



**SABRINA DE BONA SARTOR**

**COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS CHARDONNAY (*Vitis vinifera* L.)  
PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS**

**Campinas**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**SABRINA DE BONA SARTOR**

**COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS CHARDONNAY (*Vitis vinifera* L.)  
PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS**

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora, na área de Ciência de Alimentos.*

**Orientadora: Profa. Dra. HELENA TEIXEIRA GODOY**

**Co-orientador: Prof. Dr. RODRIGO RAMOS CATHARINO**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SABRINA DE  
BONA SARTOR E ORIENTADA PELO PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>.  
HELENA TEIXEIRA GODOY.**

---

**Campinas**  
**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Sa77c Sartor, Sabrina de Bona, 1982-  
Compostos voláteis em vinhos Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) produzidos em diferentes regiões brasileiras / Sabrina de Bona Sartor. -- Campinas, SP: [s.n.], 2014.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Compostos voláteis. 2. Aroma. 3. Vinho. I.  
Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Volatile compounds in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.)  
wines produced in different regions of Brazil

Palavras-chave em inglês: Volatile compounds; Aroma; Wine.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Cláudia Hoffmann Kowalski Schröder

Merenice Roberto Sobrinho

Daniele Rodrigues

Liliane Maria Ferrareso Lona

Data da defesa: 26/02/2014

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## COMISSÃO JULGADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Teixeira Godoy  
UNICAMP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Fortes Gris  
UnB

---

Dr<sup>a</sup>. Cláudia Hoffmann Kowalski Schröder  
LANAGRO

---

Dr<sup>a</sup>. Merenice Roberto Sobrinho  
SENAI

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliane Maria Ferrareso Lona  
UNICAMP

---

Dr<sup>a</sup>. Daniele Rodrigues  
UNICAMP

---

Dr. Jean Pierre Rosier  
EPAGRI

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Borin Nogueira  
PUCCAMP



## ABSTRACT

Wine aroma wine is formed by a large number of volatile chemical compounds, present in variable concentrations and detectable by the human olfactory system.

The study of the volatile fraction of wines has been the aim of many research studies and those analytical methods including basic steps, such as: isolation and extraction of matrix, separation and detect by gas chromatography coupled to a detection system and finally, the identification and quantification of the individual components. The aim of this study was to extract, identify and quantify the volatile compounds of brazilian Chardonnay wines, produced in different regions, using solid phase microextraction in headspace mode (HS-SPME) and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Samples were produced in the main wine producing regions in Brazil: Serra Gaúcha and Campanha (Rio Grande do Sul state), Santa Catarinense and Região de Altitude (Santa Catarina state) and Sul de Minas (Minas Gerais state). A extraction method of aroma compounds was developed and optimized using HS-SPME and GC-MS/MS and multivariate central composite rotational design (CCRD) with response surface methodology to obtain an optimum extraction condition. The optimized conditions were temperature (°C) and time (minutes) of extraction. Multivariate optimization of extraction conditions for HS- SPME allowed to evaluate the effects of time and temperature of extraction allowing the achievement of the optimum extraction point of compounds representatives of the main classes of volatile compounds in Chardonnay wines. The optimum point observed is at temperature in 30 ° C and time in 45 minutes.

.A method for qualitative and quantitative analysis of the volatile fraction of wines was carried out using the technique of GC-MS/MS. The method was validated and used for the analysis of 31 volatile compounds in samples of Chardonnay wines. From compounds analyzed, 30 compounds were used to perform PCA and HCA targeting regional differentiation of wines. The Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were performed with the data obtained. The results showed that samples produced in Minas Gerais and Serra Gaúcha shows high concentration of compounds with vegetal and herbaceous notes. Meanwhile, samples of Campanha, Serra Catarinense and Região de Altitude shoes high concentration of compounds with floral and fruity notes. These results reinforce the role of geographical origin in the formation and differentiation of aroma in wines.

**Keywords:** volatile compounds; aroma; wine.

## RESUMO

O aroma final de um vinho é formado por um grande número de compostos químicos voláteis, presentes em concentrações variáveis e detectáveis pelo sistema olfativo humano. O estudo da fração volátil de vinhos tem sido o objetivo de muitas iniciativas de estudo, sendo que as metodologias de pesquisa de compostos voláteis em vinhos compreendem etapas fundamentais, tais como: a extração dos compostos, a separação das diferentes moléculas por cromatografia gasosa acoplada à um sistema de detecção e posteriormente, a identificação e quantificação dos compostos voláteis. O objetivo deste trabalho foi extrair, identificar e quantificar os compostos voláteis de vinhos Chardonnay produzidos em diferentes regiões brasileiras utilizando microextração em fase sólida no modo de headspace (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas *tandem* (GC-MSMS). As amostras foram produzidas nas principais regiões vitícolas brasileiras: Serra Gaúcha e Campanha (Rio Grande do Sul), Serra Catarinense e Região de Altitude (Santa Catarina) e Sul de Minas (Minas Gerais). O método de extração de compostos de aroma foi desenvolvido usando a técnica de HS-SPME e GC-MS/MS e análise multivariada com delineamento composto central rotacional (CCRD) e metodologia de superfície de resposta para obtenção de um ponto ótimo de extração. As condições otimizadas foram temperatura (°C) e tempo (minutos) de extração. A otimização multivariada das condições de extração por HS-SPME permitiu avaliar os efeitos de tempo e temperatura de extração nesta metodologia, permitindo a obtenção de um ponto ótimo de extração, 30°C e 45 minutos, dos representantes das classes dos

principais compostos voláteis presentes em vinhos Chardonnay. A análise qualitativa e quantitativa da fração volátil dos vinhos foi realizada usando a técnica de GC-MS/MS. O método foi validado e aplicado para a análise de 31 compostos voláteis nas amostras de vinhos Chardonnay. Destes compostos analisados, 30 foram utilizados para a realização de PCA e HCA visando a diferenciação regional dos vinhos. A Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) foram realizadas com os dados obtidos. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras produzidas em Minas Gerais e na Serra Gaúcha possuem marcadores olfativos herbáceos e vegetais, enquanto as amostras produzidas na região da Campanha/RS, Serra Catarinense e Região de Altitude/SC possuem marcadores florais e frutados, reforçando o papel da origem geográfica na formação e diferenciação do aroma dos vinhos analisados.

**Palavras-chaves:** compostos voláteis; aroma; vinho.

## SUMÁRIO

<b>Introdução Geral.....</b>	<b>25</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo 1: Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>31</b>
1 Vitivinicultura.....	33
2 Vitivinicultura no Brasil.....	34
3 Cultivar Chardonnay ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	40
4 Compostos Aromáticos em Vinhos.....	42
5 Análise de Compostos Voláteis em Vinhos.....	54
6 Referências.....	63
<b>Capítulo 2: Otimização Multivariada da Extração de Compostos Voláteis em Vinhos Chardonnay utilizando HS-SPME e GC-MS/MS.....</b>	<b>73</b>
Resumo.....	77
Abstract.....	79
1 Introdução.....	81
2 Material e Métodos.....	85
3 Resultados.....	90
4 Discussão.....	95
5 Conclusões.....	99
6 Agradecimentos.....	99
7 Referências.....	99
<b>Capítulo 3: Caracterização da Fração Volátil de Vinhos Chardonnay Brasileiros utilizando HS-SPME-GC-MS/MS.....</b>	<b>105</b>
Resumo.....	109

Abstract.....	111
1 Introdução.....	113
2 Material e Métodos.....	117
3 Resultados e Discussão.....	125
4 Conclusões.....	151
5 Agradecimentos .....	151
6 Referências.....	151
<b>Conclusão Geral.....</b>	<b>157</b>

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

Sir Isaac Newton (1642-1727)



*Dedicatória:*

Dedico esta tese a todos os professores que participaram e contribuíram para a minha formação, desde a alfabetização até a pós-graduação;

Aos meus primeiros mestres: Walmor e Elisa;

E ao Rodrigo.



## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Ciência de Alimentos pela oportunidade de realização do doutorado e elaboração desta tese;

À professora Helena Teixeira Godoy, por me aceitar como sua aluna, pela amizade, pela orientação e, principalmente, por acreditar neste projeto desde o início.

Ao professor Rodrigo Ramos Catharino, pela co-orientação e por sua inestimável contribuição neste trabalho;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo e auxílio financeiro ao trabalho;

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e observações que foram imprescindíveis para este trabalho;

Á todos os amigos e funcionários do Laboratório de Análise Instrumental de Alimentos, ao longo do período de doutorado: Renata, sr. Dirceu, Marcela, Miriam, Mere, Dani Bio, Dani Pane, Vivian, Cíntia, Lucíula, Paula, Milene, Leonardo, Dani Neves, Adriana, Chico, Thais, Tayse, Wellington, Elenice, Danilo, Maria Rosa, Stefany. Em especial ao “baianucho” Janclei e ao Mateus, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos funcionários da Secretária de Pós-graduação: Cosme Perrota e Marcos Sampaio.

Aos amigos do Laboratório Innovare/FCM: Diogo, Lívia, Mônica, Natália, Gustavo;

Aos amigos do LASSPQ/FEQ: Núria, Samara e Roni.

Aos amigos e colegas de doutorado, Marla Sganzerla (Felipe) e Cristiano Augusto Ballus, pelo apoio, pela amizade e pelos bons momentos de descontração;

A todos os amigos que me acompanharam durante o período do doutorado, de perto ou de longe e, em especial, a Robin Bahr e Susyane Cosme;

À família Mioli Botan, por me acolher e ser a minha família em Campinas;

À família de Bona Sartor, por todo amor, incentivo e dedicação, mesmo com a distância;

Ao Rodrigo Botan, meu companheiro nestes anos, que sempre me incentivou e sempre esteve ao meu lado, mesmo nas intermináveis horas no laboratório.

Obrigada pelo seu amor, seu carinho, dedicação, amizade e companheirismo.

Muito obrigada!

Sabrina de Bona Sartor  
Campinas, fevereiro de 2014.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.1</b> - Principais monoterpenos encontrados em vinhos.....	45
<b>Figura 1.2</b> - C <sub>13</sub> -norisoprenoïdes encontrados em vinhos.....	47
<b>Figura 1.3</b> - Principais álcoois superiores encontrados em vinhos.....	49
<b>Figura 1.4</b> - Ácidos graxos encontrados em vinhos.....	52
<b>Figura 1.5</b> - Esquema de um espectrômetro de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo.....	59
<b>Figura 1.6</b> - Configurações de experimentos em MS/MS do tipo triplo quadrupolo.....	60
<b>Figura 2.1</b> - Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores avaliados no delineamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	92
<b>Figura 2.2</b> - Cromatograma obtido no ponto ótimo (30°C, 45 minutos) de extração dos compostos voláteis por HS-SPME em vinho Chardonnay.....	98
<b>Figura 3.1</b> - Resultado da Análise dos Componentes Principais (PCA) dos compostos voláteis em vinhos Chardonnay brasileiros.....	144
<b>Figura 3.2</b> - Dendograma da Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), com 56,6% de similaridade, dos compostos voláteis em vinhos Chardonnay brasileiros.....	150



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> - Diferentes ésteres presentes em vinhos.....	51
<b>Tabela 2.1</b> - Tempo de retenção e parâmetros de GC-MS/MS dos compostos monitorados.....	89
<b>Tabela 2.2</b> - Fatores, níveis e domínio experimental das condições aplicadas na otimização da extração por HS-SPME. ....	90
<b>Tabela 2.3</b> - Condições experimentais e respostas obtidos por DCCR para otimização da extração HS-SPME e GC-MS/MS.....	93
<b>Tabela 2.4</b> - Análise de variância pelo método de mínimos quadrados.....	94
<b>Tabela 3.1</b> - Origem e safra das amostras de vinhos Chardonnay.....	118
<b>Tabela 3.2</b> - Tempo de retenção ( $t_R$ ) e parâmetros de MS/MS para os compostos analisados.....	121
<b>Tabela 3.3</b> - Parâmetros de validação do método analítico utilizado na determinação de compostos voláteis em vinhos Chardonnay brasileiros.....	126
<b>Tabela 3.4</b> - Concentração dos 31 compostos voláteis quantificados por GC-MS/MS em vinhos Chardonnay produzidos em diferentes regiões brasileiras.....	130



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CCRD	<i>Central Composite Rotational Design</i>
cm	centímetros
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DI-SPME	<i>Direct Immersion-Solid Phase Microextraction</i>
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/Carboxen/Polimetilsiloxano
EI	<i>Electron Impact</i>
eV	elétronvolt
g	gramas
g.L <sup>-1</sup>	gramas por litro
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>
GC-MS/MS	<i>Gas Chromatography/tandem Mass Spectrometry</i>
HCA	<i>Hierarchical Clustering Analysis</i>
HS	<i>Headspace</i>
HS-SPME	<i>Headspace-Solid Phase Microextraction</i>
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
M	Molar
mg.L <sup>-1</sup>	miligramas por litro
min	minutos
mL	mililitros
mL.min <sup>-1</sup>	mililitros por minuto
mm	milímetros
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>

MS/MS	<i>tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	relação massa/carga
nd	não detectado
ng.L <sup>-1</sup>	nanogramas por litro
Q1	Quadrupolo 1
Q2	Quadrupolo 2
Q3	Quadrupolo 3
QQQ	Tripla Quadrupolo
Q-TOF	Quadrupolo- <i>Time of Flight</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo
R <sup>2</sup> /r <sup>2</sup>	Coefficiente de Correlação
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
SCAN	<i>Scanning</i>
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>
SRM	<i>Selective Reaction Monitoring</i>
t <sub>R</sub>	tempo de retenção
TOF	<i>Time of Flight</i>
TOF-TOF	<i>Time of Flight-Time of Flight</i>
V	Volts
µg.L <sup>-1</sup>	microgramas por litro
µm	micrômetro
°C	graus Celsius
°C.min <sup>-1</sup>	graus Celsius por minuto

## INTRODUÇÃO GERAL

A vitivinicultura brasileira é uma atividade com relevante importância socioeconômica nas principais regiões produtoras do país: os Estados da Região Sul, Sudeste e Nordeste. A produção de uvas ocupa uma área de, aproximadamente, 77 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país, entre o paralelo 30°S, no Estado do Rio Grande do Sul, e o paralelo 9°S, no Nordeste do país, região situada próxima a Linha do Equador [1, 2]. Em função da diversidade ambiental, o Brasil apresenta regiões produtoras com características temperadas, subtropicais e tropicais. Estas diferentes regiões, com distintas características de clima, solo, variedade de uvas cultivadas, sistemas de produção, de vinificação e envelhecimento possibilitam a produção de vinhos com ampla diversidade de características de sabor e aroma, o que constitui uma das características da vitivinicultura brasileira atual [2, 3, 4].

A produção de vinhos nacionais desenvolveu-se com base na produção de vinhos de mesa, elaborados com uvas americanas e híbridas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina*). Mais recentemente, especialmente a partir da década de 70, começaram a ocorrer investimentos com a implantação e/ou modernização de vinícolas, com produção de vinhos finos, varietais ou de corte, elaborados com uvas *Vitis vinifera* L., com maior valor agregado e, portanto, mais competitivos no mercado consumidor de vinhos finos [2, 3]. A legislação brasileira define como vinho varietal aquele produzido com, no mínimo, 75% de vinho da variedade de

uva indicada no rótulo e o restante de vinho de outra variedade, mas da mesma espécie [5].

