

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

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

Daiani Cecchin Ferreira

Porto Alegre

2017

Daiani Cecchin Ferreira

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

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

Orientador: Prof. Dr. Vitor Manfroi

Coorientadora: Prof.^a Dra. Juliane Elisa Welke

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

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

Orientador: Vitor Manfroi.

Coorientadora: Juliane Elisa Welke.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

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

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

Daiani Cecchin Ferreira

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

Aprovada em: ____/____/____

Pela Comissão Examinadora:

Homologada em: ____/____/____

Por:

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Orientador - PPGCTA/UFRGS

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

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

Prof.^a Dra. Rosângela Assis Jacques
Banca - PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Juliano Garavaglia
Banca - UNISINOS

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

(Almir Sater e Renato Teixeira)

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

EDI	Ingestão diária estimada (do inglês, <i>estimated daily intake</i>)
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization</i>)
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
FID	Detector de ionização em chama (do inglês, <i>flame ionization detector</i>)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês, <i>gas chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (do inglês, <i>gas chromatography with flame ionization detector</i>)
GCxGC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (do inglês, <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography</i>)
GC-NPD	Cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (do inglês, <i>gas chromatography nitrogen phosphorus detector</i>)
GCq/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar (do inglês, <i>gas chromatography with mass spectrometry</i>)
GC/MS-SIM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa no modo de monitoramento seletivo de íons (do inglês, <i>gas chromatography with mass spectrometric detection in selected-ion monitoring mode</i>)
GCxGC/TOFMS	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detector</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês, <i>high-performance liquid chromatography</i>)

HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (do inglês: <i>high-performance liquid chromatography with diode array detection</i>)
HPLC-FLD	Cromatografia líquida de alta performance com detector de fluorescência (do inglês, <i>high-performance liquid chromatography with fluorescence detection</i>)
HS-SPME	Microextração em fase sólida no modo headspace (do inglês, <i>headspace solid phase microextraction</i>)
HS-SPME-GC/MS	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography mass spectrometry</i>)
HS-SPME/GC-NPD	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> combinada com cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (do inglês, <i>headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography nitrogen phosphorus detector</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química (do inglês, <i>International Programme on Chemical Safety</i>)
IS	Padrão interno (do inglês, <i>internal standard</i>)
JECFA	Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e da Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives</i>)
LAB	Bactérias ácido lácticas (do inglês, <i>lactic acid bacteria</i>)
LC	Cromatografia líquida (do inglês, <i>liquid chromatography</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês, <i>liquid-liquid extraction</i>)

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

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

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

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Produção e consumo do vinho	17
3.2	Vinificação	19
3.3	Composição do vinho	21
3.4	Compostos carbonílicos tóxicos presentes em vinho	22
3.4.1	Formaldeído	23
3.4.2	Acroleína	24
3.4.3	Acetaldeído	25
3.4.4	Furfural	26
3.4.5	Carbamato de etila	27
3.5	Técnicas de extração e determinação dos compostos tóxicos encontrados na vinificação	28
3.6	Análise do risco da exposição aos compostos tóxicos presentes no vinho	37
4	ARTIGO	41
4.1	Artigo 1- Simultaneous quantification of toxic carbonyl compounds in samples from distinct stages of vinification and exposure risk assessment through wine consumption	42
5	DISCUSSÃO GERAL	85
6	CONCLUSÃO	90

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

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

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção e consumo do vinho

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2 Vinificação

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

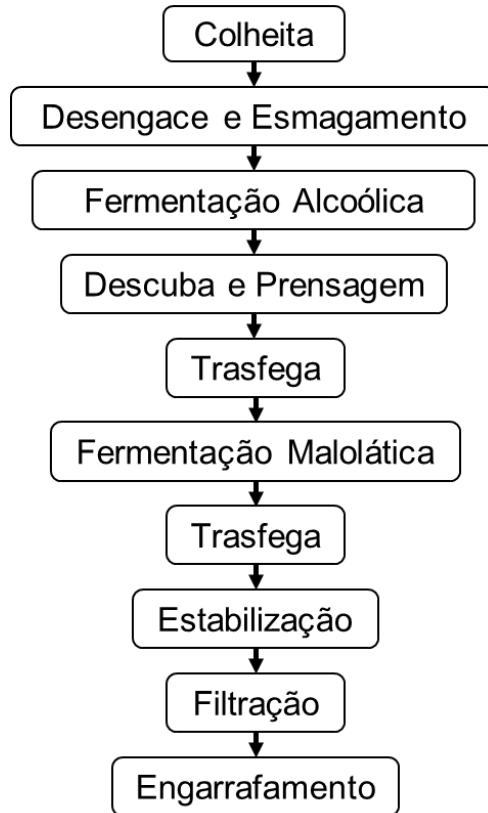


Figura 1- Etapas da elaboração de vinho tinto. Fonte: Adaptado de Ben e Monteiro (2012).

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

3.3 Composição do vinho

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

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

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

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

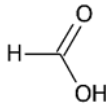
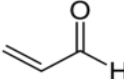
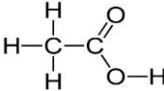
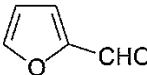
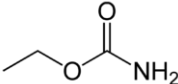
peessoas que tem baixa atividade das enzimas aminooxidasas podem ser sensíveis aos efeitos tóxicos das amins biogências (LINARES *et al.*, 2016).

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

3.4 Compostos carbonílicos tóxicos presentes em vinho

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

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

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

^a Chemical Abstracts Service; ^b peso molecular, ^c ponto de ebulição.

3.4.1 Formaldeído

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

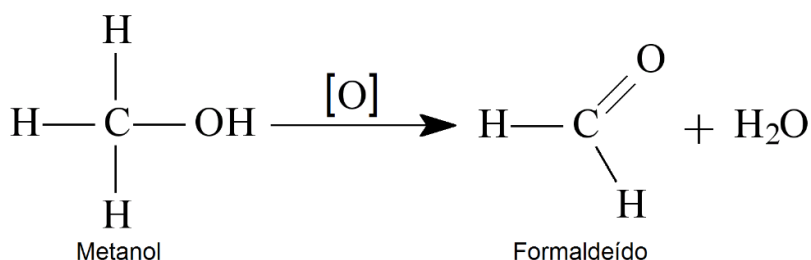


Figura 2- Reação de formação do formaldeído via oxidação do metanol.

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

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

3.4.2 Acroleína

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

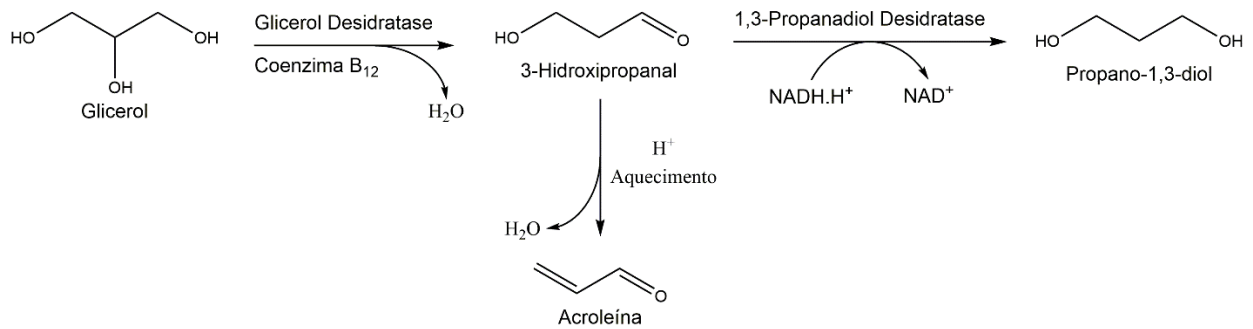


Figura 3- Via metabólica de formação da acroleína a partir do glicerol proveniente da fermentação alcoólica da glicose realizada pelas leveduras; Fonte: Adaptado de Azevedo *et al.* (2007a).

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

3.4.3 Acetaldeído

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

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

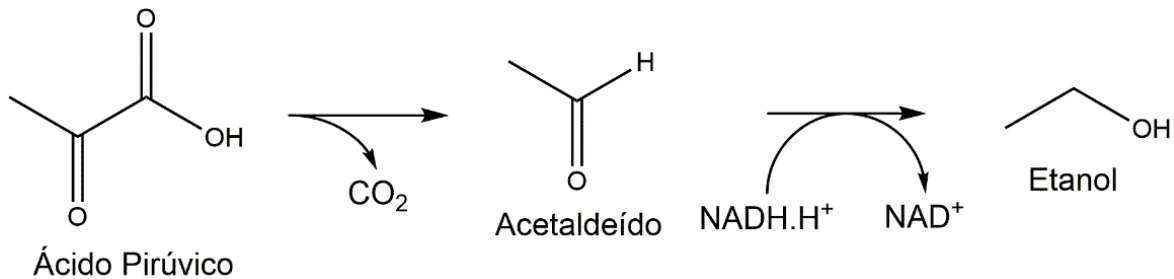


Figura 4- Via metabólica da fermentação alcoólica a partir do ácido pirúvico com formação de acetaldeído e etanol; Fonte: Adaptado de Azevedo *et al.* (2007a).

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

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

3.4.4 Furfural

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

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

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

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

3.4.5 Carbamato de etila

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

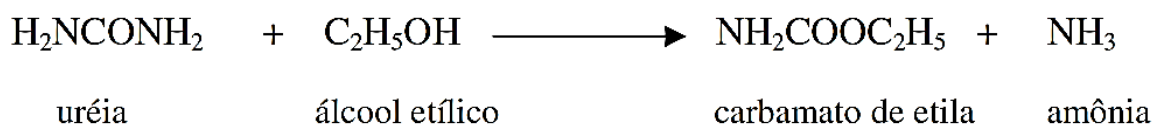


Figura 5- Reação de formação do carbamato de etila via reação entre ureia e etanol; Fonte: Masson (2009).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A extração dos constituintes da matriz da amostra via SPME pode ser realizada por imersão direta (DI-SPME, do inglês: *direct immersion solid phase microextraction*) ou por headspace (HS-SPME, do inglês: *headspace solid phase microextraction*). Na DI-SPME a fibra é diretamente imersa na amostra líquida e na HS-SPME a fibra é exposta sob a amostra (MIN *et al.*, 2015). A SPME pode ser totalmente automatizada e combinada com instrumentação analítica, como o cromatógrafo a gás, onde os analitos sorvidos pela fibra são dessorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo (BOSCH-FUSTE *et al.*, 2007; NACCARATO; PAWLISZYN, 2016).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

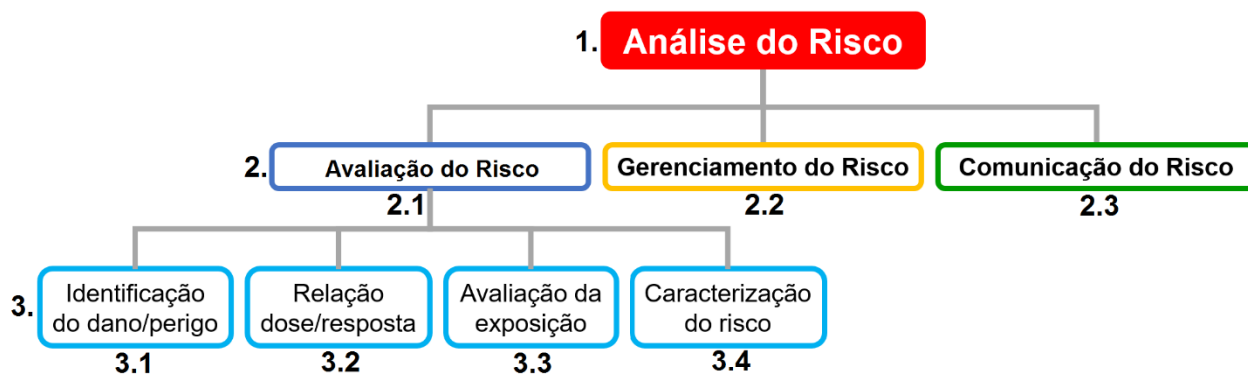


Figura 6- Etapas da análise do risco; Fonte: Adaptado de Jardim e Caldas (2009).

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

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

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

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

observed adverse effect level) e (ii) a menor dose na qual o efeito adverso foi observado (LOAEL, do inglês: *lowest observed adverse effect level*). A dose de referência toxicológica (BMD, do inglês: *benchmark dose*) é uma alternativa ao uso do NOAEL e do LOAEL para derivação dos níveis seguros de exposição humana à compostos tóxicos. A estimativa de BMD envolve modelagem matemática da curva de dose-resposta para interpolar uma dose estimada que corresponda a um nível particular de resposta. A incerteza desta interpolação também é estimada e o limite de confiança inferior desta dose é denominado BMDL (do inglês: *benchmark dose lower confidence limit*). Essas medidas podem ser utilizadas no cálculo dos parâmetros seguros de ingestão crônica e aguda para o homem (JARDIM; CALDAS, 2009).

Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura, para as substâncias que não são genotóxicas, estão a ingestão diária aceitável (ADI, do inglês: *acceptable daily intake*), a ingestão diária tolerável máxima provisória (PMTDI, do inglês: *provisional maximum tolerable daily intake*), a ingestão tolerável semanal provisória (PTWI, do inglês: *provisional tolerable weekly intake*) e a ingestão tolerável mensal provisória (PTMI do inglês, *provisional tolerable monthly intake*). Esses parâmetros representam a quantidade de uma substância que pode ser consumida diariamente (ADI e PMTDI), semanalmente (PTWI) ou mensalmente (PTMI) ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde. Para compostos intencionalmente adicionados nos alimentos (aditivos, resíduos de pesticidas e de medicamentos de uso veterinário), aplica-se a ADI. Os parâmetros de ingestão tolerável provisória (PMTDI, PTWI e PTMI) são definidos para os contaminantes, sendo que a PMTDI é definida para substâncias que não se acumulam no organismo. A PTWI e PTMI são usadas para compostos que tem potencial de acumulação no organismo, sendo que para aquelas substâncias que têm vida longa no organismo utiliza-se a PTMI (BOOBIS *et al.*, 2013; GALLI; MARINOVICHA; LOTTI, 2008; JARDIM; CALDAS, 2009; REYES, 2012). Com relação aos compostos tóxicos alvo deste estudo, o JECFA estabelece para a soma da ingestão de furfural, furfural (álcool, acetato, propionato, pentanoato, octanoato, 3-metilbutanoato) e 2-furoato (metil, propil, amil, hexil, and octil) uma ADI de 0,5 mg kg⁻¹ de peso corporal por dia (JECFA, 2017). O formaldeído, acetaldeído, CE e acroleína não possuem parâmetros de ingestão segura, pois são compostos genotóxico.

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

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

A MOE pode ser usada para classificar substâncias genotóxicas de acordo com o risco, indicando o nível de preocupação para estabelecer prioridades de ações para os gerenciadores de risco e para subsidiar os indivíduos a tomar decisões pessoais de estilo de vida. Um valor de MOE igual ou maior que 10.000 tem sido proposto como uma indicação de uma situação de risco pouco preocupante sob a ótica de saúde pública. Com relação a caracterização do risco da exposição humana a substâncias não genotóxicas, a ingestão é comparada ao parâmetro de ingestão segura, sendo assim pode haver risco quando a ingestão calculada ultrapassa esse parâmetro (BARLOW *et al.*, 2006; JARDIM; CALDAS, 2009).

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

4 ARTIGO

Os materiais e métodos usados na determinação dos compostos carbonílicos tóxicos foram descritos no artigo científico apresentado a seguir. Além disso, os resultados e discussão também foram abordados no estudo que foi submetido para publicação. Este artigo foi formatado de acordo com as normas do periódico ao qual foi submetido.

4.1 Artigo 1- Simultaneous quantification of toxic carbonyl compounds in samples from distinct stages of vinification and exposure risk assessment through wine consumption

Daiani C. Ferreira ^a, Karine P. Nicolli ^b, Erica S. Silva ^b, Vitor Manfroi ^a,
Claudia A. Zini ^b, Juliane E. Welke ^{a,*}

^aInstitute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Bento Gonçalves Avenue, 9500, zip code 91501970, Porto Alegre, Brazil

^bInstitute of Chemistry, UFRGS, zip code 91501970, Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author: juliane.welke@ufrgs.br (J.E. Welke), Tel.: +55 51-3308-9788, fax: +55 51-3308-7048.

ABSTRACT

An HS-SPME-GC/qMS-SIM method, preceded by GCxGC/TOFMS analysis for identification of possible coelutions, was validated for the determination of formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, furfural, and ethyl carbamate in different winemaking stages. Ethyl carbamate was not detected in analyzed samples, while formaldehyde was found in levels lower than LOQ ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) of the HS-SPME-GC/qMS-SIM. Acrolein and furfural were found from grapes to wine, although levels were observed to decline throughout the winemaking process. Acetaldehyde and furfural seem to be precursors of other compounds formed during vinification. The production of acetaldehyde during alcoholic fermentation and the potential environmental contamination of grapes with acrolein and furfural were pointed as the critical points related to the presence of toxic carbonyl compounds during the production of Merlot wines. Acrolein was found in quantities enough to present risk to human health, while other potentially toxic carbonyl compounds did not result in risk.

Keywords: formaldehyde; acetaldehyde; acrolein; furfural; ethyl carbamate; GCxGC/TOFMS; wine; Merlot.

1 Introduction

Winemaking encompasses the set of procedures that lead to the transformation of grape into wine, including steps such as maceration, fermentation, and solid separation, among others. As such, most compounds present in wine can be derived from the grape used in winemaking, although the presence of certain metabolites may stem from microorganisms during fermentation, or be related to maturation when this step is performed (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Some of these compounds may present a risk to human health due to their toxicity, such as formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, furfural and ethyl carbamate (EC) (JENDRAL; MONAKHOVA; LACHENMEIER, 2011; KÄCHELE *et al.*, 2014; NÓBREGA *et al.*, 2015; PAIANO *et al.*, 2014).

The formation of these toxic compounds in alcoholic beverages through different mechanisms has been documented in the literature (BAUER; KOSSMANN, 2010; PERESTRELO; SILVA; CÂMARA, 2015; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015). Wine may contain formaldehyde due to methanol oxidation, which occurs owing to the enzymatic degradation of pectin present in grape (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). The formation of acrolein occurs due to the dehydration of 3-hydroxypropionaldehyde, which is produced by lactic acid bacteria (LAB) from glycerol (product of alcoholic fermentation) (BAUER; KOSSMANN, 2010). Acetaldehyde, in turn, may be formed from glucose and amino acids during alcoholic fermentation and oxidation of phenolic compounds found in wine (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015). The furfural can be transferred from the wood barrels to the wine during maturation step. More specifically, furfural may be formed through acid hydrolysis of pentosans during the barrel toasting process (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006), or even through Maillard reactions taking place when wine is submitted to heating (above 50 °C) during aging (PERESTRELO; SILVA; CÂMARA, 2015). Lastly, the formation of EC occurs from reactions between ethanol and nitrogen-containing precursors (e.g., urea and amino acids) (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Oral exposure to these compounds has been related to various toxic effects. Formaldehyde is associated with necrosis of the superficial layers of the gastric mucosa, papillomas and ulcers (ARKEMAN, 2008). Acrolein may be related with atherosclerosis and Alzheimer's disease (ATSDR, 2007; BURCHAM, 2017). Acetaldehyde may increase the risk of cancer in some parts of the human organism, including head, neck, esophagus, liver and intestine (ERIKSSON, 2015). The toxic

effects of furfural are not clear, but it is suspected of being a mutagen and might be associated with liver neoplasms (hepatocellular adenomas or carcinomas) (ARTS *et al.*, 2004). EC has been shown to be genotoxic and cytotoxic mainly to liver and kidney (CUI *et al.*, 2016). The International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies formaldehyde and acetaldehyde as carcinogenic to humans (group 1), with the latter being ingested specifically through alcoholic beverages. EC is classified as probably carcinogenic to humans (group 2A). Acrolein and furfural are in group 3, which means that more research is necessary to classify these compounds in relation to their carcinogenic effects (IARC, 2017).

There are no limits established for these compounds in wines, in terms of legislation, with the exception of Canada ($30 \mu\text{g L}^{-1}$), Czech Republic ($30 \mu\text{g L}^{-1}$) and United States of America ($15 \mu\text{g L}^{-1}$), where maximum limits have been defined for EC in wine. Regarding the ingestion of formaldehyde and acrolein, the International Program on Chemical Safety (IPCS) of the World Health Organization (WHO) recommended maximum tolerable concentrations of 2600 and $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ for formaldehyde and acrolein, respectively (IPCS, 2002).

In addition, acetaldehyde derivatives and other furan containing structures may be formed during the processing of grapes. However, the presence of these compounds is rarely investigated. Some of them may be toxic, such as 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, 5-methyl-2-furaldehyde and 2-furyl methyl ketone (Perestrelo *et al.*, 2015), although some other furanic compounds or acetaldehyde derivatives (acetoin, acetal, sotolon, diacetyl and 2,3-butanediol) may not be or may yet not have their toxicity investigated. A far-reaching look encompassing these compounds is advisable to achieve a more comprehensive view of the toxicity of the sample, including information about the stages where they might be formed during process.

While individual quantifications of these toxic compounds in wines have been done using various analytical methods, there are no platforms reported for the simultaneous determination of all these compounds. For instance, acetaldehyde has been quantified through gas chromatography with mass spectrometric detection (GC/MS) in scan mode (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006), or in the selected ion monitoring (SIM) mode (PAIANO *et al.*, 2014). Acrolein (KÄCHELE *et al.*, 2014) and EC (NÓBREGA *et al.*, 2015) have also been determined individually by GC/MS in SIM mode or by comprehensive two-dimensional gas chromatography with a time-of-flight

mass spectrometric detector (GC×GC/TOFMS) (PERESTRELO *et al.*, 2010). At most, furfural and other furan-derivatives have been determined simultaneously by high pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) (PERESTRELO; SILVA; CÂMARA, 2015), while both formaldehyde and acetaldehyde have been quantified simultaneously through capillary electrophoresis with electrochemical detection (Zhang *et al.*, 2011).

Owing to their relevance to human health, and consequently, the need for their concomitant analysis, analytical laboratories have demonstrated increasing interest in the use of methods capable of quantifying more than one of these compounds in a single analysis. The advent of such methodology would certainly reduce costs, sample preparation time and, consequently, total analysis time. However, difficulties in the determination of these compounds may arise due to the concentration range in which they may be found in wine (in the order of μg to mg L^{-1}), in addition to the possibility of such compounds undergoing chromatographic coelution with other matrix compounds. In a previous study, a method using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detector (GC×GC/TOFMS) was validated for the simultaneous quantification of formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, furan, EC, and furfural in Syrah wines (LAGO *et al.*, 2017). Separation of acetaldehyde from two other wine compounds (4-methylethyl pentanoate and limonene) and of acrolein from methyl hexanoate were achieved only in the second chromatographic dimension.

With aims of developing a simpler and less expensive method than the GC×GC/TOFMS assay above mentioned, a GC/MS-SIM approach with the same chromatographic conditions used in the first dimension of the aforementioned method was developed to simultaneously quantify toxic carbonyl compounds in wine. Therefore, this is the first study that reports the use of HS-SPME-GC/qMS-SIM to (i) develop/validate a method for simultaneous quantification of acetaldehyde, formaldehyde, acrolein, furfural, and EC, employing a preliminary evaluation by GC×GC/TOFMS for verification of coelutions; and (ii) evaluate the levels of these compounds in four vinification stages, from grapes to wines, and in commercial wines. Possible transformations that these carbonyl compounds may undergo during winemaking were verified and an assessment of risk of exposure to toxic compounds through the consumption of commercial wines was also undertaken.

2. Material and methods

2.1 Reagents and Chemical standards

Standard compounds of analytical purity higher than 98%, including formaldehyde (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), acetaldehyde (Fluka, Ronkonkoma, USA), acrolein, furfural and EC from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) were used to prepare individual stock solutions (1000 mg L^{-1}) in double distilled ethanol (Nuclear, São Paulo, Brazil). 2-Octanone and methyl nonanoate were purchased from Sigma-Aldrich and used as internal standards (IS). A solution (10 mg L^{-1}) containing the two above mentioned IS was prepared in double distilled ethanol, with $10 \mu\text{L}$ of this mix added to each sample before HS-SPME. This IS mix ($10 \mu\text{L}$) was also employed in standard solutions used in the construction of calibration curves. Preliminary tests were performed to verify the absence of these compounds in wine samples (results not shown). Table S1 of Supplementary Material contains information about the toxic compounds and the IS used to normalize the area of each analyte, including their chemical structures, molecular weight, boiling points, retention times and qualifier/quantifiers ions used in the identification/quantification of the toxic compounds.

A model solution of grape must was prepared with tartaric acid (5 g L^{-1} , Synth São Paulo, Brazil) dissolved in Milli Q deionized water (Millipore purification system, Bedford, MA, USA, and pH adjusted at 4.5 (pH of evaluated must was in the range of 4.2 to 4.5) with sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany). This solution was used to obtain the calibration curves intended to quantify the toxic compounds of grape and must. Considering that the extraction efficiency is influenced by pH and especially by alcohol content (Welke, Zanús, Lazarotto, Schmitt, & Zini, 2012), another model wine solution was prepared with tartaric acid (6 g L^{-1} , Synth) and 10 % of ethanol (Nuclear) in Milli Q deionized water and used for the analyses of wines and samples collected after fermentation. The pH of this solution was adjusted to 3.5 (pH of wines was in the range of 3.4 to 3.5) with sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany). The standard compounds were diluted in the model solutions, which were then used to elaborate calibration curves for each compound of interest. Acetaldehyde, acrolein, and formaldehyde were derivatized with 2,2,2- trifluoroethyl hydrazine (TFEH, Aldrich, Steinheim, Germany). An aqueous solution of 10000 mg L^{-1} of TFEH was prepared in MilliQ deionized water, and $100 \mu\text{L}$ were added to each sample before extraction (LAGO *et al.*, 2017).

SPME fiber, 50/30 divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) StableFlex 2cm, was purchased from Supelco (Bellefonte, USA). Prior to first use, the fiber was conditioned for 1 h at 270 °C, according to the manufacturer's recommendations. Twenty microliter headspace vials with magnetic screw caps sealed with silicone septa were also obtained from Supelco. Sodium chloride (NaCl) of analytical grade was purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil), and oven dried at 100 °C for 1 h before its addition to samples.

