acordo com a carcinogenicidade para humanos: no grupo 1 estão os compostos carcinogênicos, o grupo 2 inclui substâncias provavelmente carcinogênicas (2A) e possivelmente carcinogênicos (2B), no grupo 3 estão as substâncias não classificáveis como carcinogênicas e no grupo 4 estão incluídos os agentes provavelmente não carcinogênicos. A IARC classificou o formaldeído e acetaldeído ingerido especificamente através das bebidas alcoólicas no grupo 1, o carbamato de etila no grupo 2A, o furano no grupo 2B e a acroleína e o furfural no grupo 3 (IARC, 2016).

O Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e da Organização Mundial da Saúde (JECFA, do inglês: *Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives*) não estabelece parâmetros de ingestão segura para estes compostos. Isso se deve ao

fato do acetaldeído, do formaldeído, do carbamato de etila, do furfural, da acroleína e do furano serem identificados como genotóxicos e carcinogênicos em vários estudos (LACHENMEIER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2015).

A avaliação do risco causado pela exposição humana a substâncias químicas na dieta é amplamente reconhecida como um processo fundamental no desenvolvimento de padrões alimentares seguros (WHO, 1997). O cálculo da margem de exposição (MOE, do inglês: *margin of exposure*) é uma abordagem que tem sido cada vez mais utilizada na avaliação da exposição a substâncias que são genotóxicas e carcinogênicas. A MOE é usada para classificar substâncias, indicar o nível de preocupação e priorizar ações de gerenciamento de risco pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Um valor de MOE igual ou superior a 10.000 indica uma baixa preocupação do ponto de vista da saúde pública e pode ser considerada como uma prioridade baixa para ações de gerenciamento de riscos (BENFORD *et al.*, 2010; BENFORD, 2015).

1.1 JUSTIFICATIVA

Os dados relativos à quantificação de compostos potencialmente tóxicos produzidos durante a elaboração de vinhos são escassos. Além disso, até o momento, os trabalhos feitos para avaliar o risco da exposição a estes compostos através do vinho e verificar se representam risco para a saúde dos consumidores são incipientes. Além disso, a avaliação do risco da exposição a estes compostos tóxicos através do consumo de vinho é relatada na literatura apenas para o acetaldeído quantificado em vinho comercializado na Itália (Paiano *et al.*, 2014) e acetaldeído, carbamato de etila, formaldeído e furano utilizando dados quantitativos previamente publicados em outros estudos (Lachenmeier *et al.*, 2012). Cabe salientar que os trabalhos que têm sido desenvolvidos objetivam quantificar apenas um composto tóxico, sendo que nenhuma pesquisa realizada até o momento se preocupou com o desenvolvimento de um único método para a determinação simultânea de vários compostos tóxicos produzidos durante a elaboração dos vinhos.

No Brasil não há legislação que estabeleça a concentração máxima dos compostos alvo desta pesquisa em vinhos. Em relação ao carbamato de etila e acroleína, há limites estabelecidos para estes compostos apenas para a cachaça

(BRASIL, 2005); para o acetaldeído e furfural, há limites para a cachaça, conhaque, grapa, aguardente de vinho e pisco (BRASIL, 2010). A necessidade do estabelecimento de normas que regulamentem os limites máximos permitidos destes compostos em vinhos torna esta área de pesquisa ainda mais relevante no que diz respeito à geração de dados sobre os níveis destes compostos, bem como da avaliação do risco da exposição a estes compostos através do consumo de vinho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Validar um método para a determinação simultânea de seis compostos tóxicos produzidos durante a vinificação e avaliar o risco relacionado à exposição a estes através do consumo de vinho.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Validar um método para detecção e quantificação simultânea de seis compostos tóxicos (formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furano, furfural e acroleína) presentes em vinhos comerciais através do uso da microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) acoplada à cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por espectrometria de massas por tempo de voo (GCxGC/TOFMS);
- Verificar a influência do estágio de maturação e tempo de maceração das uvas Syrah utilizadas na vinificação nos níveis dos compostos tóxicos;
- Determinar a estimativa de exposição a estes compostos tóxicos através do consumo de vinho;
- Caracterizar o risco da exposição aos compostos tóxicos presentes nos vinhos através da determinação da MOE;

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Vinho – Produção e consumo

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento vinho é a bebida resultante da fermentação alcoólica do mosto simples da uva sadia, fresca e

madura. Mosto simples de uva é o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva, com a presença ou não de suas partes sólidas (BRASIL, 1988).

A Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, do francês: *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*) divulgou em outubro de 2015 dados iniciais sobre a produção mundial de vinhos em 2015. A estimativa é de que foram produzidos mundialmente 275,7 milhões de hectolitros (mhl) de vinho (excluindo sucos e mostos), o que representa um aumento de 2% em relação a 2014 (OIV, 2015).

A Itália é o país onde se produz a maior quantidade de vinho (48,9 milhões de hectolitros), seguida pela França e Espanha (47,4 e 36,6 milhões de hectolitros, respectivamente) (Tabela 1). O Brasil ocupa a 15^o posição na produção mundial de vinhos (2,7 milhões de hectolitros) (OIV, 2015).

Tabela 1 - Produção de vinho (unidade: 1000 hectolitro) dos principais países produtores entre 2011-2015 (1).

País	2011	2012	2013	2014 Provisório	Previsão 2015	2015/2014 Variação em volume	2015/2014 Variação em %
Itália	42772	45616	54029	44229	48869	4640	10%
França	50757	41548	42134	46804	47373	569	1%
Espanha	33397	31123	45308	38211	36600	-1611	-4%
Estados Unidos (2)	19140	21650	23590	22020	22140	120	1%
Argentina	15473	11778	14984	15197	13358	-1839	-12%
Chile	10464	12554	12820	10500	12870	2370	23%
Austrália	11180	12259	12310	12020	12000	-20	0%
África do Sul	9725	10569	10982	11316	11310	-6	0%
China*	13200	13511	11780	11178	11178	0	0%
Alemanha	9132	9012	8409	9202	8788	-414	-4%
Portugal	5622	6327	6231	6195	6703	508	8%
Rússia*	6980	6220	5290	4880	4880	0	0%
Romênia	4058	3311	5113	3750	4069	319	9%
Hungria	2750	1818	2618	2555	2873	318	12%
Brasil*	3460	2967	2710	2732	2732	0	0%
Grécia	2750	3115	3343	2900	2650	-250	9%
Áustria	2814	2125	2392	1999	2350	351	18%
Nova Zelândia	2350	1940	2484	3204	2350	-854	27%
Sérvia*	2244	2175	2306	2332	2332	0	0%
Bulgária	1237	1442	1755	747	1538	791	106%
Moldávia*	1520	1470	2570	1630	1630	0	0%
Geórgia*	1108	830	997	1134	1134	0	0%
Total mundial OIV(3)	267803	258211	292218	270234	275665	5431	2%

Fonte: OIV 2015.

(1) Países para os quais informações foram fornecidas com uma produção de vinho de mais de 1mhl.

(2) Estimativa da OIV com base em informações do USDA.

(3) Faixa da avaliação da produção mundial de 2015: de 270,75 mhl até 280,7 mhl.

*2015: dados de 2014 utilizados como valores provisórios.

Em relação ao consumo mundial da bebida, os dados disponíveis mostram uma ligeira diminuição do consumo em 2014 (240 milhões de hectolitros) em relação a 2013 (243 milhões de hectolitros) (Tabela 2). O país que mais consome vinho é os Estados Unidos, seguido da França e Itália (Tabela 3) (OIV, 2015).

Tabela 2 - Consumo mundial de vinho em milhões de hectolitros (mhl) (1).

País	2010	2011	2012	2013	Previsão 2014 (2)	2014/2013 Variação em %
EUA	28	28	29	30	31	1,1%
França	29	29	29	29	28	-3,1%
Itália	25	23	23	22	20	-6,3%
Alemanha	20	20	20	20	20	-0,6%
China	16	17	18	17	16	-7,3%
Reino Unido	13	13	13	13	13	-1,4%
Federação Russa	12	12	11	10	10	-7,3%
Argentina	10	10	10	10	10	-4,0%
Espanha	11	10	10	10	10	2,0%
Austrália	5	5	5	5	5	-0,3%
Canadá	5	5	5	5	5	-3,5%
Portugal	5	5	5	4	4	2,4%
África do Sul	3	4	3	3	4	7,1%
Total mundial	240	243	243	243	240	-1,2%

Fonte: OIV 2015

(1) Países para os quais informações foram fornecidas com um consumo de vinho de mais de 4mhl.

(2) Incluí dados/observações recebidas até maio de 2015.

Tabela 3 - Consumo de vinho classificado por consumo per capita em 2014.

País	Consumo total (litros)	Per capita
Cidade do Vaticano	45	54,26
Andorra	3,936	46,26
Croácia	198,000	44,20
Eslovênia	88,000	44,07
Ilha Norfolk	93	42,66
França	2,790,000	42,51
Portugal	450,000	41,74
Suíça	310,000	40,49
Macedônia	84,146	40,41
Ilhas Falkland	112	35,73
São Pedro e Miquelão	206	35,25
Moldávia	125,000	34,18
Itália	2,040,000	33,30
Áustria	252,000	30,66
Uruguai	96,800	29,19

Fonte: OIV 2015

No Brasil a área de produção vitivinícola soma 83,7 mil hectares, divididos principalmente entre seis regiões: Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste e Campos de Cima da Serra, no Rio Grande do Sul, Planalto Sul Catarinense, em Santa Catarina, e Vale do Submédio São Francisco, no Nordeste do país. O Rio Grande do Sul é o principal estado produtor de vinho do Brasil, sendo responsável

por 90% da produção nacional de vinhos e suco de uvas e derivados. Merece destaque a difusão da produção de uvas e vinhos para polos de importância crescente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso e Goiás (Figura 1) (GUERRA *et al.*, 2009).

Figura 1 - Localização das regiões vitivinícolas brasileiras.



Fonte: Embrapa/Ibravin (2010).

A região do Vale do Submédio São Francisco, situado entre os estados de Pernambuco e Bahia, está se desenvolvendo intensamente nos últimos anos, sendo a segunda maior região produtora de vinhos finos do Brasil, correspondendo 15% do mercado nacional, atrás apenas do Rio Grande do Sul. Dentre as diversas variedades de uvas de origem europeia testadas nessa região, destaca-se a variedade Syrah (PEREIRA, 2006; TONIETTO; CAMARGO, 2006; LIMA *et al.*, 2015).

Syrah é uma das mais antigas castas cultivadas, sendo originária do cruzamento entre "Moudeuse Blanche" (branca) e "Dureza" (tinta) no sudeste da França, na região do Vale do Rhône. Por suas qualidades e adaptabilidade

especialmente nas regiões mais quentes, expandiu-se por muitos países (Estados Unidos, Austrália, África do Sul, Chile, Argentina), sendo hoje uma das variedades tintas mais cultivadas no mundo. É uma casta sensível a podridões do cacho, o que a torna de difícil cultivo nas condições ambientais da Serra Gaúcha que incluem clima frio e úmido. Entretanto, adaptou-se bem ao clima semiárido do nordeste brasileiro, sendo, atualmente, a principal uva tinta para a elaboração de vinhos na região, representando cerca de 80% do total de vinhos produzidos (PEREIRA, 2006; GIOVANNINI; MANFROI, 2009; GUERRA *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2015).

A Syrah é grafada Shiraz na Austrália, onde ela é a principal casta cultivada. É plantada em todas as regiões do país, tornando-se a bandeira da indústria vinícola australiana. Apesar de ser uma variedade de origem francesa, se adaptou perfeitamente às condições meteorológicas australianas (TARDÁGUILA; KRSTIC; VILANOVA, 2005).

1.3.2 Efeitos associados ao consumo de vinho

O interesse nos efeitos benéficos do vinho tem crescido desde a década de 1990, quando o consumo de vinho foi associado a baixa taxa de mortalidade cardiovascular na França em comparação com outros países com um consumo semelhante de gorduras saturadas, o que foi chamado de "paradoxo francês". A alta ingestão de vinho da população francesa tem sido proposta como uma explicação potencial para este fenômeno (ARTERO *et al.*, 2015).

As principais substâncias que constituem a composição do vinho são água, açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos, pigmentos, vitaminas, ésteres, aldeídos e cetonas. O vinho, em especial o vinho tinto, é uma fonte rica em compostos fenólicos como flavonoides, antocianinas, proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, ácidos fenólicos, estilbenos e outros. Muitos desses compostos têm sido referidos como tendo várias atividades biológicas, incluindo propriedades cardioprotetoras, anti-inflamatória, anticancerígena, antivirais e antibacteriana (VENTURINI FILHO, 2005; SOUZA *et al.*, 2006; SERUGA, NOVAK e JAKOBEK, 2011; ARTERO *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos podem agir como antioxidantes ativos, doando hidrogênio aos radicais livres, e como preventivos, impedindo a peroxidação de

lipídeos e inibindo enzimas oxidativas (fosfolipase A2, cicloxigenase e a lipoxigenase). Além disso, podem atuar como protetores e regeneradores dos antioxidantes primários do organismo como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno (vitamina A). Neste contexto, o composto que chama maior atenção é o resveratrol, uma fitoalexina que seria responsável pela redução da viscosidade do sangue além de impedir a aterosclerose. O vinho pode atuar prevenindo diferentes patologias, incluindo acidente cardiovascular e redução do risco de perda de massa óssea e fraturas, além de promover o efeito neuroprotetor para a doença de Alzheimer; reduzir a hiperglicemia e melhorar a sensibilidade a insulina; exibe efeitos anti-envelhecimento e prevenção de doenças oculares (ARTERO *et al.*, 2015; ABU-AMERO; KONDKAR; CHALAM, 2016; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2016).

O açúcar contribui pouco para o conteúdo energético do vinho (exceto os vinhos licorosos, doces e suaves), que se deve essencialmente ao etanol na taxa de 7,1 kcal/g. Além disso, o vinho contém pequenas quantidades de vitaminas A, C e do complexo B, minerais, especialmente potássio e ferro (VENTURINI FILHO, W.G., 2005; SOUZA *et al.*, 2006; MORAES, V., LOCATELLI, C., 2010).

Contudo, é importante ressaltar que esses benefícios só ocorrem quando o vinho é ingerido com moderação, durante as refeições, regularmente e por pessoas que não tenham contraindicação ao consumo de bebidas alcoólicas. O consumo moderado de vinho, que representa baixo risco para o aparecimento de doenças, está associado ao consumo de 150 mL de vinho (VENTURINI FILHO, 2005; DE OLIVEIRA GUEDES, 2013).

Além da presença de compostos benéficos, alguns compostos tóxicos podem ser produzidos durante a vinificação, incluindo-se os compostos carbonílicos (formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furfural, e acroleína) e o furano. Além desses compostos, outras substâncias tóxicas podem estar presentes no vinho: a ocratoxina A (nefrotóxica, genotóxica, teratogênica, carcinogênica), as aminas biogênicas (prurido, erupção, vômito, febre, hipertensão) e os pesticidas (neurotóxico, hepatotóxico, dano pulmonar e renal, efeito gastrointestinal, irritação ocular e dérmica, hipertrofia e hiperplasia da tireoide, dermatite) (JACKSON, 2008; GOMES *et al.*, 2014; DACHERY *et al.*, 2016). O estudo destes compostos tóxicos em vinhos é importante, pois ao conhecer os seus níveis e as situações que podem

potencializar ou diminuir sua formação em vinho pode-se sugerir estratégias a serem aplicadas durante o cultivo das uvas ou vinificação de modo a reduzir a sua formação, de forma que, os efeitos tóxicos relacionados a estes compostos não representem preocupação associada ao consumo moderado de vinho.

1.3.2 Avaliação de risco relacionado à exposição aos compostos tóxicos

Na Toxicologia, conceituam-se como “perigo” a capacidade de uma substância causar um efeito adverso e como “risco” a probabilidade de um evento nocivo ocorrer devido à exposição a um agente químico e/ou biológico. A avaliação do risco é um processo sistemático pelo qual o perigo, a exposição e o risco são identificados e quantificados. O processo de avaliação do risco envolve 4 etapas (Figura 2): identificação do dano (ou perigo), caracterização do dano/relação dose-resposta, avaliação da exposição e caracterização do risco (JARDIM e CALDAS, 2009).

Enquanto a avaliação do risco é um processo de base científica, o **gerenciamento do risco** envolve tomada de decisões pelas agências reguladoras que levam em consideração, além de informações técnicas relacionadas ao dano à saúde, fatores políticos, sociais e econômicos. A troca de informações sobre o risco entre avaliadores, gerenciadores, mídia, grupos de interesse e público em geral se dá no âmbito da **comunicação de risco** (JARDIM e CALDAS, 2009).

Figura 2 - Etapas da análise e avaliação do risco.



Fonte: MARQUES e VALENTE, 2009.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela condução de avaliação do risco da exposição humana a contaminantes em alimentos. Internacionalmente, procedimentos de avaliação do risco são conduzidos pelos comitês científicos da OMS e Organização para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês: *Food and Agriculture Organization*) para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius*. O JECFA avalia questões relativas a aditivos alimentares, contaminantes e drogas veterinárias (JARDIM e CALDAS, 2009).

Na etapa da identificação do perigo, investiga-se se o agente químico apresenta capacidade de causar um efeito adverso e estabelece-se a natureza dos efeitos em uma população. Nesse processo, são utilizados dados provenientes de estudos de relação estrutura molecular e atividade (SAR, do inglês: *Structure-Activity Relationship*), estudos toxicológicos *in vitro*, estudos com animais e, se disponíveis, estudos clínicos ou epidemiológicos em humanos (JARDIM e CALDAS, 2009).

Após a identificação do perigo, a relação quantitativa entre a exposição a um agente e a taxa de incidência de resposta a um efeito adverso é avaliada. Estudos com animais de laboratório são as principais fontes de informação na caracterização da dose-resposta de substâncias potencialmente tóxicas presentes nos alimentos. Nesse processo, são adotadas abordagens diferentes quando os efeitos adversos possuem limiar de dose ou não (*threshold* ou *no-threshold effects*) (JARDIM e CALDAS, 2009).

Substâncias com limiar de dose para efeito adverso

Para essas substâncias, nenhuma resposta biológica será evidente abaixo de uma dose específica. Nessa etapa, é estimada a dose que não causou um efeito adverso nos animais testados (NOAEL, do inglês: *No Observable Adverse Effect Level*) e/ou a menor dose na qual o efeito adverso foi observado (LOAEL, do inglês: *Lowest Observed Adverse Effect Level*). O NOAEL e o LOAEL, obtidos dos estudos mais críticos conduzidos na espécie mais sensível testada, são utilizados no cálculo dos parâmetros seguros de ingestão crônica e aguda no homem. Esses parâmetros, expressos em mg/kg de peso corpóreo, são calculados dividindo-se o NOAEL ou o

LOAEL por um fator de segurança para se extrapolar os resultados obtidos com animais de laboratório para a espécie humana (JARDIM e CALDAS, 2009).

O fator de segurança 100 é utilizado no estabelecimento da ingestão segura de resíduos de pesticidas e drogas veterinárias, aditivos e contaminantes em alimentos. Esse valor assume que o ser humano pode ser até 10 vezes mais sensível ao agente que a espécie testada, e que alguns indivíduos da população humana podem ser até 10 vezes mais sensíveis que a média da população (JARDIM e CALDAS, 2009).

Fatores de segurança maiores ou menores que 100 podem ser considerados quando os estudos são incompletos ou inadequados e/ou, quando se quer acrescentar um fator adicional de proteção a um grupo altamente sensível da população (crianças, idosos, indivíduos com alguma patologia) ou ainda, na ausência de NOAEL. Pode ser menor que 100 quando dados de toxicocinética e toxicodinâmica demonstram que o homem possa ser menos sensível que a espécie animal na qual o produto foi testado ou quando o efeito observado é reversível ou pouco severo (JARDIM e CALDAS, 2009).

Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura estimados para o homem estão a ingestão diária aceitável (IDA), também chamada de dose de referência pelo EPA, 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 da substância presente no alimento e/ou água que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde. A IDA é normalmente definida para aditivos alimentares, drogas veterinárias e pesticidas, substâncias cuja concentração nos alimentos pode ser controlada pelas autoridades reguladoras (JARDIM e CALDAS, 2009).

Para contaminantes, parâmetros de ingestão crônica segura são: PMTDI, PTMI e PTWI. Nesse caso, o termo tolerável significa permissibilidade, não a aceitabilidade para a ingestão de contaminantes, cuja associação com os alimentos não pode ser evitada ou totalmente controlada. As PMTDIs são estabelecidas para os contaminantes que não se acumulam no organismo. Para os contaminantes que podem se acumular no organismo, o JECFA define a PTWI e a PTMI (WHO, 2009).

Substâncias sem limiar de dose para efeito adverso – carcinogênicas e genotóxicas

O processo da carcinogênese é complexo e multifatorial, mas pode ser caracterizado por duas etapas principais: a primeira, que inicia o processo, envolve substâncias que reagem covalentemente com o DNA, ou são bioativadas a metabólitos que o fazem, causando mutações genéticas. A segunda envolve compostos que facilitam o crescimento de células alteradas geneticamente, contribuindo para o desenvolvimento de células neoplásicas. No último caso, assume-se que exista NOAEL. Para substâncias genotóxicas, envolvidas na primeira etapa da carcinogênese, considera-se que não existe uma dose mínima de exposição para iniciar o modo de ação, isto é, em princípio, a exposição a uma única molécula pode levar a uma alteração genética e iniciar todo o processo (JARDIM e CALDAS, 2009).

Dose de Referência (BMD)

O conceito de dose de referência (BMD, do inglês: *Benchmark Dose*) foi originalmente proposto como alternativa ao uso de NOAEL/LOAEL para derivação dos níveis seguros de exposição humana. Enquanto NOAEL e LOAEL são doses discretas de um estudo, a estimativa da BMD envolve modelagem matemática da curva de dose-resposta para interpolar uma dose estimada que corresponda a um nível particular de resposta (por exemplo, a dose que causou um aumento de 10% na incidência de tumores – BMD10). Normalmente, a incerteza desta interpolação também é calculada e o limite de confiança inferior desta dose (BMDL10, do inglês: *benchmark dose lower confidence limit*) é utilizado como referência toxicológica (JARDIM e CALDAS, 2009).

A terceira etapa, avaliação da exposição na dieta, é definida como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de um agente tóxico através da alimentação. Para isso, são necessários três dados essenciais: a concentração da substância no alimento, o consumo do alimento e o peso corpóreo (individual ou da população em estudo) (Equação 1).

$$\text{Exposição} = \frac{\text{Concentração da substância} \times \text{consumo do alimento}}{\text{Peso corpóreo}} \quad (1)$$

A forma de obtenção dos dados a serem inseridos na Equação 1 depende do objetivo da avaliação do risco, se a exposição é crônica ou aguda e do quão precisa e detalhada a estimativa deve ser. Além disso, a estimativa pode ser direcionada à população geral ou a determinado subgrupo, como crianças.

A concentração da substância no alimento pode ser obtida experimentalmente ou através de revisões da literatura. Quatro tipos de dados que podem ser usados para acessar o consumo de alimentos de uma população: dados de suprimento de alimentos, de disponibilidade de alimento no domicílio, de consumo individual de dieta duplicada. A escolha da fonte de dados irá depender principalmente dos objetivos do estudo, dos alimentos de interesse, da necessidade de acessar a exposição de grupos específicos da população e das fontes disponíveis (JARDIM e CALDAS, 2009).