Como consequência dos investimentos, os vinhos finos nacionais têm apresentado uma grande evolução sensorial e na qualidade global, sendo reconhecidos nacional e internacionalmente [2, 3]. Porém, os estudos de caracterização de aroma dos diferentes vinhos finos nacionais ainda são escassos. A composição aromática de vinhos tem uma grande importância em termos de qualidade e identificação pelo mercado consumidor. Além disso, está intimamente ligada ao conceito de *terroir*, termo francês que descreve a noção de que os vinhos de diferentes regiões geográficas podem ser percebidos como únicos, sendo resultado de características de solo, clima, condições geográficas do local de cultivo da uva e das técnicas enológicas empregadas na produção do vinho [6, 7].

Uma das cultivares de uvas que mais recebeu atenção a partir da modernização da vitivinicultura brasileira foi a cultivar Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) [3, 4, 8]. Esta cultivar é conhecida internacionalmente como a principal uva branca utilizada para a produção de vinhos brancos finos, varietal ou de corte, frutado e de médio envelhecimento [8, 9, 10]. No Brasil, está presente na maioria das regiões produtoras, originando vinhos varietais ou servindo de base para a produção de vinhos espumantes [11].

Considerando a importância da composição volátil de vinhos, e a diversidade das regiões produtoras brasileiras, este trabalho teve como objetivos:

(1) otimizar uma técnica de extração de compostos voláteis em vinho Chardonnay, utilizando microextração em fase sólida no modo de headspace (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tandem (GC-MS/MS); (2) validar um método de identificação e quantificação dos principais compostos voláteis presentes em vinhos Chardonnay varietais produzidos em diferentes regiões brasileiras utilizando microextração em fase sólida no modo de headspace e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas *tandem*; (3) identificar os compostos voláteis que formam o aroma dos vinhos Chardonnay brasileiros e através do uso de ferramentas estatísticas de análise, evidenciar suas diferenças e similaridades regionais, traçando um perfil aromático desses vinhos.

## REFERÊNCIAS

- [1] OIV. International Organisation of Vine and Wine. **Statistical Report on World Vitiviniculture 2013**. Disponível em: <http://www.oiv.int>. Acesso em 08/09/13.
- [2] MELLO, L. M. R. de. **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2012**. Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br>. Acesso em 20/07/13.
- [3] GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinhos, 2009.
- [4] IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br>. Acesso em 20/07/13.

- [5] BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Lei N°7.678, de 08 de novembro de 1988. Produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em 10/07/13.
- [6] JACKSON, R. Chemical Constituents of grapes. In: **Wine Science: principles and applications**. 3th ed. London: Academic Press, p. 270 - 331. 2008.
- [7] RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology Volume 2 – The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments**. 2 ed. West Sussex: John Wiley and Sons, Ltd., 2006.
- [8] MIELE, A.; MIOLO, A. **O sabor do Vinho**. Bento Gonçalves: Vinícola Miolo: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 136 p.
- [9] WOLPERT, J.A. et al. Field performance of six Chardonnay clones in the Napa Valley. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.45, n.4, p.393-400, 1994.
- [10] FIDELIBUS, M. W.; CHRISTENSEN, L. P.; KATAYAMA, D. G.; THIBAUT-VERDENAL, P. Yield components and fruit composition of six Chardonnay grapevine clones in the Central San Joaquin Valley, California. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 57, n.4, p.503-509, 2006.
- [11] UVIBRA. **Dados da vitivinicultura**: quantidade de uvas processadas no Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Online. Disponível em: [http:// www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vitivinicultura](http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vitivinicultura). Acesso em: 10/07/13.

## OBJETIVOS

### 1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os compostos voláteis presentes em vinhos Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) produzidos em diferentes regiões vitícolas brasileiras

### 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**2.1** Otimizar a técnica de microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME) para a extração de compostos voláteis das amostras de vinhos Chardonnay.

**2.2** Utilizar métodos multivariados para a otimização dos fatores (temperatura e tempo) que influenciam no processo de extração dos compostos voláteis em vinhos Chardonnay.

**2.3** Validar um método de identificação e quantificação dos principais compostos voláteis presentes em vinhos Chardonnay varietais produzidos em diferentes regiões brasileiras utilizando microextração em fase sólida no modo de headspace (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas *tandem* (GC-MS/MS).

**2.4** Identificar e quantificar os principais compostos voláteis que formam o aroma dos vinhos Chardonnay produzidos em diferentes regiões brasileiras

**2.5** Utilizar ferramentas estatísticas de análise para evidenciar as diferenças e similaridades dos compostos aromáticos dos vinhos Chardonnay brasileiros.

# Capítulo 1

---

## Revisão Bibliográfica

**Sabrina de Bona Sartor<sup>a</sup>, Helena Teixeira Godoy<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Ciência de Alimentos

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP



## 1. VITIVINICULTURA

A videira pertence à família *Vitaceae*, sendo considerada a mais antiga espécie frutífera domesticada, devido ao grande número de registros feitos pelas antigas civilizações mundiais. Na família *Vitaceae* existem mais de 14 gêneros, sendo que o gênero *Vitis* apresenta, aproximadamente, 108 espécies e representa o de maior importância econômica, social e histórica. As plantas da família *Vitaceae* são predominantemente tropicais e subtropicais, porém as plantas do gênero *Vitis* são, primariamente, indígenas de áreas de clima temperado do Hemisfério Norte [1].

Após a separação dos continentes americano e euro-asiático houve o desenvolvimento de espécies em diferentes regiões. Através de seleção natural, a espécie *Vitis labrusca* se desenvolveu no continente americano e a espécie *Vitis vinifera* desenvolveu-se na Europa, na Ásia e na região entre esses dois continentes, formando assim três centros de origem: Americano, Euro-asiático e Asiático [1,2].

As cultivares *Vitis labrusca*, *Vitis labruscana*, *Vitis aestivalis* e *Vitis bourquina* abrangem a maioria das variedades americanas produtoras de uvas com relevante importância econômica, entre elas as cultivares Isabel, Concord, Niágara branca, Niágara rosada e Bordô. No Brasil essas cultivares são utilizadas, principalmente, para a fabricação de vinhos de mesa, sucos, geléias e também para consumo *in natura*. As cultivares *Vitis vinifera*, também chamadas de européias, são as mais difundidas em todo o mundo vitícola, apresentando grande

importância econômica nos principais países produtores. Dentre as cultivares mais conhecidas, podemos citar as tintas Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Syrah, Tannat, Pinot Noir, Carmenère, Nebbiolo, Gamay, Sangiovese, Tempranillo, Zinfandel. Entre as cultivares brancas, destacam-se a Chardonnay, Chenin Blanc, Moscatéis (Moscatel de Hamburgo, Moscato Blanc, Moscatel de Alexandria), Riesling, Sauvignon Blanc, Sémillon, Traminer e Gewürztraminer [1,2,3].

As atividades de cultivo de uvas e produção de vinhos estão amplamente difundidas em todo o mundo, com mais de 40 países cuja produção é reconhecida pela Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV). Segundo a OIV, os maiores produtores mundiais de vinho, no ano de 2012, foram: França, Itália, Espanha, Estados Unidos e China [4]. O Brasil ocupou o 14º lugar em produção de vinhos finos, com produção estimada em 2.917 milhões de hectolitros. Entre os principais consumidores mundiais de vinhos, destacam-se a França e os Estados Unidos, com cerca de 30.000 hectolitros anuais. O volume de vinho fino consumido no Brasil foi de aproximadamente 3.000 hectolitros em 2012 [4].

## **2. VITIVINICULTURA NO BRASIL**

No Brasil a videira foi introduzida por Martim Afonso de Sousa, no século XVI, na capitania de São Vicente, no atual estado de São Paulo. Porém o desenvolvimento da viticultura nacional está fortemente ligado à chegada dos imigrantes europeus ao país, no final do século XIX [2]. O desenvolvimento da

vitivinicultura brasileira ocorreu com a produção de cultivares americanas, utilizadas para a elaboração de vinhos de mesa. Entretanto, a partir de meados do século XX começaram a ser elaborados vinhos finos, com uvas de variedades de *Vitis vinifera*. Entre as principais variedades de *Vitis vinifera* cultivadas no Brasil, podemos citar as tintas Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinotage, Pinot Noir, Syrah e Tannat. Dentre as variedades brancas destacam-se a Chardonnay, Malvasia Branca, Moscato Branco, Moscato Canelli, Prosecco e Riesling Itálico [3].

Atualmente a viticultura brasileira ocupa uma área de, aproximadamente, 77 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país, em latitude de 30°S, até regiões situadas próximas a Linha do Equador, em latitude de 9°S. A produção de uvas é da ordem de 1,5 milhões de toneladas/ano [5]. Em 2012, a produção de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de 830,92 milhões de quilos, representando 57,07% da produção nacional. O restante da produção (42,93%) foi destinado ao consumo *in natura* [5].

As principais regiões produtoras de uvas e vinhos encontram-se nos estados da Região Sul, Sudeste e Nordeste. Na Região Sul e Sudeste colhe-se uma safra por ano, assim como na clássica viticultura mundial, enquanto na Região Nordeste as colheitas se sucedem ao longo do ano. As diferentes regiões, com distintas características de clima, solo, cultivares de uvas, sistemas de produção, de vinificação e envelhecimento possibilitam a produção de vinhos com ampla diversidade de características de sabor e aroma, o que constitui uma das qualidades da vitivinicultura brasileira atual [3].

## 2.1 Rio Grande do Sul

O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de uva e vinho e apresenta três regiões vitivinícolas: Serra Gaúcha, Campanha e Serra do Sudeste. Na região tradicional da Serra Gaúcha, cujo cultivo de uvas data do final do século XIX, a principal área de cultivo de uvas para a elaboração de vinhos finos está localizada nos municípios de Bento Gonçalves, Monte Belo do Sul, Garibaldi, Farroupilha, Caxias do Sul e arredores. Mais de 80% da produção da região se origina de variedades de uvas americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina*) e outras híbridas. As variedades de maior expressão neste grupo são: Isabel, Bordô (Ives), Niágara Branca, Concord, Niágara Rosada, Jacquez e Seibel 1077. Dentre as cultivares *Vitis vinifera*, destacam-se as brancas Moscato Branco, Riesling Itáliaico, Chardonnay e Trebbiano (Ugni Blanc); e as tintas Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota e Pinotage. A produção é de 10 a 30 toneladas/hectare, de acordo com a cultivar e as condições climáticas da safra. Nessa região destaca-se a área que constitui a primeira Indicação Geográfica do Brasil, a Indicação de Procedência Vale dos Vinhedos, obtida em 2002. Atualmente, a área detém o selo de Denominação de Origem [3,6].

A região da Campanha, localizada entre os municípios de Santana do Livramento, Dom Pedrito, Candiota e Bajé, apresenta aproximadamente 1.500 hectares plantados. O desenvolvimento do cultivo de uva e da produção de vinhos finos na região consolidou-se na década de 1980. Já na Serra do Sudeste,

localizada entre os municípios de Encruzilhada do Sul e Pinheiro Machado, a vitivinicultura veio a ganhar importância econômica recentemente, a partir de investimentos efetuados por vinícolas localizadas na Serra Gaúcha. Em ambos os pólos produtores são cultivadas exclusivamente cultivares *Vitis vinifera*, com predominância das uvas tintas Cabernet Sauvignon, Merlot, Tannat, Cabernet Franc, Pinot Noir; Touriga Nacional, Tempranillo e entre as uvas brancas destacam-se Chardonnay, Sauvignon Blanc, Pinot Grigio e Ugni Blanc (Trebiano) [3,6].

## 2.2 Santa Catarina

O Estado de Santa Catarina apresenta duas regiões vitivinícolas tradicionais, o Vale do Rio do Peixe, no Meio-Oeste, e a região Carbonífera no Sul do Estado. A partir do ano 2000, foram implementados vinhedos destinados à produção de vinhos finos na Região do Planalto e Serra Catarinense, com destaque na produção de uvas viníferas (*Vitis vinifera*) para a produção de vinhos finos [7].

No Vale do Rio do Peixe a viticultura ocupa cerca de 2.200 hectares, sendo que a cultivar Isabel ocupa cerca de 75% da área de vinhedos, seguida por outras cultivares de *Vitis labrusca* e híbridas como Niágara Branca, Niágara Rosada, Ives e Couderc 13. Nesta região, a produção de uvas viníferas vem se desenvolvendo nos últimos anos. Na Região Sul do Estado destaca-se como principais produtores vinícolas os municípios de Urussanga e Pedras Grandes. A região possui como base da sua produção, vinhos brancos da variedade híbrida Goethe [6].

Na Região de Altitude destacam-se os polos de Caçador, Campos Novos e São Joaquim, com altitudes variando entre 900 e 1.400 metros e clima temperado seco, com invernos rigorosos e temperatura média anual de 13º C. Os primeiros vinhedos foram plantados na região em 2001, chegando, em 2012, a uma área aproximada de 300 hectares. Entre as principais variedades cultivadas encontram-se as tintas: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Malbec e as brancas: Chardonnay e Sauvignon Blanc [3,6].

### **2.3 Vale do Sub-médio São Francisco**

No Nordeste do Brasil, junto aos Estados de Pernambuco e da Bahia, encontra-se a região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, situada em zona de clima tropical semi-árido. A viticultura voltada à produção de vinhos concentra-se no cultivo de cultivares *Vitis vinifera*, com destaque para Syrah, Cabernet Sauvignon e Ruby Cabernet, entre as tintas e Moscato Canelli e Chenin Blanc, entre as brancas. Estima-se a existência de uma área de 500 hectares de vinhedos com estas cultivares, originando cerca de sete milhões de litros de vinho/ano, destes 80% de vinho tinto e 20% de vinho branco. O clima vitícola da região apresenta variabilidade intra-anual, o que possibilita a produção de uvas e de vinhos ao longo de todos os meses do ano. Esta região é uma das regiões emergentes que teve início nos anos de 1980 e que hoje experimenta um período de expansão da produção de vinhos finos [3,6].

## 2.4 Minas Gerais

A Região Sul de Minas Gerais, com destaque para os municípios de Caldas e Andradas, é uma região tradicional no cultivo de uvas de origem americana (*Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*), com área de produção estabilizada em torno de 350 hectares. As principais cultivares utilizadas são Bordô (localmente também conhecida por Folha de Figo), Jacquez, Niágara Rosada e Niágara Branca. Aproximadamente 95% do vinho produzido na região é de mesa, sendo produzidos com uvas cultivadas na própria região e parte com uvas adquiridas no Rio Grande do Sul. A partir de meados dos anos 2000, empresários e a Empresa de Pesquisa e Desenvolvimento do Estado de Minas Gerais (EPAMIG) desenvolveram ações estratégicas para incentivar a produção de uvas viníferas na região [6].