2.2 Samples and wine elaboration

The toxic compounds were evaluated throughout four vinification steps (grape, must, after alcoholic fermentation and wine, which are named as experimental), and in 20 commercially available wine samples. Experimental wines were produced in triplicate. Both experimental and commercial wines (~12 % ethanol, v/v) were prepared with Merlot grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in the Campanha Gaúcha region (30-34°S; 55-63°W), Rio Grande do Sul State, Brazil. This grape cultivar is among the most cultivated around the world (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Commercially available samples were produced from 2008 to 2014 by twelve different wineries from Campanha Gaúcha.

Experimental wines were produced with grapes (~21°Brix) harvested in 2014 from a vineyard (30°44'52,591" S e 55°23'49,637" W) that presents two distinct areas composed of sandy (arenosol, 170 m above sea level) and clayey (acrisol, 180 m above sea level) soils, classified by Brazilian Company of Agricultural Research (Embrapa-Grape and Wine, Bento Gonçalves, Brazil) according to the International Soil Classification System of Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2015). The two points in the vineyard from which the grapes were harvested were termed A and B, respectively. The main difference between these two types of soil is that the clay soil provides greater retention of water and nutrients, which has been previously reported to result in differences in the color and aroma of wines of the cultivar Zalema (*V. vinifera*) from Spain (GÓMEZ-MÍGUEZ *et al.*, 2007).

Grapes harvested from two distinct points of the vineyard (sandy and clayey soil) were separately vinified in the Enology Laboratory of Embrapa. Experimental wines were produced in triplicate. Vinification was performed as detailed in a previous study (LAGO *et al.*, 2017).

2.3 Sample preparation

HS-SPME was performed using 1 mL of sample (must, after alcoholic fermentation, or wine) in 20 mL glass SPME vials, 30% of NaCl (w/v), without sample agitation, extraction time of 45 min and extraction temperature of 55°C, in accordance with the optimized guidelines reported in a previous study (Welke, Zanús, *et al.*, 2012). Grapes were manually macerated with a pestle in a porcelain mortar and 1 gram was transferred to the SPME vial. Derivatization of acetaldehyde (boiling point, BP: 20.2 °C), formaldehyde (BP: -19.3 °C) and acrolein (BP: 53 °C) was performed as described in section 2.1, aiming mainly to transform these highly volatile analytes into more thermally stable derivatives for GC analysis. Compounds extracted by HS-SPME were thermally desorbed in the injector of the GC/MS at 250°C for 15 min. All samples were analyzed in triplicate.

2.4 Determination of the toxic compounds using GC×GC/TOFMS and GC/MS

Samples were evaluated by GC×GC/TOFMS to verify the occurrence of coelutions. The applied GC×GC/TOFMS method was previously reported by Lago *et al.* (2017), in which a polar column (100% polyethylene glycol, DB-Wax, 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) × and a medium polar column (50% phenyl-methylpolysiloxane, DB-17 ms, 1.70 m × 0.18 mm × 0.18 µm, J&W Scientific Inc.) were used in the first (¹D) and second (²D) dimensions, respectively. The same chromatographic conditions (oven temperature, temperature of sample desorption, carrier gas flow, etc, as described below) were used in GC×GC/TOFMS and GC with quadrupole MS (GC/qMS).

A Shimadzu GC/qMS, model QP2010 (Kyoto, Japan) equipped with a CTC CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) was employed to perform headspace analyses of toxic compounds. Compounds were separated using the same DB-Wax column formerly mentioned. The oven temperature was programmed as follows: initially kept at 35 °C for 5 min, then it was heated up to 140 °C at a rate of 3 °C min⁻¹, reaching a final temperature of 250 °C at 20 °C min⁻¹, where it remained for 10 min. The injector was kept at 250 °C, and helium (analytical purity 99.999 %, Linde Gases, Canoas, RS, Brazil) was used as carrier gas at a constant flow of 1 mL min⁻¹. The MS parameters included electron ionization at 70 eV with ion source temperature at 250 °C in SIM mode. Compounds of interest were positively identified by comparing the retention times (*t_R*) and mass spectra of unknown

compounds with those of co-injected standard compounds. Furthermore, mass spectra of the analytes have been compared with mass spectra available in the NIST mass spectral library (2005). Validation parameters were the same used for the GC×GC/TOFMS method described in a previous study for quantification of these compounds and included linearity, recovery, intermediate precision (four analyses performed in four different days, n=16), repeatability (seven analyses performed in the same day, n=7), limit of quantification (LOQ) and detection (LOD) (LAGO *et al.*, 2017).

2.5 Statistical analysis

Data related to levels of toxic compounds found in different stages of Merlot winemaking were submitted to statistical analysis, including analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test ($p < 0.05$), both undertaken with the use of Statistica 7.1 software (StatSoft, Inc. Tulsa, USA).

2.6 Calculation of the estimated daily intake (EDI) of toxic compounds through wine consumption

The estimated exposure to toxic compounds found in wine was calculated as follows: EDI of toxic compounds ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight (bw) per day) = [wine consumption expressed in milliliter per day \times concentration of toxic compound in wine expressed in micrograms per milliliter ($\mu\text{g mL}^{-1}$)] \div bw of 60 and 72 kg of Brazilian women and men, respectively, according the Analysis of Personal Food Consumption done by Brazilian government (IBGE, 2011b). The estimated daily intake was calculated for men and women based on the recommended maximum daily intake of wine for each sex, 300 mL for men and 200 mL for women, which corresponds to moderate wine consumption associated with the beneficial properties of wine due to the presence of flavonoids and stilbenes (BOBAN *et al.*, 2016).

2.7 Risk characterization

Risk characterization should be performed in one of two ways, depending on whether the compound is genotoxic or not. The Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA) has not established parameters of safe ingestion for genotoxic compounds, while establishing that the margin of exposure (MOE) must be used in risk characterization (WHO, 2010). The genotoxic compounds analyzed in this

study were formaldehyde (ARKEMAN, 2008), acrolein (ATSDR, 2007), acetaldehyde (ERIKSSON, 2015) and EC (CUI *et al.*, 2016). MOE is defined as the ratio between the dose that produces a specific toxic effect in studies using animals, and the estimated daily intake of the same compound (WHO, 2010). The lower limit of the 95% confidence interval of the dose required to yield a 10% increase in the occurrence of a toxic effect compared to the control (BMDL10, benchmark dose level) was used in risk assessment. The BMDL10 values adopted were of 28, 56 and 0,36 mg kg⁻¹ of bw per day, corresponding to chronic atrophic gastritis, tumors in rats (breast, stomach, bowel, testicular) and for stomach squamous epithelial hyperplasia in mice, formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein, respectively (ATSDR, 2007; MONAKHOVA; JENDRAL; LACHENMEIER, 2012). A MOE value lower than 10,000 has been proposed as an indicator of concern from a public health perspective. In this sense, the smaller the MOE value, the greater the risk associated with exposure to a given toxic compound (WHO, 2010).

Furfural is a non-genotoxic compound that can be used in food as a flavouring agent, and therefore has a safe ingestion parameter set by JECFA (2000). The acceptable summative daily intake (ADI) of all furan-containing compounds, including furfural, furfuryl (alcohol, acetate, propionate, pentanoate, octanoate, 3-methylbutanoate), and 2-furoate compounds (methyl, propyl, amyl, hexyl, and octyl) is 500 µg kg⁻¹ of bw. Risk characterization was carried out comparing the estimated intake of furfural with its ADI, where risk may exist if the estimated intake exceeds the ADI.

3 Results and Discussion

3.1 Derivatization reaction and verification of coelutions

Acetaldehyde, acrolein and formaldehyde were detected in the derivatized form in GC×GC/TOFMS and GC/qMS. Figure 1A shows the derivatization reaction that occurs with these compounds and the mass spectra of the derivatized analytes, in addition to the separation of coeluted compounds by GC×GC/TOFMS. The derivatizing agent (TFEH) reacted with the carbonyl groups of the toxic compounds forming a hydrazone (structure R₁R₂C=NNH₂, where R means radical) with the release of a water molecule.

The derivatization reaction resulted in the increase of the boiling points of acetaldehyde, acrolein and formaldehyde, which eluted from the chromatographic column around 65, 62 and 59 °C, respectively, (BP of non-derivatized forms are 20.2,

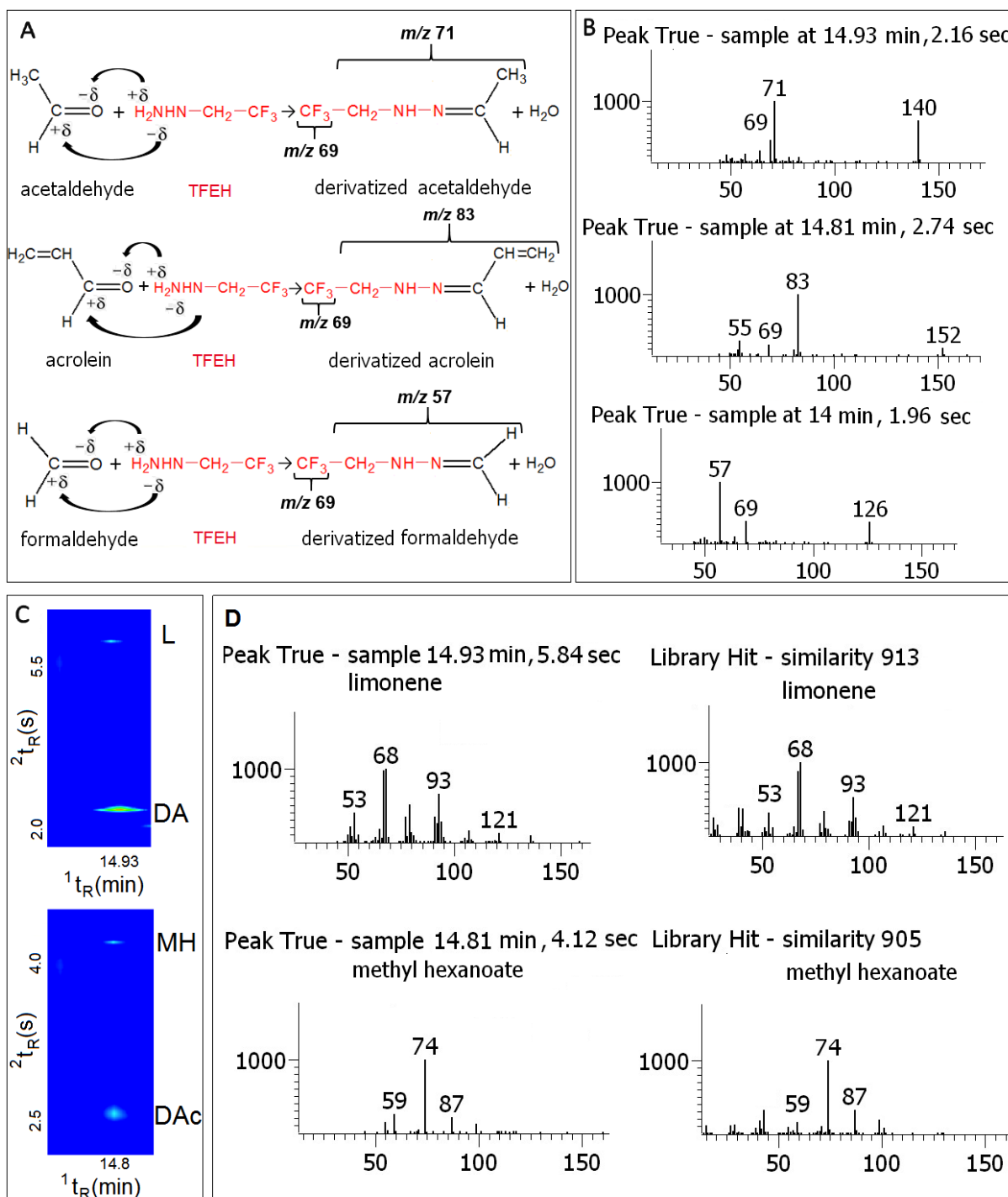


Figure 1. Toxic compounds that react with the derivatizing agent (2,2,2-trifluoroethyl hydrazine, TFEH) and were separated in the second chromatographic dimension of the comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detector (GC×GC/TOFMS). (A) Derivatization of acetaldehyde, acrolein and formaldehyde with the indication of the mass fragment related to the loss of -CF₃ from derivatized analytes after electronic ionization in the mass spectrometric detector. (B) Mass spectrum (MS) of the derivatized acetaldehyde, acrolein and formaldehyde. (C) Part of the GC×GC/TOFMS chromatogram showing the separation in the second chromatographic dimension (²D) of acetaldehyde (DA) and acrolein (DAc) from limonene (L) and methyl hexanoate (MH), respectively. (D) Mass spectra of coeluted compounds found in wines and those from NIST mass spectral library (2005).

53 and -19.3 °C, as shown in Table S1). The improvement in thermal stability of these aldehydes upon derivatization allowed their detection by GC. The mass to charge ratio (m/z) 69 corresponds to CF_3^+ fraction of the derivatizing agent, and this fragment appears in the mass spectra of all derivatized toxic compounds (Figure 1B). The molecular ions (M^+) shown in Figure 1B correspond to the molecular weight of the resulting derivatized compounds (m/z 140, 152 and 126 for acetaldehyde, acrolein and formaldehyde, respectively). The loss of $-CF_3$ from the derivatized analytes (M^+-CF_3) after electronic ionization resulted in the base-ion fragments m/z 71, 83 and 57, for acetaldehyde, acrolein and formaldehyde, respectively. The other analytes, furfural and EC, did not require derivatization since they present suitable stability/volatility for GC analysis (the boiling point of furfural and EC is 162 and 182 °C, respectively as shown in Table S1).