Dados de suprimentos de alimentos são calculados a partir dos balancetes da produção agropecuária do país que leva em consideração a produção anual do alimento, importações, exportações, perda no campo e uso na pecuária e indústria. O resultado reflete a média de disponibilidade do alimento não processado disponível por habitante. As 13 dietas *cluster* do GEMs/Food (*Global Environmental Monitoring System*) são atualmente utilizadas pelo JECFA para cálculo de exposição crônica a substâncias químicas no âmbito internacional. As dietas foram estimadas a partir de dados de suprimentos de alimentos reportados a FAO pelos países, os quais são agrupados de acordo com a disponibilidade nacional de alimentos marcados. Nesse contexto, o Brasil foi incluído na dieta K, caracterizada pelo alto consumo de aves, carne bovina, leite, trigo, milho, aipim, e entre outros. O consumo de vinho não está descrito nas dietas cluster. No âmbito internacional, considera-se o peso médio corpóreo da população de 60 ou 55 kg, dependendo da dieta.

Dados de disponibilidade de alimento no domicílio são obtidos nacionalmente a partir de pesquisas nos domicílios que reportam a quantidade de cada alimento adquirida pela família durante um determinado período. No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) conduz periodicamente a coleta de dados de disponibilidade de alimento por meio da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF). A última POF realizada foi a POF Nacional 2008-2009. Os resultados foram divulgados em 2010 e podem ser acessados na página do IBGE. A nova POF está sendo realizada no período de maio de 2015 até junho de 2016.

Dados de consumo individual é a fonte ideal para avaliar a exposição humana a substâncias químicas na dieta, já que podem acessar o consumo de subgrupos específicos da população e estabelecer a relação consumo/peso corpóreo para cada indivíduo. Entre as metodologias para coleta desses dados está o registro individual de consumo durante um período (normalmente entre 1 e 7 dias), o recordatório 24h, onde o indivíduo reporta o tipo e quantidade de alimentos consumidos nas últimas 24h, e o Questionário de Frequência Alimentar (QFA) constituído de uma lista estruturada de alimentos com o objetivo de acessar sua frequência de consumo diário ou semanal (JARDIM e CALDAS, 2009).

Em estudos de dieta duplicada, os indivíduos coletam uma segunda porção de todos os alimentos que consomem durante certo período (normalmente de 1 a 7 dias), incluindo o que é consumido fora do domicílio. Os alimentos são pesados e as porções são analisadas em laboratório para as substâncias de interesse. Esses estudos fornecem ao mesmo tempo dados de consumo por peso corpóreo e de concentração para uma dada população/substância. Pela sua alta complexidade e custo, estudos de dieta duplicada são normalmente restritos a grupos específicos da população, principalmente crianças (JARDIM e CALDAS, 2009).

A caracterização do risco pode ser definida como a estimativa qualitativa ou, sempre que possível, quantitativa, incluindo as incertezas esperadas, da probabilidade de ocorrência de um efeito adverso de um dado agente em um dado organismo ou população sob condições definidas de exposição. As metodologias utilizadas para caracterizar o risco variam de acordo com as características toxicológicas da substância, isto é, se a substância necessita de um limiar de dose no organismo para exercer sua ação tóxica (substâncias não genotóxicas) ou não (substâncias carcinogênicas e genotóxicas) (JARDIM e CALDAS, 2009).

Para substâncias não genotóxicas, a ingestão é comparada ao parâmetro de ingestão segura. O risco pode existir quando a ingestão calculada ultrapassa esse parâmetro. Esse risco pode ser expresso em % do parâmetro toxicológico como, por exemplo, em porcentagem da IDA em uma exposição crônica (Equação 2).

$$\%IDA = \frac{\sum \text{Ingestão}}{IDA} \times 100 \quad (2)$$

Dentre as metodologias disponíveis para caracterizar o risco da exposição a substâncias carcinogênicas e genotóxicas estão (JARDIM; CALDAS, 2009):

- 1) O princípio *tão baixo quanto razoavelmente possível* (ALARA, do inglês: *as low as reasonably achievable*), que indica a redução da exposição ao nível mais baixo que possa ser alcançado;
- 2) A extrapolação para doses de exposição aceitável/conhecida a partir de estudos de carcinogenicidade com roedores;
- 3) A aplicação do limiar de risco toxicológico (TTC, do inglês: *threshold of toxicological concern*) que indica um valor único de exposição segura para todas as substâncias;
- 4) O cálculo da Margem de Exposição (MOE, do inglês: *Margin of Exposure*). A MOE pode ser calculada a partir da Equação 3, sendo a BMDL, preferencialmente a BMDL10, identificada como dose de referência toxicológica mais adequado para a estimativa (BENFORD *et al.*, 2010).

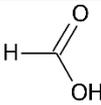
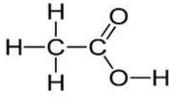
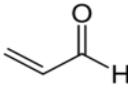
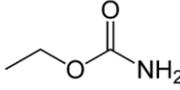
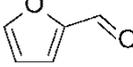
$$\text{MOE} = \frac{\text{Referência toxicológica}}{\text{Exposição}} \quad (3)$$

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 (EFSA, 2005; JARDIM e CALDAS, 2009). A caracterização de risco relacionada à exposição a compostos tóxicos presentes em vinhos foi descrita na literatura para o acetaldeído, formaldeído e carbamato de etila. Para o acetaldeído, foram obtidos valores de MOE de 98, 112, 174, 368 e 696 (LACHENMEIER; PRZYBYLSKI; REHM, 2012; PAIANO *et al.*, 2014); para o formaldeído, foram obtidos valores de 1.378, 5.511, 12.189 e 48.754; para o carbamato de etila, foram obtidos valores de 176, 704, 6.338 e 25.352 (LACHENMEIER; PRZYBYLSKI; REHM, 2012).

1.3.3 Compostos tóxicos produzidos durante a vinificação

Os compostos tóxicos produzidos durante a vinificação que são alvo desse estudo são carbamato de etila, acetaldeído, formaldeído, acroleína, furano e furfural (Tabela 4).

Tabela 4- Características físico-químicas dos compostos tóxicos presentes em vinhos e que foram avaliados neste estudo.

Analito	CAS	PM (g/mol) ^a	Fórmula molecular	Estrutura química	Densidade (g/cm ³)	PE (°C) ^b
Formaldeído	50-00-0	30,03	CH ₂ O		0,001	-19,3
Acetaldeído	75-07-0	44,05	C ₂ H ₄ O		0,788	20,2
Acroleína	107-02-8	56,06	C ₃ H ₄		0,841	53
Furano	110-00-9	68,07	C ₄ H ₄ O		0,936	31,3
Carbamato de etila	51-79-6	89,08	C ₃ H ₇ NO ₂		1,056	182
Furfural	98-01-1	96,07	C ₅ H ₄ O ₂		1,16	162

Fonte: Elaborada pelo autor.

^a peso molecular, ^b ponto de ebulição

1.3.3.1 Carbamato de etila (CE)

O carbamato de etila é um éster etílico do ácido carbâmico (NH₂COOH), também conhecido como uretana ou etiluretana, cuja temperatura de fusão e sublimação é 49 °C e 103 °C, respectivamente. A pressão de vapor é de 0,262 mm Hg a 25 °C. Apresenta-se na forma de cristal incolor, inodoro, de sabor salino refrescante e levemente amargo. É um composto relativamente polar, hidrofílico e bastante solúvel em água, etanol, éter, clorofórmio, acetato de etila, benzeno e glicerol. Essas propriedades conferem ao CE alta polaridade e baixa volatilidade, além de se decompor a baixa temperatura (O'NEIL, 2001; GALINARO *et al.*, 2011).

1.3.3.1.1 Mecanismos de formação em bebidas

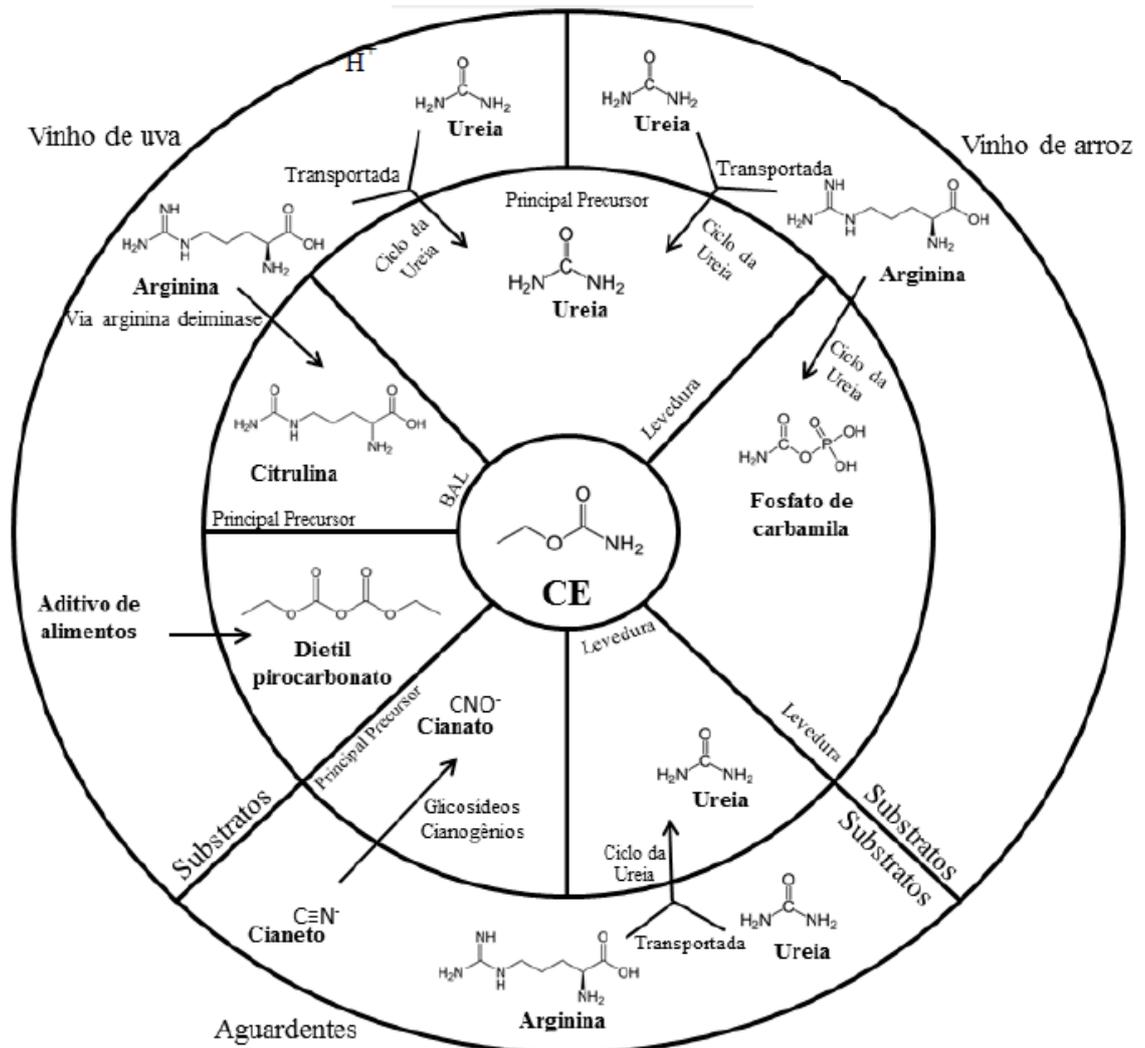
O CE forma-se naturalmente em diversas bebidas como vinho, cervejas, saquê e, em maior quantidade, em bebidas fermento-destiladas como uísque, rum, vodca, cachaça, grapa (ANDRADE-SOBRINHO *et al.*, 2002). Em bebidas fermento-destiladas, a formação de CE pode ocorrer antes, durante e depois do processo de

destilação, incluindo o armazenamento da bebida (LABANCA, GLÓRIA AFONSO, 2008).

Os principais precursores da formação do CE em diferentes tipos de bebidas alcoólicas incluem: ureia, citrulina, fosfato de carbamila, cianato e dietil pirocarbonato (DEPC) (Figura 3). Entre estes precursores, ureia, fosfato de carbamila e citrulina são produzidos principalmente por micro-organismos, tais como leveduras e bactérias ácido lácticas (BAL); enquanto que o cianato e o DEPC são produzidos por várias reações enzimáticas durante o processo de fermentação e destilação (JIAO; DONG; CHEN, 2014).

Em vinhos, o CE pode ser formado durante e depois da fermentação e a sua presença está relacionada com o tipo de levedura e com os subprodutos do seu metabolismo (GALINARO *et al.*, 2011), nutrientes adicionados ao mosto, temperatura e tempo de estocagem, luz, pH, concentração de etanol (teor alcoólico), temperatura e acidez da fermentação e uso de adubação nitrogenada para fertilização do solo onde as uvas estão sendo cultivadas (HASNIP; CAPUTI; CREWS; BRERETON, 2004; LABANCA; GLORIA; AFONSO, 2008; ANDRADE-SOBRINHO *et al.*, 2009).

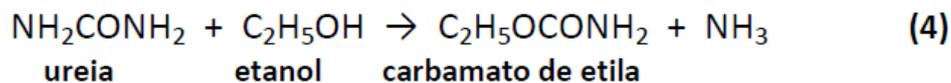
Figura 3- Mecanismos de formação e principais precursores do carbamato de etila em bebidas alcoólicas



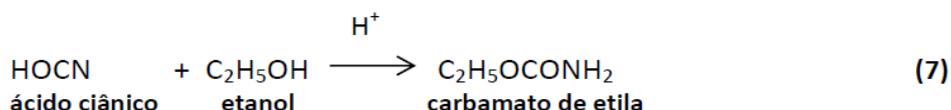
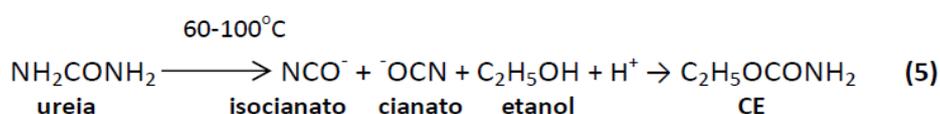
Fonte: Adaptado de ZHAO *et al.*, 2013.

Reação entre ureia e etanol

A reação entre a ureia e o etanol (Equação 4) é a via mais comum de formação de CE encontrado nas principais bebidas fermentadas, incluindo o vinho. A ureia resulta principalmente do catabolismo da arginina realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

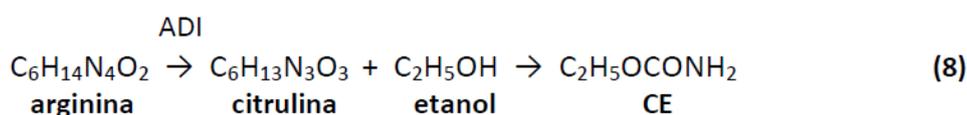


A formação de CE através dessa reação apresenta cinética moderada à temperatura ambiente. No entanto, demonstra-se que a formação deste éster a partir da ureia é potencializada com o aumento da temperatura. Neste sentido, a conservação dos vinhos em temperatura abaixo de 24 °C é indicada para evitar a formação de grande quantidade de CE (STEVENS e OUGH, 1993). Outro caminho possível para a formação do CE durante a fermentação é a degradação térmica da ureia (60-100 °C) em isocianato e cianato que, ao reagirem com o etanol, em meio ácido, forma CE (Equação 5) (BRUNO *et al.*, 2007). Outra possível via é a decomposição térmica da ureia à amônia e ácido ciânico, e posterior reação desse último com etanol (Equações 6 e 7) (WEBER; SHARYPOV, 2009).



Reação entre citrulina e etanol

A citrulina é outro precursor da formação de CE em vinho. Ao contrário da ureia que resulta do catabolismo da arginina realizado por *Saccharomyces cerevisiae*, a geração de citrulina é atribuída ao catabolismo de arginina realizado pelas BAL via fermentação maloláctica. Pela ação da arginina desiminase (ADI, do inglês: *arginine deiminase*), que é produzida pelas BAL, a arginina é convertida em citrulina. Desta maneira, a citrulina formada pode reagir espontaneamente com etanol, formando CE (Equação 8) (JIAO, DONG, CHEN, 2014).



Reação entre cianato e etanol

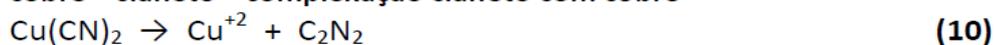
O ânion cianeto (CN⁻) do ácido cianídrico (HCN) é o substrato para a formação de cianato (⁻OCN) que é o precursor mais importante de CE em bebidas destiladas. Não é produzido por micro-organismos, e sim por reações enzimáticas e clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos presentes em alguns vegetais, como

cana-de-açúcar, cevada, mandioca, aveia, arroz, centeio, trigo, maçã e manga. Desta maneira, em vinhos não se observa a formação de CE através desta via (LACHENMEIER *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2013; RIACHI *et al.*, 2014).

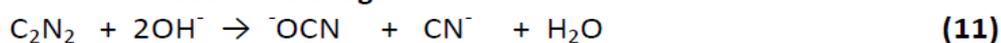
A formação de CE a partir do OCN^- é baseada na complexação do CN^- com cobre (Cu^{2+}), proveniente do destilador usado na produção de bebidas destiladas (Equação 9), seguindo-se da sua transformação em cianogênio (Equação 10), o qual sofre hidrólise a CN^- e a cianato (OCN^-) que ocorre em meio básico (Equação 11). O OCN^- reage com etanol para formar CE (Equação 12) (RIACHI *et al.*, 2014).



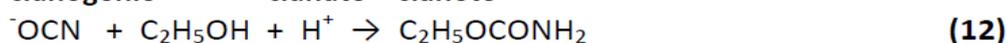
cobre cianeto complexação cianeto com cobre



cobre cianogênio



cianogênio cianato cianeto



cianato etanol CE

Reação entre fosfato de carbamila e etanol

Assim como a citrulina, o fosfato de carbamila ($\text{CH}_4\text{O}_5\text{PN}$) é outro intermediário proveniente do catabolismo de arginina que pode reagir com etanol, originando CE. Esta reação é catalisada pela enzima carbamoil-fosfato-sintase produzida pela *Saccharomyces cerevisiae* (ZHAO *et al.*, 2013; JIAO, DONG, CHEN, 2014).

Reação entre DEPC e amônia

Em comparação com outras vias de formação de CE, esta ocorre devido ao uso do aditivo DEPC. Antes da década de 1960, pesquisadores descobriram que o DEPC pode reduzir a contaminação e a deterioração da cerveja por microorganismos indesejáveis (leveduras ou bactérias). No entanto, o uso de DEPC foi rapidamente abandonado devido ao efeito secundário indesejável de formação de CE ao reagir com amônia (JIAO, DONG, CHEN, 2014).

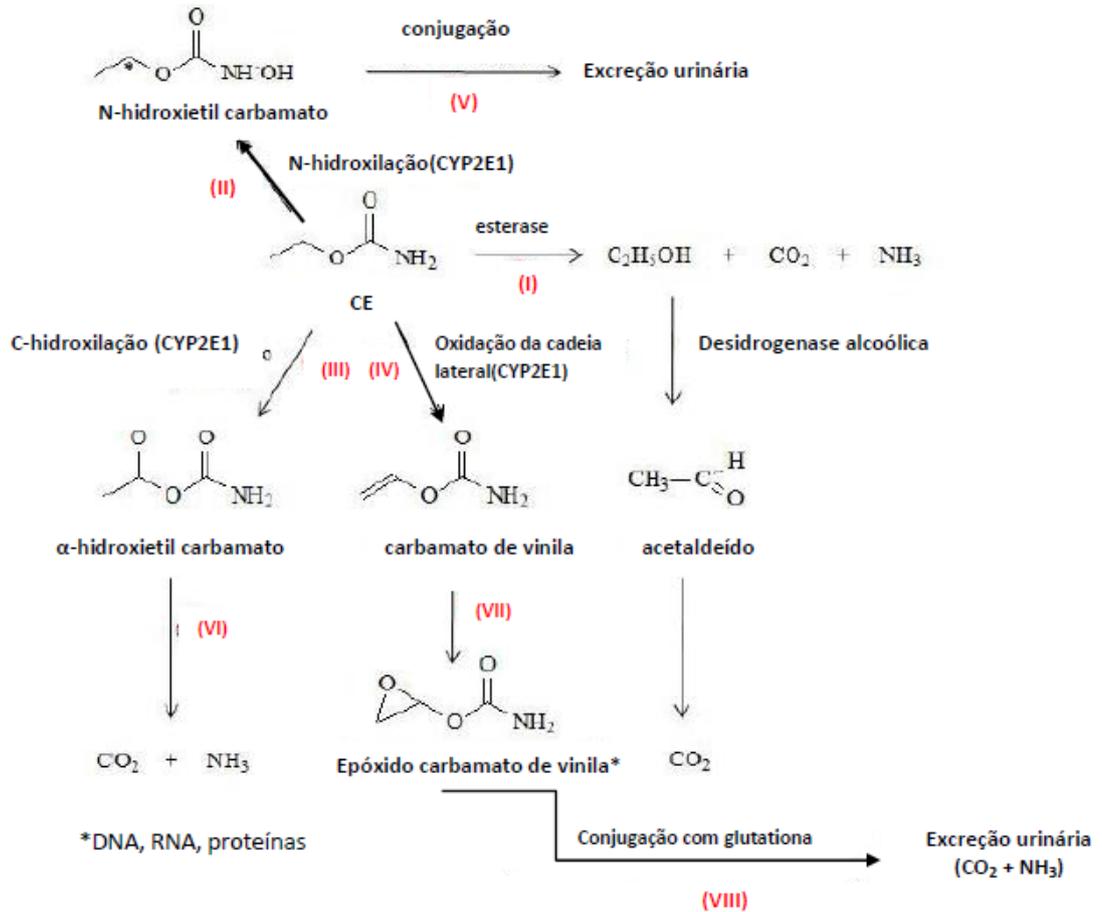
1.3.3.1.2 Aspectos toxicológicos e legislação

O CE foi utilizado na década de 1940 como hipnótico em seres humanos e como anestésico em animais de laboratório. Este último levou a descoberta (1943) de sua carcinogenicidade em animais. Em testes de toxicidade em animais

(camundongos, ratos, hamster e macacos), foi comprovado ser causador de edemas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos, hepatomas, carcinomas mamários, tumores de ovário, hemangiomas hepáticos, tumores melanóticos de pele e de íris, entre tantos outros (ZIMMERLI, SCHLATTER, 1991; BELAND *et al.*, 2005; EFSA, 2007; FORKERT *et al.*, 2007). Estudos em camundongos demonstraram que a combinação de diferentes concentrações do carbamato de etila (0, 10, 30 e 90 mg/L) com o etanol (0, 2,5 e 5%) levam a formação de tumores nos pulmões (BELAND *et al.*, 2005; WHO, 2007).

O metabolismo de CE em camundongos envolve três vias (Figura 4) (GALINARO *et al.*, 2011): a hidrólise, a N-hidroxilação, C-hidroxilação e a oxidação da cadeia lateral. A hidrólise (Figura 4, reação I) é catalisada pela enzima esterase hepática e estima-se que é responsável pela decomposição de 90% do CE ingerido, produzindo etanol, dióxido de carbono e amônia. Uma pequena porção de CE é convertido pelas reações de N-hidroxilação (Figura 4, reação II), C-hidroxilação (Figura 4, reação III) e oxidação da cadeia lateral (Figura 4, reação IV) que são catalisadas pela enzima 2E1 do citocromo P450 (CYP2E1), levando a formação de N-hidroxietil carbamato (0,1% do CE), α -hidroxietil carbamato e carbamato de vinila (0,5% do CE), respectivamente. Cerca de 5% do CE ingerido é excretado inalterado pela urina (ZIMMERLI e SCHLATTER, 1991; SAKANO *et al.*, 2002; EFSA, 2007).

Figura 4 - Metabolismo do carbamato de etila em camundongos.



Fonte: Adaptado de GALINARO *et al.*, 2011.