## 2.5 São Paulo

No Estado de São Paulo, destacam-se dois pólos vitícolas: um na Região Noroeste (Regional Agrícola de Jales) e outro na Região Leste (Regionais Agrícolas de Campinas, Itapetininga e Sorocaba).

Na Região Noroeste do Estado, a área de vinhedos é de aproximadamente 900 hectares, com predomínio de uvas para consumo *in natura*. A principal cultivar *Vitis vinifera* é a Itália, e suas mutações Rubi e Benitaka. Na Região Leste do Estado destacam-se três grupos vitícolas: um primeiro grupo, centrado nos municípios de Jundiaí, Vinhedo, Indaiatuba, Valinhos e Campinas, onde a

produção de uva americana de mesa, representa cerca de 67% da área cultivada (5.270,2 hectares), com predomínio da cultivar Niágara Rosada; um segundo pólo de produção, centrado no município de São Roque, onde a produção de uva é destinada à elaboração de vinho de mesa, representando aproximadamente 4% da área cultivada (335 hectares); e no terceiro grupo, destaca-se o município de São Miguel Arcanjo, com produção de uvas finas de mesa, representadas pela cultivar Itália e suas mutações Rubi e Benitaka, e cerca de 29% da área cultivada (2.264,1 hectares) [6].

As vinícolas paulistas comercializam vinhos finos produzidos, quase que exclusivamente, no Rio Grande do Sul, porém o setor vitícola do Estado tem buscado reestruturar, melhorar e expandir sua cadeia produtiva, o que demanda uma avaliação do potencial produtivo para uvas destinadas à elaboração de vinhos finos, com base nas características de clima e solo do Estado [8].

### **3. CULTIVAR CHARDONNAY (*Vitis vinifera* L.)**

A cultivar Chardonnay é originária da região da Borgonha, França, sendo responsável pela qualidade dos vinhos brancos elaborados nessa região, e está difundida nas principais áreas vitícolas do mundo [9, 10, 11]. Na França, além de ser a cultivar quase que exclusiva de vários vinhos da Borgonha, é uma das uvas clássicas utilizadas na produção do Champagne. É cultivada com sucesso nos Estados Unidos (Califórnia), Austrália, Nova Zelândia, Itália, Portugal, Chile, Argentina, África do Sul e Brasil [3, 12].

Foi introduzida no Brasil na década de 1930, na região de São Roque, em São Paulo, e no Rio Grande do Sul, por volta de 1948, mas somente na década de 1980 que ela adquiriu notoriedade na Serra Gaúcha, sendo utilizada como base para a produção de vinho espumante. Em 2007 a quantidade de uva Chardonnay processada no Rio Grande do Sul foi de 1.752,5 toneladas, representando, 6,3% do total de uvas viníferas brancas processadas no Estado [13].

A cultivar Chardonnay produz vinho branco frutado, de médio envelhecimento. É um dos vinhos brancos que aceita e se beneficia da fermentação e/ou maturação em barris de carvalho. Os principais descritores aromáticos relacionados ao vinho varietal Chardonnay são descritores frutados (*citrus*, abacaxi, maracujá, maçã, pêssego e melão), baunilha e manteiga [1, 12].

Mais de 140 compostos voláteis já foram identificados em vinhos Chardonnay. Destes, ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas são considerados de maior relevância na formação do aroma final do vinho. As concentrações encontradas variaram em função do processo fermentativo adotado e/ou pelo processo de envelhecimento em barris de carvalho [14].

Segundo Lee e Noble [15], os vinhos Chardonnay californianos apresentaram aromas florais e frutados, relacionados com as concentrações dos compostos acetato de isopentila, acetato de 2-feniletanol e linalol. Em vinhos Chardonnay chineses, produzidos na Província de Changli, foram detectados 41 compostos voláteis, sendo álcoois superiores e ésteres de ácidos graxos, os principais grupos químicos encontrados. O composto 2-feniletanol, juntamente com sete ésteres,

foram descritos como responsáveis pelo aroma floral/frutado característico desse vinho [16].

Os compostos voláteis aldeído acético, acetato de etila, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol+3-metil-1-butanol foram analisados em vinhos Chardonnay produzidos na Serra Gaúcha. Estes compostos atuam na formação do aroma acético (acetato de etila), aroma de oxidação (aldeído acético) e aroma herbáceo (álcoois superiores) em vinhos e os resultados encontrados mostraram que estes compostos não apresentam grande participação na formação do aroma dos vinhos analisados [17].

#### **4. COMPOSTOS AROMÁTICOS EM VINHOS**

O vinho é uma solução hidroalcoólica contendo centenas de compostos químicos provenientes das uvas utilizadas na vinificação, além de compostos formados durante o processo de fermentação e envelhecimento. Muitos destes compostos participam da formação do aroma do vinho, servindo como parâmetro de qualidade e de identidade pelo mercado consumidor.

O aroma é formado por um grande número de moléculas químicas, com média hidrofobicidade, baixo peso molecular e baixo ponto de ebulição sendo, conseqüentemente, voláteis. Estas moléculas possuem a capacidade de estimular os órgãos sensoriais responsáveis pelo olfato, sendo detectáveis pelo nariz humano. As concentrações variam de  $\text{mg.L}^{-1}$  a  $\text{ng.L}^{-1}$ , ou em quantidades ainda menores (traços). Certos compostos, mesmo presentes em quantidades mínimas

podem desempenhar um importante papel no aroma final de um vinho, enquanto outros, muito mais abundantes, podem fazer apenas uma pequena contribuição [18].

Mais de 1000 compostos voláteis já foram identificados em vinhos, mas aproximadamente 10% possuem participação efetiva na formação do seu aroma final. A participação de cada um dos componentes depende da correlação entre a composição química e o limiar de percepção de cada um desses compostos, pois a maioria dos compostos voláteis encontra-se abaixo ou muito próximo ao limiar sensorial individual [19].

A composição e intensidade desses compostos dependem de vários fatores entre eles: a cultivar de uva utilizada, as características edafoclimáticas do local de cultivo da uva, fatores agrônômicos empregados na produção e manejo do vinhedo, técnicas enológicas empregadas durante a produção do vinho e as condições de armazenamento dos vinhos engarrafados [20, 21, 22, 23, 24, 25].

#### **4.1 Classificação dos Compostos Aromáticos de Vinhos**

Os compostos voláteis pertencem a grupos químicos heterogêneos, tais como: álcoois superiores, ésteres, monoterpenos, compostos sulfurados, norisoprenoides, entre outros. Considerando a sua origem e sua natureza química, o aroma pode ser classificado em quatro diferentes grupos: aromas varietais, provenientes da cultivar utilizada e que depende das condições edafoclimáticas do local de cultivo; aromas pré-fermentativos, formados durante o processamento das

uvas, em etapas como transporte, prensagem e maceração; aromas fermentativos, produzidos pelas leveduras durante o processo de fermentação alcoólica e por bactérias lácticas durante o processo de fermentação malolática, que dependem da temperatura de fermentação e das cepas de microrganismos utilizados; e por último os aromas pós-fermentativos, formados durante o processo de conservação e envelhecimento do vinho [1, 18, 26].

#### 4.1.1 Aromas Varietais

Os compostos de aroma varietal mais conhecidos são os monoterpenos, responsáveis pelo aroma floral característico nas uvas e vinhos das variedades Moscatéis, as metoxipirazinas, características da família de uvas Cabernet, os tióis voláteis, presentes em uvas Sauvignon e os C<sub>13</sub>-norisoprenoides, característicos de uvas Chardonnay [1, 18, 26, 27, 28].

Os monoterpenos são C<sub>10</sub>-terpenoides formados na planta pela fusão de duas moléculas de isopentenilpirofosfato através da rota do isopreno e posterior reação enzimática. Considerando as suas propriedades aromáticas, os monoterpenos mais conhecidos são o linalol, hotrienol,  $\alpha$ -terpineol, nerol e geraniol, além de dois óxidos monoterpênicos, o óxido de rosa e o óxido de nerol (Figura 1.1). Estes compostos possuem baixo limiar de percepção olfativa e estão presentes em baixas concentrações nos vinhos, na ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , contribuindo para a formação de aromas florais [18].

As metoxipirazinas são compostos nitrogenados heterocíclicos formados, provavelmente, durante o catabolismo de aminoácidos, porém suas origens ainda não são totalmente elucidadas [18, 26]. Contribuem na formação de aromas vegetais, tais como pimentão verde e aspargo, possuem limiar de percepção muito baixo e as concentrações encontradas em vinhos são da ordem de  $\text{ng.L}^{-1}$ . Os principais compostos dessa classe são 3-isobutil-2-metoxipirazina, 3-isopropil-2-metoxipirazina e 3-secbutil-2-metóxi-pirazina [18].

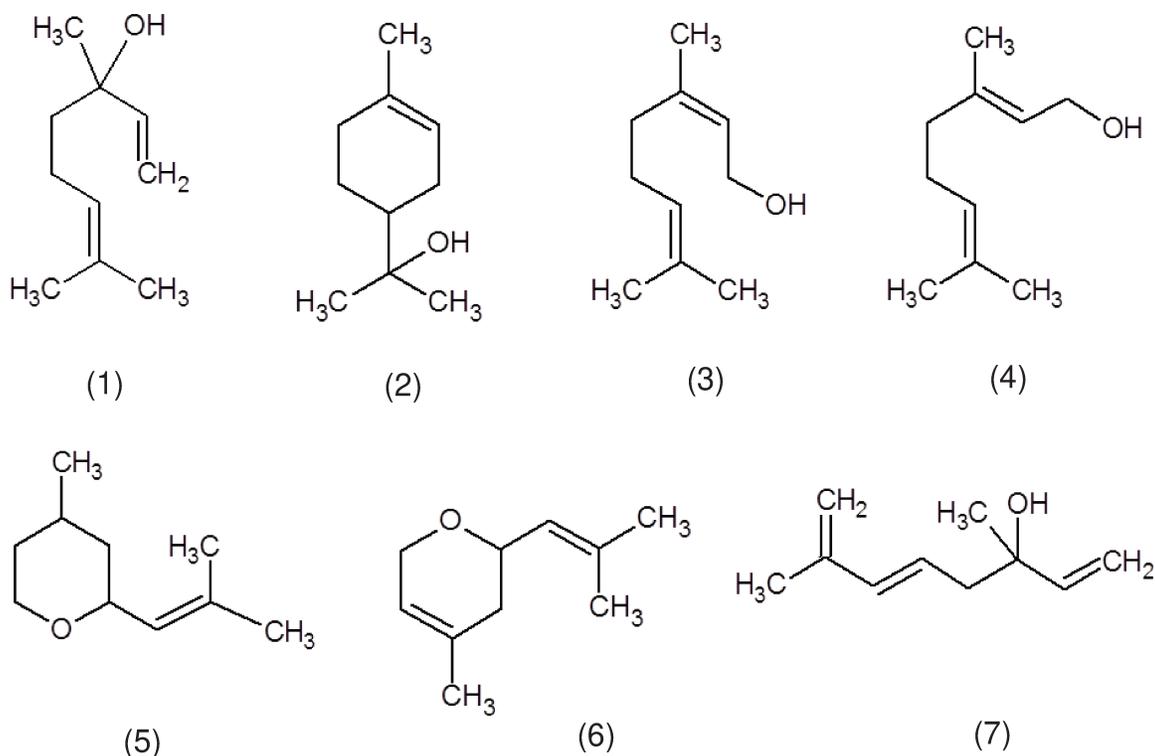


Figura 1.1. Principais monoterpenos encontrados em vinhos: (1) linalol; (2)  $\alpha$ -terpineol; (3) nerol; (4) geraniol; (5) óxido de rosa; (6) óxido de nerol e (7) hotrienol.

Os principais tióis voláteis identificados em vinhos são 4-mercapto-4-metil-2-pentatona, 4-mercapto-4-metil-2-pentanol, 3-mercapto-1-hexanol, 3-mercapto-3-metil-1-butanol e acetato de 3-mercaptohexila [29, 30]. Estes compostos estão presentes em uvas na forma de cisteína-S-conjugados, sendo enzimaticamente liberados durante o processo de vinificação. São responsáveis pelos aromas vegetais e frutados, tipicamente observados em vinhos provenientes da cultivar Sauvignon blanc [30].

C<sub>13</sub>-norisoprenoides são formados a partir da degradação oxidativa de carotenoides e usualmente divididos em dois grupos: megastigmanos e não-megastigmanos. No grupo de megastigmanos, destacam-se as iononas (molécula de oxigênio em C<sub>9</sub>) e as damasconas (molécula de oxigênio em C<sub>7</sub>). Estes compostos estão presentes em uvas em sua forma glicosilada, sendo hidrolisados enzimaticamente ou no meio ácido dos vinhos [1, 18]. Dentre os compostos do grupo de não-megastigmanos, destacam-se o vitispirano e 1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno (TDN), responsáveis pelos aromas canforados e de solventes, respectivamente.

A  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona e a  $\beta$ -damascenona são os principais compostos C<sub>13</sub>-norisoprenoides presentes em vinhos, contribuindo na formação de aromas florais e frutados (Figura 1.2) [1, 18]. A exposição solar favorece a síntese de carotenoides nos frutos antes do *véraison* (aproximadamente metade do ciclo de maturação das uvas) e sua degradação em C<sub>13</sub>-norisoprenoides após esse período [31].

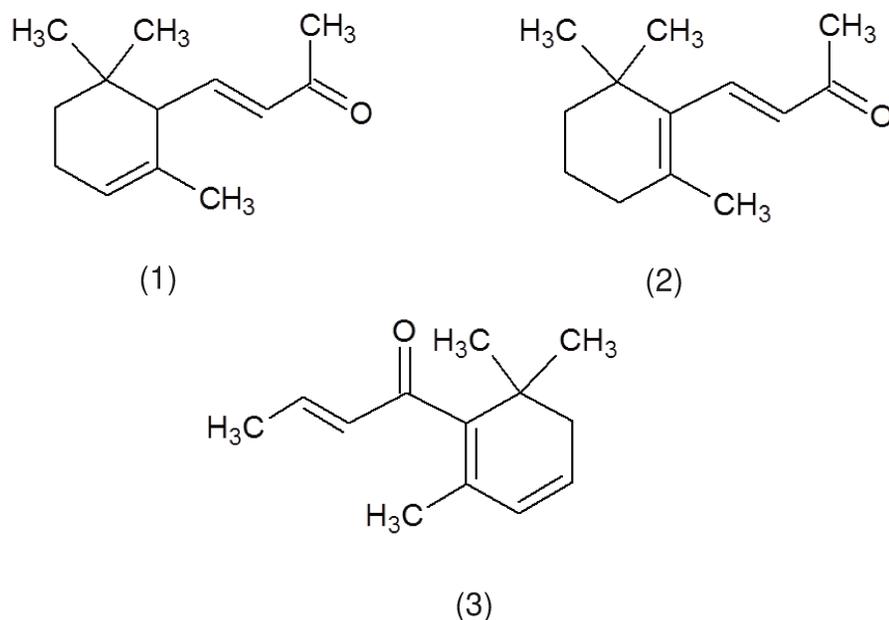


Figura 1.2. C<sub>13</sub>-norisoprenoides encontrados em vinhos: (1) α-ionona; (2) β-ionona; (3) β-damascenona.