The GC \times GC/TOFMS analysis of Merlot wines revealed that two derivatized toxic compounds coeluted with other volatile compound in the first chromatographic dimension (1D). Figure 1C shows the separation in second chromatographic dimension (2D) between the derivatized acetaldehyde ($^1t_R=14.93$ min; $^2t_R = 2.14$ s) and limonene ($^1t_R=14.93$ min; $^2t_R =5.95$ s), as well as the successful separation between derivatized acrolein ($^1t_R=14.82$ min; $^2t_R=2.7$ s) and methyl hexanoate ($^1t_R=14.82$ min; $^2t_R=4.1$ s). Additionally, Figure 1D presents the respective mass spectra of the 1D coeluting volatile compounds.

Limonene and methyl hexanoate are not involved in toxicity issues, and present aromas described as citrus and fruity, respectively (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). These two pairs of coelutions were found to occur in all Merlot samples of Campanha Gaúcha region herein investigated, whereas the other toxic compounds (formaldehyde, furfural and EC) did not coelute with any other compound.

The occurrence of both coeluting compounds (limonene and methyl hexanoate) has also been previously found in Brazilian Syrah wines from Vale do São Francisco (LAGO *et al.*, 2017) and Moscatel sparkling wines from Serra Gaúcha (SOARES *et al.*, 2015) using GC \times GC/TOFMS and the same column set of the present study. Besides limonene and derivatized acetaldehyde, Lago *et al* (2017) have also found 4-methylethyl pentanoate as a coeluting compound, but this ester was not detected in the Merlot wines under study. However, these coeluted compounds were not found in Merlot wines from other Brazilian region called Serra Gaúcha, and no other compound seems to elute with retention index that would be similar to the toxic compounds in

those wines (Welke, Manfroi, Zanús, Lazarotto, & Zini, 2012). However, two compounds (butyl butanoate and ethyl pyrrole) found only in Chardonnay wines from Serra Gaúcha and seem to be particular of this type of wine, may coelute with derivatized acetaldehyde (Welke, Nicolli, Barbará, Biasoto, & Zini, submitted). This information demonstrates the importance of investigating possible analyte coelution for each type of wine, since the wine chemical profile may vary widely according to grape cultivar and place of production Lago *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2015; Welke *et al.*, 2012). Coelutions verified in the column set used in this study (polar × medium polar) could be resolved by employing a different set of GC columns, with distinct polarity and orthogonality. However, as previously reported by (Welke *et al.*, submitted) other types of coelutions involving these analytes may occur when employing a polar × non polar or non polar × polar column sets.

Quantification of toxic carbonyl compounds in wine samples was performed by 1D-GC/MS in SIM mode. For this purpose, the most intense ion was employed to calculate the peak area for the derivatized forms of acetaldehyde (m/z 71), acrolein (m/z 83) and formaldehyde (m/z 57) (Figure 1B). It is worth mentioning that for derivatized acetaldehyde and acrolein, the quantifier ions used in SIM of 1D-GC/MS were not found in mass spectra of the coeluting compounds (limonene and methyl hexanoate) (Figure 1D). Indeed, these findings indicate the importance of investigating beforehand any possibility of coelution by GC×GC as to avoid erroneous determination and/or quantification of toxic compounds.

Figure 2A shows the separation of the target toxic compounds and internal standards from other wine matrix compounds using scan mode of GC/qMS (Figure 2A). Figure 2B presents the peaks obtained in SIM mode of GC/MS for the ions m/z 57, 83, 71, 96 and 62 at t_R 13.50, 14.25, 14.50, 27.25 and 36.53 min, used to quantify formaldehyde, acrolein, acetaldehyde, furfural and EC, respectively. Peak shown with green line corresponds to a toxic compound found in the sample, blue and pink lines are related to the peaks resulting from the addition of 25 and 50 μL , respectively, of a solution containing 1000 mg L^{-1} of each standard compound. As EC was not detected in wine samples, only peaks related to the addition of the standard solutions could be seen in Figure 2B. Mass spectra of furfural and EC obtained from a wine sample, standard reagents and mass spectra library, which had not reacted with the derivatizing agent, nor coeluted with other compounds in GC×GC/TOFMS are shown in Figure 2C.

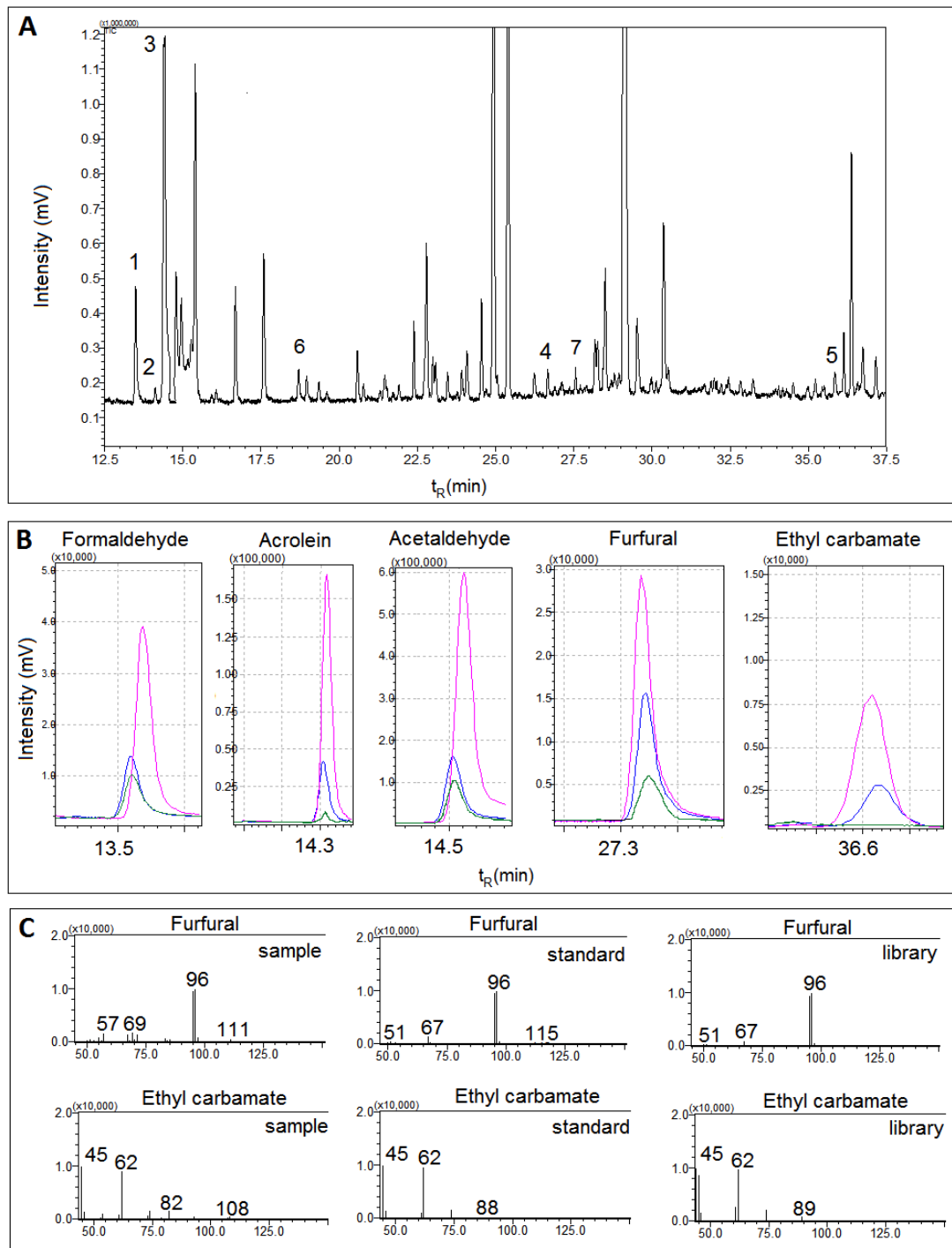


Figure 2. Chromatograms and mass spectra of the toxic compounds evaluated in wines through gas chromatography with mass spectrometric detection (GC/MS). (A) GC/MS chromatogram in scan mode showing the peaks of the toxic compounds (1: formaldehyde, 2: acrolein, 3: acetaldehyde, 4: furfural and 5: ethyl carbamate) and internal standards (6: 2-octanone and 7: methyl nonanoate) of a Merlot wine sample. (B) Peak obtained in SIM mode of GC/MS for the ions m/z 57, 83, 71, 96 and 62 at the retention times 13.50, 14.25, 14.50, 27.25 and 36.53 min used to quantify formaldehyde, acrolein, acetaldehyde, furfural and ethyl carbamate, respectively. Peaks in green line correspond to toxic compounds found in wine samples. Blue and pink lines are related to the addition of 25 and 50 μL , respectively, of a 1000 mg L^{-1} solution containing each standard compound. (C) Mass spectra (MS) of furfural and ethyl carbamate from a wine sample, from standard reagent and mass spectra library, which had not reacted with the derivatizing agent (2,2,2-trifluoroethyl hydrazine, TFEH) nor coeluted with other compounds in comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detector (GC \times GC/TOFMS).

3.2 Method Validation

The analytical performance of 1D-GC/MS-SIM method used to simultaneously determine and quantify the five toxic compounds is shown in Table 1. The calibration curves were carried out in model solutions of must and wine (section 2.1) and showed adequate linearity with determination coefficients (r^2) ranging from 0.9812 to 0.9940 for EC and formaldehyde, respectively. The LOD and LOQ values show that the method is sufficiently sensitive to quantify the five compounds in these matrices. The lowest value of LOD ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) was found for both formaldehyde and furfural, and the highest value was $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ for acetaldehyde. The lower LOQ was found for formaldehyde ($0.4 \mu\text{g L}^{-1}$) and acetaldehyde showed the highest LOQ ($1.5 \mu\text{g L}^{-1}$). Furthermore, recoveries ranged from 91 to 102 %, and the coefficients of variation obtained in assays of repeatability and intermediate precision were lower than 10 %, therefore demonstrating the efficiency of the proposed method.

In general, slightly better values of some validation parameters, including lower LOD/LOQ values and lower relative standard deviation in the repeatability/intermediate precision assays were found for must rather than wine. The differences among the validation parameters found for must and wine models were as follows: (i) LOD/LOQ found in must model were up to $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ lower than those reported for wine, (ii) recoveries were up to 9% higher in must than wine, and (iii) RSD for precision assays were up to 5% lower in model must solutions than those obtained in model wine matrix. These findings may be related to the effect of ethanol present in wine but absent in must. Decreased extraction efficiency with increased ethanol concentration may occur due to competitive adsorption between ethanol and other analytes for the binding sites of fiber coating. Nonetheless, it should be point out that these differences are subtle, since the use of internal standard in the quantification method accounts for the matrix effects.

Even though GCxGC has proved to be important to elucidate the occurrence of coelutions in the first chromatographic dimension (section 3.1), it did not result in improved sensitivity as LOD and LOQ determined with GC/qMS in the present study were similar to the ones found in the method previously validated by Lago *et al.* (2017), using GCxGC/TOFMS. Sensitivity gain due to cryogenic modulation was probably compensated by the fact that SIM mode was employed in GC/qMS. In addition, recovery, repeatability, and precision values obtained with both methods were also of the same order of magnitude. Recovery ranged from 92 to 103% and 91 to 102% when

Table 1. Figures of merit of the analytical method employed for the determination of toxic compounds found in grape, must, after alcoholic fermentation and wine, using gas chromatography with mass spectrometric detection (HS-SPME-GC/ MS) in selected ion monitoring mode (SIM) mode. Experimental conditions are described in sections 2.3 and 2.4.