O α -hidroxi-etil carbamato é metabolizado a dióxido de carbono e amônia (Figura 4, reação VI), enquanto que o carbamato de vinila é oxidado a epóxido carbamato de vinila (Figura 4, reação VII). O epóxido carbamato de vinila é metabolizado a dióxido de carbono e amônia após conjugação com glutatona (GSH), sendo eliminado na urina (Figura 4, reação VIII) (GALINARO *et al.*, 2011). O epóxido carbamato de etila está associado à carcinogenicidade do CE uma vez que pode se ligar covalentemente a ácidos nucleicos (DNA, RNA) e a proteínas (WEBER; SHARYPOV, 2009; GALINARO *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2013).

O JECFA estimou que a população está exposta ao CE na ordem de 15 mg/kg de peso corpóreo por dia, quando se considera os níveis desse éster comumente presentes em pão, produtos lácteos fermentados e molho de soja. Quando se considera o consumo das bebidas alcoólicas, além desses alimentos, a população está exposta a 80 mg/kg de peso corpóreo por dia (JECFA, 2016).

A tabela 5 apresenta os limites para o CE estabelecidos em alguns países de acordo com o tipo de bebida alcóolica, No Brasil, o nível máximo de CE é regulamentado apenas para a aguardente.

Tabela 5 - Teores de carbamato de etila ($\mu\text{g/L}$) estabelecidos por diferentes países para cada tipo de bebida

País	Vinho	Vinho Fortificado	Uísque	Saque	Brandy	Aguardente
Canadá	30	100	150	200	400	-
EUA	15	60	-	-	-	-
República Tcheca	30	100	150	200	400	-
França	-	-	150	-	1000	-
Alemanha	-	-	-	-	800	-
Suíça	-	-	-	-	1000	-
Brasil	-	-	-	-	-	150

Fonte: Galinaro *et al.*, 2011.

1.3.3.1.3 Estratégias na diminuição do CE em bebidas

Devido aos vários precursores, aos diferentes mecanismos e aos fatores envolvidos na sua formação, não existe uma metodologia única para prevenir e/ou reduzir os teores de CE em bebidas. A enzima arginase, responsável por metabolizar o aminoácido arginina em urea, é codificada pelo gene CAR1 da *Saccharomyces cerevisiae*. A deleção deste gene resultou na diminuição de 77,89 e 73,78 % nos teores de uréia e de CE em vinhos, respectivamente (GUO *et al.*, 2016).

Em bebidas destiladas, uma das maneiras de reduzir a formação de carbamato de etila consiste na eliminação dos íons cianeto através da enzima rodanase (tiosulfato-cianeto sulfotransferase). A utilização desta enzima em soluções modelo (30% v/v de etanol) fortificadas com o íon cianeto reduziu em 80% o teor de CE (TAKI *et al.*, 1992). Procedimentos para remoção do cobre, como a percolação do destilado por resinas de troca iônica, carvão ativado, carvão vegetal, quitosana, pela bidestilação (dupla destilação) ou por meio do tratamento com CaCO_3 ou MgCO_3 , tem sido descritos (NEVES *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2009; JANEGITZ *et al.*, 2010). Entretanto estes procedimentos podem extrair outros compostos além do cobre (álcoois superiores, aldeídos e ésteres) que são indispensáveis à qualidade sensorial da aguardente (GALINARO *et al.*, 2011).

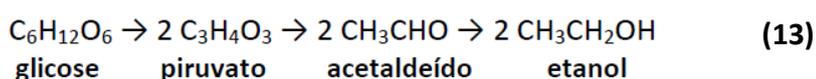
1.3.3.2 Acetaldeído

Conhecido também como etanal ou aldeído acético, o acetaldeído é um líquido incolor, volátil à temperatura ambiente, e, tanto o líquido e os vapores são altamente inflamáveis. Como um líquido é mais leve do que a água, e os vapores são mais pesados do que o ar. É solúvel em água, álcool, éter, acetona e benzeno. A temperatura fusão é de -123,5 °C e pressão de vapor é 0,97 mmHg a 20 °C (O'NEIL, 2001).

É o principal aldeído presente no vinho, do ponto de vista quantitativo, possui aroma frutado agradável em baixas concentrações, mas em altas concentrações possui um odor irritante pungente. O limite de percepção olfativa (menor concentração de uma substância que é detectável através do odor) do acetaldeído é de 100-125 mg/L (DE AZEVÊDO, 2007).

1.3.3.2.1 Mecanismos de formação do acetaldeído em bebidas

O acetaldeído é formado durante a fermentação alcoólica pela ação de leveduras, sendo o açúcar o principal substrato (Equação 13). Os níveis de acetaldeído podem variar consideravelmente dependendo das condições de fermentação, tais como a temperatura, os níveis de oxigênio e dióxido de enxofre, pH e disponibilidade de nutrientes para a levedura (LIU e PILONE, 2000).



Além de leveduras, bactérias acéticas provenientes das uvas e dos equipamentos vinícolas também pode produzir acetaldeído através da oxidação do etanol. Nos vinhos tintos, o acetaldeído também pode ser produzido através da oxidação do etanol, provocada pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formado na reação de auto-oxidação de compostos fenólicos presentes no mosto das uvas (LIU e PILONE, 2000).

1.3.3.2.2 Aspectos toxicológicos e legislação

Os efeitos da exposição ao acetaldeído começaram a ser investigados no início dos anos 1950 e sua relação com o câncer em 1970. Em 1965, o acetaldeído foi classificado como "geralmente reconhecido como seguro" (GRAS, do inglês:

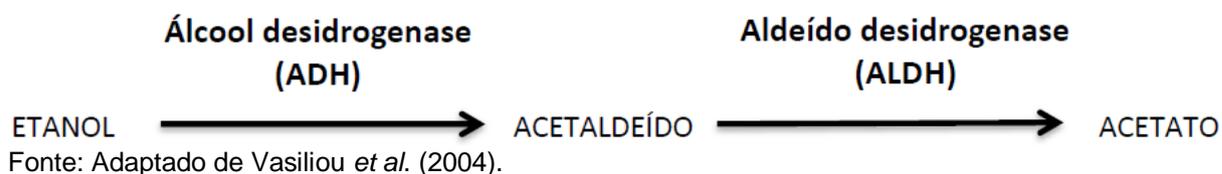
Generally Recognised As Safe) pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, do inglês: *Food and Drug Administration*), uma designação que permite que ele seja utilizado como um aditivo alimentar (CHUNG *et al.*, 2015). Esse status foi confirmado pelo JECFA em 1998. No entanto, estudos recentes mostram que o acetaldeído é mutagênico, genotóxico e desempenha um papel significativo no desenvolvimento de certos tipos de câncer, tais como câncer da cavidade oral, laringe, faringe, esôfago, colo retal, fígado (carcinoma hepatocelular) e mama (LACHENMEIER, KANTERES, REHM, 2009; SCOCCIANTI *et al.*, 2015).

O acetaldeído interfere na síntese e reparo do DNA, o que pode resultar no desenvolvimento de tumores. Esse aldeído provoca mutações pontuais nos linfócitos humanos, induz trocas de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas brutas, inflamação e metaplasia do epitélio traqueal, atrasa a progressão do ciclo celular e aumenta a lesão celular associada com hiper-regeneração (HELANDER, LINDAHL-KIESSLING, 1991; SIMANOWSKI *et al.*, 1994). Em um experimento em que o acetaldeído foi administrado na água potável dos roedores, as lesões da mucosa do trato aerodigestivo superior se assemelhavam as observadas após a ingestão crônica de álcool (HOMANN, 2001). Além disso, quando inalado, o acetaldeído provoca carcinoma da nasofaringe e laringe em ratos e hamsters (SEITZ e MEIER, 2007).

A presença de aldeídos em bebidas alcoólicas pode causar dores de cabeça, náuseas, confusão mental, queda de pressão sanguínea, entre outros sintomas. Nos seres humanos, o acetaldeído é o primeiro metabólito do etanol, que é oxidado no fígado a acetaldeído e depois a acetato pelas enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH), respectivamente (Figura 5). Além disso, pequenas quantidades de acetaldeído são instantaneamente produzidas na cavidade oral, a partir de etanol ingerido, por micro-organismos presentes na saliva (YOKOYAMA *et al.*, 2008; LACHENMEIER, KANTERES, REHM, 2009; PAIANO *et al.*, 2014). Estudos epidemiológicos mostraram que mutações no gene da ALDH2, enzima responsável pela oxidação do acetaldeído durante o metabolismo do álcool, contribui significativamente para o desenvolvimento de câncer de esôfago, devido ao consumo de álcool. Isto é devido ao fato de os portadores deste genótipo processarem o acetaldeído a uma taxa muito mais lenta, o que leva a maiores

concentrações de acetaldeído no sangue e na saliva após o consumo de álcool (LEWIS e SMITH, 2005). De acordo com um estudo recente, esses indivíduos também têm níveis mais elevados de adutos de DNA relacionado com o acetaldeído em seus linfócitos (MATSUDA *et al.*, 2006).

Figura 5 - Metabolismo do etanol e do acetaldeído.



Na indústria de bebidas, é importante conhecer as concentrações de acetaldeído, pois este tem papel central na manifestação da intoxicação alcoólica. A legislação brasileira estabelece limites máximos de aldeídos totais em bebidas destiladas, expressos em acetaldeído/100 mL de etanol anidro: aguardente 30,0 mg/100 mL, conhaque 40,0 mg/100 mL, grapa 80,0 mg/100 mL, destilado simples de uva 40,0 g/100 mL, pisco 200,0 mg/100 mL (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010). Entretanto, não há legislação nacional e internacional que estabeleça limites máximos para o acetaldeído em vinhos.

1.3.3.2.3 Estratégias na diminuição do acetaldeído em bebidas

A concentração elevada de acetaldeído em bebidas alcoólicas pode ser resultante de oxidação ou contaminação por bactérias ou leveduras, aeração no final da fermentação ou da conservação em recipiente cujo volume em líquido esteja incompleto, permitindo o contato com a camada interna de ar. Quando não é possível preencher todo o volume da garrafa, um jato de gás inerte (N₂) pode ser utilizado para deslocar o oxigênio. Além disso, a oxidação é menos intensa a temperaturas mais baixas (CORTÉS *et al.*, 2003). A utilização de estirpes mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* em que o gene ADH2 que codifica a enzima álcool desidrogenase (ADH), responsável pela oxidação do etanol em acetaldeído, é deletado, resulta na redução do teor desse aldeído em 68% (SUN *et al.*, 2006).

Won *et al.* (2015) compararam os efeitos do emprego da chaptalização (adição de açúcar no início da fermentação) e da adição de ácido láctico e pectinase e na produção de acetaldeído em vinhos de maçã. O ácido láctico é adicionado para diminuir o pH do mosto a fim de evitar o desenvolvimento de micro-organismos não

relacionados a fermentação alcoólica, a pectinase é adicionada para clarificação do mosto e a adição de açúcar é feita para aumentar o grau alcoólico do vinho. Este estudo mostrou que a amostra em que o ácido láctico foi adicionado apresentou teor de acetaldeído menor (2,07 mg/L) do que a amostra controle (2,39 mg/L), indicando que a queda no pH pode reduzir a formação desse aldeído. Por sua vez, a amostra em que a pectinase foi adicionada teve uma redução maior na concentração de acetaldeído (1,32 mg/L) comparada com a amostra em que o ácido láctico foi adicionado (2,07 mg/L). A chaptalização foi o procedimento mais eficaz na redução da síntese de acetaldeído em vinho de maçã por apresentar o menor teor desse aldeído (1,00 mg/L) em relação ao controle (WON *et al*, 2015).

1.3.3.3 Formaldeído

O formaldeído é conhecido também como metanal, formol e aldeído fórmico. É um composto volátil a temperatura ambiente, incolor, inflamável, altamente reativo e com um odor pungente e irritante. É solúvel em água, etanol, dietil-éter e outros solventes polares. A temperatura de fusão -92 °C e a pressão de vapor 3284 mm Hg a 20 °C (WHO, 2002).

O formaldeído está presente no ambiente externo devido à fotooxidação de metano. As fontes antropogênicas de emissão de formaldeído para o ambiente são a exaustão automotiva, processos de combustão e atividades industriais como a produção de resinas. Incêndios florestais e gases vulcânicos são as principais fontes naturais de emissão de formaldeído na atmosfera. Outras fontes de exposição a esse composto são alimentos e bebidas alcoólicas, fumaça de cigarro e fluidos de embalsamamento usados em laboratórios de patologia (WHO, 2002).

1.3.3.3.1 Mecanismos de formação em bebidas

O formaldeído é formado naturalmente no processo de fermentação alcoólica através da oxidação do metanol provindo da hidrólise da pectina (DOROKHOV *et al.*, 2015). Além disso, a presença de formaldeído em bebidas alcoólicas pode ser decorrente do uso de antissépticos a base desse aldeído na higienização dos equipamentos ou para inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis durante a fermentação (ZHAO, ZHANG, 2009; MONAKHOVA, JENDRAL, LACHENMEIER, 2012; LACHENMEIER *et al.*, 2013; ARSLAN *et al.*, 2015).

1.3.3.3.2 Aspectos toxicológicos e legislação

O formaldeído foi considerado por muito tempo como um provável carcinogênico (Grupo 2A da IARC), com base na comprovação da carcinogenicidade em animais e evidências limitadas da relação com o câncer em humanos. No entanto, a IARC reclassificou o formaldeído como carcinogênico para os seres humanos (Grupo 1 IARC) em junho de 2004 a partir de "estudos epidemiológicos que associam à exposição a esse aldeído e a ocorrência de câncer na nasofaringe em seres humanos". Em 2009, a IARC concluiu que há provas suficientes para a associação entre a exposição ao formaldeído e a ocorrência de leucemia (ZHANG *et al.*, 2009; LADEIRA *et al.*, 2011).

Alterações histopatológicas (hiperplasia, metaplasia escamosa, inflamação, erosão, ulceração) e aumento na proliferação celular foram observados na cavidade nasal e em porções superiores do trato respiratório de animais de laboratório expostos repetidamente ao formaldeído por inalação. Um aumento da incidência de tumores na cavidade nasal foi observado em estudos em que os ratos foram expostos através de inalação a concentração de formaldeído superior a 7,2 mg/m³. Animais expostos ao formaldeído por via oral tiveram alterações histopatológicas no estômago, aumento do peso relativo dos rins e redução no ganho de peso, além de aumento na incidência de tumores do sistema hematopoiético em ratos machos que receberam água potável contendo formaldeído em concentrações que variaram de 0 a 1500 mg/L (WHO, 2002).

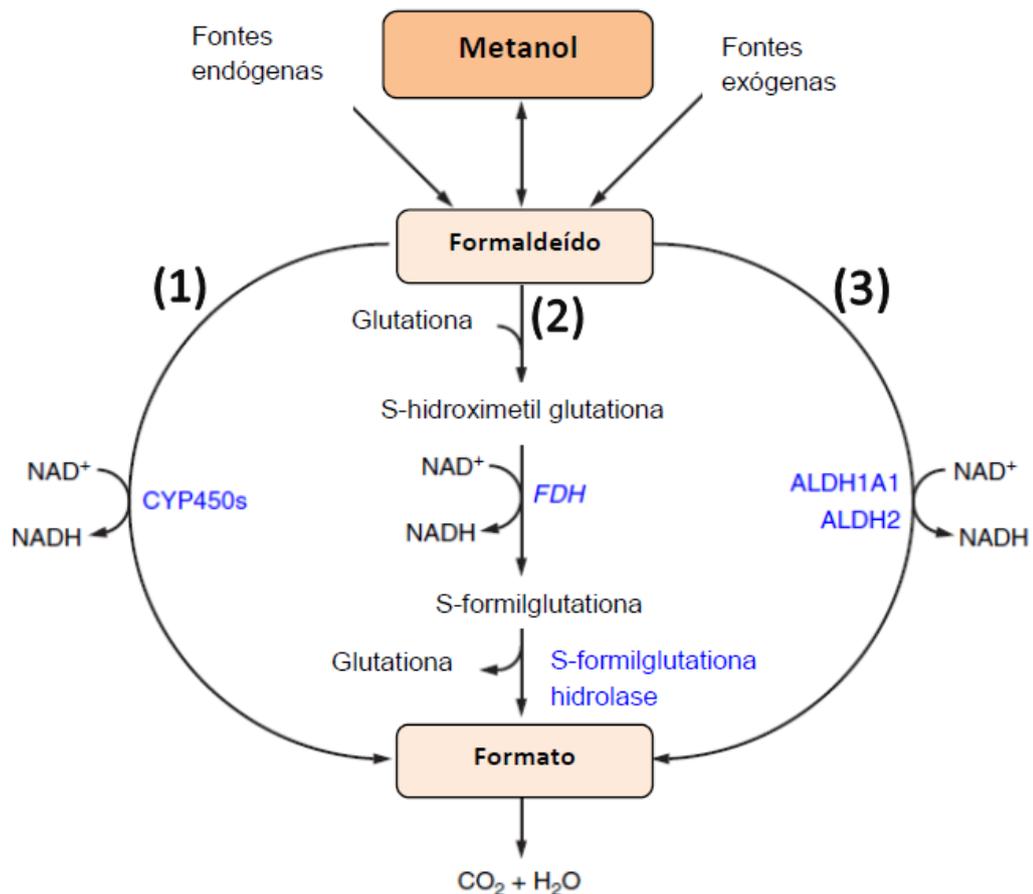
Casos clínicos mostraram que a exposição via oral ao formaldeído induz úlcera no trato gastrointestinal e a inalação crônica está associada a sintomas respiratórios e irritação nos olhos, nariz e garganta. Além disso, suspeita-se que o formaldeído está relacionado com o desenvolvimento de asma brônquica. O formaldeído induziu efeitos genotóxicos e citotóxicos em bactérias e células de mamíferos. A genotoxicidade desse aldeído foi provada em estudo que utilizou culturas de células de mamíferos e linfócitos humanos para determinar ligações cruzadas DNA-proteína, aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e micronúcleos (NAYA e NAKANISHI, 2005; NORLIANA *et al.*, 2009; LADEIRA *et al.*, 2011).

O formaldeído é um intermediário do metabolismo normal de aminoácidos, tais como serina, glicina, metionina e colina. A concentração endógena no sangue

de seres humanos, macacos e ratos é de aproximadamente 2-3 mg/L (NAYA e NAKANISHI, 2005; ZHANG *et al*, 2009).

A oxidação do formaldeído a formato pode ocorrer através de três vias diferentes: (1) enzimas mono oxigenases do citocromo P450 (CYP450); (2) álcool desidrogenase 3 (ADH3) ou formaldeído desidrogenase (FDH); (3) aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2) e citosólica (ALDH1A1) (Figura 6). A FDH é uma ADH dependente de glutatona e oxida o formaldeído em um processo de duas etapas. O formaldeído interage com a glutatona, formando S-hidroximetil glutatona que é subseqüentemente utilizada como substrato pela FDH para gerar S-formil glutatona. A S-formil glutatona é hidrolisada pela S-formilglutatona hidrolase (FGH), gerando formato e glutatona. O formato gerado é convertido em água e CO₂, podendo ser eliminado na urina ou no ar expirado (DOROKHOV *et al.*, 2015).

Figura 6 - Metabolismo do formaldeído com destaque para as etapas de conversão de formaldeído em água e CO₂.



Fonte: Adaptado de Dorokhov *et al.* (2015).

ALDH2: aldeído desidrogenase mitocondrial; ALDH1A1: aldeído desidrogenase citosólica; FDH: formaldeído desidrogenase; CYP450s: enzimas do citocromo P450.

Apesar de não haver legislação nacional e internacional que estabeleça a concentração máxima de formaldeído em bebidas alcoólicas, o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, do inglês: *International Programme on Chemical Safety*) da WHO sugeriu uma concentração tolerável (CT) de formaldeído de 2,6 mg/L em produtos ingeridos, incluindo as bebidas alcoólicas (WHO, 2002; LACHENMEIER *et al.*, 2013).

1.3.3.3.3 Estratégias na diminuição do formaldeído em bebidas

A oxidação do formaldeído em formato pode ser catalisada por enzimas da *Saccharomyces cerevisiae*, tais como aldeído desidrogenase (ALD), ADH, FDH e FGH. Assim, o uso de cepas de levedura com modificações genéticas nessas enzimas pode aumentar a conversão de formaldeído a formato (JAYAKODY *et al.*, 2016).

1.3.3.4 Acroleína

A acroleína é uma substância altamente tóxica encontrada em alimentos, bebidas e no meio ambiente, principalmente nas cidades e zonas industriais onde é considerada como um composto irritante para as vias respiratórias (ATSDR, 2007).

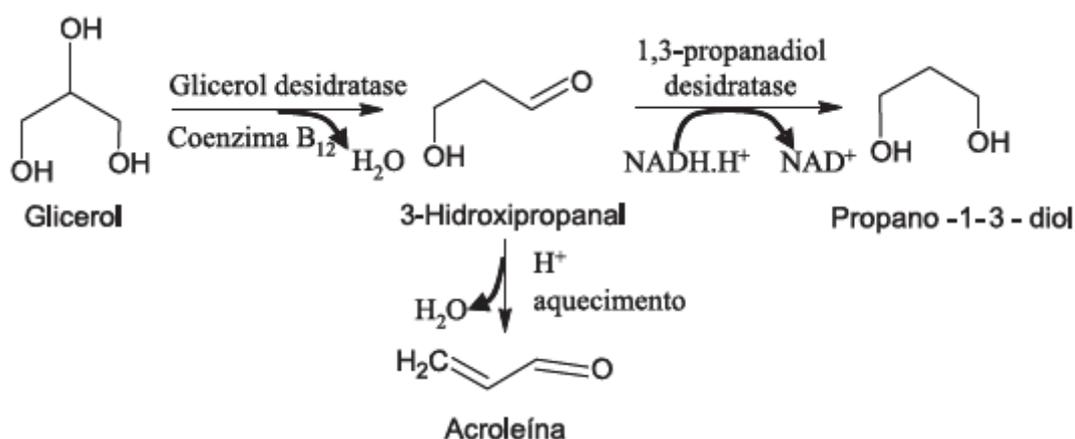
Também conhecida como 2-propenal, é um aldeído etilênico altamente eletrofílico, apresenta-se na forma de um líquido amarelo com odor penetrante e picante e sabor amargo. A temperatura de fusão é -87,7 °C e pressão de vapor é de 200 mmHg a 17,5 °C. É solúvel em água, etanol, éter dietílico e acetona, muito inflamável e polimeriza com facilidade, tratando-se, portanto, de uma substância bastante reativa, o que a torna muito instável. Uma vez absorvida, a acroleína reage diretamente com ácidos, amins primárias e secundárias encontradas em proteínas e ácidos nucleicos (GARAI-IBABE *et al.*, 2008).

1.3.3.4.1 Mecanismos de formação da acroleína em bebidas

A acroleína pode ser formada durante o processo de fermentação alcoólica ou durante a destilação das bebidas alcoólicas. O glicerol é um dos produtos da fermentação e atua como precursor da formação da acroleína durante a

fermentação e destilação de bebidas (Figura 7). Em vinho e cidra deteriorados, o sabor amargo e desagradável está associado com a presença de acroleína. Nestas bebidas, a acroleína resulta da contaminação por bactérias lácticas, como a *Lactobacillus colinoides*, que metabolizam o glicerol (CLAISSE e LONVAUD-FUNEL, 2000; SAUVAGEOT *et al.*, 2000; GARAI-IBABE *et al.*, 2008).

Figura 7- Via metabólica de formação da acroleína a partir do glicerol.



Fonte: De Azevêdo *et al.* (2007).