#### 4.1.2 Aromas Pré-fermentativos

Compostos pré-fermentativos são formados em etapas anteriores à fermentação alcoólica. Durante a colheita, transporte, trituração e prensagem, bem como durante a maceração, ocorrem reações enzimáticas, em presença de oxigênio, originando compostos pertencentes aos grupos de C<sub>6</sub>-alcoois e C<sub>6</sub>-aldeídos, principalmente. Os compostos voláteis produzidos são hexanal, Z-3-hexenal, E-2-hexenal e os álcoois correspondentes. Estes compostos são derivados da fração lipídica das uvas (ácidos linoléico e linolênico), tendo como principais descritores os aromas herbáceos e vegetais [32, 33, 34].

### 4.1.3 Aromas Fermentativos

O processo de fermentação é a etapa essencial para a transformação do mosto em vinho, com a produção de etanol a partir das moléculas de açúcares (principalmente glicose e frutose) presentes nas uvas. Esse processo ocorre pela presença de microrganismos no mosto, sendo que as leveduras do gênero *Saccharomyces* são as mais comuns associadas ao processo de vinificação [25]. Durante a etapa de fermentação, além do etanol, são formados compostos secundários pertencentes à diversos grupos químicos, como álcoois superiores, acetatos de álcoois superiores, ésteres, etílicos de ácidos graxos e ácidos graxos. Estes compostos possuem intensa capacidade odorífera, que desempenham importante papel na formação do aroma de um vinho, contribuindo para a formação de aromas frutados, característicos de vinhos brancos jovens [1].

Os álcoois com mais de dois átomos de carbono são conhecidos como álcoois superiores ou álcoois fúseis, sendo praticamente ausentes em uvas e mostos, mas encontrados em vinhos em concentrações relativamente mais elevadas, atingindo valores superiores a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  [1, 18]. Estes álcoois e os seus ésteres possuem intensa capacidade odorífera, desempenhando um papel de extrema importância para o aroma final de um vinho. Os principais compostos desta classe são o 2-metil-1-propanol (álcool isobutílico), 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 2-feniletanol (álcool feniletílico), 1-propanol e 1-hexanol (Figura 1.3) [1].

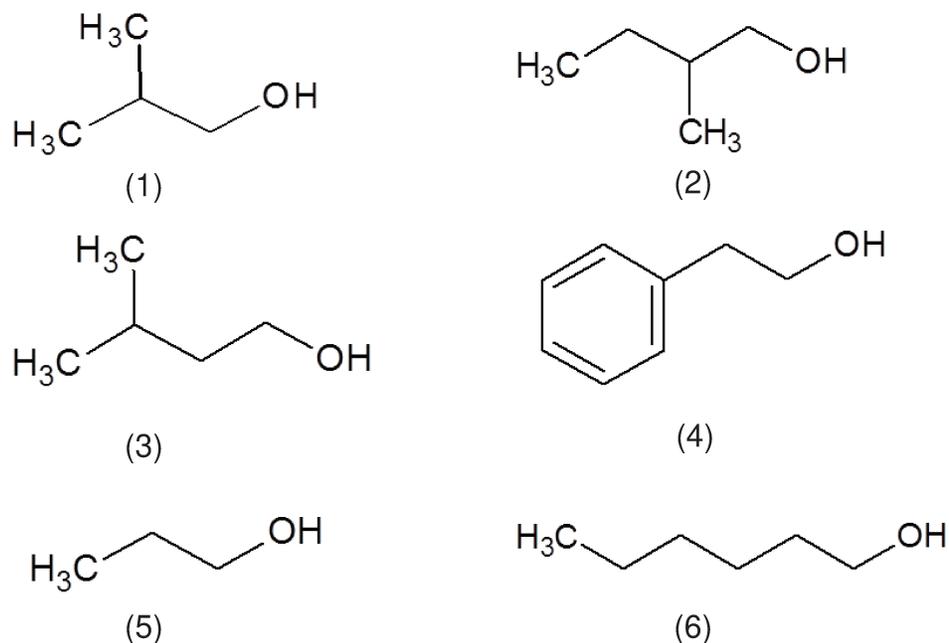


Figura 1.3. Principais álcoois superiores encontrados em vinhos: (1) 2-metil-1-propanol; (2) 2-metil-1-butanol; (3) 3-metil-1-butanol; (4) 2-feniletanol; (5) 1-propanol; (6) 1-hexanol.

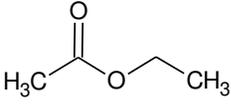
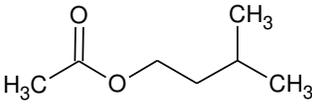
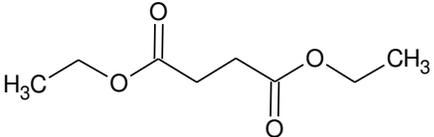
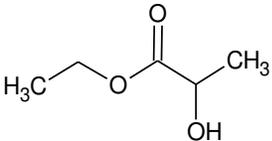
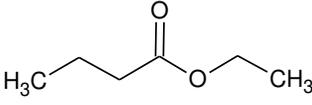
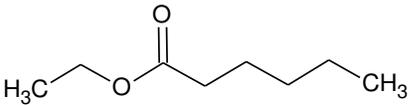
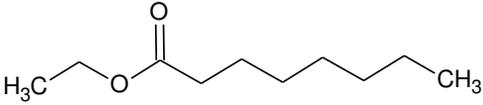
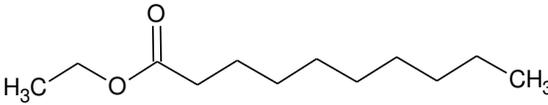
A concentração de álcoois fúseis em vinhos varia de 140 a 420 mg.L<sup>-1</sup> [35]. Com exceção do 2-metil-1-butanol e do 2-feniletanol, estes compostos estão presentes, geralmente, em concentrações abaixo de seus limiares de percepção olfativa, porém quando os níveis de álcoois fúseis estão acima dessas concentrações, podem apresentar impacto negativo no aroma [36].

Os ésteres são um dos principais componentes dos vinhos, logo após a água, etanol e álcoois fúseis. São produtos da condensação entre o grupo carboxílico de um ácido orgânico e o grupo hidroxílico de um álcool ou fenol. Mais de 160 moléculas de ésteres já foram identificadas em vinhos, porém os mais

comuns são os acetatos de ésteres, formados pela condensação do ácido acético e um álcool fúsel e os ésteres etílicos de ácidos graxos, formados entre etanol e ácidos graxos [1]. Com o grande número de diferentes álcoois e ácidos em vinhos, o potencial de formação de uma grande gama de diferentes ésteres é considerável. Assim, é possível dividir o grupo de ésteres em classes, tais como acetatos de álcoois superiores, ésteres etílicos de ácidos graxos, ésteres etílicos de ácidos orgânicos, entre outros [37]. A Tabela 1.1 apresenta alguns representantes das principais classes de ésteres presentes em vinhos e seus principais descritores aromáticos.

Estes compostos são de extrema importância para o perfil aromático das bebidas fermentadas, especialmente vinhos, pois a presença de diferentes ésteres apresenta um efeito sinérgico, contribuindo para uma maior percepção dos aromas individuais que estão abaixo do limiar de percepção. Apresentam, em geral, aromas frutados, característicos de vinhos brancos jovens [1]. Durante o envelhecimento dos vinhos, os ésteres são lentamente hidrolisados, perdendo sua capacidade odorífera [1, 38, 39].

Tabela 1.1. Diferentes ésteres presentes em vinhos.

Éster	Molécula	Descritores Aromáticos <sup>a</sup>
<i>Acetatos de álcoois</i>		
Acetato de etila		Solvente
Acetato de isoamila		Banana
<i>Ésteres de ácidos orgânicos</i>		
Succinato de dietila		Floral, frutado
Lactato de etila		Frutado, amanteigado
<i>Ésteres etílicos de ácidos graxos</i>		
Butanoato de etila		Frutado, morango
Hexanoato de etila		Frutado, maçã verde
Octanoato de etila		Doce, frutado
Decanoato de etila		Frutado, uva, floral

<sup>a</sup>: [23, 40, 41].

Os ácidos graxos voláteis presentes no vinho podem derivar do anabolismo de lipídios, resultando em compostos com número par de átomos de carbono, por descarboxilação oxidativa de  $\alpha$ -cetoácidos ou por oxidação de aldeídos. Os ácidos graxos voláteis sintetizados a partir de  $\alpha$ -cetoácidos são, principalmente, o ácido propanóico, o ácido 2-metil-1-propanóico (ácido isobutírico), ácido 2-metil-1-butanóico e ácido 3-metil-1-butanóico (ácido isovalérico, ácido 3-metilbutirico). A partir do metabolismo lipídico, os seguintes ácidos graxos são relatados: butanóico (butírico), ácido hexanóico (capróico), ácido octanóico (caprílico) e ácido decanóico (cáprico) (Figura 1.4) [42].

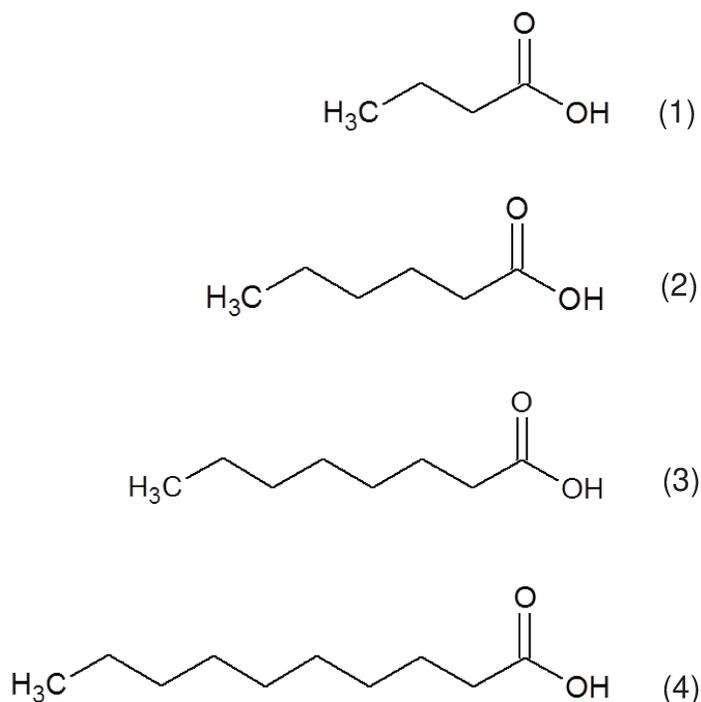


Figura 1.4. Ácidos graxos encontrados em vinhos: (1) ácido butanoico; (2) ácido hexanóico; (3) ácido octanóico (4) ácido decanóico.

Embora os ácidos graxos estejam descritos por notas desagradáveis em vinhos, tais como rançoso, queijo e sabão, apenas alguns compostos desta família atingem o seu limiar de percepção. No entanto, são considerados essenciais para o equilíbrio aromático do vinho [36].

#### **4.1.4 Aromas Pós-Fermentativos**

O aroma de um vinho pode mudar drasticamente durante o período de envelhecimento em barris e/ou em garrafa. As reações químicas que ocorrem durante esse período ainda são pouco compreendidas, porém sabe-se que o conteúdo de oxigênio desempenha papel relevante na formação de novos compostos e na evolução de compostos já presentes. Em geral, o conteúdo de oxigênio está relacionado com a formação de determinados compostos com aromas oxidativos (por exemplo, aldeídos ou sotolon) e a formação/degradação de compostos orgânicos sulfurados voláteis [43].

Em vinhos que passam pelo processo de envelhecimento, principalmente em barris de carvalho, ocorre a formação de alguns compostos de aroma característicos, como por exemplo,  $\beta$ -metil-octalactona, composto que participa da formação de aroma contribuindo com o odor de amadeirado, carvalho, baunilha e/ou coco [44].

## 5. ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS

A fração volátil do vinho é extremamente complexa, principalmente devido ao grande número de compostos, de diferentes classes químicas, cobrindo uma vasta gama de polaridades, solubilidade, volatilidade e concentração variáveis. Além disso, os compostos voláteis estão contidos em matrizes complexas e de composição muito variável, onde podem estar associados e, portanto, a sua volatilidade é modulada por outros macrocomponentes dos vinhos (polifenóis, etanol, polissacarídeos, etc.) [45].

As metodologias de pesquisa de compostos voláteis em vinhos compreendem etapas fundamentais, entre elas a extração dos compostos voláteis da matriz (vinho), a separação e detecção das diferentes moléculas por cromatografia gasosa acoplada à um sistema de detecção e posteriormente, a identificação e quantificação dos compostos voláteis [46].

### 5.1 Extração dos Compostos Voláteis

A determinação de compostos voláteis em uvas e vinhos requer, muitas vezes, extensa extração e preparação das amostras antes da análise instrumental. Historicamente, os voláteis de vinhos foram isolados usando destilação ou técnicas de extração por uso de solventes [47, 48].

Atualmente, há ampla disponibilidade de ferramentas analíticas para a extração de compostos, sendo que os métodos mais comumente utilizados são a extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE), extração em fase sólida

extração (*Solid Phase Extraction*, SPE) e microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME). LLE é uma tecnologia versátil, que possibilita extrações simultâneas utilizando solventes com polaridades distintas, porém são utilizados grandes volumes de solventes, acarretando em impactos ambientais e à saúde do analista [48]. A SPE utiliza pequenos volumes de solvente e apresenta a vantagem de ser uma técnica seletiva usando fases adsorventes apropriados para as classes de compostos de interesse [49].

A microextração em fase sólida (SPME) é a técnica mais empregada atualmente para isolamento dos compostos voláteis em vinhos. Foi introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990 [50] e oferece muitas vantagens em relação às técnicas convencionais de preparo de amostras, entre as principais podemos citar a simplicidade, rapidez, utilização de pequenos volumes de amostras, extração isenta de solventes e manipulação mínima das amostras [51].

O dispositivo utilizado em SPME consiste em um *holder* (suporte), um êmbolo e uma agulha de aço. Quando o embolo é deslocado para baixo, uma haste metálica e/ou de sílica fundida que se encontra dentro da agulha é exposta. Na extremidade da haste um pequeno segmento é recoberto com material polimérico adsorvente, responsável pela extração dos compostos de interesse. Esse segmento será exposto à amostra, por imersão direta ou no modo de espaço confinado (*headspace*) [51, 52].

Na extração por SPME as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas [51, 52].

As características do material de recobrimento da fibra (espessura, polaridade, natureza do material polimérico) devem ser escolhidas de acordo com as características da(s) molécula(s) de interesse. Após a extração, a fibra extratora é transferida diretamente para o injetor de um cromatógrafo à gás onde os analitos sofrem dessorção térmica, podendo ser subsequentemente analisados qualitativamente e/ou quantitativamente [51, 52].