Compound	Range ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Regression equation	r^2 ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^b	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^c	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^d	Rec. (%) ^e	RSD Rep (%) ^f	RSD Prec. (%) ^g
Formaldehyde	1-100	Must	$y = 14.384x + 1.0436$	0.9922	0.1	0.4	1.0	94	5.4	8.0
		Wine	$y = 31.259x + 0.6648$	0.9940	0.4	1.0		93	7.4	10.2
		Must					50	96	7.6	5.4
		Wine						99	7.7	10.3
		Must					100	97	7.1	5.7
		Wine						97	8.0	10.6
Acrolein	1-100	Must	$y = 1.5818x + 0.0470$	0.9932	0.4	0.9	1.0	91	5.4	8.2
		Wine	$y = 1.9521x + 0.0445$	0.9905	0.7	1.0		90	7.9	9.5
		Must					50	101	5.5	8.7
		Wine						92	6.0	9.7
		Must					100	95	5.0	8.9
		Wine						96	5.3	9.9
Acetaldehyde	1.5-146	Must	$y = 102.84x + 2.1645$	0.9871	0.2	0.8	1.5	96	4.3	10.1
		Wine	$y = 221.69x + 2.6086$	0.9908	0.8	1.5		98	6.4	11.8
		Must					73	100	5.2	5.4
		Wine						91	7.8	10.5
		Must					146	96	4.7	8.7
		Wine						95	8.7	9.0
Furfural	1.4-140	Must	$y = 0.8175x + 0.0038$	0.9668	0.1	1.0	1.4	93	4.0	4.2
		Wine	$y = 0.6661x + 0.0098$	0.9917	0.5	1.4		98	3.7	3.6
		Must					70	96	5.0	8.8
		Wine						100	7.4	9.8
		Must					140	95	6.9	7.7
		Wine						93	3.1	7.0
Ethyl carbamate	1.0-100	Must	$y = 4.6601x - 0.0233$	0.9612	0.3	0.9	1.0	94	3.8	5.1
		Wine	$y = 1.9158x + 0.0308$	0.9625	0.4	1.0		95	4.7	6.3
		Must					50	102	2.9	4.0
		Wine						102	7.0	9.7
		Must					100	97	6.1	7.8
		Wine						90	2.6	4.0

^a r^2 : Determination coefficient; ^bLOD: Limit of detection; ^cLOQ: Limit of quantification; ^dConc.: Concentration corresponding to the lowest, intermediate and higher concentration of analytical curve of each toxic compound used for determining the percentage of repeatability, reproducibility and recovery; ^eRec.: Recovery; ^fRep.: Repeatability (n=7): coefficient of variation of seven independent assays performed under the same analytical conditions on the same day; ^gPrec.: Intermediate precision (n=16): coefficient of variation of four independent assays performed under the same analytical conditions in four different days.

GC×GC/TOFMS and GC/qMS were used, respectively. Repeatability was lower than 13 and 9% for GC×GC/TOFMS and GC/qMS methods, and intermediate precision lower than 12% for both methods. The similarity among results proves the appropriate performance of the two analytical approaches.

3.3 Toxic compounds in winemaking stages

The levels of toxic compounds found in grape, must, after alcoholic fermentation and wine are shown in Figure 3. The levels found in the stages of vinification produced with grapes harvested from two distinct soil types, sandy (A) and clayey (B), were found to be statistically similar at 95% of confidence level ($p > 0.05$). EC has not been included in Figure 3 since this ester was not detected during winemaking (concentration lower than LOD, which is 0.3 and 0.4 for must and wine model solutions, respectively).

Formaldehyde was detected but not quantifiable since its levels were lower than LOQ in all winemaking stages, therefore the concentration of this aldehyde ranges between 0.1-0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LOD and LOQ values, respectively) in grapes and musts, and between 0.2-0.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in samples collected after alcoholic fermentation and wines (Figure 3). Therefore, the values found for this aldehyde in all vinification stages were below 2600 $\mu\text{g L}^{-1}$, which is the safe established concentration for oral exposure by IPCS (IPCS, 2002).

Pesticides used in the vineyard may contain formaldehyde in their formulation. In addition, the presence of this aldehyde, from grape to wine occurs due to the hydrolysis of pectin, which is a grape polysaccharide. Pectin is responsible for the firmness of the berry, and with the advancement of grape maturation this saccharide is hydrolyzed by grape enzymes. In wine, pectinase is added in winemaking to facilitate the extraction of the must from the grapes, resulting in intensified color extraction, and increasing the yield of must. Pectin contains units of galacturonic acid partially esterified with methanol. This alcohol is released after hydrolysis from the grape to must and/or wine and its oxidation produces formaldehyde (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

The high volatility and reactivity of formaldehyde may explain the low levels found in all stages of winemaking. The binding of formaldehyde to phenolic compounds (PISSARRA *et al.*, 2003) and/or sulfur dioxide (SO_2) (AZEVEDO *et al.*, 2007b) has been already reported in wines, as well the chemical connection of other aldehydes under study (acetaldehyde and acrolein) with phenolic compounds or SO_2 , which will

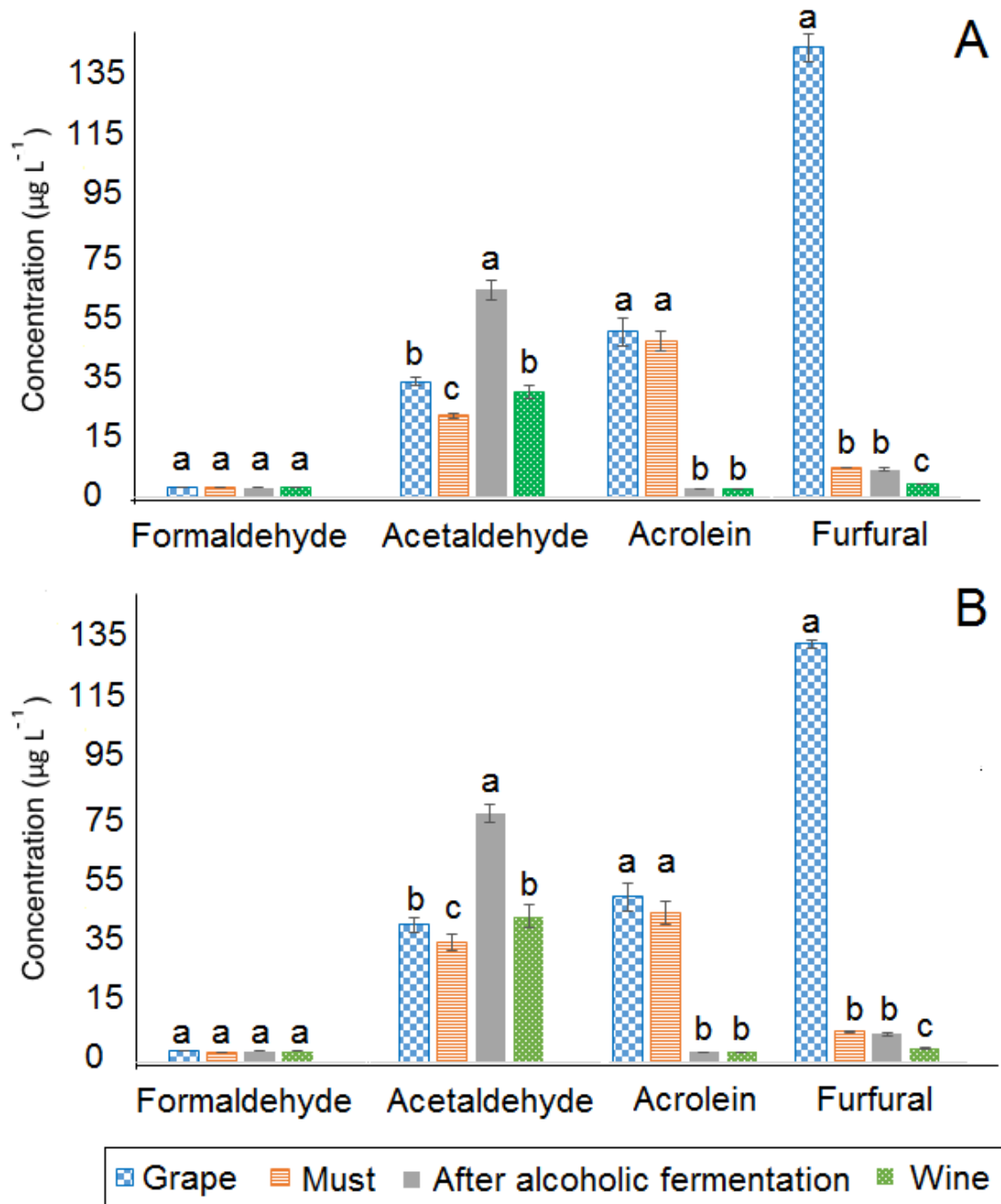


Figure 3. Concentration of toxic compounds (formaldehyde, acrolein, acetaldehyde and furfural) in four stages of Merlot wine winemaking (grape, grape must, after fermentation and wine). Grapes harvested from two areas of the vineyard with sandy (A) and clayey (B) soils were used to produce wines. Bars related to a compound in the winemaking stages followed by the same letter indicate that the levels are not statistically different ($P < 0.05$) by Tukey test. Experimental conditions were described in section 2.3 and 2.4.

be further discussed. Pissarra *et al.*(2003) found that the reaction between an anthocyanin (malvidin 3-glucoside) and a flavanol [(+)-catechin] may be mediated by aldehydes, including formaldehyde. The product of this polymerization reaction

(malvidin 3-glucoside- catechin) increases the intensity of red color, as well as its stabilization in wines (PISSARRA *et al.*, 2003).

The reaction between formaldehyde and SO₂ results in the formation of hydroxymethanosulfonic acid. SO₂ has antimicrobial and antioxidant properties and is added to the must in the form of sodium or potassium bisulfite. The binding between SO₂ and formaldehyde may decrease the preservative capability of the SO₂. Hydroxymethanosulfonic acid is non-volatile and therefore has higher odor threshold than free formaldehyde. Its presence in place of SO₂ might be positive to wine flavour, since the formaldehyde pungent odor may not be perceived by consumers (FRIVIK; EBELER, 2003). Azevedo *et al.*(2007) found that 90% of formaldehyde was present in the bound form, detected as hydroxymethanosulfonic acid, when 50 mg L⁻¹ of sodium bisulfite was added to wines. In the experimental wines under study, 80 mg L⁻¹ of potassium bisulfite was added to the must, which may have resulted in lower percentage of free formaldehyde than those reported by Azevedo *et al.*(2007). HS-SPME-GC/MS is not able to extract/detect formaldehyde in its bound form (to SO₂ or phenolic compounds) as efficiently as the volatile toxic aldehydes studied herein. It is important to be aware that the toxicity of the bound formaldehyde is not known.

Acetaldehyde, acrolein and furfural were found in all winemaking stages. Acetaldehyde was found in grapes and wines in similar concentrations as shown in Figure 3 (median around 36 and 32 µg L⁻¹, respectively), which proved to be not significantly different according to Tukey test (p< 0.05). However, the levels of this aldehyde found in grapes were statistically different from those detected in must and after alcoholic fermentation. At these levels, acetaldehyde contributes to fruity aroma, and only in concentrations higher than 2000 µg L⁻¹, it becomes pungent/unpleasant (AZEVEDO *et al.*, 2007b).

In grapes, acetaldehyde is formed from pyruvate, which is a product of glucose hydrolysis (glycolysis), upon the action of pyruvate decarboxylase during anaerobic respiration. During the development of grapes in the vine, exposure to oxygen determines that pyruvate is directed to the mitochondria, where the Krebs cycle occurs to produce energy. However, as fruit ripens, cell membranes lose selective permeability, and mitochondrial activity is reduced resulting in the inability of the cell to produce sufficient energy. At this point, anaerobic respiration begins to increase the level of available energy, in addition to liberate CO₂ and produce acetaldehyde in grapes (PESIS, 2005).

The concentration of acetaldehyde in musts produced with grapes harvested from the area with sandy (A) and clayey (B) soils (23 and 32 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) was lower than those found in grapes from A and B soils (34 and 38 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively), and statistically different in relation to other winemaking stages, according to Tukey test, $p < 0.05$ (Figure 3).

During must preparation, SO_2 is added as preservative, and phenolic compounds present in grape skin begin to be transferred to must. The electrophilicity of acetaldehyde leads it to react with nucleophiles present in wine, such as SO_2 and phenolic compounds, which decreases the concentration of free acetaldehyde, as detected by GC/MS.

Similarly to what was reported about formaldehyde, these reactions also occur with acetaldehyde. Sheridan & Elias(2016) showed that reactions among acetaldehyde and flavonoids (catechin, tannins and malvidin-3-glucoside) resulted in improved wine color stability (PISSARRA *et al.*, 2003). However, Zea *et al.*(2015) reported that acetaldehyde favored the condensation between phenolic compounds in Sherry wines, which is a fortified wine with protected designation of origin status produced from white grapes grown near the town of Jerez de la Frontera in Andalusia, Spain. This reaction results in products of higher molecular mass that precipitate, thus causing a decrease in color intensity, which is quite undesirable.

Higher levels of acetaldehyde were found after alcoholic fermentation, indicating that *S. cerevisiae* may play an important role in the formation of this compound. Alcohol dehydrogenase of this yeast is able to synthesize acetaldehyde from ethanol, which is the major product of the alcoholic fermentation. Glucose is the primary substrate for the formation of ethanol, and thus of acetaldehyde; however, the metabolism of amino acids such as alanine also contributes to the formation of acetaldehyde. Autoxidation of phenolic compounds is yet another via of acetaldehyde formation, which forms hydrogen peroxide (H_2O_2) capable of oxidizing the ethanol resulting in acetaldehyde (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Acetaldehyde levels (31 and 40 $\mu\text{g L}^{-1}$) in wines produced from grapes of two points of the vineyard with sandy (A) and clayey (B) soils, respectively, as described in section 2.2) were statistically lower than those found after the alcoholic fermentation (63 and 70 $\mu\text{g L}^{-1}$, for A and B soils, respectively). Decrease in acetaldehyde levels found in wine in relation to the previous winemaking step (after alcoholic fermentation) may occur due to the adduct formed between this aldehyde and flavonoids

(SHERIDAN; ELIAS, 2016), as also verified in must preparation. Furthermore, acetaldehyde may be the precursor for the synthesis of other compounds including acetals (such as 1,1-diethoxyethane), sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone), diacetyl (2,3-butanedione) and acetoin (3-hydroxybutanone), which were previously identified as markers of Sherry wines (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015). Figure S1 of Supplementary Material shows a scheme that indicates the reaction of acetaldehyde formation from pyruvate during glycolysis, as well as the routes leading to the formation of acetaldehyde derivatives in wine.