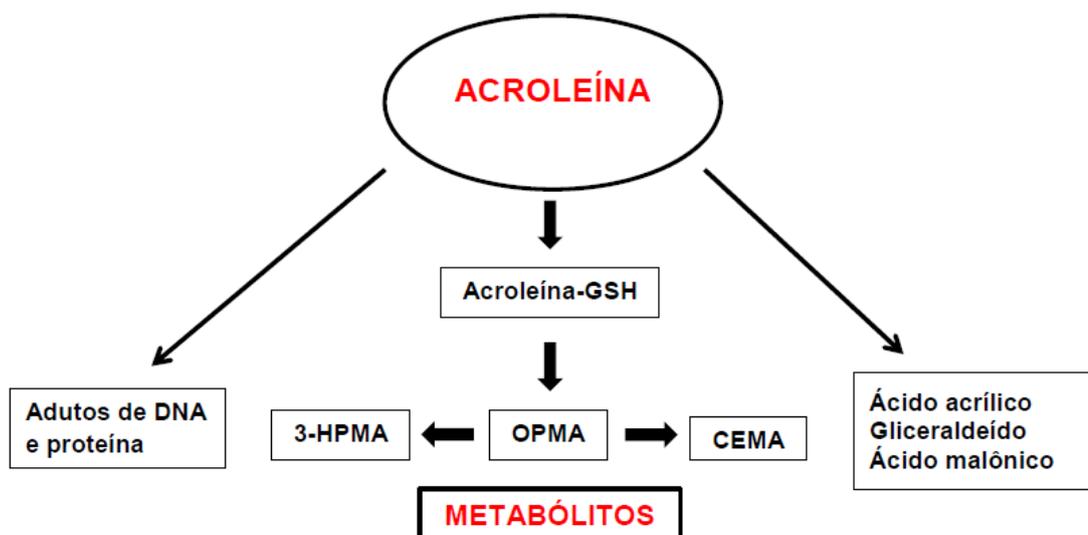
Na primeira etapa da formação da acroleína ocorre a desidratação do glicerol pela enzima glicerol desidratase, a qual é dependente da coenzima B12, resultando na formação de 3-hidroxiopropanal (3-HPA). Na segunda etapa, o 3-HPA é convertido em acroleína, sendo que esta reação ocorre em meio ácido e na presença de calor (DE AZEVÊDO *et al.*, 2007).

1.3.3.4.2 Aspectos toxicológicos e legislação

A acroleína é extremamente tóxica por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos. Os sinais e sintomas decorrentes da exposição por inalação de acroleína podem incluir irritação do nariz, garganta e pulmões, edema pulmonar, hemorragia pulmonar e morte; exposição via oral pode resultar em desconforto gastrintestinal, vômitos, úlcera ou hemorragia; exposição cutânea ao vapor ou líquido podem causar irritação dos olhos, como lacrimejamento e vermelhidão, e ulceração e necrose da pele (DE AZEVÊDO *et al.*, 2007; FAROON *et al.*, 2008).

A acroleína é solúvel em água, em álcool e em éter dietílico, e, portanto, pode atravessar as membranas por difusão passiva. Uma vez absorvida, ela reage diretamente com ácidos, amins primárias e secundárias encontradas em proteínas e ácidos nucleicos (GARAI-IBABE *et al.*, 2008). A principal via de eliminação de acroleína é a conjugação com glutathiona no fígado, seguido por clivagem enzimática dos resíduos de glicina e do ácido γ -glutâmico, respectivamente, no fígado e no rim, e N-acetilação da cisteína conjugada resultante para formar S-(3-oxopropil)-N-acetilcisteína (OPMA) no rim. A redução deste aldeído produz S-(3-hidroxiopropil)-N-acetilcisteína (3-HPMA), o principal metabólito da acroleína encontrado na urina, enquanto que a sua oxidação produz S-carboxietil-N-acetilcisteína (ácido mercaptúrico-2-carboxietilo, CEMA). A oxidação da acroleína pode preceder a conjugação com a GSH, formando assim o ácido acrílico. A epoxidação da acroleína mediada enzimaticamente produz glicidaldeído, um intermediário instável que pode reagir com a água para obter gliceraldeído ou pode formar um conjugado com a glutathiona. A acroleína pode também ser convertida em ácido malônico pela aldeído desidrogenase. Finalmente, a acroleína pode formar adutos irreversíveis com nucleófilos celulares, uma reação metabólica que pode ser a base de vários dos seus efeitos tóxicos (Figura 8) (STEVENS e MAIER, 2008; MOGHE *et al.*, 2015).

Figura 8 - Destino metabólico da acroleína.



Fonte: Adaptado de Moghe *et al.*, 2015.

CEMA: ácido mercaptúrico-2-carboxietilo; GSH: glutathiona; 3-HPMA: ácido mercaptúrico-3-hidroxiopropilo; OPMA: S-(3-oxopropil)-N-acetilcisteína.

A acroleína é altamente eletrofílica, portanto reage rapidamente e forma adutos com DNA, RNA e proteínas. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a acroleína causa estresse oxidativo, levando a disfunção da membrana, dano ao DNA e dano mitocondrial, os quais têm sido relacionados ao desenvolvimento de patologias, como câncer de pulmão, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença renal, lesão hepática, doenças cardiovasculares e derrame (FAROON *et al.*, 2008; MOGHE *et al.*, 2015).

Estudos indicam que a acroleína é um composto mutagênico, genotóxico e carcinogênico, entretanto ainda há incertezas quanto ao mecanismo de toxicidade deste composto e os dados disponíveis sobre a sua carcinogenicidade são limitados, fazendo-se necessários mais estudos (TANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; KÄCHELE *et al.*, 2014).

A Legislação Brasileira considera a acroleína um contaminante orgânico em aguardente de cana e na cachaça de alambique e a sua presença é regulamentada pela Instrução Normativa nº 13 de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essa normativa estabelece o limite máximo de 5 mg/100 mL e, acima desse limite, a bebida estará imprópria para ser comercializada. Não há concentração máxima estabelecida pela legislação brasileira para a acroleína em vinhos (BRASIL, 2005).

1.3.3.4.3 Estratégias na diminuição da acroleína em bebidas

Parâmetros como pH e disponibilidade de substrato influenciam na concentração de 3-HPA nos vinhos. Assim, o teor de acroleína pode ser minimizado ao manter valores de pH entre 3-4, uma vez que nesta faixa de pH a atividade bacteriana e acumulação de 3-HPA são reduzidas. Concentrações razoáveis de anidrido sulfuroso (SO₂) livre inibem o crescimento de bactérias lácticas indesejáveis através da redução da atividade específica da ATPase (CARRETÉ *et al.*, 2002; BAUER, 2010).

1.3.3.5 Furano

O furano é um éter cíclico com propriedades aromáticas. É um líquido incolor e inflamável, apresenta ponto de fusão de -85,6 °C e pressão de vapor de 600

mmHg a 25 °C. É insolúvel em água, mas solúvel em álcool, acetona, benzeno, éter e outros solventes orgânicos apolares (NTP, 2005).

1.3.3.5.1 Mecanismos de formação em bebidas

A formação de furano em alimentos foi inicialmente observada em estudos que tinham por objetivo identificar substâncias voláteis responsáveis pelo aroma dos produtos processados e geradas durante o aquecimento. Ele é considerado um contaminante formado no processamento de alimentos e tem sido detectado em uma grande variedade de alimentos, como vinho, vinagre, cerveja, aguardente, tequila, sucos de frutas, mel, avelã, proteína hidrolisada, pão, café e alimentos infantis (ARISSETO e TOLEDO, 2008; BONONI e TATEO, 2009; HU *et al.*, 2013).

O barril de madeira é um recipiente destinado à conservação, transporte e/ou envelhecimento de bebidas alcoólicas, especialmente vinho e cachaça. Esses recipientes passam por um tratamento térmico (tostagem) antes de serem usados, o qual causa a termólise de constituintes da madeira, como a celulose e a hemicelulose, que se decompõem em açúcares, os quais, por sua vez, podem ser desidratados e degradados pela alta temperatura, originando furano. Nas aguardentes víquicas, os derivados furânicos podem resultar da degradação térmica dos açúcares residuais do vinho, ao longo do processo de destilação (ARISSETO e TOLEDO, 2008).

Perez-Locas e Yaylayan (2004) estudaram a reatividade de vários açúcares para formar furano, tendo observado que a eritrose é o açúcar que origina maior quantidade de furano, seguido da ribose, sacarose, glicose e frutose. Aldotetroses, como eritrose, podem sofrer desidratação e formar 3-furanona, que após redução e desidratação, pode dar origem à molécula de furano. Já as pentoses, como a ribose, podem ser convertidas por desidratação em seus derivados de 3-desoxiosona, que após clivagem do grupo carbonila formam 2-desoxi-aldotetrose, um precursor direto do furano. A formação de furano a partir das hexoses se inicia com uma clivagem retro-aldol para produção de uma aldotetrose, que prossegue a reação após ser convertida em 3-furanona. Em menor extensão, hexoses podem formar 2-desoxi-3-cetoaldotetrose, que após desidratação, sofre ciclização para produzir 3-furanona. Um terceiro caminho para a formação de furano a partir de hexoses, que também ocorre em menor extensão, envolve a produção de 3-desoxiosona, que forma 2-

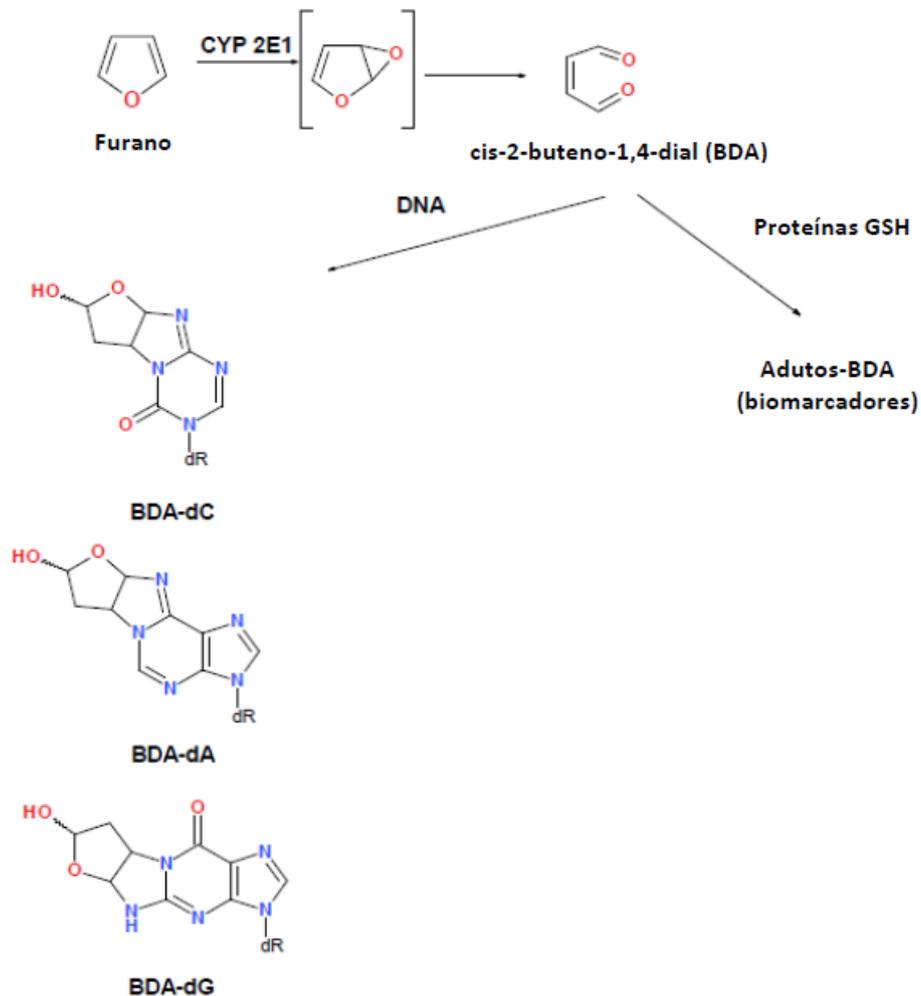
desoxi-aldotetrose por clivagem do grupo carbonila e oxidação (PEREZ-LOCAS e YAYLAYAN, 2004).

1.3.3.5.2 Aspectos toxicológicos e legislação

Dada a sua baixa polaridade, o furano consegue passar através das membranas biológicas e ser rapidamente absorvido pelos pulmões, intestino e pele. Experimentos realizados com furano isotopicamente marcado, administrado a ratos pela dieta, mostraram que 84% da dose total ingerida eram metabolizadas em 24h. Desta maneira, o rápido metabolismo do furano limita a concentração que esse atinge os órgãos e tecidos. Entretanto devido às suas características lipossolúveis, doses repetidas desse composto se acumulam principalmente no fígado e nos rins (ARISSETO e TOLEDO, 2008).

O furano é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450, em particular pela citocromo P2E1(CYP2E1), sendo sua biotransformação caracterizada pela abertura do anel presente na estrutura do furano com formação de dióxido de carbono e cis-2-buteno-1,4-dial (BDA) (Figura 9). O BDA é considerado citotóxico, genotóxico, indutor de estresse oxidativo celular e hepatocarcinogênico (MOSER *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2016).

Figura 9- Biotransformação do furano.



Fonte: Adaptado de Churchwell *et al.* (2015).

dA-BDA: ligação covalente entre o BDA e a base adenina (A) do DNA; dC-BDA: ligação covalente entre o BDA e a base citosina (C) do DNA; dG-BDA: ligação covalente entre o BDA e a base guanina (G) do DNA.

Não há legislação nacional e internacional que estabeleça a concentração máxima de furano em bebidas alcoólicas.

1.3.3.5.3 Estratégias na diminuição do furano em bebidas

Uma alternativa para reduzir os níveis de compostos tóxicos formados durante o processamento de alimentos é eliminar ou diminuir as concentrações de seus precursores. Na literatura, dados quantitativos de furano em bebidas alcoólicas são inexistentes, portanto não há informação disponível sobre métodos de mitigação deste composto.

1.3.3.6 Furfural

O furfural é um aldeído heterocíclico e aromático, conhecido também como 2-furfural, 2-furanocarboxialdeído, furaldeído, 2-furanaldeído, fural e furfuraldeído. Este composto é incolor, inflamável, apresenta odor de amêndoas e quando exposto ao oxigênio do ar sofre oxidação tornando-se castanho-avermelhado. Apresenta temperatura de fusão de -39 °C e pressão de vapor 13,5 mmHg a 55 °C, é solúvel em água, etanol, éter, acetona e clorofórmio (RIBEIRO *et al.*, 2012).

1.3.3.6.1 Mecanismos de formação do furfural em bebidas

O furfural pode ser considerado um indicador de deterioração de alimentos e bebidas, tais como suco de laranja, suco de uva, bebidas destiladas, vinho, leite, mel, cereais, cerveja e vinhos envelhecidos em barril de madeira. Esse aldeído cíclico é o principal produto da degradação de carboidratos em meio ácido, como as pentoses (xilose e arabinose) (EFSA, 2004).

Nas bebidas envelhecidas, os carboidratos provenientes do tratamento térmico (tostagem) da madeira dos barris não são fermentados pelas leveduras, e sofrem hidrólise ácida, produzindo furano e furfural (PEREIRA *et al.*, 2011). Além disso, o armazenamento do vinho em temperatura elevada durante o seu envelhecimento também favorece a formação do furfural (CÂMARA, ALVES, MARQUES, 2006). A presença desse composto no vinho pode ser proveniente das rolhas de cortiça devido ao tratamento térmico de autoclavagem que ocorre na produção das rolhas. Ele contribui para o aroma do vinho, com odores descritos como amêndoa doce, levemente tostado e caramelo (ROCHA, COIMBRA, DELGADILLO, 2004; DE AZEVÊDO *et al.*, 2007).

Na cachaça, o furfural pode ser formado em diferentes etapas do processamento, tais como a pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques ou mesmo durante o envelhecimento da bebida por meio da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), que podem estar presentes nos recipientes de madeira utilizados no armazenamento da bebida (ZACARONI *et al.*, 2011).

O processo de envelhecimento que ocorre durante o armazenamento da cerveja pode resultar na formação de aldeídos voláteis como o furfural. A

concentração deste composto depende de diferentes fatores, tais como o tipo de malte utilizado na fermentação ou as condições de armazenamento (MARTINS *et al.*, 2015; RICO-YUSTE *et al.*, 2016).

1.3.3.6.2 Aspectos toxicológicos e legislação

O furfural é rapidamente metabolizado no fígado de ratos após a administração oral. O metabolismo possui duas vias: a maior parte é oxidado e conjugado com glicina, formando furoilglicina; o restante é condensado com ácido acético e conjugado com glicina, originando ácido acrílico 2-furano. Estes dois metabólitos são excretados pela urina (ARTS *et al.*, 2004).

O furfural mostrou ser genotóxico em estudos *in vitro* realizados em culturas de células de ovário de hamster e linfócitos humanos ao induzir trocas de cromátides irmãs (EFSA, 2004). Estudos *in vivo* com ratos e camundongos forneceram evidências de que o furfural não é um agente genotóxico, mas mostrou ser hepatotóxico e carcinogênico ao induzir necrose e inflamação crônica do fígado e adenoma e carcinoma hepatocelulares, sendo estes efeitos devido a mecanismos não genotóxicos (LAKE *et al.*, 2001).

Apesar de a presença do furfural em cachaça ser monitorada pela Instrução Normativa nº 13 de 2005 do MAPA que estabelece o limite máximo de 5 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2005) e que também estabelece limites máximos para a presença de furfural em conhaque, graspa, aguardente de vinho e pisco, não há limites máximos estabelecidos para vinho (BRASIL, 2010), nem legislação internacional que estabeleça a concentração máxima de furfural em bebidas alcoólicas.

1.3.3.6.3 Estratégias na diminuição do furfural em bebidas

Uma alternativa que pode ser utilizada para reduzir os níveis tanto de furano quanto de furfural é o uso de lascas de madeira ao invés do uso dos barris de madeira durante o envelhecimento de bebidas alcoólicas. Teores mais elevados de aldeídos furânicos (furfural, 5-metilfurfural e 5-hidroximetilfurfural) foram encontrados nas aguardentes envelhecidas em barris de madeira, em comparação com aquelas que foram envelhecidas em tanques de inox na presença de fragmentos de madeira (CALDEIRA *et al.*, 2009).

A autoclavagem das rolhas de cortiça (130 °C durante 18-20min a pressão de 180kPa) leva à degradação da xilose, arabinose e celulose com formação de furano e aldeídos furânicos. Rolhas lavadas e secas após a autoclavagem possuem quantidade até 53% menor destes compostos do que as rolhas que não passaram por esses tratamentos (ROCHA, COIMBRA, DELGADILLO, 2004).

1.3.4 Métodos para extração e determinação dos compostos tóxicos produzidos durante a vinificação

Vários métodos de extração têm sido utilizados para extrair compostos tóxicos de vinho, incluindo a extração líquido-líquido (LLE, do inglês: *liquid-liquid extraction*), extração em fase sólida (SPE, do inglês: *solid-phase extraction*) e microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME, do inglês: *headspace solid phase micro extraction*). O uso da LLE apresenta algumas desvantagens por ser um procedimento trabalhoso, possuir alto custo, sensibilidade limitada e requerer o uso de grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos. Em contrapartida, a SPE necessita de menos solvente e é menos trabalhosa, entretanto, pode requerer uma etapa posterior de concentração da amostra, o que pode resultar na perda de analitos. A SPME combina a extração e a concentração dos analitos em uma única etapa, sendo que uma pequena quantidade da amostra é necessária, o que encurta o tempo necessário para a extração e reduz o custo. Esta técnica apresenta vantagens quando comparada com os processos convencionais (LLE e SPE), pois é rápida, fácil de usar e livre de solventes (VAS e VÉKEY, 2004; PERESTRELO *et al.*, 2010; WELDEGERGIS *et al.*, 2011; JELEN, MAJCHER, DZIADAS, 2012; JIAO, DONG, CHEN, 2014; XIAO *et al.*, 2015). Alguns estudos têm feito a injeção da amostra no equipamento de determinação sem etapa prévia de extração (LACHENMEIER *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014). Entretanto, este procedimento pode exigir uma etapa exaustiva de limpeza da coluna cromatográfica além de diminuir a sua vida útil (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

As técnicas utilizadas para a determinação de compostos tóxicos de vinho são cromatografia gasosa (GC, do inglês: *gas chromatography*) cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês: *high-performance liquid chromatography*), espectrofotometria UV e eletroforese capilar, sendo que a GC é a

mais utilizada em função das características voláteis dos compostos alvo desta pesquisa (Tabela 6).

Tabela 6- Compostos tóxicos quantificados em vinhos produzidos em vários locais do mundo com métodos de análise e com seus respectivos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), níveis de recuperação e níveis encontrados.

Composto	Método	Extração	LOD (µg/L) ^a	LOQ (µg/L) ^b	Recuperação (%)	Concentração (µg/L) ^c	Procedência das amostras	Referência
Carbamato de etila	GC-MS ^d	SPE ^r	0,6	1,9	104,4	5,2-29,4	Brasil	Nóbrega et al., 2015
	GCxGC-TOFMS ^L	HS-SPME ^p	seco: 4,31 doce: 2,75	seco: 14,38 doce: 9,16	seco: 88,6 doce: 99,4	seco: 4,59-367,2 doce: 8,89-547,2	Portugal	Perestrelo et al., 2010
	HPLC-FLD ^e	- ^u	4,8	16	tinto:99,5	tinto: 13,7	China	Zhang et al., 2014
Acetaldeído	mini-CE-ED ^t	- ^u	16	NI ^g	licor:101 ⁿ	tinto: 20700 ⁱ branco: 67500 ⁱ de arroz: 23400 ⁱ licor: 45600 ⁱ	China	Zhang et al., 2011
	GC-MS ^d	- ^u	NI ^g	NI ^g	NI ^g	fortificados: 12000-80000	Europa	Lachenmeier et al., 2008
	GC-MS ^d	- ^u	430	1280	NI ^g	de arroz:4990-11570 de fruta:1330-11730	Coréia do Sul	Chung et al., 2015
Formaldeído	mini-CE-ED ^t	- ^u	9,1	NI ^g	licor: 106 ^h	tinto: ND ^j branco: 4830 ⁱ de arroz: 7440 ⁱ	China	Zhang et al., 2011
	Espectrofotometria UV	destilação	NI ^g	NI ^g	NI ^g	0-1150 (média: 130)	Alemanha	Jendral et al., 2011
	GC-MS ^d	SPME ^q	NI ^g	NI ^g	68,37-128,22 ^k	tinto:40,9 ⁱ branco:18,38 ⁱ espumante:19,5 ⁱ	Coréia do Sul	Jeong et al., 2015
	GC-MS ^d	- ^u	5000	15000	NI ^g	ND ^j	Coréia do Sul	Chung et al., 2015
Acroleína	GC-MS ^d	HS-SPME ^p	14	40	NI ^g	0-8,8 (média: 0,7)	Alemanha	Kächele et al., 2014
	LC/MS ^m	SPE ^r	250 µg/kg	800 µg/kg	79 (10 mg/kg) 119 (50 mg/kg) 93	ND ^j	Alemanha	Hollosi et al., 2012

					(100 mg/kg)			
	GCxGC-TOFMS ^L	HS-SPME ^P	branco e tinto: 19600	branco e tinto: 59400	NI ⁹	ND ^I	África do Sul	Bauer et al., 2012
Furfural	HPLC-DAD ⁿ	- ^u	1220	3690	99	3820-22900	Portugal	Pereira et al., 2011
	HPLC-DAD ⁿ	- ^u	0,74	1,85	NI ⁹	800-8800	Portugal	Ho et al., 1999
	GC-MS ^d	LLE ^t	NI ⁹	NI ⁹	NI ⁹	200-24100	Portugal	Câmara et al., 2006
	UHPLC-PDA ^o	MEPS ^s	0,0045	0,0149	97 (300 µg/L); 87 (8 µg/L); 88 (15 µg/L)	fortificados: 670-3610	Portugal	Perestrelo et al., 2015

^a Limite de detecção; ^b limite de quantificação, ^c intervalo de concentração encontrado nas amostras; ^d Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; ^e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência; ^f electroforese capilar miniaturizada com detecção electroquímica; ^g não informado; ^h ensaio de recuperação não foi feito para o vinho, apenas para o licor; ⁱ apenas valores médios de concentração foram informados; ^j não detectado; ^k a matriz na qual foi feita o ensaio de recuperação não foi mencionada; ^L cromatografia gasosa bidimensional abrangente; ^m cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; ⁿ cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos; ^o cromatografia líquida de alta pressão; ^p microextração em fase sólida no modo *headspace*; ^q microextração em fase sólida; ^r extração em fase sólida; ^s microextração por sorvente empacotado; ^t extração líquido-líquido, a etapa de extração não foi realizada.