Considerando que a técnica de SPME não é uma extração exaustiva, mas sim uma técnica de equilíbrio, com o máximo de sensibilidade obtido em um determinado ponto, o desenvolvimento de um método de SPME requer a otimização de alguns parâmetros, tais como: tipo e modo de amostragem (imersão direta ou *headspace*), as condições de agitação (velocidade, tempo e temperatura), a força iônica, o pH, o volume da amostra, o volume de *headspace*, as condições de dessorção, entre outros [39, 33, 53, 54, 55, 56, 57].

A técnica SPME realizada no modo *headspace* (HS) acoplada com a cromatografia gasosa (GC) e/ou cromatografia gasosa/espectrometria de massas

(GC/MS) tem sido amplamente utilizado para analisar e monitorar o aroma de uvas e vinhos [16, 55, 58, 59, 60, 61].

## **5.2 Análise dos Compostos Voláteis por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas**

A mistura complexa de compostos voláteis obtida através da etapa de extração requer, para a sua separação, o uso de cromatografia gasosa (*gas chromatography*, GC). A separação baseia-se na diferente distribuição dos compostos da amostra entre uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel (gasosa). As substâncias presentes na amostra passam através da coluna cromatográfica, onde são separadas, e chegam ao sistema de detecção [62].

Diferentes detectores podem ser acoplados à GC e suas características (sensibilidade, seletividade, linearidade e quantidade mínima detectável) diferem significativamente. Dentre os detectores mais utilizados destacam-se o de Ionização de Chama e o de Espectrometria de Massas. O detector por Ionização de Chama é considerado universal para compostos orgânicos. A Espectrometria de Massas, em inglês *Mass Spectrometry* (MS), é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, bem como da estrutura do analito [46, 62].

Atualmente alguns sistemas apresentam o acoplamento entre GC e a espectrometria de massas *tandem* ou espectrometria de massas sequencial, também chamada de MS/MS ou MS<sup>n</sup>. Nesta técnica, as moléculas de interesse,

após um processo de ionização, sofrem uma sequência de análises: primeiro ocorre a seleção de um íon precursor ou íon pai, em seguida ocorre a ruptura deste íon precursor para gerar íons-fragmentos e ao final ocorre a análise e detecção dos fragmentos formados [63, 64].

Para realização de análises do tipo *tandem*, são necessários equipamentos apropriados que permitam a seleção específica de cada íon desejado. As configurações mais comuns são os do tipo triplo quadrupolo (QQQ), quadrupolo-*time of flight* (Q-TOF) e *time of flight - time of flight* (TOF/TOF). Esses equipamentos apresentam três componentes em sequência, sendo dois analisadores e uma câmara de fragmentação ou colisão [63, 64].

O analisador do tipo triplo quadrupolo é constituído por três quadrupolos em série, Q1, Q2 e Q3, sendo que o Q2 atua como uma célula de colisão, onde ocorrem as fragmentações dos íons selecionados anteriormente (Q1) (Figura 1.5).

O processo de colisão utiliza um gás inerte para induzir a dissociação do íon, *Collision-Induced Dissociation* (CID). O Q2 também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo [65].

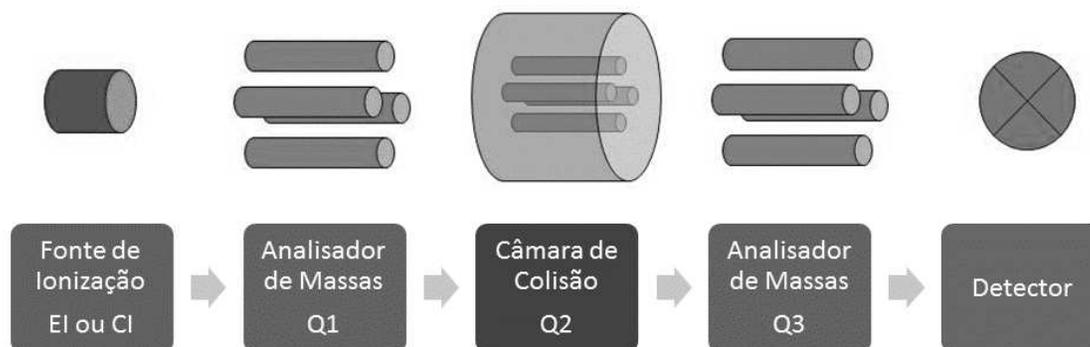


Figura 1.5. Esquema de um espectrômetro de massas em *tandem* do tipo triplo quadrupolo.

Em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, diferentes configurações de experimentos podem ser realizados, incluindo os modos SCAN (varredura) e SIM (*Single Ion Monitoring*), ambos em modo MS tradicional. No modo MS/MS, as configurações utilizadas podem ser: monitoramento seletivo de reações (SRM, *Selective Reaction Monitoring*) ou monitoramento múltiplo de reações (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*), varredura de íons produtos, varredura de íons precursores e varredura de perda neutra [63, 64]. A figura 1.6 mostra uma representação esquemática dos tipos de experimentos em MS/MS.

Na configuração Monitoramento Seletivo de Reações, MSR, o Q1 monitora a fragmentação de um íon precursor previamente selecionado e os seus correspondentes íons produtos. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, este modo de varredura é denominado Monitoramento de Reações Múltiplas, MRM [65].

A varredura dos íons produto (*Product Ion Scan*) isola o íon de interesse em Q1 que, em seguida, é fragmentado na cela de colisão (Q2). No Q3 é realizada a varredura dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon de interesse isolado em Q1 para obtenção do espectro de massas [65].

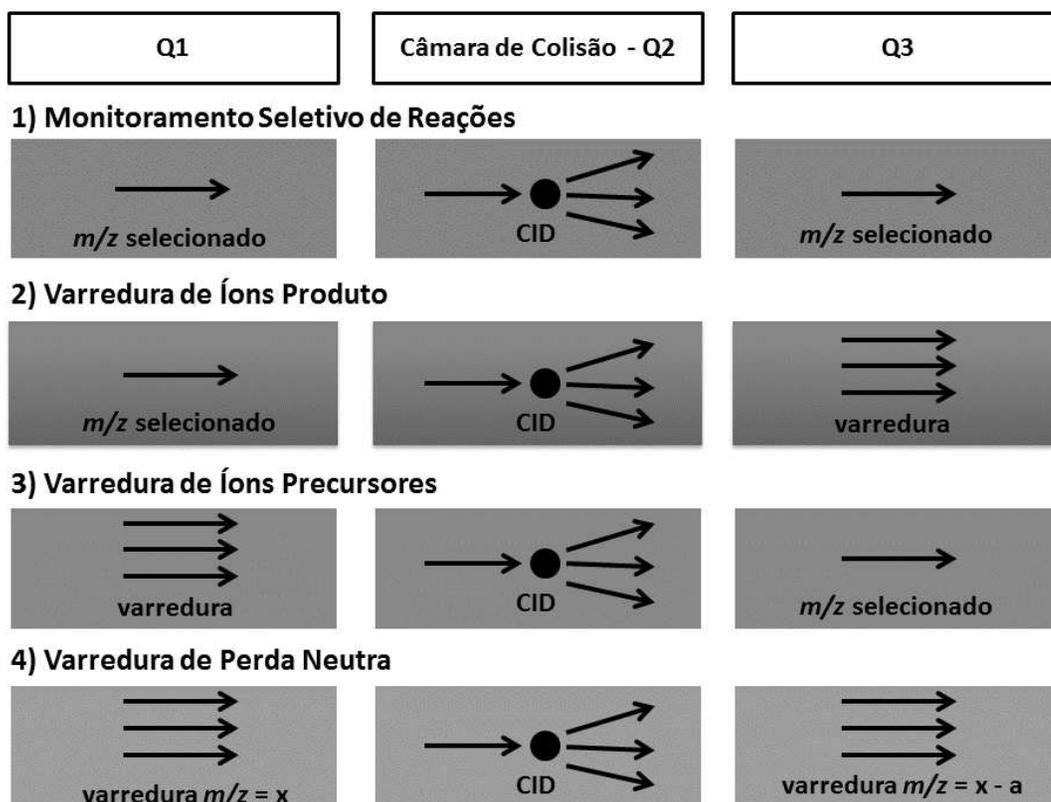


Figura 1.6. Configurações de experimentos em MS/MS do tipo triplo quadrupolo.

Já a varredura do íon precursor (*Precursor Ion Scan*) é realizada quando o Q1 é ajustado para transmitir íons dentro de um intervalo de  $m/z$  de interesse, os quais são fragmentados na cela de colisão (Q2), sendo transmitidos íons de uma

única razão  $m/z$  (íon produto de fragmentação) para o Q3 [65]. Por sua vez, a varredura da perda neutra (*Neutral Loss Scan*) permite observar íons que se fragmentam perdendo uma massa de estrutura química específica e neutra [65].

Uma das principais vantagens do acoplamento entre cromatografia gasosa e espectrometria de massas em *tandem* é a identificação de compostos com alto grau de confiança, o que não seria possível apenas com base nas características de retenção/eluição dos compostos, fornecidas por outros detectores utilizados [65]. Assim, as análises em *tandem* propiciam maior seletividade e sensibilidade do sistema cromatográfico.

### 5.3 Identificação e Quantificação de Compostos Voláteis

A maneira mais simples de identificar compostos voláteis é comparando os tempos de retenção ( $t_R$ ) dos picos de interesse com os picos de padrões analíticos puros. Quando não há a disponibilidade de padrões, outros parâmetros podem auxiliar na identificação do analito desconhecido, aumentando, assim, o grau de confiabilidade. As opções mais empregadas para este fim são: quando possível, o conhecimento prévio dos constituintes da amostra analisada; comparar o índice de retenção (ou índice de Kovats) calculado para o analito com aqueles fornecidos pela literatura para a substância em questão, obtidos em colunas com a mesma fase estacionária; comparar o índice de retenção em duas circunstâncias, uma utilizando uma coluna de fase polar e outra apolar [66]; considerar a posição do analito em relação a outros constituintes com identificação consolidada na mesma

amostra; e quando possível, relacionar os descritores sensoriais obtidos por olfatometria com os termos descritivos apresentados na literatura para o mesmo composto, principalmente quando o pico registrado pelo MS não possui razão sinal/ruído suficientemente grande para fornecer um espectro de qualidade [46].

Quando se utiliza espectrometria de massas para a identificação e confirmação dos compostos voláteis previamente separados, utiliza-se a informação estrutural proveniente da relação massa/carga ( $m/z$ ) do íon molecular e dos fragmentos registrada nos espectros de massas obtidos. O analito é considerado positivamente identificado quando o seu espectro é idêntico ao obtido para a substância pura [67].

As análises quantitativas podem ser desenvolvidas utilizando padronização interna ou externa. No método de padronização interna uma quantidade de uma substância medida cuidadosamente, que atua como padrão interno, é introduzida em cada padrão e na amostra, e a razão entre as áreas do pico do analito e do padrão interno funcionam como parâmetro analítico. O método de padronização externa envolve a preparação de uma série de soluções-padrão de composições próximas à concentração do analito na amostra. A altura ou áreas dos picos obtidos no cromatogramas dos padrões são então utilizadas em um gráfico em função da concentração. Idealmente a curva obtida deve ser uma reta que passa pela origem e a concentração da amostra é obtida a partir da equação desta reta [68, 69].

A quantificação dos picos de compostos voláteis identificados deve ser realizada depois da validação do método. É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados, garantindo a confiabilidade e reprodutibilidade do método analítico utilizado. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez [68, 69].

## 6. REFERÊNCIAS

- [1] JACKSON, R. Chemical Constituents of grapes. In: **Wine Science: principles and applications**. 3th ed. London: Academic Press, p. 270 - 331. 2008
- [2] INGLEZ DE SOUZA, J. S. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.
- [3] GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinhos, 2009.
- [4] OIV. International Organisation of Vine and Wine. **Statistical Report on World Vitiviniculture 2013**. Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/cms/index>. Acesso em 08/set/2013.
- [5] MELLO, L. M. R. de. **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2012**. Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>. Acesso em 20 julho 2013.

- [6] IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/index.php>. Acesso em 20 julho 2013.
- [7] BRDE, Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. Agência de Florianópolis. Superintendência de Planejamento. **VITIVINICULTURA EM SANTA CATARINA Situação atual e perspectivas**. Florianópolis: BRDE, 2005.
- [8] MARIN, F.R; ASSAD, M. L. L.; PACHECO, L. R. F.; PILAU, F. G.; PINTO, H. S.; CONCEIÇÃO, M. A. F.; TONIETTO, J.; MANDELLI, F. Potencial de clima e solo para a viticultura, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.16, n. 2, p.163-174, 2008.
- [9] WOLPERT, J.A. et al. Field performance of six Chardonnay clones in the Napa Valley. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.45, n.4, p.393-400, 1994.
- [10] FIDELIBUS, M. W.; CHRISTENSEN, L. P.; KATAYAMA, D. G.; THIBAUT-VERDENAL, P. Yield components and fruit composition of six Chardonnay grapevine clones in the Central San Joaquin Valley, California. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 57, n.4, p.503-509, 2006.
- [11] ANDERSON, M. M.; SMITH, R. J.; WILLIAMS, M. A.; WOLPERT, J. A. Viticultural evaluation of French and Californian Chardonnay clones grown for production of sparkling wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.59, n.1, p.73-77, 2008.
- [12] MIELE, A.; MIOLO, A. **O sabor do Vinho**. Bento Gonçalves: Vinícola Miolo: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 136 p.
- [13] UVIBRA. **Dados da vitivinicultura**: quantidade de uvas processadas no Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Online. Disponível em: [http:// www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vitivinicultura](http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vitivinicultura). Acesso em: 10 jul. 2013.

- [14] JAFFRÉ, J.; VALENTIN, D.; MEUNIER, J. M.; SILIANI, A. ; BERTUCCIOLI, M. ; LE FUR, Y. The Chardonnay wine olfactory concept revisited: A stable core of volatile compounds, and fuzzy boundaries. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 456 – 464, 2011.
- [15] LEE, S. J.; NOBLE, A. C. Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 8036 – 8044, 2003.
- [16] LI, H.; TAO, Y. S.; WANG, H.; ZHANG, L. Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 287 – 292, 2008.
- [17] RIZZON, L. A.; MIELE, A.; SCOPEL, G. Características analíticas de vinhos Chardonnay da Serra Gaúcha. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2555 – 2558, 2009.
- [18] RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology Volume 2 – The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments**. 2 ed. West Sussex: John Wiley and Sons, Ltd., 2006.
- [19] FALQUÉ, E.; FERNÁNDEZ, E.; DUBOURDIEU, D. Differentiation of white wines by their aromatic index. **Talanta**, n. 54, v. 2, p. 271 – 281, 2000.
- [20] SPILLMAN, P. J.; SEFTON, M. A.; GAWEL, R. The contribution of volatile compounds derived during oak barrel maturation to the aroma of a Chardonnay and Cabernet Sauvignon wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, n. 10, p. 227-235, 2004.
- [21] DUBOURDIEU, D.; TOMINAGA, T.; MASNEUF, I.; DES GACHONS, C. P. ; MURAT, M. L. The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation : The Exemple of Sauvignon blanc. **American Journal of Enology and Viticulture**, n. 57, v. 1, p. 81 -88, 2006.