Acetals are formed from the reaction of acetaldehyde with the hydroxyl groups from two alcohol molecules (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Sotolon results from the aldol condensation that occurs between acetaldehyde and α -ketobutyric acid, which is the product of the hydrolysis of an amino acid (such as threonine) (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015). Diacetyl occurs upon the binding of acetaldehyde to acetyl coenzyme A, and acetoin results from the condensation of two acetaldehyde molecules (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015). Table S2 of Supplementary Material shows the acetaldehyde derived compounds found in Merlot wines with their respective structural formula, figures of merit of the method used for their quantification by HS-SPME-GC/MS, t_R in a DB-WAX column, concentration and contribution to wine aroma. Acetals, sotolon and diacetyl were not found in any winemaking step of Merlot under study, and acetoin was detected at $9.6 \mu\text{g L}^{-1}$ and $12.7 \mu\text{g L}^{-1}$ in wines elaborated with grapes harvested from vineyards of sandy and clayey soil, respectively. It should be highlighted that both diacetyl and acetoin are precursors of 2,3-butanediol via enzymatic reaction, and that this alcohol was found in Merlot wines (20.3 and $16.8 \mu\text{g L}^{-1}$, Table S2). The formation of 2,3-butanediol from acetoin may have a positive contribution to wine quality, since acetoin has buttery/cream odor and 2,3-butanediol contributes with floral/fruity notes.

Acrolein was found in higher levels in grapes (49.8 and $45.8 \mu\text{g L}^{-1}$ from points A and B of the vineyard, respectively), which were not statistically different from those present in the second step of winemaking (after must preparation, 46.8 and $41.1 \mu\text{g L}^{-1}$ found in winemaking A and B, respectively). The occurrence of this aldehyde in the atmospheric air can justify its presence in the grapes and therefore also in the must. Acrolein may be released to the environment during incomplete combustion processes (petrochemical fuels, wood, cigarette smoking among others), and it is formed as a photooxidation product of hydrocarbon pollutants found in air, including propylene and

1,3-butadiene(BURCHAM, 2017). In fact, the wood burning in fireplaces and wood stoves/ovens is a frequent practice in cold areas such as Campanha Gaúcha. In addition, the generation of heat through the burning of wood is done around the vineyard to protect it from frosting. The impact of the exposure of grapes to smoke in a South African vineyard was studied by Vries, Mokwena, Buica, & Mckay (2016) with focus on phenolic compounds derived from wood burning. The authors reported that the accumulation of these compounds during grape ripening adversely affected the quality of Cabernet Sauvignon wines.

Acrolein was not found after alcoholic fermentation nor in wine (levels lower than LOD, $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$). This aldehyde may also react with SO_2 and polyphenols, which may explain the non-detection of acrolein in the last two stages of vinification. Additionally, the interaction acrolein-phenolic compounds is reported to contribute to the bitterness, which impairs the sensory quality of wine (BAUER; KOSSMANN, 2010). The reduction of acrolein levels across the winemaking stages appears to be greater than that observed for acetaldehyde possibly because of the following aspects (i) the formation of acrolein during vinification either does not occur or take place in small extent, whereas the amount of acetaldehyde formed during fermentation is expressive, and/or (ii) acrolein has multiple sites in its structural formula at which the electron density is low and are consequently more polarizable than acetaldehyde, allowing for a more expressive interaction of acrolein with the nucleophiles present in wine, such as SO_2 and polyphenols (KÄCHELE *et al.*, 2014).

Furfural was found in higher concentration in grapes (140 and $120 \mu\text{g L}^{-1}$ coming from sites A and B of the vineyard, respectively) than in any other winemaking step (Figure 3). Statistically similar levels of this aldehyde were found in both, the musts (6.6 and $6.1 \mu\text{g L}^{-1}$ for winemaking A and B, respectively) and after alcoholic fermentation (6.0 and $5.3 \mu\text{g L}^{-1}$ for winemaking A and B, respectively), which were statistically different from the levels found in wines (1.4 and $1.1 \mu\text{g L}^{-1}$ for winemaking A and B, respectively). Furfural may occur in grapes due to its presence in atmospheric pollution, which may be related to wood burning, a common practice at Campanha Gaúcha region as formerly mentioned. Kennison, Wilkinson, Williams, Smith, & Gibberd (2007) found furfural in Verdelho grapes from Australia exposed to straw-derived smoke and the following negative aroma descriptors 'smoky', 'dirty', 'earthy', 'burnt' and 'smoked meat' were perceived in wine.

The concentration of furfural decreased throughout the winemaking steps, although six other furan-containing compounds were found from must to wine as shown in Table 2. Therefore, it seems that furfural detected in grapes may undergo transformations during winemaking giving rise to its derivative compounds. Table S3 of Supplementary Material shows the structural formula, t_R in a DB-WAX column, retention index, contribution to aroma and concentration of the furan-containing compounds found in winemaking stages. Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone (DPF) was found in must and after alcoholic fermentation. Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid was detected after alcoholic fermentation and in wine. Other compounds, namely 5-ethoxydihydro-2(3H)-furanone, 5-(1,2-dihydroxyethyl)-dihydrofuran-2-one (DEDF), 5-butyldihydro-2(3H)-furanone and tetrahydro-5-methyl-2-furanmethanol, were only found in wine. The levels of furan-derivatives ranged from 4.5 to 139.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DPF and DEDF found in must and wine, respectively. These furan-containing compounds may also occur in wines placed in contact with wood barrel, or that had aged at high temperatures (around 50 °C), as previously reported for Madeira wines by Perestrelo *et al.* (2015). Nonetheless, the wines under study herein were not matured in toasted wood nor submitted to heating, thus indicating furfural detected in grapes as one of the possible precursors for these compounds during winemaking.

Table 2. Concentration and relative standard deviation (RSD) of furan-containing compounds verified in Merlot grapes, musts, after alcoholic fermentation and experimental wines from Campanha Gaúcha, Brazil produced as described in section 2.2. Characteristics (structural formula, CAS, retention time (t_R) in a DB-WAX column, retention index and contribution to aroma) and figures of merit of the method used for quantification by HS-SPME-GC/MS were detailed in Table S3.

Samples	Vn ^a	DPF ^b	EDF ^c	DEDF ^d	BDF ^e	OTFCA ^f	TMF ^g
Must	A	6.7±6.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	B	4.5±2.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
After alcoholic fermentation	A	15.5±4.1	<LOD	<LOD	<LOD	61.1±5.5	<LOD
	B	13.3±9.0	<LOD	<LOD	<LOD	66.9±6.7	<LOD
Wine	A	<LOD	116.4±9.4	139.4±5.6	34.7±4.3	138.9±7.0	108.9±8.9
	B	<LOD	129.0±7.8	120.9±7.1	44.3±6.6	122.9±4.5	104.3±5.4

^aVn: Vinification done with grapes harvested in two different vineyard points with sandy (A) and clayey (B) soils as detailed in section 2.2; ^bDPF: Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone; ^cEDF: 5-Ethoxydihydro-2(3H)-furanone; ^dDEDF: 5-(1,2-Dihydroxyethyl)-dihydrofuran-2-one; ^eBDF: 5-Butyldihydro-2(3H)-furanone; ^fOTFCA: 5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid; ^gTMF: Tetrahydro-5-methyl-2-furanmethanol; <LOD: The compound was found in this stage in levels lower than LOD.

3.4 Determination of concentration, EDI and MOE of target toxic compounds in commercially available wines

EC was not detected in commercial wines (values lower than LOD, $1 \mu\text{g L}^{-1}$), but has already been quantified in red and white wines from China ($13.7 \mu\text{g L}^{-1}$) (Zhang *et al.*, 2014), Portugal ($54.1 \mu\text{g L}^{-1}$) (PERESTRELO *et al.*, 2010) and Brazil ($14.4 \mu\text{g L}^{-1}$) (NÓBREGA *et al.*, 2015). Formaldehyde was found in all wines under study at levels between LOD and LOQ (0.4 and $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively). This aldehyde was found in red wines produced in Germany ($130 \mu\text{g L}^{-1}$) (JENDRAL; MONAKHOVA; LACHENMEIER, 2011) and white wine from China ($4,830 \mu\text{g L}^{-1}$) (Zhang *et al.*, 2011).

Toxic carbonyl compounds were quantified in commercial wines to verify if the exposure to these compounds poses risk to consumer health. The concentrations and EDI of acetaldehyde, acrolein, and furfural found in commercial wines are presented in Table 3 and are compared with the median values formerly reported in the literature. Acrolein was found in 50% of wines in concentration ranging from 1 to $29.8 \mu\text{g L}^{-1}$ (median $15.9 \mu\text{g L}^{-1}$) and these the levels were higher than those reported by Kächele *et al.* (2014) for German wines ($0.7 \mu\text{g L}^{-1}$).

Acetaldehyde and furfural were detected in all samples in levels ranging from 1.5 to 113.5 and 1.6 to $227.9 \mu\text{g L}^{-1}$ with medians of 16.6 and $30.9 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The median levels of these toxic compounds in commercially available wines were higher than those found in the stages of winemaking shown in section 3.3 Therefore, storage may also play an important role in the formation of these toxic compounds. The concentration of precursors, temperature, position of bottle and cork characteristics during storage may be related to toxic compounds levels (Perestrelo *et al.*, 2015).

Acetaldehyde was detected in red wines ($55800 \mu\text{g L}^{-1}$) produced in Italy (PAIANO *et al.*, 2014), white wines from, Portugal ($53489 \mu\text{g L}^{-1}$) (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006) and China ($67500 \mu\text{g L}^{-1}$) (Zhang *et al.*, 2011). Furfural was found in Portuguese white wines matured in oak barrel at levels of 7900 (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006) and $1876 \mu\text{g L}^{-1}$ (PERESTRELO; SILVA; CÂMARA, 2015).

Table 3. Concentration, estimated daily intake (EDI) and margin of exposure (MOE) of toxic compounds found in commercial Merlot wines produced in Campanha Gaúcha region, Brazil. MOE values that represent risk to consumer health (MOE < 10,000) were underlined.

S ^b	Winery ^c	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm RSD (%) ^a			EDI for women; men (ng kg^{-1} body weight)			MOE for women; men	
		Acrolein	Acetaldehyde	Furfural	Acrolein	Acetaldehyde	Furfural	Acrolein	Acetaldehyde
1	A-2011	0.8 \pm 4.5	23.2 \pm 1.3	53.6 \pm 8.7	2.6; 3.3	76.1; 96.7	175.7; 223.3	137,250; 108,000	736,207; 579,310
2	A-2012	<LOD ^d	92.8 \pm 9.2	24.4 \pm 8.7	NC ^e	304.3; 386.7	80.0; 101.7	NC ^e	184,052; 144,828
3	B-2012	<LOQ ^f	<LOQ ^f	16.8 \pm 4.9	2.3; 2.9 ^g	2.6; 3.3 ^g	55.1; 70.0	156,857; 123,429 ^g	21350000; 16800000 ^g
4	C-2013	11.8 \pm 2.8	18.6 \pm 4.8	111.6 \pm 4.7	38.7; 49.2	61.0; 77.5	365.9; 465.0	<u>9305; 7322</u>	918,280; 722,581
5	C-2014	22.6 \pm 10.8	3.7 \pm 11.7	31.7 \pm 16.7	74.1; 94.2	12.1; 15.4	103.9; 132.1	<u>4858; 3823</u>	4,616,216; 3,632,432
6	D-2012	18.2 \pm 6.2	14.4 \pm 9.9	123.1 \pm 8.2	59.7; 75.8	47.2; 60.0	403.6; 512.9	<u>6033; 4747</u>	1,186,111; 933,333
7	D-2013	<LOD	13.5 \pm 4.2	38.5 \pm 2.6	NC ^e	44.3; 56.3	126.2; 160.4	NC ^e	1,265,185; 995,556
8	E-2011	29.8 \pm 7.7	13.1 \pm 4.1	227.9 \pm 5.1	97.7; 124.2	43.0; 54.6	747.2; 949.6	<u>3685; 2899</u>	1,303,817; 1,025,954
9	E-2014	10.0 \pm 7.5	1.6 \pm 9.5	20.6 \pm 5.8	32.8; 41.7	5.2; 6.7	67.5; 85.8	10,980; <u>8640</u>	10,675,000; 8,400,000
10	F-2012	24.8 \pm 10.2	23.9 \pm 5.2	77.0 \pm 6.7	81.3; 103.3	78.4; 99.6	252.5; 320.8	<u>4427; 3484</u>	714,644; 562,343
11	G-2009	9.0 \pm 10.5	<LOQ ^f	30.1 \pm 5.0	29.5; 37.5	2.6; 3.3 ^g	98.7; 125.4	12,200; <u>9600</u>	21350000; 16800000 ^g
12	H-2011	<LOD ^d	6.4 \pm 8.9	29.0 \pm 6.9	NC ^e	21.0; 26.7	95.1; 120.8	NC ^e	2,668,750; 2,100,000
13	H-2011	<LOD ^d	25.2 \pm 9.9	75.4 \pm 0.2	NC ^e	82.6; 105.0	247.2; 314.2	NC ^e	677,778; 533,333
14	H-2012	<LOD ^d	10.7 \pm 10.9	161.3 \pm 10.7	2.3; 2.9 ^g	35.1; 44.6	528.9; 672.1	156,857; 123,429 ^g	1,596,262; 1,256,075
15	H-2014	<LOD ^d	3.6 \pm 8.8	57.1 \pm 1.6	NC ^e	11.8; 15.0	187.2; 237.9	NC ^e	4,744,444; 3,733,333
16	I-2013	<LOD ^d	<LOQ ^f	18.3 \pm 9.4	NC ^e	2.6; 3.3 ^g	60.0; 76.3	NC ^e	21350000; 16800000 ^g
17	J-2013	<LOD ^d	33.1 \pm 10.5	1.6 \pm 4.6	NC ^e	108.5; 137.9	5.2; 6.7	NC ^e	516,012; 406,042
18	K-2008	<LOD ^d	113.5 \pm 10.7	22.4 \pm 9.9	NC ^e	372.1; 472.9	73.4; 93.3	NC ^e	150,485; 118,414
19	K-2011	<LOD ^d	32.1 \pm 6.4	21.9 \pm 7.8	NC ^e	105.2; 133.8	71.8; 91.3	NC ^e	532,087; 418,692
20	L-2008	<LOD ^d	16.6 \pm 9.1	22.3 \pm 8.6	NC ^e	54.4; 69.2	73.1; 92.9	NC ^e	1,028,916; 809,639
Average		15.9	26.2	58.2	42.1; 53.5	73.5; 93.4	190.9; 242.6	50,245; 39,537	4,878,212; 3,838,593
Median		15.0	16.6	30.9	35.7; 45.4	45.7; 58.1	101.3; 128.8	10,143; 7981	1,225,648; 964,444