A cromatografia é uma ferramenta analítica que abrange um conjunto de métodos físico-químicos de separação que envolve o transporte dos componentes de uma mistura através de uma coluna cromatográfica. Esta coluna contém uma fase estacionária, que pode ser líquida ou sólida, capaz de interagir com os componentes da mistura. O transporte dos componentes através da coluna está a cargo da fase móvel, que pode ser gasosa ou líquida. O processo de passagem de um líquido ou de um gás por uma coluna cromatográfica é conhecido como eluição, enquanto o fluido que entra na coluna é o eluente, aquele que emerge ao final dela é o eluato. A ampla variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna esta técnica extremamente versátil e de grande aplicação. Se a fase móvel é um gás, a cromatografia é chamada gasosa, e se for um líquido, chama-se cromatografia líquida (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

O principal mecanismo de separação da GC está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase gasosa e a fase estacionária sólida. Uma corrente de gás passa de forma contínua pela coluna, e quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente nessa corrente de gás, ela é arrastada através da coluna. Desta forma as substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector, que geram um sinal para o sistema de registro e tratamento de dados (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A GC monodimensional é amplamente aplicada na análise de vinhos (LACHENMEIER et al., 2008; KÄCHELE et al., 2014; CHUNG et al., 2015; NÓBREGA et al., 2015). Mesmo com o grande poder de separação desta técnica, algumas amostras são muito complexas para que se possa atingir a separação de seus componentes em uma só fase estacionária (ZINI, 2009). Além disso, a análise profunda dos cromatogramas frequentemente indica que alguns picos são o resultado de dois ou mais compostos co-eluídos (TRANCHIDA et al., 2004). A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC, do inglês: *comprehensive two-dimensional gas chromatography*) surgiu como uma alternativa para analisar amostras complexas ou analisar analitos alvo em uma única análise (HERRERO et al., 2009).

A GC×GC é caracterizada pela combinação de duas colunas cromatográficas unidas por um modulador e que contem fases estacionárias diferentes. Inicialmente, a amostra é submetida à separação na primeira coluna. O efluente da primeira coluna ingressa no modulador, o qual concentra e libera as frações do efluente, enviando-as para a segunda coluna, sendo que a separação ocorre de forma independente da que ocorreu na primeira coluna (ZINI, 2009). Algumas das vantagens desta técnica são: aumento da capacidade de pico, o que implica na melhora da separação dos analitos entre si e dos mesmos em relação a outros compostos da matriz; melhora a resolução e aumenta a sensibilidade do método; procedimentos de preparação de amostras podem ser minimizados, ou mesmo eliminados em alguns casos, devido ao elevado poder de separação oferecido por esta técnica (ZINI, 2009; HERRERO, 2009).

Após a separação dos compostos da amostra através da coluna, esses chegam ao sistema de detecção. A escolha do detector adequado é extremamente importante para que atenda as necessidades da amostra e as seguintes características devem ser avaliadas, como: seletividade, sensibilidade, nível de ruído (os efeitos eletrônicos do sistema de detecção devem ser mínimos) e a possibilidade do sistema de detectar a mínima presença do composto, para obter uma análise suficientemente sensível. O detector mais comumente usado na análise de vinhos por GC é o detector de espectrometria de massas (MS, do inglês: *mass spectrometer*) (REBIÈRE *et al.*, 2010). O MS utiliza o movimento de íons em campos elétricos e magnéticos para separá-los de acordo com sua relação massa-carga. O princípio da espectrometria de massas por tempo de voo (TOFMS, do inglês: *time-of-flight mass spectrometry*) baseia-se no fato de que todos os íons são acelerados com a mesma energia. Suas velocidades são inversamente proporcionais às raízes quadradas de suas massas. Os íons mais leves de alta velocidade chegam ao detector antes do que os íons mais pesados de baixa velocidade (TRANCHIDA *et al.*, 2004; ZINI, 2009; HERRERO, 2009)

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Periódico: Food Chemistry

Efeito do grau de maturação e tempo de maceração das uvas nos níveis de compostos carbonílicos e furano formados durante a vinificação – desenvolvimento de um método para detecção simultânea destes compostos tóxicos e caracterização do risco da exposição

Título abreviado: Compostos tóxicos formados durante a vinificação

Laura Oliveira Lago^a, Karine Primieri Nicolli^b, Aline Biasoto Marques^c, Elina Caramão^d, Claudia Alcaraz Zini^b, Juliane Elisa Welke^{a,*}

^a Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Semiárido, BR 428, km 152, CEP: 56302-970, Petrolina, PE, Brazil

^d Universidade Tiradentes, Avenida Murilo Dantas 300, CEP: 49032-490, Aracaju, SE, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33 08 97 88; fax: +55 51 33 08 70 48.
E-mail address: juliane.welke@ufrgs.br (J.E.Welke)

Resumo: O efeito do grau de maturação e tempo de maceração das uvas nos níveis de compostos tóxicos formados durante a vinificação, bem como a caracterização do risco relacionado à exposição humana a estes compostos foram avaliados nesse estudo. O método baseado no uso da HS-SPME-GC×GC/TOFMS mostrou-se adequado para a quantificação simultânea de carbamato de etila, acroleína, acetaldeído, formaldeído, furano e furfural em vinhos. Vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em estágio de sobrematuração e 20 dias de maceração apresentaram os maiores níveis de compostos tóxicos. Os níveis desses compostos tóxicos encontrados em vinhos Syrah disponíveis comercialmente revelaram que a

exposição ao furano, acroleína e carbamato de etila representa risco para a saúde do consumidor. Os demais compostos (acetaldeído, formaldeído e furfural) foram detectados em níveis que não indicam risco.

Palavras-chave: GCxGC/TOFMS, Shiraz, Syrah, carbamato de etila, acroleína.

Compostos químicos: acetaldeído (PubChem [CID:177](#)); formaldeído (PubChem [CID:712](#)); acroleína (PubChem [CID:7847](#)); carbamato de etila (PubChem [CID:5641](#)); furano (PubChem [CID:8029](#)); furfural (PubChem CID:7362).

1. Introdução

O vinho apresenta propriedades benéficas oriundas do consumo moderado desta bebida. Estes efeitos são observados, principalmente, devido à presença dos compostos fenólicos e estilbenos (Shen *et al.*, 2015). Entretanto, dentre os compostos presentes em vinhos, encontram-se os seguintes compostos tóxicos: acetaldeído, formaldeído, carbamato de etila, furfural, acroleína e furano. A presença destes compostos em bebidas fermentadas é comum, uma vez que são formados durante o metabolismo normal dos micro-organismos ou através de reações que envolvem os compostos produzidos durante a fermentação (Kächele, Monakhova, Kuballa e Lachenmeier, 2014; Chung, Yoon, Han e Kim, 2015; Jeong, Chung, Song, Kim, Lee e Kim, 2015; Nóbrega *et al.*, 2015; Perestrelo, Silva e Câmara, 2015).

Os efeitos tóxicos da ingestão aguda destes compostos presentes nas bebidas alcoólicas estão relacionados com sintomas como náuseas, vômito, inquietação, suor, confusão, queda na pressão e dores de cabeça (Jackson, 2014). Ainda, o acetaldeído, por exemplo, desempenha um papel importante no desenvolvimento de carcinoma do trato aerodigestivo superior do qual fazem parte a cavidade oral, faringe, laringe e esôfago (Lachenmeier, Gumbel-Mako, Sohnius, Keck-Wilhelm, Kratz e Mildau, 2009). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a

acroleína causa estresse oxidativo, levando a disfunção da membrana plasmática e dano ao DNA e à mitocôndria, os quais contribuem para o desenvolvimento de câncer de pulmão, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (Moghe *et al.*, 2015). O carbamato de etila foi associado a edemas pulmonares, papilomas de pele, linfomas malignos e hepatomas em animais (EFSA, 2007). O formaldeído induz efeitos citotóxicos em células de mamíferos e está relacionado com o desenvolvimento de câncer de nasofaringe e leucemia em humanos (Costa *et al.* 2015). Estudos *in vivo* com ratos e camundongos fornecem evidências de que o furfural é hepatotóxico e carcinogênico ao induzir necrose e inflamação crônica do fígado e adenoma e carcinoma hepatocelulares (Lake *et al*, 2001). O furano é considerado citotóxico, indutor de estresse oxidativo celular e hepatocarcinogênico em animais (Dong *et al.*, 2016). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica o formaldeído e o acetaldeído associado ao consumo de bebidas alcoólicas como carcinogênicos para os seres humanos (Grupo 1), o carbamato de etila como provável carcinogênico (Grupo 2A), o furano como possível carcinogênico (Grupo 2B) e a acroleína e o furfural como não classificáveis como carcinogênicos (Grupo 3) (IARC, 2016).

O Comitê Conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA, do inglês: *Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives*) não estabelece parâmetros de ingestão segura para estes compostos. Apesar disso, o acetaldeído, formaldeído, carbamato de etila, furfural, acroleína e furano têm sido identificados como genotóxicos e carcinogênicos em vários estudos (Lake *et al.*, 2001; EFSA, 2007; Lachenmeier *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015; Moghe *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2016).

Os dados relativos à quantificação de compostos potencialmente tóxicos formados durante a elaboração de vinhos são escassos. Além disso, a avaliação do risco da exposição a estes compostos tóxicos através do consumo de vinho é relatada na literatura apenas para o acetaldeído quantificado em vinho comercializado na Itália (Paiano, Bianchi, Davoli, Negri, Fanelli e Fattore, 2014) e acetaldeído, carbamato de etila e formaldeído utilizando dados quantitativos previamente publicados em outros estudos (Lachenmeier, Przybylski e Rehm, 2012). Os trabalhos que têm sido desenvolvidos objetivam quantificar apenas um composto tóxico (Jendral, Monakhova e Lachenmeier, 2011; Kächele, Monakhova, Kuballa e Lachenmeier, 2014; Paiano *et al.*, 2014; Nóbrega *et al.*, 2015; Perestrelo, Silva e Câmara, 2015), sendo que nenhuma pesquisa realizada até o momento preocupou-se com o desenvolvimento de um único método para a determinação simultânea de vários compostos tóxicos formados durante a elaboração dos vinhos e/ou com a avaliação global do risco da exposição a estes compostos quantificados na mesma amostra.

A variedade de uva Syrah (*Vitis vinífera*) está entre as mais cultivadas mundialmente, com destaque para a Austrália, onde estima-se que 40% dos vinhos produzidos são desta variedade. Na Austrália e África do Sul utiliza-se a denominação Shiraz e na França e América esta variedade ficou conhecida como Syrah. Os vinhos produzidos com uvas desta variedade possuem aroma característico descrito como apimentado ou picante (Frank, 2008). No Brasil, a região do submédio do Vale do Rio São Francisco (latitude: 8-9°S, longitude: 40°O e latitude: 300-450m) destaca-se na produção de uvas Syrah, onde esta é a variedade de uva a mais cultivada.

O avanço do grau de amadurecimento da uva provoca alterações desejáveis, incluindo o aumento da extratabilidade da cor e dos níveis de compostos fenólicos e polissacarídeos. Por outro lado, o prolongamento do tempo de maceração ocasiona a diminuição da intensidade de cor do mosto e dos níveis de compostos fenólicos. Parâmetros sensoriais indesejáveis relacionados à sensação de adstringência e amargor são observados quando uvas usadas para a elaboração de vinho estão pouco maduras (colhidas cerca de 3 semanas após a *véraison* que é o momento em que a uva inicia a mudança de tonalidade de verde para vermelho/roxo) e o tempo de maceração é prolongado (de 1 para 4 semanas) (Gil *et al.*, 2012). Até o momento, nenhum estudo publicado na literatura avaliou o efeito do estágio de amadurecimento e tempo de maceração das uvas nos níveis de compostos tóxicos dos vinhos.

Os objetivos deste estudo foram: (i) validar um método para detecção e quantificação simultânea de seis compostos tóxicos (formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furano, furfural e acroleína) em vinhos através do uso da microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) acoplada à cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por espectrometria de massas por tempo de voo (GC×GC/TOFMS), (ii) verificar a influência do estágio de maturação e tempo de maceração das uvas Syrah utilizadas na vinificação, (iii) estimar a exposição a estes compostos tóxicos através do consumo de vinho e (iv) caracterizar o risco da exposição aos compostos tóxicos presentes nos vinhos através da determinação da margem de exposição (MOE).

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras, reagentes analíticos e suprimentos

Uvas Syrah colhidas em três diferentes estádios de maturação [T1: antes da maturação tecnológica ou industrial (20°Brix), T2: grau de maturação ideal (22°Brix), T3: sobrematuração (24°Brix)] e maceradas durante 3 diferentes períodos (C1: 10 dias, C2: 20 dias e C3: 30 dias) foram avaliadas em relação aos níveis de compostos carbonílicos e furano formados durante a vinificação. As vinificações foram conduzidas em triplicata com oito diferentes combinações entre os estádios de maturação e tempos de maceração originando os seguintes experimentos: T1_C1, T1_C2, T2_C1, T2_C2, T2_C3, T3_C1, T3_C2 e T3_C3. A escolha desses estádios de maturação ocorreu em função do grau alcoólico esperado do respectivo vinho produzido, uma vez que a Lei Nº 7.678 de 8 de novembro de 1988 da legislação brasileira estabelece que o teor alcoólico de vinhos esteja entre 8,6 e 14%. O teor alcoólico dos vinhos produzidos foi: 11% (T1_C1 e T2_C2) e 14% para os demais vinhos (T2_C1, T2_C2, T2_C3, T3_C1, T3_C2, T3_C3). As uvas foram cultivadas em 2013 na mesma área (latitude: 9°16'S; longitude: 40°52'O; altitude: 413,5 m), localizada no município de Casa Nova, Bahia, Brasil, sendo que 48 plantas foram destinadas para cada um dos oito experimentos. As plantas apresentavam 5 anos de plantio e foram irrigadas por gotejamento. Os vinhos produzidos a partir destes experimentos foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Semiárido localizada em Petrolina, Pernambuco.

Onze amostras de vinhos Syrah obtidos de diferentes safras (2010-2013) e disponíveis comercialmente foram avaliadas. Essas amostras foram doadas por vinícolas localizadas no Brasil (estados: Rio Grande do Sul, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais) e Chile (Detalhes sobre o ano e local de produção de cada amostra estão na Tabela S1 do Material Suplementar).

Uma solução modelo de vinho foi preparada com ácido tartárico (Synth, São Paulo, Brasil) e 10% de etanol (Nuclear, São Paulo, Brasil) em água MilliQ deionizada (sistema de purificação Millipore, Bedford, MA, EUA). O pH da solução foi ajustado a 3,5 com hidróxido de sódio (Nuclear, São Paulo, Brasil). Essa solução modelo de vinho foi utilizada na diluição das soluções padrão que foram empregadas na construção das curvas analíticas. Este procedimento possibilitou a construção das curvas analíticas em uma matriz semelhante à da amostra real de vinho, o que reduz os erros provenientes de efeitos de matriz.

Os compostos padrão de formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, acroleína, furano e furfural foram adquiridos da Fluka (Ronkonkoma, EUA) e soluções estoque individuais (1000 mg L^{-1}) de cada componente foram preparadas em etanol bidestilado. Os padrões internos utilizados foram octanal, 2-furfuriltiol e nonanoato de metila foram adquiridos da Sigma (St. Louis, EUA). Uma solução de cada padrão interno (1000 mg L^{-1}) foi preparada em etanol e a partir dessas soluções, um mix (10 mg L^{-1}) contendo os 3 padrões internos foi preparado e $10 \mu\text{L}$ desse mix foi adicionado a cada amostra antes da extração por HS-SPME. Os padrões internos foram escolhidos conforme a classe química de cada um dos compostos tóxicos avaliados neste trabalho e o padrão interno usado para a quantificação de cada um dos tóxicos está especificado na Tabela S2 do Material Suplementar.

A 2,2,2-trifluoroetilhidrazina [TFEH, Aldrich (Steinheim, Alemanha)] foi escolhida como agente derivatizante conforme sugerido por Kim e Shin (2011) em seu trabalho de determinação de aldeídos, incluindo acetaldeído e formaldeído, e cetonas em água. Uma solução aquosa de TFEH 62.000 ppm foi preparada e $100 \mu\text{L}$ foram adicionados em cada amostra. O cloreto de sódio de grau analítico (NaCl,

Nuclear, São Paulo, Brasil) foi adicionado nos frascos das amostras e solução padrão para aumentar a força iônica dos analitos e dessa maneira potencializar a extração dos compostos. O NaCl foi previamente seco em estufa a 100 °C por 1 h e armazenado em dessecador até o momento do uso.

A fibra utilizada para HS-SPME foi a divinilbenzenocarboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 2 cm (Supelco, Bellefonte, EUA). Antes da primeira utilização da fibra, esta foi condicionada a 270 °C por 1 hora de acordo com as orientações do fabricante. Frascos de vinte mililitros com tampas de rosca magnética selados com septos de silicone (Supelco, Bellefonte, EUA) foram usados na HS-SPME.

2.2. Extração dos compostos através da HS-SPME

A extração dos compostos via da HS-SPME foi feita através de amostrador automático CTC CombiPAL. As condições utilizadas para a extração foram 1 mL de amostra em frascos de headspace de 20 mL, 30% de NaCl (m/v), sem agitação da amostra, tempo e temperatura de extração de 45 min a 55 °C, respectivamente. Os compostos extraídos através da HS-SPME foram dessorvidos termicamente no injetor do GC×GC/TOFMS a 250 °C durante 5 min (Welke *et al.*, 2012). A etapa de derivatização com TFEH foi adicionada ao método desenvolvido em trabalho prévio por Welke *et al.*, 2012 para a determinação de compostos voláteis de vinho. A derivatização foi adotada a fim de melhorar a detecção de três compostos tóxicos que são altamente voláteis: acetaldeído (ponto de ebulição, PE: 20,2 °C), formaldeído (PE: -19,3 °C) e acroleína (PE: 53 °C). Essas características dificultam a determinação desses compostos, visto que é necessário torna-los mais estáveis para que sejam analisados através da cromatografia gasosa (GC, do inglês: *gas*

chromatography). As reações de derivatização foram mostrados na Figura S1 do Material Suplementar. O furano, carbamato de etila e furfural não reagem com o TFEH e não necessitam de derivatização para serem analisados por GC. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.3. Determinação dos compostos tóxicos através da GCxGC/TOFMS

O sistema GCxGC consiste em um cromatógrafo gasoso bidimensional Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) com um detector espectrométrico de massas Pegasus do tipo tempo de voo (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA). O sistema GCxGC (Agilent 6890N) contém um forno convencional, um forno para a coluna secundária e um modulador térmico com quatro jatos, sendo que os dois jatos quentes empregam nitrogênio gasoso aquecido pelo próprio bloco do modulador e os dois jatos frios usam gás nitrogênio, resfriado por nitrogênio líquido. Na primeira dimensão utilizou-se uma coluna polar (DB-WAX, 100% polietilenoglicol, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) e na segunda dimensão uma coluna medianamente polar (DB-17, 50% fenil e 50% polimetilsiloxano, 2,15m × 0,18 mm × 0,18 µm). Esse conjunto de colunas foi definido como o mais adequado para a análise de vinho em trabalho prévio (Welke, Manfroi, Zanús, Lazarotto & Zini, 2012). A temperatura inicial do forno foi de 40 °C durante 5 min, atingiu 200 °C a 3 °C/min e atingiu 250 °C durante 3 min a 20 °C/min. A temperatura da interface foi de 300 °C e o modo de injeção splitless. A temperatura do forno auxiliar foi mantida 35 °C acima do forno primário. Hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo constante de 1 mL min⁻¹. O período de modulação foi de 7 s e os parâmetros relacionados ao detector foram: temperatura da fonte de íons de 240 °C, voltagem do detector de

1513 V, faixa de varredura de massas de 45 a 450 m/z e taxa de aquisição de 100 espectros/s.

A identificação dos compostos foi feita através da comparação dos tempos de retenção e espectros de massas dos compostos desconhecidos com aqueles de compostos padrão. Além disso, os espectros de massas dos compostos foram comparados com os espectros disponíveis na biblioteca comercial de espectros de massas (Wiley). Co-injeções da solução de compostos padrão e amostra foram realizadas para confirmar a identificação dos compostos.

A quantificação dos analitos foi feita através do método da padronização externa. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, construídas através da área relativa de cada composto tóxico (área do íon quantificador do composto tóxico/área do íon quantificador do respectivo padrão interno) em função da concentração do respectivo composto. O íon quantificador de cada composto padrão está especificado na Tabela S2 do Material Suplementar.

O método aplicado para a quantificação dos compostos tóxicos foi validado utilizando-se os seguintes parâmetros: linearidade, recuperação, precisão, exatidão, limite de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) (ICH, 1996).

2.4. Determinação da ingestão diária estimada e caracterização do risco da exposição aos compostos tóxicos avaliados

A avaliação da exposição aos compostos tóxicos ingeridos através do vinho foi feita através do cálculo da ingestão diária estimada (IDE) segundo a equação 1.

$$IDE(\mu\text{g}/\text{kgpc}/\text{dia}) = \frac{\text{concentração do composto tóxico}(\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{consumo de vinho}(\text{mL}/\text{dia})}{\text{peso do indivíduo}(\text{kg})}$$

Equação 1

Esta abordagem foi aplicada para avaliar a exposição aos compostos tóxicos quando a recomendação de ingerir diariamente uma taça de vinho (150 mL) é

seguida. O valor da mediana correspondente à concentração de cada composto quantificado nos vinhos foi utilizado no cálculo. O peso corpóreo (p.c) médio de 60 kg foi utilizado para expressar os resultados em $\mu\text{g}/\text{kg p.c.}$

Os compostos avaliados nesse estudo possuem potencial carcinogênico, em função disso a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece que a caracterização do risco seja feita através do cálculo da margem de exposição (MOE). A MOE é calculada por meio da razão entre a dose que produz um efeito específico em estudos com animais (dose de referência, BMD do inglês: *benchmark dose*) e a ingestão diária estimada calculada através da equação 1. Em nosso estudo foi utilizada a BMDL10 (do inglês: *benchmark dose lower confidence limit* 10%, limite inferior do intervalo de confiança em que foi observado um aumento de 10% na incidência de um efeito tóxico específico em animais). Os valores de BMDL10 com o respectivo efeito tóxico descrito na literatura para cada composto avaliado nesse estudo e que foi usado no cálculo da MOE foram apresentados na Tabela 1. Um valor de MOE menor que 10.000 tem sido proposto como uma indicação de situação de risco preocupante sob a ótica de saúde pública (WHO, 2009). Neste estudo, os valores de BMDL10 usados para o cálculo da MOE estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de BMDL10 e respectivos efeitos tóxicos observados após exposição oral aos compostos formaldeído, acetaldeído, acroleína, furano, carbamato de etila e furfural.