- [22] ESTI, M., TAMBORRA, P. Influence of winemaking techniques on aroma precursors. **Analytica Chimica Acta**, n. 563, p. 173-179, 2006.
- [23] GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J.; GÓMEZ-MÍGUEZ, M.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: effects of grape maturity and soil type. **Journal of Food Engineering**, n. 9, p. 758–764, 2007.
- [24] FALCÃO, L. D.; de REVEL, G.; PERELLO, M. C.; RQUIER, L.; ROSIER, J. P.; UBERTI, A. A. A.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Volatile Profile Characterization of Young Cabernet sauvignon Wines from a New Grape Growing Region in Brazil. **Journal International of Science Vigne Vin**, v. 42, n. 3, p.133-145, 2007.
- [25] SWIEGERS, J. H.; KIEVIT, R. L.; SIEBERT, T.; LATTEY, K. A.; BRAMLEY, B. R.; FRANCIS, L.; KING, E. S.; PRETORIUS, I. S. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. **Food Microbiology**, n. 26, p. 204–211, 2009.
- [26] BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L.; CROUZET, J.; GÜNATA, Y. Z. **Arômes**. In: Oenologie: Fondements Scientifiques et Technologiques, C. Flanzy (Eds.), Paris: Lavoisier-Tec & Doc, 1998.
- [27] MARAIS, J. Terpenes in the aroma of grapes and wine: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 4, p. 49 -58, 1983.
- [28] SKINKS, P. A; BORDELON, B. P; WOOD, K. V. Comparison of Monoterpene Constituents in Traminette, Gewürztraminer, and Riesling Winegrapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, n. 59, v. 4, 2008.
- [29] TOMINAGA, T.; DARRIET, P.; DUBOURDIEU, D. Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. **Vitis**, n. 35, v. 4, p. 207–210, 1996.
- [30] TOMINAGA, T.; DUBOURDIEU, D. Recherches sur l'arôme variétal des vins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs du raisin. **Revue des Oenologues**, n.97, p. 22–28, 2000.

- [31] RAZUNGLES, A.; GÜNATA, Y. Z.; PINATEL, S.; BAUMES, R. L.; BAYONOVE, C. L. Étude quantitative de composés terpéniques, norisoprenoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. **Sciences des Aliments**, n. 13, p. 59 – 72, 1993.
- [32] CABAROGLU, T.; CANBAS, A.; BAUMES, R. L.; BAYONOVE, C. L.; LEPOUTRE, J. P.; GÜNATA, Y. Z. Aroma composition of a white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as affected by skin contact. **Journal of Food Science**, n.62, v. 4, p. 680–683, 1997.
- [33] CROUZET, J.; FLANZY, C.; GÜNATA, Y. Z.; PELLERIN, P.; SAPI, J. C. **Les enzymes enoenologie**. In: *Oenologie: Fondements Scientifiques et Technologiques*, C. Flanzzy (Eds.), Paris: Lavoisier-Tec & Doc, 1998.
- [34] MOIO, L.; UGLIANO, M., GENOVESE, A.; GAMBUTI, A.; PESSINA, R.; PIOMBINO, P. Effect of antioxidant protection of must on volatile compounds and aroma shelf life of Falanghina (*Vitis vinifera* L.) wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n.52, v.4, p. 891 – 897, 2004.
- [35] BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. **Principles and Practices of Winemaking**. Chapman and Hall: New York, 1996.
- [36] Etiévant, P. X. **Wine**. In: *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, Henk Maarse (Eds.), Marcel Dekker Inc.: New York, 1991.
- [37] SUMBY, K. M.; GRBIN, P. R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, n.121, v.1, p. 1 - 16, 2010.
- [38] FERREIRA, V.; LÓPEZ, R.; CACHO, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 80, v.11, p. 1659–1667, 2000.
- [39] ANTALICK, G.; PERELLO, M. C.; DE REVEL, G. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine

- esters by headspace-solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 121, p. 1236–1245, 2010.
- [40] GURBUZ, O.; ROUSEFF, J. M.; ROUSEFF, R. L. Comparison of aroma volatiles in commercial merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, v.11, p. 3990–3996, 2006.
- [41] AZNAR, M.; ARROYO, T. Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap–gas chromatography–mass spectrometry: Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions. **Journal of Chromatography A**, n. 1165, v. 1–2, p. 151–157, 2007.
- [42] DUBOIS, P. Les arômes des vins et leurs défauts (cont.). **Revue Française d'Oenologie**, n. 145, p. 27–40, 1994.
- [43] UGLIANO, M. Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.61, v.26, p. 6125–6136, 2013.
- [44] GUTH, H. In: **Chemistry of Wine Flavour**; Waterhouse, A. L.; Ebeler, S. E, (eds); American Chemical Society: Washington, DC, 1998.
- [45] POZO-BAYÓN, M. A.; REINECCIUS, G. **Interactions Between Wine Matrix Macro-Components and Aroma Compounds**. In: Wine Chemistry and Biochemistry, M. V. Moreno-Arribas, M. Carmen Polo (Eds), Springer Science+Business Media: New York, 2009.
- [46] FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. In: **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**, FRANCO, M. R. B. (ed.). Varela: São Paulo, p.17-27, 2004.
- [47] EBELER, S. Analytical Chemistry: Unlocking the Secrets of Wine Flavor. **Food Reviews International**, v.17, p. 45 – 64, 2001.
- [48] POLÁŠKOVÁ, P.; HERSZAGE, J.; EBELER, S. E. Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*, n. 37, p. 2478 – 2489, 2008.

- [49] LÓPEZ, R.; AZNAR, M.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 966, n.1-2, p. 167–177, 2002.
- [50] ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.
- [51] PAWLISZYN, J. (ed) Handbook of solid phase microextraction. Chemical Industry Press of China, 406 p., 2009.
- [52] VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.
- [53] DE LA CALLE GARCÍA, D.; MAGNAGHI, S.; REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid phase microextraction. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 19, p. 257–262, 1996.
- [54] WHITON, R. S.; ZOECKLEIN, B. W. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 4, p. 379 – 382, 2000.
- [55] ZHANG, M.; PAN, Q.; YAN, G.; DUAN, C. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine, **Food Chemistry**, v. 125, p. 743 – 749, 2011.
- [56] SAGRATINI, G.; MAGGI, F.; CAPRIOLI, G. C.; RICCIUTELLI, M.; TORREGIANI, E.; VITTORII, S. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marche and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME–GC–MS and HPLC–MS. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1592-1599, 2012.
- [57] BARROS, E. P.; MOREIRA, N.; PEREIRA, G. E.; LEITE, S. G. F.; REZENDE, C. M.; GUEDES DE PINHO, P. Development and validation of automatic HS-

- SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines, **Talanta**, v. 101, p. 177–186, 2012.
- [58] POZZO-BAYÓN, M. A.; PUEYO, E.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; POLO, M. C. Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction–gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines: Its application to the characterization of varietal wines. **Journal of Chromatography A**, v. 922, p. 267 – 275, 2001.
- [59] HOWARD, K. L.; MIKE, J. H.; RIESEN, R. Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for Headspace Analysis of Wine Aroma Components. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, n. 1, p. 37 - 45, 2005.
- [60] NAVAJAS, M. P. S.; CAMPO, E.; CULLERÉ, L.; ZURBANO, P. F.; VALENTIN, D.; FERREIRA, V. Effects of the Nonvolatile matriz on the Aroma Perception of Wine. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5574 – 5585, 2010.
- [61] SAN-JUAN, F.; PETKA, J.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; ESCUDERO, A. Producing headspace extracts for the gas chromatography–olfactometric evaluation of wine aroma. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 188 – 195, 2010.
- [62] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (eds.). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.
- [63] HOFFMANN, E.; STROOBANT V., **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. John Wiley & Sons: Chichester, 3<sup>a</sup> ed., 2007.
- [64] DASS, C., **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, 2007.
- [65] CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O 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.

- [66] JENNINGS, W. G.; SHIBAMOTO, T. **Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Gas Chromatography**. Academic Press. 1980.
- [67] MCLAFFERTY, F. W. Interpretation of Mass Spectra, 2. ed. Mill Valey: University Science Books, 1993, 371p.
- [68] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.
- [69] LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: RiMa Editora, 46p. 2004.



## Capítulo 2

---

Otimização multivariada da extração de  
Compostos Voláteis em Vinhos Chardonnay  
utilizando HS-SPME e GC-MS/MS

**Sabrina de Bona Sartor, Marla Sganzerla, Diogo Noin de Oliveira, Rodrigo**

**Ramos Catharino, Helena Teixeira Godoy.**



**OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS  
EM VINHOS CHARDONNAY UTILIZANDO HS-SPME E GC-MS/MS**

Sabrina de Bona Sartor<sup>a</sup>, Marla Sganzerla<sup>a</sup>, Diogo Noin de Oliveira<sup>b</sup>, Rodrigo  
Ramos Catharino<sup>b</sup>, Helena Teixeira Godoy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Análise Instrumental de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

<sup>b</sup> *Laboratório Innovare de Biomarcadores, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil.*

Artigo preparado para submissão conforme as normas do periódico Australian  
Journal of Grape and Wine Research, John Wiley & Sons, Inc. (2013).



## RESUMO

**Contexto e Objetivos:** Um método de extração de compostos voláteis em vinhos Chardonnay utilizando microextração em fase sólida (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas *tandem* (GC-MS/MS) foi desenvolvido através de otimização multivariada.

**Métodos e Resultados:** A estratégia de otimização foi conduzida utilizando análise multivariada com delineamento composto central rotacional (CCRD) baseado em planejamento fatorial  $2^2$  e metodologia de superfície de resposta. As condições otimizadas foram temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo (minutos) de extração. A área total dos picos cromatográficos referentes a dezenove compostos específicos foram monitorizados e utilizado como resposta. A aquisição foi realizada no modo de monitoramento de reações múltiplas modo (MRM). O modelo matemático que descreve a superfície de resposta para o CCRD foi validado usando a análise de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança. Este modelo mostrou uma falta de ajuste, baseado nos valores de média dos quadrados e erro puro de cada resposta, onde o  $F_{\text{calculado}}$  foi 2,23 vezes de  $F_{\text{tabulado}}$ .

**Conclusão:** Apesar de não poder ser rigorosamente utilizados para fazer previsões quantitativas, o modelo apresentou coeficientes da equação úteis, principalmente os lineares, para a compreensão do comportamento sistemático nos valores de resposta em função dos níveis de fator com base nos resultados observados. Assim, a condição ótima observada neste método foi de  $30^{\circ}\text{C}$  e 45

minutos de extração. Os compostos majoritários observados nesta amostra foram ésteres e álcoois, característicos de aroma de vinho Chardonnay.

**Importância do Estudo:** O planejamento estatístico multivariado pode ser usado na otimização dos parâmetros de extração por HS-SPME, com número reduzido de experimentos, podendo ser efetivamente empregado na extração de compostos voláteis de vinhos Chardonnay e posterior análise utilizando GC-MS/MS. Este é o primeiro estudo empregando GC-MS/MS à análise de compostos voláteis em vinhos.

**Palavras chave:** otimização multivariada; HS-SPME; compostos voláteis; Chardonnay; GC-MS/MS.

## ABSTRACT

**Background and Aims:** A method for optimization of extraction of volatile compounds in Chardonnay wine was developed using headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry (GC-MS/MS).

**Methods and Results:** Optimization of the HS-SPME conditions was carried out using a 22 factorial central composite rotational design (CCRD). Variables chosen were temperature (T, °C) and extraction time (t, minutes). Total area of chromatographic peaks respect to nineteen specific compounds were monitored. Acquisition was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The mathematical model that describes the response surface for the CCRD was validated using the analysis of variance (ANOVA) at 95% of confidence level. This model showed a lack of fit based on mean square pure error ratios for each response, with  $F_{\text{calculated}}$  2,23 times of  $F_{\text{tabulated}}$ .

**Conclusion:** Although the models cannot be rigorously used to make quantitative predictions, the model coefficients, especially the linear ones, are useful for understanding systematic behaviour in the response values as a function of the factor levels based on the observed results. Thus, the optimal extraction condition achieved in this method was corresponding to 30°C and 45 minutes.

**Significance of the Study:** Multivariate statistical design can be used in optimization of HS-SPME extraction parameters, with reduced number of experiments and can be useful in sampling method of volatile compounds of

Chardonnay wines analysis by CG-MS/MS. This is the first study employing GC-MS/MS to the analysis of wine volatile compounds.

**Key words:** Chardonnay; GC-MS/MS; HS-SPME; multivariate optimization; volatile compounds.

## 1 INTRODUÇÃO

Os diferentes compostos voláteis presentes em vinhos determinam o seu aroma final, característica fundamental na identidade, qualidade e aceitação pelo mercado consumidor. Estes compostos, quando em conjunto, formam uma matriz capaz de estimular uma resposta sensorial pelo sistema olfativo humano (Smyth and Cozzolino, 2012). Pertencem a diferentes classes químicas, tais como ésteres, álcoois, cetonas, aldeídos, monoterpenos, C<sub>13</sub>-norisoprenoides, metoxipirazinas e compostos sulfurados (Ebeler and Thorngate, 2009). Mais de 1.000 compostos de aroma já foram identificados em vinhos de diferentes origens, porém apenas cerca de 10% destes apresentam alguma contribuição importante para o aroma final de um vinho. A composição e a intensidade destes compostos dependem de vários fatores, tais como a cultivar de uva utilizada, grau de maturação da uva, clima, solo, altitude, microrganismos utilizados na fermentação, técnicas enológicas utilizadas durante o processo de fermentação, envelhecimento, etc. (Jiang et al., 2013, Medina et al., 2013, Añón et al., Liberatore et al., 2010).

Devido à complexa composição química de vinhos, matriz onde os compostos de aroma estão presentes, um método eficiente de extração se faz necessário, tendo como objetivo isolar os analitos alvo da matriz, além de servir como uma ferramenta de pré-concentração, aumentando a sensibilidade do sistema analítico empregado. Vários métodos de extração são relatados na literatura para a análise de compostos voláteis em vinhos, tais como técnicas de destilação,

extração por solvente e extração em fase sólida (SPE) (Polaskova et al., 2008). Atualmente, o método de extração mais utilizado em análise de compostos voláteis em uvas e vinhos é a microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) (San-Juan et al., 2010, Zhang et al., 2011).