^aRSD: Relative standard deviation; ^bS: Sample; ^cWinery and year of production; ^d<LOD: Toxic compound was found in this sample in levels lower than LOD; ^eNC: Not calculated. EDI and MOE were not calculated for acrolein in samples 2, 7, 12, 13 and 15-20, since this compound has not been detected in these samples (values lower than LOD; <0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$); ^fToxic compound was found in this sample in levels lower than LOQ; ^gg EDI and MOE related to acrolein and acetaldehyde of sample 3 were calculated using the LOD values of these compounds (0.7 and 0.8 $\mu\text{g L}^{-1}$), since these compounds have not been quantified in this sample (levels within LOD and LOQ).

Furfural showed the highest median EDI (0.10 and 0.13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of bw for women and men, respectively, Table 3), followed by the median values of exposure to acetaldehyde (0.46 and 0.58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of bw for women and men, respectively) and acrolein (0.36 and 0.45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of bw for women and men, respectively). In addition to furfural, 16 other furan-containing compounds were found in commercial wines that were shown in Table S4 of Supplementary Material.

The most frequently detected furan-containing compounds were tetrahydrofuran, 2,5-dimethylfuran and 5-methyl furfural, which were found in all samples. Considering the samples presented in Table S4, the median EDI of furan-containing compounds was 62.2 and 93.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of bw for women and men, respectively. Among these furan-containing compounds, only ethyl 2-furoate is included in the ADI that is the safe ingestion parameter of furan derived compounds (500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of bw) established by JECFA (2000). Even if the other furan-compounds detected in this study were included in ADI established by JECFA (2000), the EDI would not exceed the safe parameter. Therefore, these EDI values indicated that the exposure to these compounds through wine consumption does not represent a risk to human health. Nevertheless, other foods/beverages could be a potential source of exposure to these toxic compounds. Furan-containing compounds are characteristic flavor products of the Maillard reaction, commonly found in baked products, coffee, roast beef, and others sources.

Since acrolein and acetaldehyde are genotoxic compounds, the risk characterization was done through the calculation of MOE. Exposure of men (daily consumption of 300 mL of wine) to acrolein may pose risk on the consumer's health, since MOE values were lower than 10,000 in 7 out of 10 samples in which this compound was quantified. Regarding the exposure of acrolein to women, only five samples of this study may pose a health risk, since the recommended daily intake of wine for women (200 mL) is lower than for men (300 mL). The exposure to acetaldehyde presents no risk on the health for both sexes (MOE was below 10,000 in all samples).

4 Conclusions

A preliminary GC \times GC/TOFMS analysis was of utmost importance to verify possible coelutions between the target toxic compounds and other volatile constituents of wine, providing information for the appropriate selection of ions for the quantification

of the target toxic compounds by GC/qMS-SIM. Validation parameters showed that the HS-SPME-GC/MS-SIM method herein developed was able to simultaneously determine formaldehyde, acrolein, acetaldehyde, furfural and EC in different winemaking stages of Merlot wine production and in commercial samples.

The results of this study contributed to identify the critical points related to the presence of toxic compounds during the winemaking stages of Merlot wines, including the production of acetaldehyde during alcoholic fermentation, as well as possible environmental contamination of grapes with acrolein and furfural. EC was not detected, and formaldehyde was found in levels between LOD and LOQ of HS-SPME-GC/qMS method in all samples evaluated, along winemaking and commercial wines. Acrolein and furfural were found from grapes to wine, although throughout the winemaking steps their levels were reduced. Furfural seems to be a precursor for other furan-containing compounds formed during vinification. These toxic aldehydes may react with nucleophilic compounds such as phenolics and SO₂, which may explain their reduction throughout the winemaking. Acetaldehyde was also found in grapes, and was the only compound with increased concentration during the alcoholic fermentation.

Acrolein, acetaldehyde and furfural were also found in commercial wines, and only the exposure to acrolein may represent risk to consumer's health. The reduction of acrolein levels in grapes is necessary to protect consumers from the hepatotoxic effects, occurrence of atherosclerosis and Alzheimer's disease, which are related to the oral exposure to this compound. Reduction of the emission of acrolein to the environment may be achieved by replacing wood burning by another heat source in fireplaces/wood stoves, and in protecting the vineyard from frost. The awareness of the population living around vineyards to abandon the practice of burning garbage and vegetation can also contribute to the reduction of acrolein levels in grapes.

Acknowledgements

Authors thank National Council of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq. Project BJT 401581/2014-4; CNPq project Pq 306067/2016-1), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES) and Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS,

Edital Pesquisador Gaúcho, Project 1995-2551/13-7) for financial support and scholarships.

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BARLOW, S. *et al.* Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic. Report of an International Conference organized by EFSA and WHO with

support of ILSI Europe. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1636–1650, 2006.

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

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

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

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

BOOBIS, A. *et al.* Interpretation of the margin of exposure for genotoxic carcinogens- Elicitation of expert knowledge about the form of the dose response curve at human relevant exposures. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 106–118, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OIV. **International Organisation of Vine and Wine. World vitiviniculture situation.** Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/en-Bilan_OIV_Mainz_2015>. Acesso em: 19 jan. 2016a.

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

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

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

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

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

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

pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1381, p. 54–63, 2015.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XU, M. *et al.* Magnetic solid-phase extraction of phthalate esters (PAEs) in apparel textile by core-shell structured Fe₃O₄ silica triblock-copolymer magnetic microspheres. **Talanta**, v. 150, p. 125–134, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

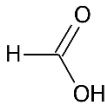
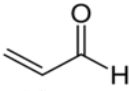
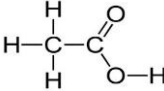
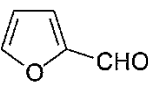
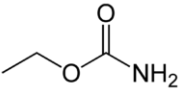
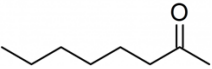
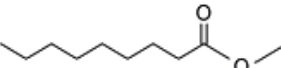
ZHAO, X.; JIANG, C. Determination of ethyl carbamate in fermented liquids by ultra high performance liquid chromatography coupled with a Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 177, p. 66–71, 2015.

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

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

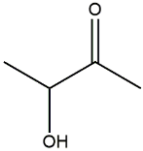
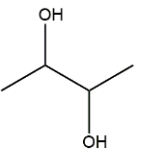
Supplementary Material

Table S1. Toxic compounds with their respective chemical structure, molecular weight, boiling point, retention time (t_R), monitored ions in gas chromatography analyses, and the indication of the internal standards (IS) used in the quantification.

	CS ^a	MW (g/mol) ^b	BP (°C) ^c	t_R (min)	Monitored ions ^d	
Toxic compounds	Formaldehyde		30.03	-19.3	13.45	<u>57</u> ; 126
	Acrolein		56.06	53	14.20	<u>83</u> ; 55; 152
	Acetaldehyde		44.05	20.2	15.00	<u>71</u> ; 140
	Furfural		96.07	162	27.25	<u>96</u> ; 95
	Ethyl carbamate		89.08	182	36.50	<u>62</u> ; 74; 89
IS	2-Octanone ^e		128.2	173.5	18.80	<u>58</u> ; 71
	Methyl nonanoate ^e		172.3	213.5	28.45	<u>74</u> ; 87

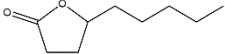
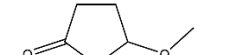
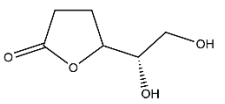
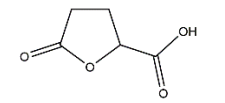
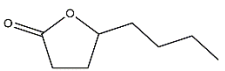
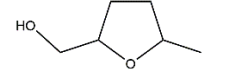
^a CS: chemical structure; ^b MW: molecular weight; ^cBP: boiling point; ^d quantifier ion is underlined and in bold; ^e 2-octanone and methyl nonanoate were use as internal standard.

Table S2. Acetaldehyde derivatives quantified in experimental wines produced as described in section 2.2 with their structural formula, Chemical Abstracts Service (CAS) registry number, retention time (t_R) in the DB-WAX column, retention index, contribution to aroma and figures of merit of the method used for the quantification by HS-SPME-GC/MS.

Compound	3-Hydroxy-2-butanone (acetoin)	2,3-Butanediol
Structural formula		
CAS	513-86-0	513-85-9
Tr (min)	18.6	29.8
RI exp	1300	1566
RI lit	1309	1563
Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm RSD	12.7 \pm 0.6 (A) ^b ; 9.6 \pm 0.9 (B) ^b	20.3 \pm 3.0 (A) ^b ; 16.8 \pm 3.6 (B) ^b
Regression equation (RE); R ² ; Concentration range (CR); LOD and LOQ ^a	RE: $y=54700x+118000$; R ² : 0.994; CR: 4.3-425 $\mu\text{g L}^{-1}$; LOD: 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOQ: 1 $\mu\text{g L}^{-1}$	RE: $y=15800x+30900$; R ² : 1; CR: 4.5-450 $\mu\text{g L}^{-1}$; LOD: 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOQ: 2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Aroma ^c	Buttery, cream	Fruity, floral

RI_{exp}: Experimental retention index obtained with a DB-WAX column in GC/qMS; RI_{lit}: Retention index reported in scientific literature and obtained in polar columns; RSD: Relative standard deviation; ^a Figures of merit of the HS-SPME-GC/MS analytical method for quantification of each compound: R²: determination coefficient; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; ^b Vinification done with grapes harvested from two vineyard points with sandy (A) and clayey (B) soil as detailed in section 2.2 of Material and Methods; ^caroma description previously reported by Welke, J. E., Manfroi, V., Zanus, 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.

Table S3. Characteristics (structural formula, CAS, retention time (t_R) in a DB-WAX column, retention index and contribution to aroma) and figures of merit of the method used for quantification by HS-SPME-GC/MS of furan-containing compounds quantified in grape, must, after alcoholic fermentation and in wine.

Compounds	Structural formula	CAS	T_R (min)	RI exp ^a	RI lit ^b	Aroma ^L	Regression equation (RE); r^2 ; Concentration range (CR); LOD and LOQ ^c
Furan-compounds							
DPF ^d		104-61-0	43.43	1999	2007 ^j	Coconut [1]	
EDF ^e		932-85-4	36.75	1784	1794 ^j	Caramel [2]	Analytical curve of furfural was used to quantify DPF, EDF, DEDF and OTFCA RE: $y=594.44+22.758x$; R ² : 0.995; CR: 3-140 $\mu\text{g L}^{-1}$; LOD: 1.2 and LOQ 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$
DEDF ^f		61989-58-0	45.02	2193	NF	NF	
OTFCA ^g		1126-51-8	44.52	2177	2174 ^j	Sweet, coconut [3]	
BDF ^h		104-50-7	43.44	1932	1936 ^k	Coconut-like [4]	Analytical curve of 2-furanmethanol was used to quantify BDF and TMF RE: $y=533.2x - 2225.7$; R ² : 0.995; CR: 4.5-120 $\mu\text{g L}^{-1}$; LOD: 4.5 and LOQ 10.0 $\mu\text{g L}^{-1}$
TMF ⁱ		6126-49-4	46.02	2222	NF	NF	

^aRI exp: Experimental retention index obtained in a DB-WAX column of GC/qMS; ^bRI lit: Literature retention index obtained in polar column; ^c Figures of merit of the analytical method based on the use of HS-SPME-GC/MS for the determination of each compound: r^2 : determination coefficient; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; ^d Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone; ^e 5-Ethoxydihydro-2(3H)-furanone; ^f 5-(1,2-Dihydroxyethyl)-dihydrofuran-2-one; ^g 5-Butyldihydro-2(3H)-furanone; ^h 5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid; ⁱ Tetrahydro-5-methyl-2-furanmethanol; ^j Welke, J. E., Manfroi, V., Zanus, 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; ^k Hognadóttir, Á.; Rouseff, R. L. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998, 201–211; ^L Odour description was found in [1] Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, v. 103, p. 1228–1236; [2] Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M. L., Hernández, L. M., Ramírez, M. (2015) Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-11; [3] Panceri, C. P., Burin, V. M., Caliarì, V., Amboni, R. D. M. C., Bordignon-Luiz, M.T. (2017). Aromatic character of Cabernet Sauvignon and Merlot wines produced with grapes dried under controlled conditions. *European Food Research and Technology*, 243, p. 609–618; [4] Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F.F., Câmara, J. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta*, v. 563, p. 154–164; NF: not found in literature.