Composto	BMDL10 (mg/kg peso corpóreo/dia)	Efeito tóxico	Referência
Formaldeído	28	Gastrite crônica em ratos	MONAKHOVA, JENDRAL e LACHENMEIER (2012)
Acetaldeído	56	Tumores em ratos (mamários, estomacais, intestinais, testiculares)	LACHENMEIER et al. (2009)
Acroleína	0,36	Hiperplasia epitelial escamosa em estomago de ratos	ATSDR (2007)
Furano	0,96	Adenomas e carcinomas hepatocelulares em ratas (oral)	WHO (2011)
Carbamato de etila	0,25	Neoplasia alveolar e bronquiolar em ratos machos e fêmeas	SCHLATTER et al. (2010)
Furfural	656	Carcinoma hepatocelular em ratas	LACHENMEIER e MONAKHOVA (2012)

3. Resultados e Discussão

A separação dos compostos tóxicos (formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furano, furfural e acroleína), bem como dos padrões internos (octanal, 2-furfuriltiol, nonanoato de metila) dos demais compostos da amostra no espaço bidimensional está apresentada na Figura 1. O uso da GCxGC/TOFMS foi importante para a correta identificação e quantificação de dois desses compostos tóxicos que co-eluíram na primeira dimensão cromatográfica (¹D) com outros compostos presentes nos vinhos Syrah. O acetaldeído (¹t_R:14,93 min e ²t_R: 2,14 s) foi separado do 4-metilpentanoato de etila (¹t_R:14,93 min e ²t_R: 4,8 s) e limoneno (¹t_R:14,93 min e ²t_R: 5,95 s) apenas na segunda dimensão cromatográfica (²D). O mesmo foi observado em relação à acroleína (¹t_R:14,82 min e ²t_R: 2,7 s) que foi separada do hexanoato de metila (¹t_R:14,82 min e ²t_R: 4,1 s) e 3-metil-1-butanol propanoato (¹t_R:14,82 min e ²t_R: 4,8 s) na ²D (Figura S4).

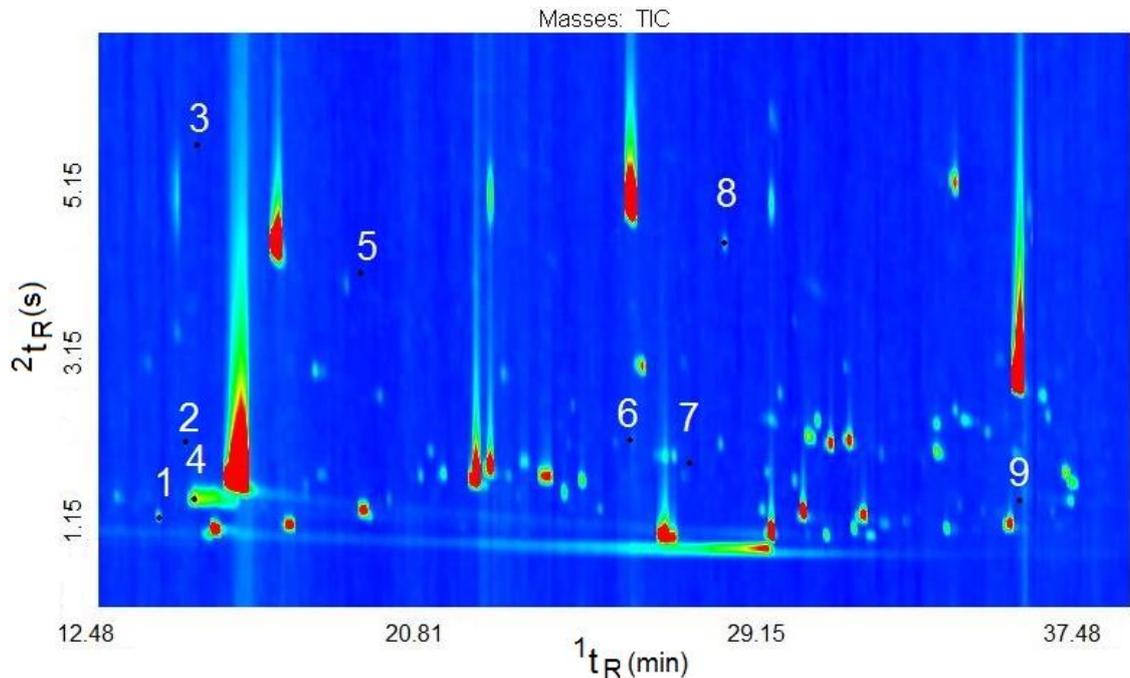


Figura 1. Diagrama de cores obtido através da cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC/TOFMS) demonstrando a separação dos compostos tóxicos, padrões internos (PI) e demais compostos voláteis da amostra na primeira (1t_R) e segunda (2t_R) dimensão do espaço bidimensional: [1] formaldeído, [2] acroleína, [3] furano, [4] acetaldeído, [5] octanal (PI), [6] furfuriltiol (PI), [7] furfural, [8] nonanoato de metila (PI) e [9] carbamato de etila. O espectro de massas de cada composto está apresentando nas **Figuras S2** e **S3**.

A performance do método usado para a quantificação dos seis compostos tóxicos está mostrada na Tabela 2. As curvas analíticas apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estudadas, o que pode ser observado através dos valores do coeficiente de determinação (r^2) que foram de 0,9898 a 0,9978. Os valores de LOD e LOQ demonstram que o método aplicado é suficientemente sensível para a quantificação dos compostos tóxicos em vinhos. Além disso, os valores de recuperação superiores a 90% e coeficientes de variação inferiores a 12,1% obtidos nos ensaios de exatidão e precisão revelam a eficiência do método.

Tabela 2. Figuras de mérito do método baseado no uso da HS-SPME-GC×GC/TOFMS para a determinação de compostos tóxicos encontrados em vinhos.

Composto	Linearidade (µg/L)	Equação de regressão	r^2 ^a	LOD ^b (µg L ⁻¹)	LOQ ^c (µg L ⁻¹)	Conc. (µg L ⁻¹) ^d	Rec. (%) ^e	Exat. (%) ^f	Prec. (%) ^g
Formaldeído	11 – 39	y=368,78x+1,562	0,9920	0,5	1,5	11	94	6,5	11,2
						22	95	7,7	10,3
						39	100	7,8	9,8
Acetaldeído	11 – 39	y=3135,7x-23,054	0,9898	3,0	9,0	11	103	6,0	12,0
						22	94	6,5	7,6
						39	96	8,0	7,8
Acroleína	10 – 35	y=18,443x-0,025	0,9939	1,0	3,0	10	90	11,1	12,1
						20	98	6,7	11,4
						35	99	7,9	9,2
Furano	45 – 270	y=14,731x-0,431	0,9732	5,2	15,5	45	95	13,1	9,9
						180	100	11,0	7,4
						270	96	8,1	8,7
Carbamato de etila	51 – 303	y=0,1053x+0,004	0,9978	0,3	0,9	51	97	9,0	12,3
						150	97	6,9	9,1
						303	99	11,1	8,5
Furfural	50 – 503	y=594,44x-22,758	0,9970	1,1	3,3	50	106	10,8	9,9
						201	98	8,7	10,1
						503	92	11,2	12,0

^a coeficiente de determinação; ^b limite de detecção; ^c limite de quantificação; ^d concentração correspondente ao ponto menor, intermediário e maior da curva analítica de cada composto tóxico usado para a determinação do percentual de recuperação, exatidão e precisão; ^e percentual de recuperação; ^f exatidão: coeficiente de variação de repetições feitas no mesmo dia; ^g precisão: Coeficiente de variação de repetições feitas em quatro dias diferentes.

Os menores níveis de todos os compostos tóxicos foram observados nos vinhos produzidos a partir de uvas do experimento T1C1 (uvas colhidas antes da maturação tecnológica ou industrial e maceradas durante 10 dias). Em contrapartida, os vinhos do experimento T3_C2 (sobrematuração e 20 dias de maceração) apresentaram os maiores níveis de todos os compostos tóxicos, com destaque para a quantidade elevada de acetaldeído que foi produzida nestas condições (Figura 2).

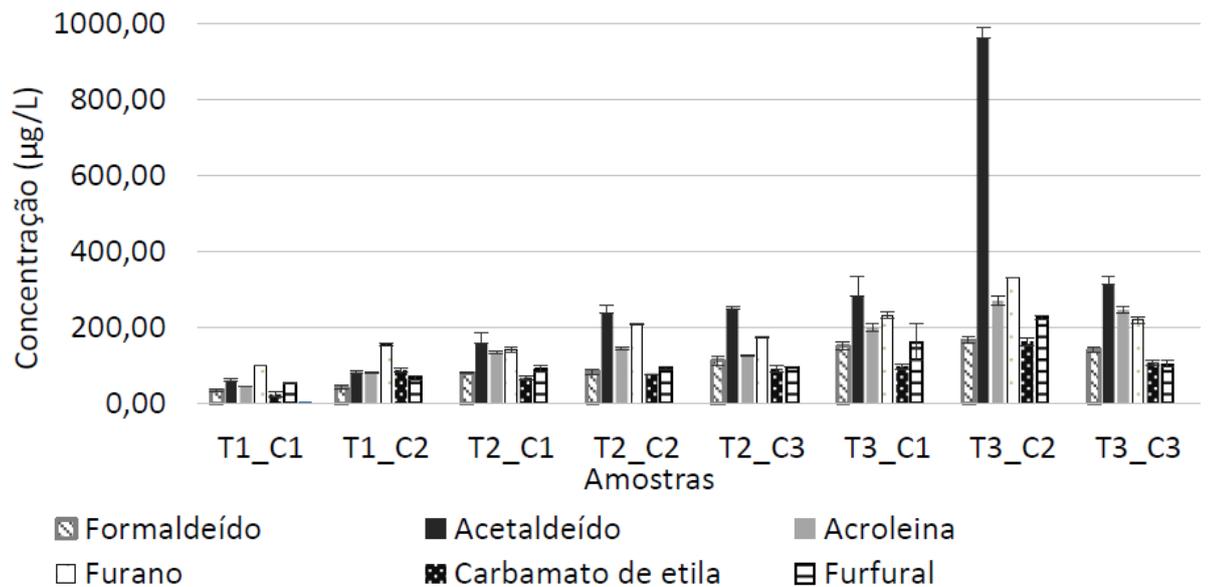


Figura 2. Concentração dos compostos tóxicos (formaldeído, acetaldeído, acroleína, furano, carbamato de etila e furfural) de vinhos elaborados com uvas Syrah colhidas em 3 estádios de maturação (T1: antes da maturação tecnológica ou industrial, T2: grau de maturação ideal, T3: sobrematuração) e 3 diferentes tempos de maceração (C1: 10 dias, C2: 20 dias e C3: 30 dias).

O avanço do grau de maturação e prolongamento do tempo de maceração parece resultar no aumento dos níveis de compostos tóxicos dos vinhos. O único experimento que não segue essa tendência é T3_C3, em função das reações de degradação dos compostos tóxicos que podem ter ocorrido nos vinhos desse experimento T3_C3, por conta da combinação de uvas sobrematuradas e tempo de maceração demasiado (30 dias). A maturação da uva resulta no incremento da concentração de compostos que podem ser precursores de compostos tóxicos incluindo aminoácidos, glicose e compostos fenólicos, entre outros. Da mesma maneira, a maceração que é a etapa em que ocorre a extração dos compostos contidos na parte sólida da uva (casca, polpa e semente), fornece ao vinho precursores de compostos tóxicos, como por exemplo, pentoses, glicerol e produtos da hidrólise da pectina (Lamikanra & Kassa, 1999; Gil et al., 2012). A arginina e a alanina são os aminoácidos precursores da formação do carbamato de etila e acetaldeído, respectivamente (Araque, Gil, Carreté, Constantí, Bordons, & Reguant,

2016). O acetaldeído também pode ser formado a partir da oxidação de compostos fenólicos. A acroleína, o furano e o furfural são formados a partir do glicerol, glicose e pentoses, respectivamente. O formaldeído origina-se a partir de produtos da hidrólise da pectina (Jackson, 2014).

A Tabela 3 mostra as concentrações dos compostos tóxicos nas amostras de vinhos Syrah disponíveis comercialmente. O formaldeído ($23,4 - 205,9 \mu\text{g L}^{-1}$), o acetaldeído ($51,5 - 634,9 \mu\text{g L}^{-1}$), a acroleína ($8,4 - 410,4 \mu\text{g L}^{-1}$), o furano ($55,8 - 295,2 \mu\text{g L}^{-1}$) e o furfural ($83,9 - 1715,3 \mu\text{g L}^{-1}$) foram encontrados em todas as amostras avaliadas. O carbamato de etila não foi encontrado (concentração inferior ao LOD do método $< 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$) em apenas duas amostras avaliadas. Alguns compostos foram encontrados em elevados níveis, como por exemplo, o furfural e acetaldeído cujos níveis chegaram a $1715,3$ e $634,9 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

O perfil químico do vinho varia de acordo com as características da uva, localização geográfica do vinhedo, que está relacionada com as características do solo e clima, sistemas de cultivo e adubação (Lima, Leite, Sampaio, Vianello e Lima, 2015), cepa da levedura, procedimentos da vinificação, incluindo a maceração da uva (Esti e Tamborra, 2006) e envelhecimento (Fernández de Simón, Martínez, Sanz, Cadahía, Esteruelas e Muñoz, 2014; Pizarro, Rodríguez-Tecedor, Esteban-Díez, Pérez-del-Notario e González-Sáiz, 2014), entre outros fatores (Jackson, 2014). Esses fatores explicam as diferenças entre as concentrações dos compostos tóxicos nas amostras avaliadas, assim como em comparação com os dados da literatura. Elevada variabilidade entre os níveis de acetaldeído ($18100-477000 \mu\text{g L}^{-1}$), formaldeído ($130 - 1150 \mu\text{g L}^{-1}$) e furfural ($670 - 3610 \mu\text{g L}^{-1}$) também foi observada em vinhos comercializados na Itália (Paiano et al., 2014), Alemanha (Jendral, Monakhova e Lachenmeier, 2011) e Portugal (Perestrelo, Silva, Câmara,

2015), respectivamente. Esses autores encontraram amostras com níveis de acetaldeído, formaldeído e furfural superiores aos que foram detectados nos vinhos avaliados no presente estudo (Tabela 3). Em relação ao carbamato de etila, o presente estudo encontrou amostras com níveis maiores ($<0,3 - 242,3 \mu\text{g L}^{-1}$) deste éster do que foi reportado por Nóbrega et al. (2015) ($5,2 - 29,4 \mu\text{g L}^{-1}$) para vinhos comercializados no Brasil. Da mesma forma, os níveis de acroleína ($8,4 - 410,4 \mu\text{g L}^{-1}$) foram maiores em nossa avaliação do que aqueles ($0,7$ e $8,8 \mu\text{g L}^{-1}$) mencionados por Kächele, Monakhova, Kuballa e Lachenmeier (2014) que analisaram vinhos da Alemanha. Nenhuma comparação pôde ser feita em relação aos níveis de furano, pois este é o primeiro estudo que detectou este composto tóxico em vinho.

Tabela 3. Quantificação dos compostos tóxicos [formaldeído, acetaldeído, acroleína, furano, carbamato de etila (CE) e furfural] em vinhos Syrah disponíveis comercialmente.

Nº ^a	Formaldeído	Acetaldeído	Acroleína	Furano	CE	Furfural
Concentração ($\mu\text{g/L}$) \pm CV ^b (%)						
1	205,9 \pm 5,6	501,3 \pm 13,0	148,8 \pm 5,4	82,0 \pm 12,5	17,5 \pm 9,1	123,3 \pm 8,4
2	118,9 \pm 12,1	634,9 \pm 5,8	410,4 \pm 9,4	295,2 \pm 9,3	200,5 \pm 10,5	211,5 \pm 6,5
3	40,3 \pm 0,2	252,2 \pm 6,2	32,3 \pm 10,5	263,2 \pm 7,5	143,8 \pm 11,0	1715,3 \pm 6,2
4	67,2 \pm 10,0	226,5 \pm 8,4	23,9 \pm 11,8	145,2 \pm 4,1	242,3 \pm 12,2	208,5 \pm 10,0
5	55,6 \pm 12,3	67,4 \pm 1,27	42,9 \pm 4,9	256,3 \pm 10,3	77,2 \pm 8,1	315,6 \pm 6,0
6	38,1 \pm 3,4	111,7 \pm 4,2	30,2 \pm 11,7	242,8 \pm 12,8	61,7 \pm 15,2	366,5 \pm 5,6
7	48,9 \pm 2,3	131,3 \pm 9,6	29,4 \pm 5,6	198,6 \pm 1,7	ND ^c	414,4 \pm 0,7
8	23,4 \pm 12,5	103,9 \pm 4,8	22,6 \pm 11,4	71,1 \pm 8,8	68,9 \pm 8,7	149,2 \pm 11,5
9	23,5 \pm 9,9	73,9 \pm 7,1	8,4 \pm 8,1	82,6 \pm 5,6	ND ^c	203,9 \pm 8,3
10	33,2 \pm 5,7	51,5 \pm 9,5	18,0 \pm 1,0	64,1 \pm 10,9	51,7 \pm 5,9	243,4 \pm 8,9
11	47,0 \pm 10,0	192,3 \pm 1,1	30,1 \pm 1,0	55,8 \pm 11,3	40,0 \pm 6,9	83,9 \pm 10,2
Ma^d	63,8	213,4	72,4	159,7	100,4	183,9
M^e	47,0	131,3	30,1	145,2	68,9	211,5

^a Número da amostra conforme especificado na Tabela S1 do Material Suplementar; ^b Coeficiente de variação; ^c Não detectado (concentração inferior ao LOD do método $< 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para o carbamato de etila); ^d Média aritmética; ^e Mediana.

No Brasil não há legislação que estabeleça a concentração máxima dos compostos alvo desta pesquisa em vinhos. Em relação ao carbamato de etila e acroleína, há limites estabelecidos para estes compostos apenas para a cachaça (BRASIL, 2005); para o acetaldeído e furfural, há limites para a cachaça, conhaque, grappa, aguardente de vinho e pisco (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010). A existência de limites para esses compostos em vinhos poderia refletir em segurança para os consumidores e a exigir a produção de vinhos em conformidade com a legislação para esses compostos.

Os valores da MOE calculados para os compostos estudados estão representados na Tabela 4. A exposição ao furano e carbamato de etila através do consumo dos vinhos analisados representa risco para a saúde dos consumidores, pois os valores de MOE para estes compostos foram mais baixos do que 10.000 para todas as amostras em que estes compostos foram detectados. Resultado semelhante foi observado por Lachenmeier, Przybylski e Rehm (2012) que fizeram caracterização do risco da exposição ao carbamato de etila presente em vinho e encontraram amostras com valores de MOE (176, 704 e 6338) que indicam risco para o consumidor. A caracterização do risco da exposição ao furano através do consumo de vinho está sendo feita pela primeira vez na literatura.

Tabela 4. Valores da margem de exposição (MOE) calculados para os compostos tóxicos: formaldeído, acetaldeído, acroleína, furano, carbamato de etila (CE) e furfural. As amostras que representam risco para a saúde do consumidor estão destacadas de vermelho.

N ^o ^a	Formaldeído	Acetaldeído	Acroleína	Furano	CE	Furfural
BMDL10^b	28 ^c	56 ^d	0,36 ^e	0,96 ^f	0,25 ^g	656 ^h
Margem de exposição (MOE)						
1	54.393	44.681	967	4.682	5.728	2.128.182
2	94.193	35.279	350	1.300	498	1.240.455
3	277.948	88.800	4.457	1.459	695	152.976
4	166.613	98.883	6.023	2.644	412	1.258.768
5	201.551	332.217	3.359	1.498	1.295	831.433
6	293.994	200.603	4.774	1.581	1.620	715.907
7	229.615	170.616	4.901	1.933	i	633.177
8	478.582	215.583	6.373	5.401	1.451	1.758.631
9	475.797	303.274	17.087	4.650	i	1.287.156
10	337.611	435.059	7.989	5.992	1.935	1.078.242
11	238.275	116.476	4.784	6.875	2.500	3.128.473

^a Número da amostra conforme especificado na Tabela S1 do Material Suplementar; ^b Valor de BMDL10 conforme especificado na Tabela 2; ^c LACHENMEIER et al. (2012); ^d LACHENMEIER et al. (2009); ^e ATSDR (2007); ^f WHO (2011); ^g SCHLATTER et al. (2010); ^h LACHENMEIER e MONAKHOVA (2012); ⁱ carbamato de etila não foi encontrado nestas amostras (concentração inferior ao LOD do método < 0,3 µg L⁻¹ para o carbamato de etila)

Em relação à acroleína, observou-se que a exposição à este tóxico não representa risco para a saúde em apenas uma amostra. Apesar do acetaldeído e furfural terem sido encontrados em níveis elevados em algumas amostras, estes compostos, segundo o cálculo da MOE não representam risco para a saúde do consumidor. Porém, deve-se levar em conta que, além de o acetaldeído estar naturalmente presente em bebidas e alimentos (Uebelacker e Lachenmeier, 2011), ele também é formado no corpo humano após a ingestão de bebidas alcoólicas pelo metabolismo hepático do etanol (Lachenmeier, Kanteres e Rehm, 2009). A estimativa da contribuição da exposição humana ao acetaldeído formado

endogenamente após o consumo de vinho não foi feita neste estudo. Deve-se considerar também que o risco de câncer pode ser maior para os indivíduos deficientes na enzima aldeído desidrogenase (ALDH) que possuem níveis mais elevados de acetaldeído no sangue e na saliva após o consumo de bebidas alcoólicas (Yokoyama, Eri Tsutsumi, Imazeki, Suwa, Nakamura, Mizukami e Yokoyama, 2008) e níveis mais elevados de adutos de DNA relacionados com acetaldeído em seus linfócitos (Matsuda, Yabushita, Kanaly, Shibutani e Yokoyama, 2006). Lewis e Smith (2005) mostraram que mutações no gene da ALDH2, enzima responsável pela oxidação do acetaldeído durante o metabolismo do álcool, contribui significativamente para o desenvolvimento de câncer de esôfago, devido ao consumo de álcool.

Semelhante ao que foi observado para o acetaldeído, a exposição ao formaldeído através do consumo dos vinhos analisados também não representou risco para a saúde. Lachenmeier, Przybylski e Rehm (2012) encontraram amostras de vinho com níveis de acetaldeído que representam risco para a saúde.

4. Conclusões

A HS-SPME-GC×GC/TOFMS mostrou ser adequada para a detecção e quantificação simultânea de formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furano, furfural e acroleína nas amostras de vinho Syrah. Estes compostos tóxicos foram quantificados em uma única análise, o que reduz o tempo de análise. A coeluição tanto do acetaldeído quanto da acroleína com outros compostos do vinho indica as dificuldades que poderiam surgir se apenas a cromatografia gasosa monodimensional fosse empregada para a determinação desses compostos,

possivelmente resultaria em separação cromatográfica insuficiente e consequentemente, incorreta identificação e quantificação.