Introduzido por Arthur e Pawliszyn em 1990 (Arthur and Pawliszyn, 1990), a SPME é uma técnica sortiva de preparo de amostras isenta de solventes, que envolve a exposição de uma pequena quantidade de fase extratora dispersa em um suporte sólido, sob condições controladas, em contato direto com a amostra (DI-SPME) ou então, com o *headspace* (ou espaço confinado) desta, estabelecido previamente (HS-SPME). O processo envolve duas etapas básicas : a primeira, onde há a partição entre os analitos da amostra e o material do recobrimento da fibra (fase extratora), e a segunda etapa, onde ocorre a dessorção dos analitos concentrados na fibra para um instrumento analítico (Risticvic et al., 2009). Dentre as principais vantagens desta técnica estão: o preparo das amostras em menor tempo, uso de pequenos volumes de amostras, a possibilidade de concentração de analitos em amostras líquidas e sólidas, reduzida manipulação por parte do analista e, principalmente, o não uso de solventes orgânicos, sem, conseqüentemente, a geração de grandes volumes de solventes residuais (Risticvic et al., 2009, Zhang et al., 1994). A SPME tem sido utilizada, rotineiramente, em conjunto com sistemas de cromatografia gasosa e aplicada com sucesso a uma grande variedade de compostos, especialmente para a

extração de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de matrizes complexas (Risticvic et al., 2009, Hayasaka et al., 2005).

Considerando que a microextração em fase sólida não é uma técnica exaustiva e sim uma técnica de equilíbrio, com o máximo de sensibilidade obtido em um ponto de equilíbrio, durante o desenvolvimento de um método de SPME alguns parâmetros podem ser otimizados. Usualmente, os parâmetros monitorados são o tipo de recobrimento da fibra, o modo de amostragem (modo imersão direta ou *headspace*), agitação, tempo e temperatura de extração, força iônica, pH, volume de amostra, tipo de vial utilizado, volume de *headspace*, condições de dessorção, entre outros (Risticvic et al., 2009, Zhang et al., 2011, Hayasaka et al., 2005, Medina et al., 2013, Whiton and Zoecklein, 2000).

Nestes casos, onde muitos fatores podem influenciar a resposta do sistema, os procedimentos de otimização da extração podem ser conduzidos usando análises estatísticas multivariadas, que permitem a variação simultânea de todos os fatores estudados, sendo útil para localizar as interações entre eles e as variações não detectáveis por análises experimentais univariadas tradicionais. Essas ferramentas podem fornecer informações seguras sobre as melhores condições de análise e existência ou não de erros experimentais. Uma das ferramentas mais utilizadas, em análise estatística multivariada, é o uso de delineamento composto central rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (Bogusz Junior et al., 2011, Welke et al., 2012).

Tradicionalmente, a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é a mais utilizada para a análise de compostos

voláteis em vinhos (Polaskova et al., 2008). Na técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (GC-MS/MS), as moléculas de interesse são fragmentados por duas vezes e, em seguida, o sistema é capaz de isolar um fragmento selecionado e refragmenta-lo, gerando um espectro específico obtido a partir dos íons selecionados ( $m/z$ ). O uso de GC-MS/MS proporciona um elevado grau de segurança na identificação do analito, devido sua maior seletividade e sensibilidade quando comparado à técnica de GC-MS. Em função disso, esta técnica vem sendo amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações na composição de matrizes complexas, tais como a determinação de resíduos de pesticidas em diferentes matrizes alimentares (Sapozhnikova and Lehotay, 2013), determinação de drogas anabólicas em urina humana (Delgadillo et al., 2012), análise de compostos orgânicos voláteis em água (Cervera et al., 2011), análises metabolômicas (Tsugawa et al.), entre outros.

Assim, o objetivo deste trabalho é, pela primeira vez em literatura, otimizar um método de extração de compostos voláteis em vinhos Chardonnay por microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (GC-MS/MS), através da otimização dos fatores temperatura e tempo de extração, mediante o uso de delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^2$  e metodologia de superfície de resposta para a determinação da condição ótima de extração.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e Padrões

Os padrões analíticos utilizados foram: 1-hexanol (CAS número 111-27-3), 3-metil-1-butanol (CAS número 123-51-3), 2-feniletanol (CAS número 60-12-8), acetato de isoamila (CAS número 123-92-2), acetato de hexila (CAS número 142-92-7), lactato de etila (CAS número 97-64-3), succinato de dietila (CAS número 123-25-1), butanoato de etila (CAS número 105-54-4), hexanoato de etila (CAS número 123-66-0), octanoato de etila (CAS número 106-32-1), decanoato de etila (CAS número 110-38-3), ácido hexanóico (CAS número 142-62-1), ácido octanóico (CAS número 124-07-2), ácido decanóico (CAS número 334-48-5), nerol (CAS número 106-25-2), linalol (CAS número 78-70-6),  $\alpha$ -terpineol (CAS número 10482-56-1),  $\alpha$ -ionona (CAS número 127-41-3),  $\beta$ -ionona (CAS número 79-77-6). Todos os padrões foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), com pureza  $\geq 99\%$ .

Uma solução sintética de vinho foi preparada utilizando água Milli- Q<sup>®</sup>, 12% (v/v) de etanol grau HPLC (JT Baker, Xalostoc, México) e 2 g.L<sup>-1</sup> de ácido tartárico (Merck, Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 3,2 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M . Cloreto de Sódio (NaCl) foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

### 2.2 Amostras

A amostra de vinho Chardonnay utilizada foi obtida em estabelecimento comercial na cidade de Campinas, São Paulo e armazenada ao abrigo da luz e temperatura de 16°C até a realização das análises. O vinho foi produzido no município de Andradas, Minas Gerais, durante a safra 2011 e as análises foram realizadas no primeiro semestre de 2012.

### **2.3 Preparo da amostra e procedimentos de SPME**

Alíquotas de 10 mL de vinho foram transferidas para vials de SPME de 40 mL, com tampa de rosca e septo de PTFE/silicone (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA). Foi adicionado 3,0 g de cloreto de sódio (NaCl). Durante o tempo de amostragem, a amostra foi agitada constantemente com uma pequena barra de agitação magnética. A fibra de SPME utilizada foi de 1 cm, recoberta com 50/30 mM de Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA.), condicionada antes do uso de acordo com as instruções do fabricante. A fibra foi exposta no *headspace* da amostra após 10 minutos de tempo de equilíbrio. Após a extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo à gás para a dessorção dos analitos a uma temperatura de 270°C, no modo *splitless* durante um período de 15 minutos.

### **2.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em *tandem* (GC - MS/MS)**

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo à gás Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) acoplado ao detector de massas do tipo triplo quadrupolo Agilent 7000 Triple Quad (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). O gás de arraste utilizado foi Hélio ultra puro 6.0 (White Martins, Brasil), em vazão constante de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi estabelecida em 270°C, com injeção no modo *splitless*. O *liner* utilizado no experimento foi específico para SPME, com diâmetro interno de 0,75mm, obtido da Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna capilar do tipo Supelcowax<sup>®</sup> 10 (100% polietilenoglicol) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA.) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25µm. A programação de temperatura foi realizada conforme metodologia proposta por Weldegergis e colaboradores (Weldegergis et al., 2011), onde a temperatura inicial foi 30°C, mantida por 2 minutos, aumentando 4°C.min<sup>-1</sup> até 130°C e mantida por 2 minutos, aumentando a uma taxa de 8°C.min<sup>-1</sup> até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. O tempo de corte de solvente foi estabelecido em 2,5 minutos.

Os espectros de massa foram obtidos usando ionização por impacto de elétrons (EI, *Electron Impact*) com energia de colisão de -70eV. As temperaturas da interface, fonte e quadrupolos (Q1, Q2 e Q3) utilizadas foram 250, 260 e 150°C, respectivamente. Nitrogênio e Hélio foram utilizados na célula de colisão (Q2) com vazão de 2,25 mL.min<sup>-1</sup> e 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*). Os íons precursores (*m/z*) foram escolhidos como

qualificadores e os íons produto ( $m/z$ ) como identificadores após otimização dos valores de energia de colisão e fragmentação (CID, *Collision-Induced Dissociation*), sendo estabelecidos de acordo com cada analito analisado. A faixa de massas analisada foi de 30 até 400  $m/z$ , com 50 milissegundos de tempo de aquisição. O *dwell time*, tempo de aquisição dividido pelo número de transições, utilizado foi de 1 milissegundo para cada analito. As condições específicas de MS/MS estão apresentadas na Tabela 2.1.

Os dados foram adquiridos e processados utilizando o programa Agilent MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis (versão B.06.00, Agilent Technologies Inc.) e Agilent MassHunter Workstation Software Quantitative Analysis for QQQ (versão B.05.02, Agilent Technologies Inc.). A identificação dos compostos foi realizada por comparação entre tempos de retenção dos compostos analisados e com padrões analíticos presentes em uma solução sintética de vinho, injetada sob mesmas condições. Os íons qualificadores e identificadores foram considerados quando apresentaram mais que 75% de similaridade entre os padrões preparados e analisados, além de comparados com os padrões de fragmentação disponíveis nos espectros de massa presente na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST, 2011).

Tabela 2.1. Tempo de retenção e parâmetros de GC-MS/MS dos compostos monitorados

Analito	Transição	Íon Precursor Selecionado (m/z)	Íon Produto Selecionado (m/z)	Energia de Colisão (V)	Tempo de Retenção (min)
<i>Álcoois</i>					
1-hexanol	69.0→43.0	69	43	40	21.76
3-metil-1-butanol	77.0→55.0	77	55	20	29.39
2-feniletanol	91.0→65.0	91	65	40	34.61
<i>Ésteres</i>					
Acetato de hexila	84.0→56.0	84	56	25	27.78
Acetato de isoamila	87.0→70.0	87	70	25	37.16
Lactato de etila	75.0→45.0	75	45	25	16.03
Dietil Succinato	129.0→101.0	129	101	25	29.02
<i>Ésteres etílicos de ácidos graxos</i>					
Butanoato de etila	101.0→29.0	101	29	25	21.65
Hexanoato de etila	115.0→27.0	115	27	25	21.71
Octanoato de etila	143.0→73.0	143	73	35	27.78
Decanoato de etila	155.0→101.0	155	101	35	30.93
<i>Ácidos graxos</i>					
Ácido decanóico	129.0→57.0	129	57	30	21.66
Ácido hexanóico	99.0→55.0	99	55	30	14.68
Ácido octanóico	115.0→85.0	115	85	30	37.14
<i>C<sub>13</sub>-norisoprenoides</i>					
α-ionona	136.0→109.0	136	109	40	35.40
β-ionona	177.0→135.0	177	135	40	24.29
<i>Monoterpenos</i>					
Linalol	121.0→80.0	121	80	35	28.78
α-terpineol	136.0→59.0	136	59	35	19.89
Nerol	139.0→84.0	139	84	35	27.14

## 2.4 Estratégia de Otimização

A otimização das condições de HS-SPME foi realizada utilizando um delineamento fatorial composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>2</sup>, com quatro pontos axiais ( $\alpha = 1,4142$ ) e quatro pontos centrais (Ferreira et al., 2007). Como variáveis a serem estudadas foram escolhidas a temperatura (T, °C) e tempo de extração (t, minutos). Os níveis de cada variável podem ser vistos na Tabela 2.2. Doze experimentos foram realizados de forma aleatória. Outros parâmetros

(quantidade de NaCl, tempo de equilíbrio, a velocidade de agitação, volume de amostra) foram arbitrariamente estabelecido pelos autores.

Tabela 2.2. Fatores, níveis e domínio experimental das condições aplicadas na otimização da extração por HS-SPME.

Variáveis	Variáveis codificadas				
	$-\alpha^a$	-1	0	1	$\alpha^a$
Temperatura de extração (T, °C)	30	32,5	40	47,5	50,6
Tempo de extração (t, minutes)	30	35	45	55	59,1

<sup>a</sup> $\alpha = 1,4142$ .

## 2.5 Análises Estatísticas

A análise de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança foi utilizada para validar o modelo matemático que descreve a superfície de resposta para o CCRD. O software Statistica<sup>®</sup> v.7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para análise estatística dos dados e resultados obtidos.

## 3 RESULTADOS

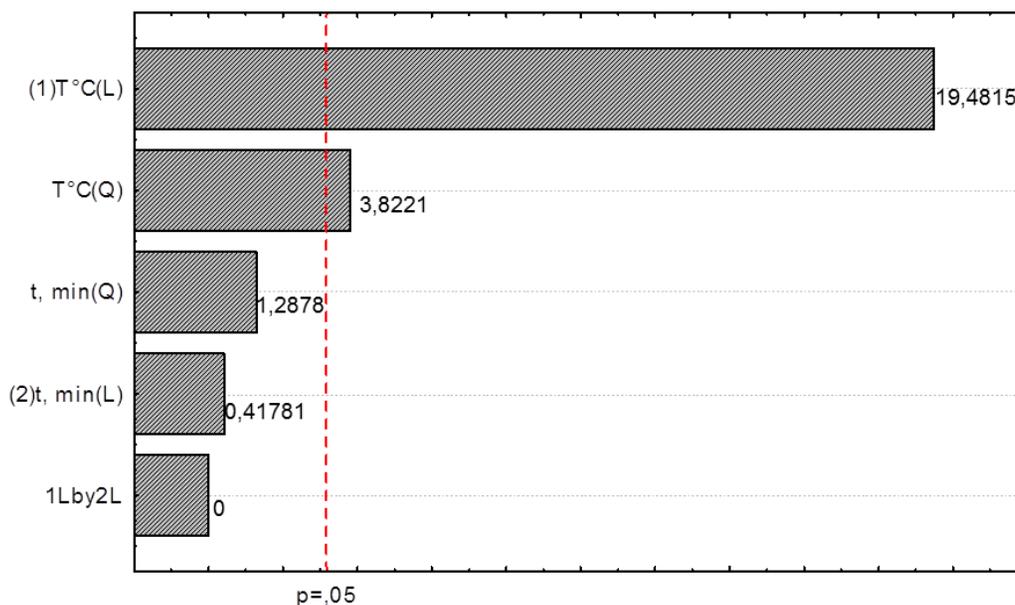
Os compostos voláteis monitorados neste estudo foram escolhidos por representar as principais classes químicas de compostos de aroma de vinhos: álcoois, ésteres, etil ésteres, ácidos graxos, monoterpenos e C<sub>13</sub>-norisoprenoides [15]. A escolha da fibra utilizada, DVB/CAR/PDMS, foi realizada de acordo com o interesse do presente trabalho: cobrir uma ampla gama de polaridade, volatilidade e funcionalidade, representado pelos compostos selecionados. Diversos autores

citam a fibra do tipo DVB/CAR/PDMS como a mais seletiva e eficiente para a pesquisa de compostos voláteis em vinhos (Castro Mejías *et al.*, 2003, Welke *et al.*, 2012, Howard *et al.*, 2005).

A quantidade de sal adicionada tem a finalidade de aumentar a força iônica, promovendo o “*salting out*” dos compostos voláteis da matriz aumentando os seus coeficientes de partição e conseqüentemente o aumento da concentração dos analitos no *headspace* antes da extração (Whiton and Zoecklein, 2000, Howard *et al.*, 2005). Teoricamente, qualquer sal inorgânico pode ser utilizado, porém os sais mais utilizados são o sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e o cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), devido à alta solubilidade destes em meio aquoso (vinho) (Howard *et al.*, 2005). A concentração geralmente utilizada é de 30% do volume da amostra (Câmara *et al.*, 2006, Welke *et al.*, 2012)

O volume de amostra utilizado foi estabelecido de acordo com os procedimentos experimentais previamente testados, considerando o volume do vial utilizado, o volume de *headspace* e tamanho e profundidade de exposição da fibra ao *headspace* da amostra.