Table S4. Concentration of furan-containing compounds in commercially available Merlot wines produced in Campanha Gaúcha region, Brazil.

Compounds	CAS	RI _{calc} ^b	RI _{lit} ^c	Samples/Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm RSD (%) ^a					
				1	3	4	6	8	16
Dihydro-5-pentyl-2-furanone	104-61-0	2000	2007 [1]	61.7 \pm 5.0	33.7 \pm 3.3	38.3 \pm 1.5	87.8 \pm 89.2	<LOD	90.3 \pm 6.0
5-Butyldihydro-2(3H)-furanone	104-50-7	1943	1936 [2]	49.4 \pm 6.4	<LOD	36.3 \pm 1.0	61.3 \pm 68.5	110.3 \pm 1.7	56.4 \pm 3.2
5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	1126-51-8	2180	2174 [1]	35.9 \pm 4.0	37.1 \pm 8.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Tetrahydrofuran	109-99-9	833	829 [1]	123.0 \pm 3.6	39.0 \pm 0.9	88.5 \pm 3.8	204.5 \pm 106.2	265.8 \pm 2.7	221.4 \pm 3.9
2,5-Dimethylfuran	625-86-5	948	953 [3]	4180.3 \pm 0.2	4179.2 \pm 0.2	4177.2 \pm 9.0	4188.6 \pm 0.0	4180.3 \pm 0.2	4200.5 \pm 0.8
5-Methylfurfural	620-02-0	1610	1600 [1]	46.6 \pm 3.4	30.7 \pm 0.6	35.0 \pm 1.2	54.4 \pm 57.3	78.6 \pm 6.6	82.3 \pm 7.3
2-Furanmethanol	98-00-0	1876	1680 [1]	4174.9 \pm 6.9	4176.5 \pm 0.1	4174.3 \pm 4.0	4178.8 \pm 0.1	<LOD	4179.0 \pm 0.1
Pantolactone	79-50-5	2160	2158 [1]	50.8 \pm 1.8	31.1 \pm 3.6	<LOD	<LOD	69.7 \pm 5.8	48.0 \pm 7.0
Difurfuryl ether	4437-22-3	1999	1996 [1]	4177.9 \pm 0.1	<LOD	4174.5 \pm 0.0	4203.2 \pm 0.6	<LOD	<LOD
1-(2-Furanyl)-ethanone	1192-62-7	1501	1498 [3]	4175.7 \pm 9.6	<LOD	<LOD	4180.2 \pm 0.1	4182.5 \pm 0.3	4182.9 \pm 0.1
Ethyl 2-furoate	614-99-3	1619	1627 [1]	4179.6 \pm 0.2	<LOD	4176.1 \pm 6.8	4200.2 \pm 0.6	4192.1 \pm 0.6	4198.5 \pm 0.3
2-Pentylfuran	3777-69-3	1260	1258 [1]	<LOD	<LOD	4174.2 \pm 4.9	<LOD	<LOD	4174.3 \pm 5.8
Oaklactone	39212-23-2	1907	1910 [1]	<LOD	<LOD	<LOD	235.9 \pm 2.9	<LOD	752.0 \pm 1.5
2(5H)-Furanone	497-23-4	1710	1703 [1]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	32.7 \pm 10.1
γ -Valerolactone	542-28-9	1599	1589 [1]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	32.4 \pm 9.3
2-Methylfuran	534-22-5	801	798 [1]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4175.0 \pm 5.4	<LOD
Concentration total ($\mu\text{g L}^{-1}$)				21255.8	8527.3	21074.4	21594.9	17254.3	22250.7
EDI for women and men, respectively (ng kg ⁻¹ bw)				69700; 88600	28000; 35500	69100; 87800	70800; 90000	56600; 71900	73000; 92700

^a Relative standard deviation; ^b Retention index obtained in a DB-WAX column; ^c Literature retention index obtained in polar columns as reported previously by [1] Welke, J. E., Manfroi, V., Zanus, 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; [2] Hognadóttir, Á.; Rouseff, R. L. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998, 201–211; [3] Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J., Schorr-Galindo, S. (2007). Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 297–307; < LOD: toxic compound was found in this sample in levels lower than LOD found for furfural (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) as shown in Table 1.

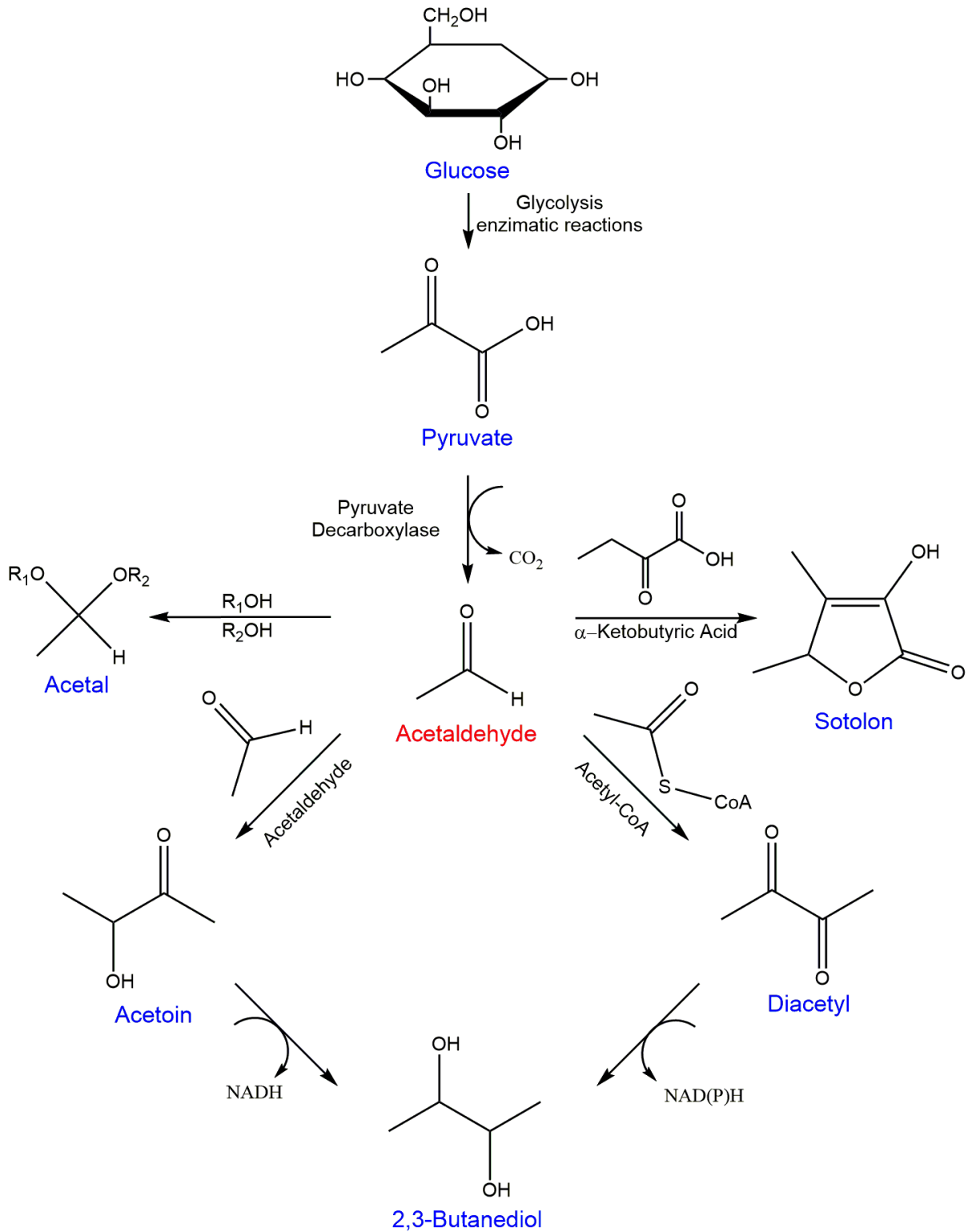


Figure S1- Acetaldehyde formation from pyruvate during glycolysis and routes of formation of acetaldehyde derivatives in wine, including acetals, sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone), diacetyl (2,3-butanedione), acetoin (3-hydroxybutanone) and 2,3-butanediol.

5 DISCUSSÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

esterificadas com metanol. Após a hidrólise da pectina, seja durante a maturação da uva ou pelas ação pectinases adicionadas ao mosto, este álcool é liberado e sua oxidação produz formaldeído (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). No entanto, os baixos níveis de formaldeído encontrados em todas as etapas da vinificação podem ser explicados pela alta volatilidade, reatividade, e possíveis ligações deste aldeído com compostos fenólicos e/ou SO₂ conforme previamente demonstrado por Azevedo *et al.* (2007b), Frivik; Ebeler (2003), Pissarra *et al.* (2003).

O acetaldeído, acroleína e furfural também foram encontrados em todas as etapas da vinificação. O acetaldeído foi encontrado na uva (35,8 µg kg⁻¹) e no vinho (35,5 µg L⁻¹) em concentração estatisticamente similar de acordo com o teste de Tukey (p <0,05). No entanto, os níveis encontrados deste aldeído nas uvas foram estatisticamente diferentes daqueles detectados no mosto (27,7 µg L⁻¹) e após a fermentação alcoólica (66,8 µg L⁻¹). Nas uvas, o acetaldeído é formado a partir do piruvato durante a respiração anaeróbica pela ação da piruvato descarboxilase (PESIS, 2005). No preparo do mosto, o SO₂ é adicionado como conservante e os compostos fenólicos presentes na casca da uva começam a ser transferidos para o mosto. Da mesma forma que o formaldeído, o acetaldeído também pode reagir com os fenólicos conforme demonstrado por Sheridan & Elias (2016), Pissarra *et al.* (2003), Zea *et al.* (2015), diminuindo assim a concentração de acetaldeído livre capaz de ser detectado por HS-SPME-GC/MS-SIM. Após a fermentação alcoólica, os níveis deste aldeído aumentaram, o que pode indicar que a álcool desidrogenase da *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de reduzir o acetaldeído a etanol, que é o principal produto da fermentação alcoólica (LIU; PILONE, 2000). Outra via de formação do acetaldeído é a auto-oxidação de compostos fenólicos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Os níveis de acetaldeído nos vinhos (35,5 µg L⁻¹) foram estatisticamente inferiores aos níveis encontrados após a fermentação alcoólica (66,8 µg L⁻¹). A diminuição nas concentrações deste aldeído pode ocorrer devido as possíveis ligações com flavonóides (SHERIDAN; ELIAS, 2016), assim como verificado na preparação do mosto. Além disso, o acetaldeído pode ser precursor para a síntese de outros compostos incluindo acetais (como o 1,1-dietoxietano), sotolon (3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona), diacetil (2,3-butanodiona) e acetoína (3-hidroxiбутанона), os quais podem ser encontrado em vinhos (ZEA; SERRATOSA; JULIETA, 2015).

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÃO

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

Na determinação dos compostos tóxicos, o CE não foi detectado e o formaldeído foi encontrado em concentrações superiores ao LOD e inferiores ao LOQ em todas as etapas da vinificação e nos vinhos comerciais. Acroleína e furfural foram encontrados nas uvas e seus níveis reduziram ao longo da vinificação. O furfural parece ser um precursor para outros compostos contendo furano formados durante a vinificação. O acetaldeído foi detectado em todas as etapas, sendo que as maiores concentrações foram após a fermentação alcoólica. A eletrofilicidade desses aldeídos tóxicos pode levá-los a reagir com compostos nucleofílicos, como os fenólicos e SO₂, o que pode explicar redução dos mesmo ao longo da vinificação. Estes resultados contribuíram para identificar os pontos críticos de controle relacionado à presença de compostos tóxicos durante as etapas da vinificação de vinho Merlot, incluindo a produção do acetaldeído durante a fermentação alcoólica, bem como a contaminação das uvas com acroleína e furfural através do ar atmosférico.

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BOOBIS, A. *et al.* Interpretation of the margin of exposure for genotoxic carcinogens- Elicitation of expert knowledge about the form of the dose response curve at human relevant exposures. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 106–118, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por

cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JACKSON, R. S. **Wine Science Principles, Practice, Perception.** 2^a. ed. Ontario: ACADEMIC PRESS, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OIV. **International Organisation of Vine and Wine. World vitiviniculture situation.** Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/en-Bilan_OIV_Mainz_2015>. Acesso em: 19 jan. 2016a.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XU, M. *et al.* Magnetic solid-phase extraction of phthalate esters (PAEs) in apparel textile by core-shell structured Fe₃O₄ silica triblock-copolymer magnetic microspheres. **Talanta**, v. 150, p. 125–134, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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