O avanço do grau de maturação e prolongamento do tempo de maceração das uvas são pontos críticos relacionados à formação de compostos tóxicos. Essas etapas estão relacionadas ao aumento da concentração de compostos no mosto/vinho que podem atuar como precursores da formação dos tóxicos. A cinética de formação desses compostos durante a vinificação será estudada em trabalho futuro. Uma avaliação abrangente será obtida a partir dos resultados desse estudo e da elucidação dos mecanismos de formação desses compostos durante a vinificação. Especial atenção deve ser dada à formação de compostos com probabilidade de causar danos à saúde do consumidor, especialmente acroleína, carbamato de etila e furano, cujo cálculo da margem de exposição indicou que a exposição a estes compostos representa risco.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Fundação Nacional de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Programa Pesquisador Gaúcho: 1995-2551/13-7) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

Referências

Araque, I., Gil, J., Carreté, R., Constantí, M., Bordons, A., Reguant, C. (2016). Arginine deiminase pathway genes and arginine degradation variability in *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiologica*, 61(2), 109-118.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for acrolein. *U.S. Department of Health and Human Services*, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Instrução normativa Nº 13 de 29 de junho de 2005.

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

Chung, H., Yoon, M.K., Han, J., Kim, YS. (2015). Evaluation of volatile organic compounds in alcoholic beverages consumed in Korea. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(3), 423-432.

Costa, S., Carvalho, S., Costa, C., Coelho, P., Silva, S., Santos, L.S., Gaspar, J.F., Porto, B., Laffon, B., Teixeira, J.P. (2015). Increased levels of chromosomal aberrations and DNA damage in a group of workers exposed to formaldehyde. *Mutagenesis*, 30(4), 463-473.

Dong, H., Gill, S., Curran, I.H., Williams, A., Kuo, B., Wade, M.G., Yauk, C.L. (2016). Toxicogenomic assessment of liver responses following sub chronic exposure to furan in Fischer 344 rats. *Archives of Toxicology*, 90(6), 1351-1367.

Esti, M., Tamborra, P. (2006). Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 173-179.

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

Fernández de Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M. (2014). Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*, 147, 346-356.

Frank, J. *Wine at Your Fingertips*. Alpha: New York, 2008.

Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., Zamora, F. (2012). Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of cabernet sauvignon and tempranillo wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7988-8001.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the *IARC Monographs*, Volumes 1–115. URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List_of_Classifications_Vol1-115.pdf>. Acesso em 01/05/2016.

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

Jendral, J.A., Monakhova, Y.B., Lachenmeier, D.W. (2011). Formaldehyde in Alcoholic Beverages: Large Chemical Survey Using Purpald Screening Followed by Chromotropic Acid Spectrophotometry with Multivariate Curve Resolution. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011.

Jeong, H.S., Chung, H., Song, S.H., Kim, C., Lee, J.G., Kim, Y.S. (2015). Validation and Determination of the Contents of Acetaldehyde and Formaldehyde in Foods. *Toxicological Research*, 31(3), 273-278.

Kächele, M., Monakhova, Y.B., Kuballa, T., Lachenmeier, D.W. (2014). 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*, 820, 112-118.

Kim, H.J., Shin, H.S. (2011). Simple and automatic determination of aldehydes and acetone in water by headspace solid-phase micro extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 34(6), 693-699.

Lachenmeier, D.W., Kanteres, F., Rehm, J. (2009). Carcinogenicity of acetaldehyde in alcoholic beverages: risk assessment outside ethanol metabolism. *Addiction*, 104(4), 533-550.

Lachenmeier, D.W., Gumbel-Mako, S., Sohnius, E.M., Keck-Wilhelm, A., Kratz, E., Mildau, G. (2009). Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: A risk factor for oral cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 125, 730-735.

Lachenmeier, D.W., Przybylski, M.C., Rehm, J. (2012). Comparative risk assessment of carcinogens in alcoholic beverages using the margin of exposure approach. *International Journal of Cancer*, 131(6), 995-1003.

Lake, B.G., Edwards, A.J., Price, R.J., Phillips, B.J., Renwick, A.B., Beamand, J.A., Adams, T.B. (2001). 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*, 39(10), 999-1011.

Lamikanra, O., Kassa, A. K. (1999). Changes in the Free Amino Acid Composition with Maturity of the Noble Cultivar of *Vitis rotundifolia* Michx. Grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4837-4841.

Lewis, S.J., Smith, G.D. (2005). Alcohol, ALDH2, and Esophageal Cancer: A Meta-analysis Which Illustrates the Potentials and Limitations of a Mendelian Randomization Approach. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(8), 1967-1971.

Lima, M.S., Leite, A.P.S, Sampaio, Y.C., Vianello, F., Lima, G.P.P. (2015). Influences of the Harvest Season on Analytical Characteristics of Syrah Grapes and Wines

Produced in the Northeast Region of Brazil. *International Journal of Agriculture and Forestry*, 5(2), 151-159.

Matsuda, T., Yabushita, H., Kanaly, R.A., Shibutani, S., Yokoyama, A. (2006). Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chemical Research in Toxicology*, 19(10), 1374-1378.

Mogue, A., Ghare, S., Lamoreau, B., Mohammad, M., Barve, S., McClain, C., Joshi-Barve, S. (2015). Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease. *Toxicological Sciences*, 143(2), 242-255.

Monakhova, Y.B., Jendral, J.A., Lachenmeier, D.W. (2012). The margin of exposure to formaldehyde in alcoholic beverages. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 63(2), 227-237.

Nóbrega, I.C.C., Pereira, G.E., Silva, M., Pereira, E.V.S., Medeiros, M.M., Telles, D.L., Albuquerque Jr., E.C., Oliveira, J.B., Lachenmeier, D.W. (2015). Improved sample preparation for GC–MS–SIM analysis of ethyl carbamate in wine. *Food Chemistry*, 177, 23-28.

Paiano, V., Bianchi, G., Davoli, E., Negri, E., Fanelli, R., Fattore, E. (2014). Risk assessment for the Italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages. *Food Chemistry*, 154, 26-31.

Perestrelo, R., Silva, C.L.; Câmara, J.S. (2015). 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*, 1381, 54-63.

Pizarro, C., Rodríguez-Tecedor, S., Esteban-Díez, I., Pérez-del-Notario, N., González-Sáiz, J.M. (2014). Experimental design approach to evaluate the impact of oak chips and micro-oxygenation on the volatile profile of red wines. *Food Chemistry*, 148, 357-366.

Schlatter, J., DiNovi, M., Setzer, R. W. (2010). Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic Example: Ethyl carbamate. *Food and Chemical Toxicology*, 48, S63–S68.

Shen, J., Wilmot, K.A., Ghasemzadeh, N., Molloy, D.L., Burkman, G., Mekonnen, G., Gongora, M.C., Quyyumi, A.A., Sperling, L.S. (2015). Mediterranean Dietary Patterns and Cardiovascular Health. *Annual Review of Nutrition*. 35, 425-449.

Uebelacher, M., Lachenmeier, D. W. (2011). Quantitative determination of acetaldehyde in foods using automated digestion with simulated gastric fluid followed by headspace gas chromatography. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, v. 2011.

Welke, J. E., Zanus, M., Lazarotto, M., Schmitt, K.G., Zini, C. A. (2012). Volatile characterization by multivariate optimization of headspace-solid phase

microextraction and sensorial evaluation of Chardonnay base wines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(4), 678-687.

Welke, J. E., Manfroi, V., Zanús, M., Lazarotto, M., Zini, C. A. (2012). 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*, 1226, 124-139.

WHO. (2011). Food Additives Series 63. Safety evaluation of certain contaminants in food. Prepared by the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, Switzerland: WHO and FAO, 487–603.

WHO. (2009). Environmental Health Criteria 239: Principles for modelling dose–response for the risk assessment of chemicals. World Health Organization, Geneva. URL:<
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43940/1/9789241572392_eng.pdf>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

Yokoyama, A., Eri Tsutsumi, E., Imazeki, H., Suwa, Y., Nakamura, C., Mizukami, T., Yokoyama, T. (2008). Salivary Acetaldehyde Concentration According to Alcoholic Beverage Consumed and Aldehyde Dehydrogenase-2 Genotype. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(9), 1607-1614.

Material Suplementar

Tabela S1. Local de produção das onze amostras de vinho Syrah disponíveis comercialmente avaliadas em relação à presença dos compostos tóxicos (formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furano, furfural e acroleína).

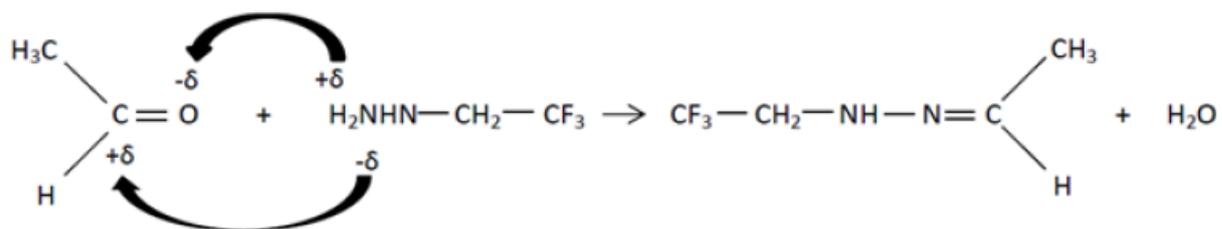
Nº	Ano ^a	Local de produção
1	2011	Vale do São Francisco, Casa Nova – BA, Brasil
2	2012	Vale do São Francisco, Lagoa Grande – PE, Brasil
3	2010	Região do Maule (VII), Villa Alegre, Chile
4	2013	Vale do São Francisco, Casa Nova – BA, Brasil
5	2010	Vale dos Vinhedos, Bento Gonçalves – RS, Brasil
6	2011	Vale dos Vinhedos, Bento Gonçalves – RS, Brasil
7	2012	Vale dos Vinhedos, Bento Gonçalves – RS, Brasil
8	2011	Valle de Casablanca, Casablanca, Chile
9	2012	Campanha Gaúcha, Itaqui – RS, Brasil
10	2012	Serra da Mantiqueira, Andradas – MG, Brasil
11	2011	Vale do São Francisco, Casa Nova – BA, Brasil

^a ano de produção

Tabela S2. Tempo de retenção na primeira (1t_R) e segunda dimensão (2t_R) da cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por espectrometria de massas por tempo de voo (GCxGC/TOFMS) dos padrões internos utilizados na quantificação dos compostos tóxicos presentes no vinho com os respectivos íons qualificadores e quantificadores usados na identificação e quantificação, respectivamente, destes compostos:

Padrão interno	1t_R (min); 2t_R (s)	Íons qualificadores^a	Composto tóxico	1t_R (min); 2t_R (s)	Íons qualificadores^a
Octanal			Formaldeído	14,00; 1,98	57 , 126
Octanal	19,46; 4,24	56 , 84	Acetaldeído	14,93; 2,14	71 , 140
Octanal			Acroleína	14,82; 2,70	55, 83 , 152
2-Furfuriltiol	26,01; 2,79	81 , 114	Furano		68
2-Furfuriltiol			Furfural	27,3; 2,38	96 , 95
Nonanoato de metila	28,35; 4,75	74 , 87	Carbamato de etila	36,05; 1,93	62 , 74, 89

^a íon quantificador está em negrito

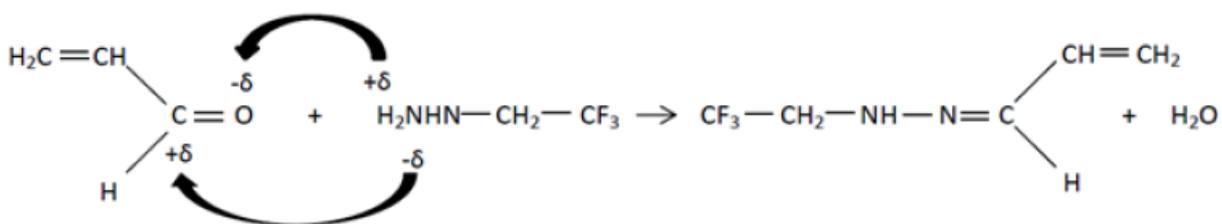


acetaldeído

TFEH

acetaldeído derivativado

A

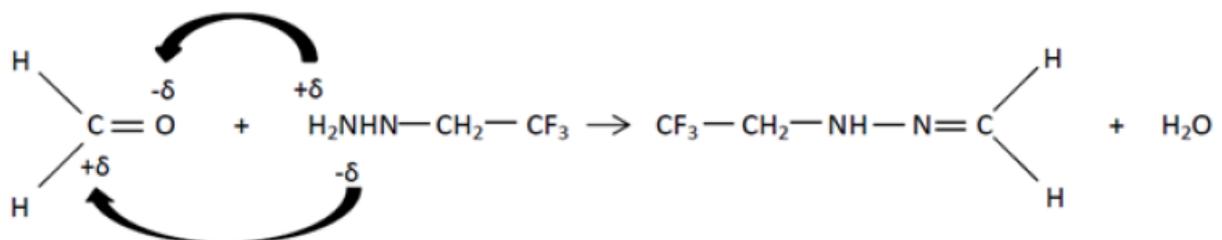


acroleína

TFEH

acroleína derivativada

B



formaldeído

TFEH

formaldeído derivativado

C

Figura S1. Reação de derivatização que ocorre entre a carbonila (C=O) do acetaldeído (A), acroleína (B) e formaldeído (C) e agente derivatizante a 2,2,2-trifluoroetilhidrazina (TFEH) formando uma hidrazona (N-N=C).

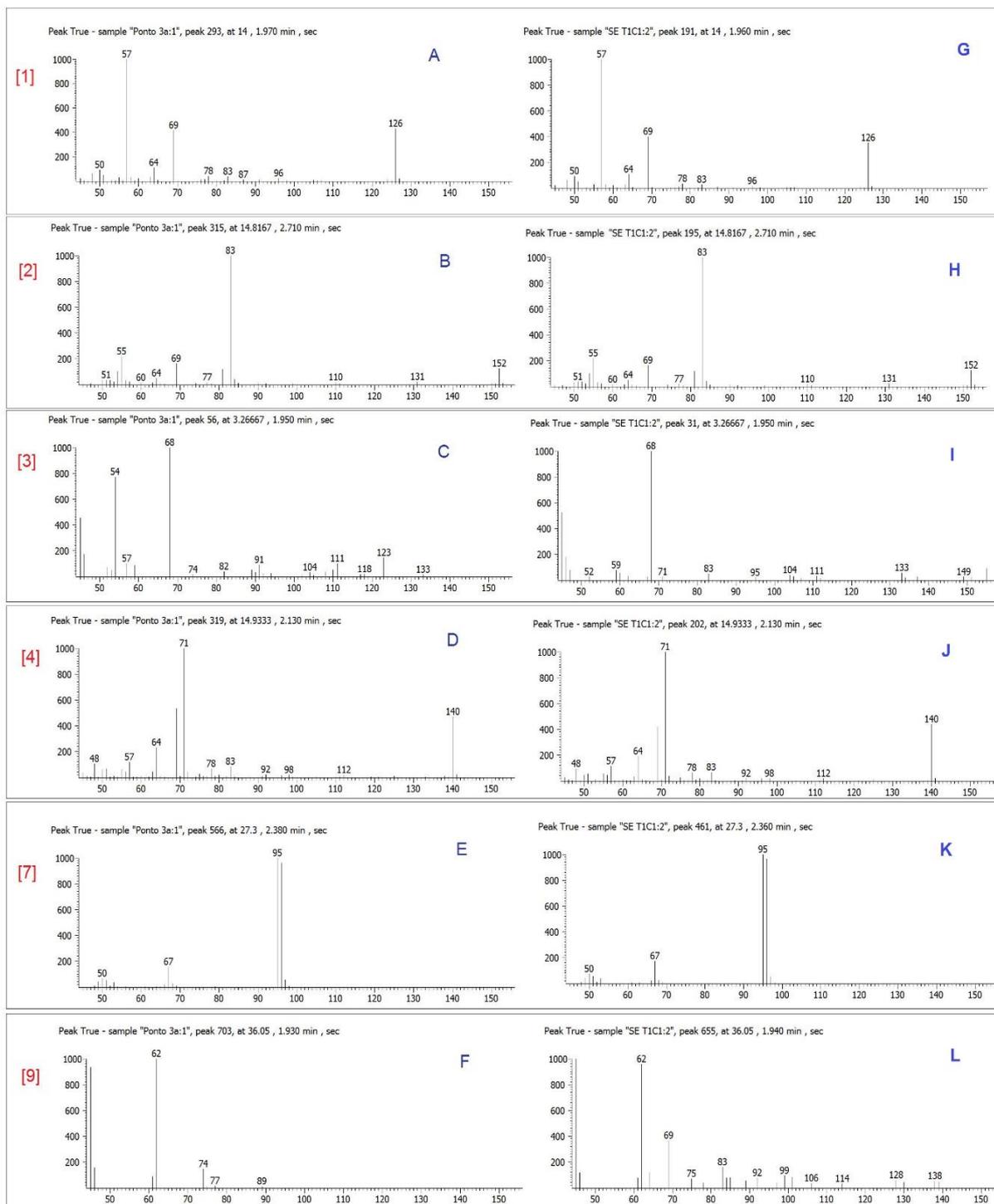


Figura S2. Comparação entre os espectros de massas dos compostos tóxicos padrão (A, B, C, D, E e F) e dos compostos detectados nas amostras (G, H, I, J, K e L): [1] formaldeído, [2] acroleína, [3] furano, [4] acetaldeído, [7] fural e [9] carbamato de etila.

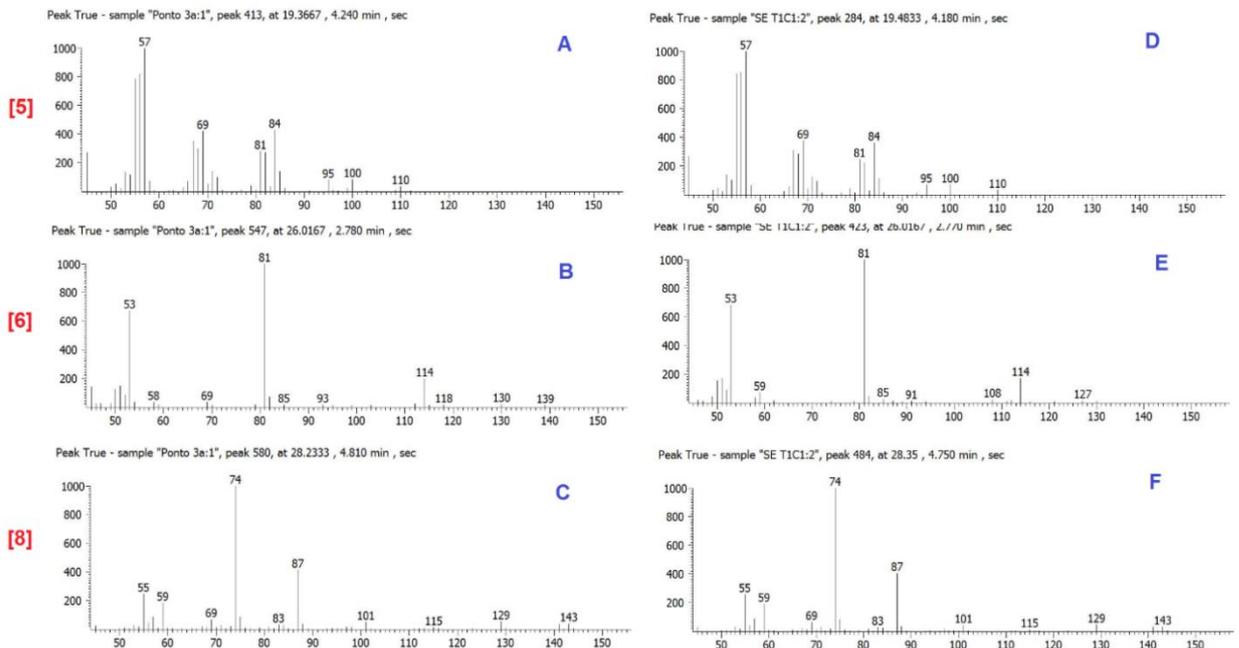


Figura S3. Comparação entre os espectros de massas dos padrões internos [5] octanal, [6] furfúritol e [8] nonanoato de metila usados na quantificação dos compostos tóxicos analisados na forma de solução de compostos padrão (A, B e C) e quando adicionados às amostras (D, E e F).

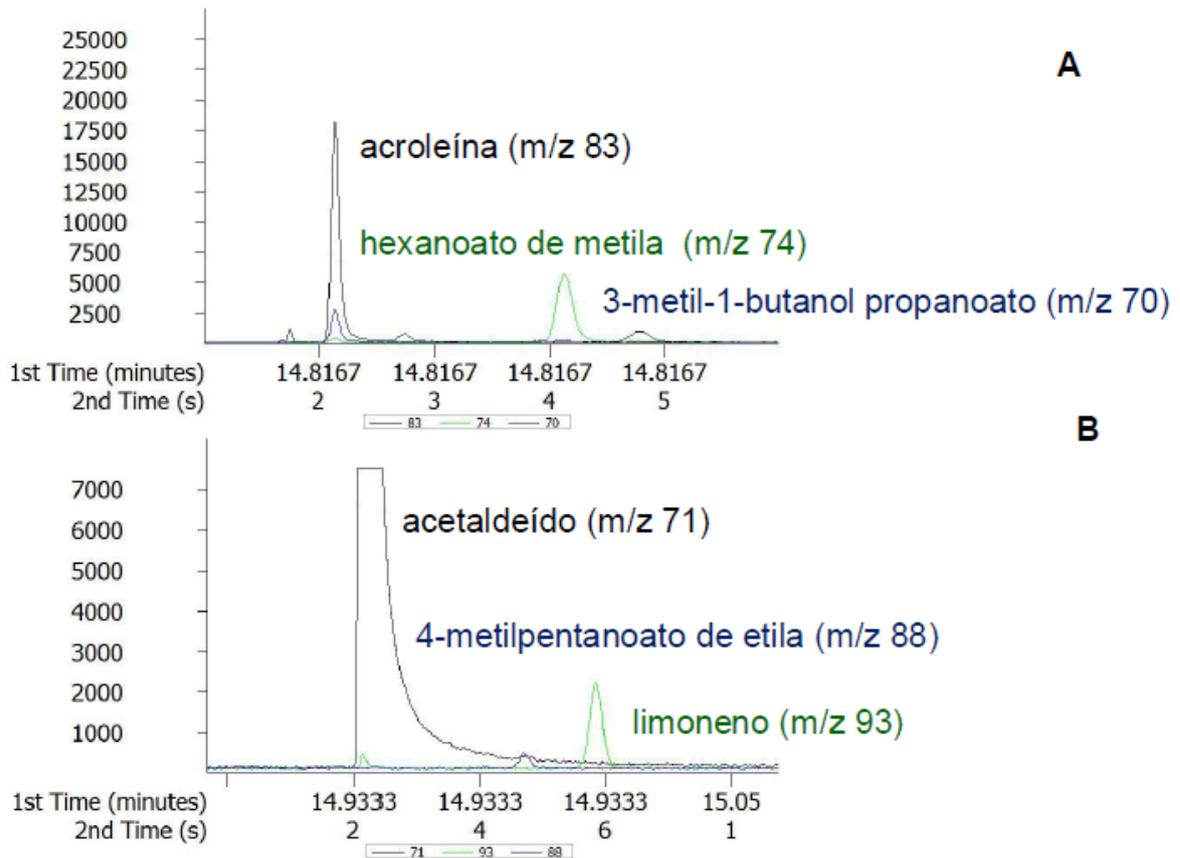


Figura S4. Partes dos cromatogramas dos picos modulados referentes à separação na segunda dimensão (²D): **(A)** da acroleína, hexanoato de metila e 3-metil-1-butanol propanoato e **(B)** do acetaldeído, 4-metilpentanoato de etila e limoneno identificados nos vinhos Syrah analisados através da HS-SPME-GC×GC/TOFMS.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho desenvolvido é pioneiro no que diz respeito à determinação simultânea dos seis compostos tóxicos formados durante a vinificação, avaliação do efeito do estágio de amadurecimento e tempo de maceração das uvas nos níveis de compostos tóxicos dos vinhos e caracterização do risco relacionado à exposição a esses compostos. A metodologia baseada no uso da HS-SPME-GC×GC/TOFMS mostrou ser adequada para a detecção e quantificação simultânea de formaldeído, acetaldeído, carbamato de etila, furano, furfural e acroleína nas amostras de vinho Syrah. O uso da GC×GC/TOFMS foi importante para a correta identificação e quantificação do acetaldeído e acroleína que co-eluíram na 1^aD com outros compostos presentes nos vinhos.

O avanço do grau de maturação e prolongamento do tempo de maceração das uvas são pontos críticos relacionados à formação de compostos tóxicos. Essas etapas podem estar relacionadas ao aumento da concentração de compostos no mosto/vinho que podem atuar como precursores da formação dos tóxicos. A cinética de formação desses compostos durante a vinificação será estudada em trabalhos posteriores.

Os dados gerados neste estudo poderão ser utilizados para o futuro estabelecimento de normas regulamentadoras relacionadas aos limites máximos permitidos para estes compostos, estabelecimento de métodos de rotina em órgãos de regulamentação e fiscalização para a determinação de algum composto avaliado nesta pesquisa, bem como, para subsidiar outros estudos de exposição humana aos compostos tóxicos. Especial atenção deve ser dada à formação de compostos com probabilidade de causar danos à saúde do consumidor, especialmente acroleína,

carbamato de etila e furano, cujo cálculo da margem de exposição indicou que a exposição a estes compostos representa risco.

REFERÊNCIAS

ABU-AMERO, K.K; KONDKAR, A.A.; CHALAM, K.V. Resveratrol and Ophthalmic Diseases. **Nutrients**, v. 8, issue 200, 2016.

ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; BRINKMAN, U.A.TH. Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, issues 1-2, p. 67-108, 2008.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G. *et al.* Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v.25, n. 6B, p. 1074-1077, nov./dez. 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G. *et al.* Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n. 1, p. 116-119, 2009.

ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Furano: um contaminante formado durante o processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. 236-241, 2008.

ARMANINO, C. *et al.* Modelling aroma of three Italian red wines by headspace-mass spectrometry and potential functions. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, issue 2, p. 134-142, 2008.

ARSLAN, M. M. *et al.* Analysis of methanol and its derivatives in illegally produced alcoholic beverages. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 33, p. 56-60, 2015.

ARTERO, A. *et al.* The impact of moderate wine consumption on health. **Maturitas**, v. 80, 1º ed., p. 3-13, Jan. 2015.

ARTS, J.H.E. *et al.* Subacute (28-day) toxicity of furfural in Fischer 344 rats: a comparison of the oral and inhalation route. **Food and Chemical Toxicology**. v. 42, issue 9, p. 1389–1399, Sept. 2004.

ATSDR. Toxicological profile for acrolein. U.S. Department of Health and Human Service, **Public Health Service**, Atlanta, Georgia, EUA, Aug. 2007.

AZEVEDO, Z.; COUTO, J.A.; HOGG, T. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, issue 1, p. 32-36, 2002.

BARTOWSKY, E.J. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, issue 2, p. 149-156, 2009.

BAUER, R. **Acrolein in wine: Bacterial origin and analytical detection**. 2010. Dissertation (Master of Science in Analytical Chemistry) - University of Stellenbosch, Stellenbosch, 2010.

BAUER, R. *et al.* Acrolein dimer as a marker for direct detection of acrolein in wine. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 33, p. 72-79, 2012.

BELAND, F.A. *et al.* Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1-19, 2005.

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

BENFORD, D.J. The use of dose-response data in a margin of exposure approach to carcinogenic risk assessment for genotoxic chemicals in food. **Mutagenesis**, p. 1-3, 2015.

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

BONONI, M.; TATEO, F. Determination of furan by headspace solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry in balsamic vinegars of Modena (Italy). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 79-82, 2009.

BOOBIS, A.; FLARI, V.; GOSLING, J.P. 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 Chemical Toxicology**, v. 57, p. 106-118, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências**. LEI Nº 7.678, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça**. Instrução normativa Nº 13 de 29 de junho de 2005.

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

BRUNO, S.N.F. *et al.* Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1345-1352, 2007.

BUTZKE, C.E.; BISSON, L.F. Ethyl carbamate preventative action manual. **US Food and Drug Administration**, Washington D.C., USA, 1997.

CALDEIRA, I. *et al.* Envelhecimento acelerado de aguardentes v nicas na presença de fragmentos de madeira. Influência nos compostos odorantes. In Encontro de Química dos Alimentos, 9. [S.I.]: SPQ ; CITAA., p. 114-115, 2009.

C MARA, J.S.; ALVES, M.A.; MARQUES, J.C. Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, issues 1-2, p. 188-197, Mar. 2006.

CARRETÉ, R. *et al.* Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 211, p. 155-159, 2002.

CARUSO, M.S.F.; NAGATO, L.A.F.; ALABURDA, J. Avalia o do teor alcoólico e componentes secund rios de cachaça. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 67, n. 1, p. 28-33, São Paulo, 2008.

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

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

CHURCHWELL, M.I. *etal.* Evaluation of serum and liver toxicokinetics for furan and liver DNA adduct formation in male Fischer 344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 1-8, Dec. 2015.

CLAISSE, O.;LONVAUD-FUNEL, A. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. **Food Microbiology**, v. 17, p. 513-519, 2000.

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

CORTÉS, S. *et al.* Evolution in the concentration of aldehydes, acetals and acetates during the refining of spirits. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 99, n. 2, p. 58-62, 2003.

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

DACHERY, B. *et al.* Occurrence of ochratoxin A in grapes, juices and wines and risk assessment related to this mycotoxin exposure. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 176-183, Santa Maria, Jan. 2016.

DAHABIEH, M.S., HUSNIK, J.I.; VAN VUUREN, H.J. 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.

DANON, B.; MARCOTULLIO, G.; DE JONG, W. Mechanistic and kinetic aspects of pentose dehydration towards furfural in aqueous media employing homogeneous catalysis. **Green Chemistry**, v. 16, issue 1, p. 39-54, 2014.

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

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

DE OLIVEIRA GUEDES, J.R. **Efeitos sobre a saúde do consumo moderado de vinho tinto**. 2013, 74 f, Dissertação (Mestrado) - Universidade Fernando Pessoa, Ciências Farmacêuticas, Porto, 2013.

DONG, H. *et al.* Toxicogenomic assessment of liver responses following sub chronic exposure to furan in Fischer 344 rats. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 6, p. 1351-1367, Jun. 2016.

DOROKHOV, Y.L. *et al.* Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. **American Physiological Society**. v. 95, n. 2, p. 603-644, Apr. 2015.

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

ESTI, M.; TAMBORRA, P. Influence of winemaking techniques on aroma precursors. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, p. 173-179, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Furfural and Furfural Diethylacetal. **EFSA Journal**, v. 67, p. 1-27, Parma, Italy, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonized approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. **EFSA Journal**, v. 282, p.1–131, 2005. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/282.pdf>. Acesso em: 18 de maio de 2016.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. **EFSA Journal**, v. 551, p. 1-44, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Endogenous formaldehyde turnover in humans compared with exogenous contribution from food sources. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, p. 11, Parma, Italy, 2014.

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

FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. *et al.* Volatile compounds and sensorial characterization of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. **Food Chemistry**, v. 147, p. 346-356, 2014.

FORKERT, P.G. *et al.* Oxidation of Vinyl Carbamate and Formation of 1, N⁶-Ethenodeoxyadenosine in Murine Lung. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 5, p. 713-720, 2007.

GALINARO, C. A. *et al.* **Da formação e controle de carbamato de etila em aguardentes.** Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.

GARAI-IBABE, G. *et al.* Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 253–261, 2008.

GIOVANNINI, E.; MANFROI, V. **Viticultura e Enologia: Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros.** 1^o ed., Bento Gonçalves, IFRS, 2009.

GOMES, M.B. *et al.* The risk of biogenic amines in food. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, Rio de Janeiro, Apr. 2014.

GUERRA, C.C. Influência de parâmetros enológicos de maceração na vinificação em tinto sobre a evolução da cor e qualidade do vinho. In: X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves. Bento Gonçalves-RS: Embrapa Uva e Vinho, Anais. p. 15-18. 2003.

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

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

HASNIP, S.; CAPUTI, A.; CREWS, C.; BRERETON, P. Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. **Food Additives and Contaminants**, v.21, p. 115-1161, 2004.

HELANDER, A.; LINDAHL-KIESSLING, K. Increased frequency of acetaldehyde-induced sister-chromatid exchanges in human lymphocytes treated with an aldehyde dehydrogenase inhibitor. **Mutation Research**, v. 264, issue 3, p. 103-107, 1991.

HERRERO, M. *et al.* Multidimensional chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, issue 43, p. 7110-7129, 2009.

HOMANN, N. Alcohol and upper gastrointestinal tract cancer: the role of local acetaldehyde production. **Addiction Biology**, v. 6, issue 4, p. 309-323, 2001.

HU, G *et al.* An efficient method for the determination of furan derivatives in apple cider and wine by solid phase extraction and high performance liquid chromatography—Diode array detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1284, p. 100-106, Apr. 2013.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, France, 2006. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>>. Acesso em: 21 de maio de 2016.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the *IARC Monographs*, Volumes 1–115. Disponível: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List_of_Classifications_Vol1-115.pdf>. Acesso em 01/05/2016.

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

JANEGITZ, B.C. *et al.* Removal of copper (II) from sugar-cane spirits employing chitosan. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 458-460, 2010.

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

JAYAKODY, L.N. *et al.* Mitigating health risks associated with alcoholic beverages through metabolic engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 173–181, 2016.

JECFA. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Disponível em: <<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx>>. Acesso em: 25 de maio de 2016.

JELLEN, H.H.; MAJCHER, M.; DZIADAS, M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 13-26, Aug. 2012.

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, 2011.

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

JIAO, Z; DONG, Y; CHEN, Q. Ethyl Carbamate in Fermented Beverages: Presence, Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Proposals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 13, issue 4, p. 611-626, July 2014.

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

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10-26, Nov. 2004.

KOUNDOURAS, S. *et al.* Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 5077–5086, 2006.

LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; AFONSO, R. Determination of ethyl carbamate in sugar cane spirits by GC-MS. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1860-1864, 2008.

LACHENMEIER, D. W. *et al.* Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. **Food Additives and Contaminants: part A**, Abingdon, v. 22, n. 5, p. 397-405, May 2005.

LACHENMEIER, D. W.; SOHNIUS, E.M. 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, n. 8, p. 2903-2911, Aug. 2008.

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

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

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

LACHENMEIER, D.W. *et al.* Occurrence of carcinogenic aldehydes in alcoholic beverages from Asia. **International Journal of Alcohol and Drug Research**, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2013.

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

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

LEWIS, S.J.; SMITH, G.D. Alcohol, ALDH2, and Esophageal Cancer: A Meta-analysis Which Illustrates the Potentials and Limitations of a Mendelian Randomization Approach. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 8, p. 1967-1971, 2005.

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, p. 943-948, 2012.

LIMA, A.J.B. *et al.* Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.

LIMA, M.S. *et al.* Influences of the Harvest Season on Analytical Characteristics of Syrah Grapes and Wines Produced in the Northeast Region of Brazil. **International Journal of Agriculture and Forestry**, v. 5, n. 2, p. 151-159, 2015.

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

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

MARTINS, C. *et al.* Insights on beer volatile profile: Optimization of solid-phase microextraction procedure taking advantage of the comprehensive two-dimensional gas chromatography structured separation. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 12, p. 2140-2148, 2015.

MATSUDA, T. *et al.* Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 10, p. 1374-1378, 2006.

MELLO, L.M.R.de. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2014**. Comunicado Técnico 175, Bento Gonçalves, RS, Embrapa Uva e Vinho, setembro de 2015.

MOGHE, A. *et al.* Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease. **Toxicological Sciences**, v. 143, n. 2, p. 242-255, 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, issue 2, p. 227-237, June 2012.

MORAES, V., LOCATELLI, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência**, 10 (1-2), p. 57-68, 2010.

MOSER, G.J. *et al.* Furan-induced dose-response relationships for liver cytotoxicity, cell proliferation and tumorigenicity (furan-induced liver tumorigenicity). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, n. 2, p. 101-111, Mar. 2009.

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

NEVES, E.A. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 33-36, 2007.

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

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

NTP, N. T. P. **Furan**. Disponível em: <<http://www.jmcpri.net/PUBLICACIONES/F05/cancerigenos/eleventh/profiles/s090fura.pdf>>. Acesso em: 30 de março de 2016.

OLIVEIRA, F. S.; SOUSA, E. T.; ANDRADE, J. B. A sensitive flow analysis system for the fluorimetric determination of low levels of formaldehyde in alcoholic beverages. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 561–566, 2007

O'NEIL, M.J. The Merck Index: Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 13th ed. New Jersey: Merck, p. 1759, 2001.

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.

PARAZZI, C. *et al.* Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercussp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 193-199, Campinas, 2008.

PEREIRA, G.E. **Notas técnicas**. Curitiba: CODEVASF, 2006. Disponível em: <<http://www.vinhovasf.com.br/site/arquivos/NotasTecnicas.pdf>>. Acesso em: 16 de janeiro de 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, Jan. 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, n. 20, p. 3441-3445, May 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, Feb. 2015.

PEREZ-COELHO, M.S. *et al.* Fermentation of White Wines in the Presence of Wood Chips of American and French Oak. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 3, p. 885-889, 2000.

PEREZ-LOCAS, C.; YAYLAYAN, V.A. Origin and Mechanistic Pathways of Formation of the Parent Furans - A Food Toxicant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 22, 2004.

PETISCA, C. *et al.* Optimization and Application of a HS-SPME-GC-MS Methodology for Quantification of Furanic Compounds in Espresso Coffee. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 81–88, 2014.

PIZARRO, C. *et al.* Experimental design approach to evaluate the impact of oak chips and micro-oxygenation on the volatile profile of red wines. **Food Chemistry**, v. 148, p. 357-366, 2014.

REBIÈRE, L. *et al.* A robust method for quantification of volatile compounds within and between vintages using headspace-solid-phase micro-extraction coupled with GC-MS – Application on Semillon wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 660, n. 1-2, p. 149-157, Feb. 2010.

RIACHI, L. G. *et al.* A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 149, p. 159-169, abr. 2014.

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

RICO-YUSTE, A. *et al.* Furfural Determination with Disposable Polymer Films and Smartphone-Based Colorimetry for Beer Freshness Assessment. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 7, p. 3959–3966, Mar. 2016.

ROCHA, S.M.; COIMBRA, M.A.; DELGADILLO, I. Occurrence of furfuraldehydes during the processing of *Quercus suber* L. cork. Simultaneous determination of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and 5-methylfurfural and their relation with cork polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 3, p. 287-293, July 2004.

SABON, I. *et al.* Determination of Volatile Compounds in Grenache Wines in Relation with Different Terroirs in the Rhone Valley. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6341–6345, 2002.

SAKANO, K. *et al.* Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 703-714, 2002.

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.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) - Opinion on furfural. **European Commission**, 27 March 2012.

SCOCCIANTI, C. *et al.* European Code Against Cancer 4th Edition: Alcohol drinking and cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 39, p. S67-S74, Dez. 2015.

SEITZ, H.K.; MEIER, P. The role of acetaldehyde in upper digestive tract cancer in alcoholics. **Translational Research**, v. 149, issue 6, p. 293-297, June 2007.

SERUGA, M.; NOVAK, Y.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1208-1216, 2011.

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

SIMANOWSKI, U.A. *et al.* Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. **Gut**, v. 35, n. 8, p. 1102-1106, 1994.

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

STEVENS, D.F.; OUGH, C.S. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 3, p. 309-312, 1993.

STEVENS, J.F. e MAIER, C.S. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 1, p. 7-25, Jan. 2008.

SUN, J.S. *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, p. 195-201, 2006.

SUOVANIEMI, O. *et al.* Food composition for binding acetaldehyde in mouth and in digestive tract, and method for the preparation of the composition. **International Patent Application** WO 2006/103316 A1, 34 p., 2006.

TANG, M. *et al.* Acrolein induced DNA damage, mutagenicity and effect on DNA repair. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 9, p. 1291-1300, Sept 2011.

TARDÁGUILA, J.; KRSTIC, M.; VILANOVA, M. **La viticultura en Australia**. Sevi, n. 3097, p. 4326-4333, 2005.

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

TONIETTO, J.; CAMARGO, U.A. **Vinhos tropicais no Brasil e no mundo**. Bon Vivant, Flores da Cunha, v. 8, n. 94, p. 15-17, dez. 2006.

TORRENS, J. *et al.* Volatile Compounds of Red and White Wines by Headspace-Solid-Phase Microextraction Using Different Fibers. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, n. 6, p. 310-316, 2004.

TRANCHIDA, P.Q. *et al.* Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 3-16, 2004.

VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 3, p. 233-254, Mar. 2004.

VASILIOU, V.; PAPPA, A.; ESTEY, T. Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. **Drug Metabolism Reviews**, 36: 279-299, 2004.

VENTURINI FILHO, W.G. **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. 1^o ed., São Paulo: Edgard Blucher, 2005.

WANG, H.T. *et al.* Effect of carcinogenic acrolein on DNA repair and mutagenic susceptibility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 15, p. 12379-86, 2012.

WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. **Environmental Chemical Letters**, v. 7, n. 3, p. 233-247, Sept. 2009.

WELDEGERGIS, B.T. *et al.* Solid phase extraction in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the detailed investigation of volatiles in South African red wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 1, p. 98-111, Sept. 2011.

WELKE, J. E. *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, 2012.

WHO - World Health Organization. Risk Management and Food Safety. **FAO Food and Nutrition Paper**, nº 65. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Rome, Jan. 1997. Disponível em:< <http://www.fao.org/3/a-w4982e.pdf>>. Acesso em: 18 de maio de 2016.

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

WHO – World Health Organization. IARC Monographs on the valuation of carcinogenic risks to human: alcohol consumption and ethyl carbamate. IARC Group, v. 96, Lyon, 2007

WHO/IPCS. Environmental Health Criteria 239: Principles for modelling Dose-response for the risk assessment of chemicals. **World Health Organization**, Geneva, 2009. Disponível em:<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43940/1/9789241572392_eng.pdf>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

WHO - World Health Organization. **Safety evaluation of certain contaminants in food**. Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Rome, 2011.

WON, S.Y *et al.* Quality Characteristics and Quantification of Acetaldehyde and Methanol in Apple Wine Fermentation by Various Pre-Treatments of Mash. **Preventive Nutrition and Food Science**. v. 20, n. 4, p. 292-297, dec. 2015.

XIAO, Z. *et al.* Optimization and application of headspace solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in cherrywines. **Journal of Chromatography B**, v. 978-979, p. 122-130, Jan. 2015.

XU, X. *et al.* Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2632-2638, Oct. 2011.

ZACARONI, L. M. *et al.* Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 320–324, 2011.

ZHANG, L. *et al.* Formaldehyde exposure and leukemia: A new meta-analysis and potential mechanisms. **Mutation Research**, v. 681, n. 2-3, p. 150-168, Mar-June 2009.

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, n. 13, p. 2797-2802, 2014.

ZHAO, X. Q.; ZHANG, Z. Q. Rapid and sensitive determination of formaldehyde in some beverages and foods by flow-injection fluorimetric analysis. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 216–221, Jan. 2009.

ZHAO, X. Q.; ZHANG, Z. Q. Microwave-assisted on-line derivatization for sensitive flow injection fluorometric determination of formaldehyde in some foods. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 242–245, Nov. 2009.

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

ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. **Mutation Research**, v. 259, p. 325-350, 1991.

ZINI, C.A. Cromatografia Gasosa Bidimensional. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, 2009.

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

ANEXO A

1. Orientações da Revista Food Chemistry

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Ten essential rules to ensure your manuscript is handled promptly

The manuscript fits the Aims and Scope of the journal (<http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry>) Manuscript is in accordance with ARTICLE TYPE – GUIDELINES (<http://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146/guide-for-authors#14000>). The text is written in good English. Authors who feel their manuscript may require editing to conform to correct scientific English may wish to use an English Language Editing service such as the one available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>). Manuscript text is divided into numbered sections; line and page numbers are added and text is double spaced An ethical statement is required for experiments involving humans or animals Conflict of interest statement is included at the end of the manuscript The number of figures and tables combined does not exceed a total of 6; additional tables and figures can be submitted as supplementary material. All relevant references should be provided in the Reference list. Cover letter is prepared, introducing your article and explaining the novelty of the research Highlights are prepared (a birds' eye view of your article in 3-5 points, 85 characters each).

Submission checklist

Checklist can also be downloaded:

http://cdn.elsevier.com/promis_misc/FOCH_Submission_Checklist.pdf

1)Study contents:

The Authors should ensure that The manuscript fits within [Aims & Scope](#) of Food Chemistry. The research is **novel** and has **not been published previously** - please see "Responsible research publication: international standards for authors" from COPE for more information http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011_0.pdf **Ethical consent** has been obtained in case of work on animals and/or humans.

2)Manuscript preparation:

The Authors should ensure that The number of words and of figures/tables is within limits:

- Research article: 7500 words, 6 tables and figures combined
- Review article: 10 000 words, 6 tables and figures combined
- Short communication: 3000 words, 6 tables and figures combined. More tables and figures? Submit as [supplementary material](#) The **title page** contains title, author names, affiliations and corresponding author telephone. **Email addresses are required for ALL authors. Authors must provide and use an e-mail address unique to themselves and not one that is shared with another author registered in EES, or a department.** The **highlights** are provided (3-5 bullet points, max 85 characters each including spaces). The manuscript contains a **conflict of interest** statement (before references) The

language follows the requirements of the Guide for Authors . The **formatting** of the manuscript follows the requirements of the Guide for Authors . Continuous **line numbering** is provided throughout the manuscript (including captions and references); **page numbering** is provided. All relevant **references** are provided in alphabetical order Figures and tables (6 combined) include clear **labels** and are prepared as **individual files**. The manuscript contains appropriate **ethical approval** and **informed consent** (if applicable, include statement).

3) Before submission: Manuscript file is provided as a Microsoft Word file. Figures and tables are provided as **individual files** A **cover letter** is included. 3 or more suggested **reviewers** are provided (including affiliation and professional email address), **at least 2 of which are from a different country than the Authors**. **Keywords** are provided.

Now you are ready to submit at <http://ees.elsevier.com/foodchem>

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including no more than 6 tables - additional tables and figures can be submitted as supplementary material). Research papers should not contain more than 40 references.

2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). Review articles should not contain more than 80 references.) If it is felt absolutely necessary to exceed this number, please contact the editorial office for advice before submission.

3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication. These papers should not contain more than 30 references.

5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. Book reviews

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Another useful source of guidance is "Responsible research publication: international standards for authors" from COPE

(http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011_0.pdf)

Guidelines in the US and Canada, Europe and Australia specifically state that hypothermia (use of ice slurries) is not an acceptable method for killing fish in the research environment.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Cross Check](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit with their articles, the names, complete affiliations (spelled out), country and contact details (including current and valid (preferably business) e-mail address) of three potential reviewers. Email addresses and reviewer names will be checked for validity. **Your potential reviewers should not be from your institute, and at least two should be from different countries.** Authors should not suggest reviewers with whom they have collaborated within the past two years. Your submission will be rejected if these are not supplied. Names provided may be used for other submissions on the same topic. Reviewers must have specific

expertise on the subject of your article and/or the techniques employed in your study. Briefly state the appropriate expertise of each reviewer.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
- 5) is poorly written.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal and email addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text, figures and tables should be submitted as separate files. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below

the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the [PubChem CID](#) of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

[More information.](#)

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf . Accessed 14.02.11.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-chemistry>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

Journal of Scientific Communications, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

AFTER ACCEPTANCE**Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