A Figura 2.1 apresenta o Diagrama de Pareto, onde os dados obtidos pelo delineamento experimental realizado podem ser observados. Com base na análise dos efeitos dos fatores envolvidos no delineamento, a 95% de confiança, podemos verificar que apenas o fator temperatura ( $T$ , °C) foi significativo nos modelos avaliados.



*Estimativa dos Efeitos Padronizados (Valor Absoluto)*

Figura 2.1. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores avaliados no delineamento fatorial  $2^2$ . Resposta: área total dos picos cromatográficos dos compostos avaliados.

A Tabela 2.3 apresenta os resultados obtidos nos experimentos conduzidos por DCCR, onde a resposta está expressa em unidade arbitrária de área e representa a área total dos picos cromatográficos dos dezenove compostos selecionados e monitorados.

Também podemos observar os níveis dos fatores tempo (t, min) e temperatura (T, °C) utilizados na execução dos experimentos. Os valores foram arredondados para melhor controle experimental dos níveis. Observa-se maior resposta cromatográfica no experimento número 5, com valores de área de  $2,54E+07$ , onde o valor de temperatura utilizado foi  $30^{\circ}\text{C}$  e o tempo de extração foi de 45 minutos.

Tabela 2.3. Condições experimentais e respostas obtidos por DCCR para otimização da extração HS-SPME e GC-MS/MS

Experimento	Fatores				Resposta <sup>b</sup>
	T (°C)	Temperatura de extração	t (min)	Tempo de extração	
1	-1	32,5	-1	35	2,50E+07
2	1	47,5	-1	35	2,44E+07
3	-1	33,5	1	55	2,49E+07
4	1	47,5	1	55	2,43E+07
5	-1,41	29,4	0	45	2,54E+07
6	1,41	50,6	0	45	2,43E+07
7	0	40	1,41	59,1	2,50E+07
8	0	40	-1,41	30,0	2,49E+07
9 <sup>a</sup>	0	40	0	45	2,48E+07
10 <sup>a</sup>	0	40	0	45	2,49E+07
11 <sup>a</sup>	0	40	0	45	2,49E+07
12 <sup>a</sup>	0	40	0	45	2,49E+07

<sup>a</sup>: repetição do ponto central.

<sup>b</sup>: área total dos picos selecionados, expresso em unidade arbitrária.

A análise de variância (ANOVA), com 95% de confiança, foi utilizada para verificar quais fatores afetam significativamente a resposta do procedimento de HS-SPME e para validar o modelo matemático que descreve a superfície de resposta do DCCR. A Tabela 2.4 apresenta os valores obtidos pela ANOVA. Com base nos resultados de regressão, podemos evidenciar a existência ou não da falta de ajuste do modelo matemático, podendo fazer previsões baseados neste (Bogusz Junior *et al.*, 2011, Ferreira *et al.*, 2007).

Tabela 2.4. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados, para os fatores tempo e temperatura de extração dos compostos voláteis de vinho Chardonnay por HS-SPME

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	$F_{cal}^a$	$F_{tab}^b$	$F_{cal}/F_{tab}$
Regressão	8,27E+11	5	1,65E+11	395,97	4,39	90,2
Resíduos	1,63E+11	6	2,71E+10			
Falta de ajuste	1,55E+11	3	5,17E+10	20,68	9,28	2,23
Erro puro	7,50E+09	3	2,50E+09			
Total	1,14E+12	11				
$R^2$	0,720					

<sup>a</sup>:  $F_{calculado}$

<sup>b</sup>:  $F_{tabulado}$

Com base com dados apresentados, verifica-se que a significância estatística da regressão, dada pela média quadrática dos resíduos ( $MQ_R/MQ_r$ ) ou  $F_{calculado}$ , é de 395,97. Quando comparamos, ao nível de confiança de 95%, os valores de  $F_{calculado}$  e de  $F_{tabulado}$  (5,6,95%), cujo valor é de 4,39, verifica-se que  $F_{calculado} > F_{tabulado}$  cerca de 90,2 vezes, indicando que a correlação entre as variáveis estudadas é considerada adequada.

Com base no modelo quadrático obtido, foi gerado a superfície de resposta do experimento. O modelo quadrático gerou a equação  $R = 24875744 - 344901 \cdot T - 75859T^2 - 7397 \cdot t - 25559t^2$ , onde T é a variável 1 (temperatura de extração, °C), t é a variável 2 (tempo de extração, min) e R, a resposta (área total dos picos cromatográficos). Os coeficientes da equação do modelo, mesmo apresentando falta de ajuste, podem ser utilizados na compreensão do comportamento sistemático nos valores de respostas em função dos níveis dos fatores (Meinhart et al., 2010).

#### 4 DISCUSSÃO

O processo de extração por HS-SPME envolve a partição dos analitos entre a matriz, o recobrimento da fibra extratora e o *headspace*. No equilíbrio, a quantidade de amostra extraída é proporcional ao coeficiente de partição e a concentração do analito no *headspace*. A extração é considerada ótima quando a concentração do analito atinge o equilíbrio de distribuição entre a fase extratora (recobrimento da fibra) e o *headspace* (San-Juan et al., 2010, Zhang et al., 2011, Zhang et al., 1994, Zhang and Pawliszyn, 1993).

A temperatura de extração exerce grande influencia sobre a eficiência do processo de extração dos compostos voláteis em um método de HS-SPME. A cinética do processo de extração é afetada diretamente pela temperatura, pois atua na determinação da pressão de vapor dos analitos na matriz (Pawliszyn, 2000). Além disso, afeta diretamente o coeficiente de partição dos analitos. O aumento da temperatura, devido às condições termodinâmicas, reduz o coeficiente de partição e conseqüentemente, diminuindo a quantidade de analito extraído (Zhang and Pawliszyn, 1993, Câmara et al., 2006, Pawliszyn, 2000). Para a análise de compostos voláteis em vinhos por HS-SPME, as temperaturas utilizadas, apresentadas em literatura, variam entre 35°C e 55°C. Porém, estes valores variam em função do tipo de vinho analisado, dos constituintes da matriz e das concentrações dos compostos analisados (Câmara et al., 2006, Welke et al., 2012, Whiton and Zoecklein, 2000).

O tempo de extração, ou de exposição da fibra ao *headspace* da amostra, influencia diretamente o equilíbrio entre as fases envolvidas, e,

consequentemente, a eficiência da extração. O tempo de extração é definido como o tempo necessário para que o equilíbrio entre as fases seja atingido. Para compostos com menor coeficiente de partição, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é maior. Compostos com coeficiente de partição maiores necessitam menor tempo para atingir o equilíbrio (Zhang et al., 1994, Câmara et al., 2006, Pawliszyn, 2009).

A exposição da fibra por períodos de tempo mais curtos, ou antes de atingir o ponto de equilíbrio, faz com que a concentração extraída dos compostos seja subestimada. Por outro lado, a exposição da fibra durante períodos de tempo muito longos faz com que os compostos passem a competir pelos sítios ativos da fibra, também afetando sua concentração final (Zhang et al., 1994, Welke et al., 2012, Whiton and Zoecklein, 2000, Howard et al., 2005).

Para a determinação de compostos voláteis de vinhos, os tempos de extração otimizados e posteriormente utilizados, variaram entre 30 e 60 minutos (Whiton and Zoecklein, 2000, Howard et al., 2005, Câmara et al., 2006). Para a extração HS-SPME em vinhos Chardonnay produzidos no Rio Grande do Sul e utilizados como base para espumantes, Welke e colaboradores (Welke et al., 2012) utilizaram 45 minutos como condição ótima de extração. Neste estudo, o mesmo tempo de extração (45 minutos) foi observado, através da análise multivariada, sendo determinado como tempo ótimo de equilíbrio.

O modelo gerado mostrou uma falta de ajuste, baseado nos valores de média dos quadrados e erro puro de cada resposta, onde o  $F_{\text{calculado}}$  foi 2,23 vezes de  $F_{\text{tabulado}}$ , sendo que  $F_{\text{calculado}}$  deveria ser menor que  $F_{\text{tabulado}}$  para que houvesse

um bom ajuste do modelo. Com base nesse resultado, este modelo não pode ser utilizado para fazer previsões sobre a resposta. Porém, o ponto ótimo de extração está baseado em um resultado real, obtido experimentalmente, além disso, o coeficiente de variação calculado para os experimentos do ponto central foi consideravelmente baixo, 0,14%, indicando adequada repetibilidade do método desenvolvido nesta condição.

Após o processo de extração por HS-SPME, os analitos de interesse foram separados e identificados utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (GC-MS/MS).

A configuração empregada para a aquisição de dados foi o monitoramento de reações múltiplas (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*), onde os íons precursores foram escolhidos como qualificadores e os íons produto como identificadores após otimização dos valores de energia de colisão e fragmentação (CID, *Collision-Induced Dissociation*), sendo estabelecidos de acordo com cada analito analisado. Assim, para a confirmação de cada pico cromatográfico obtido, as transições apresentadas na Tabela 2.1 foram monitoradas individualmente.

A Figura 2.2 apresenta o cromatograma obtido no ponto ótimo de extração por HS-SPME (30°C, 45 minutos) dos compostos voláteis em vinho Chardonnay. O pico destacado ( $t_R = 14.68\text{min}$ ) corresponde ao ácido hexanóico, sendo confirmado pela análise do íon precursor/qualificador ( $m/z = 99$ ) e do íon produto/identificador ( $m/z = 55$ ) na faixa de massas ( $m/z$ ) monitorada.

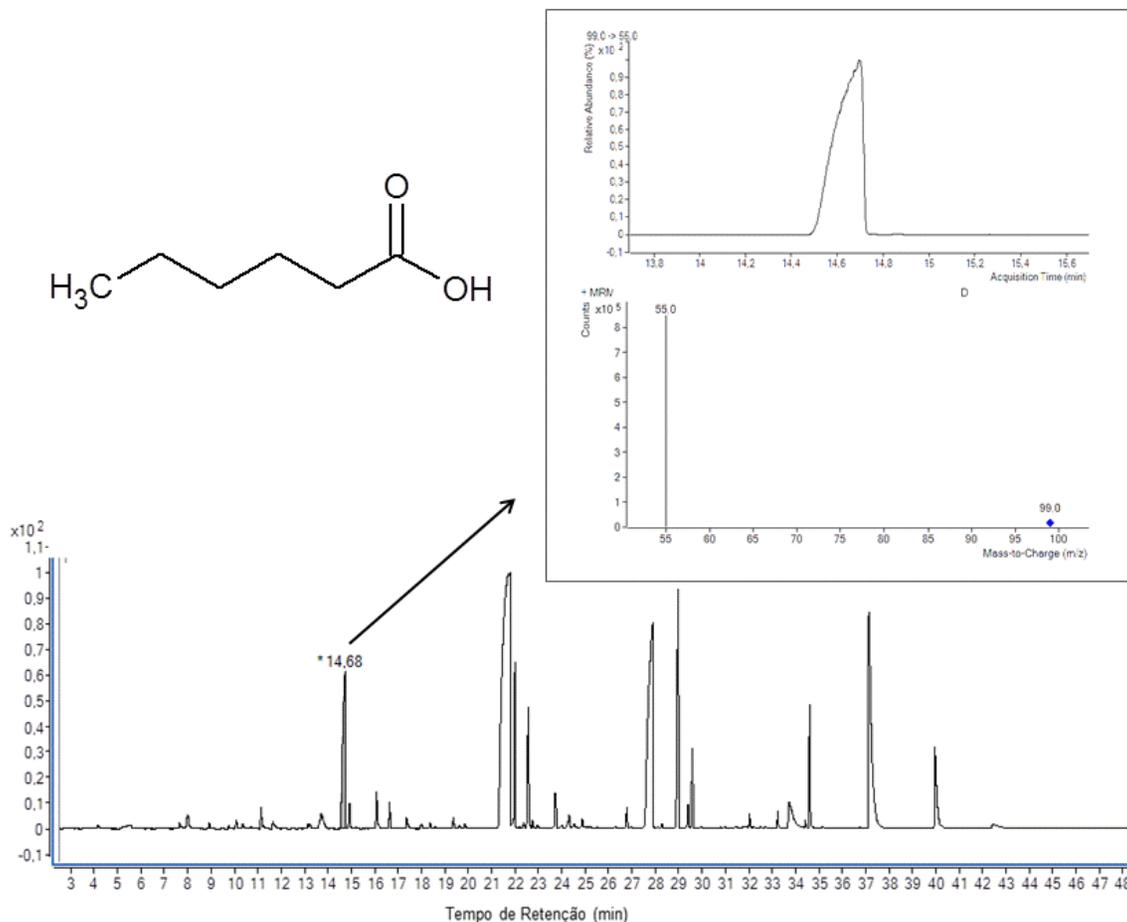


Figura 2.2. Cromatograma obtido no ponto ótimo (30°C, 45 minutos) de extração dos compostos voláteis por HS-SPME em vinho Chardonnay. O pico destacado ( $t_R=14.68\text{min}$ ) corresponde ao ácido hexanóico e a sua respectiva faixa de transição monitorada ( $m/z$ ).

A confirmação da identidade de cada analito foi realizada pela comparação dos espectros obtidos pela injeção dos padrões analíticos e entre os analitos presentes na amostra. O uso de GC-MS/MS proporciona um elevado grau de segurança na identificação dos compostos avaliados, com elevado grau de seletividade e sensibilidade, quando comparado à GC-MS (Chiaradia et al., 2008).

## 5 CONCLUSÕES

O uso combinado das técnicas de HS-SPME e GC-MS/MS mostrou-se adequado para a análise de compostos voláteis em amostras de vinhos Chardonnay. A otimização multivariada das condições de extração por HS-SPME permitiu avaliar os efeitos de tempo e temperatura de extração nesta metodologia, permitindo a obtenção de um ponto ótimo de extração, 30°C e 45 minutos, dos representantes das classes dos principais compostos voláteis presentes em vinhos Chardonnay.

## 6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (número de processo: 2011/17094-2) pelo suporte financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela disponibilização de bolsa de doutorado (S. B. Sartor).

## 7 REFERÊNCIAS

AÑÓN, A., LÓPEZ, J. F., HERNANDO, D., ORRIOLS, I., REVILLA, E. & LOSADA, M. M. Effect of five enological practices and of the general phenolic composition on fermentation-related aroma compounds in Mencia young red wines. *Food Chemistry*.

- ARTHUR, C. L. & PAWLISZYN, J. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.
- BOGUSZ JUNIOR, S., DE MARCHI TAVARES DE MELO, A., ZINI, C. A. & GODOY, H. T. 2011. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. *Journal of Chromatography A*, 1218, 3345-3350.
- CÂMARA, J. S., ALVES, M. A. & MARQUES, J. C. 2006. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 555, 191-200.
- CASTRO MEJÍAS, R., NATERA MARÍN, R., DE VALME GARCÍA MORENO, M. & GARCÍA BARROSO, C. 2003. Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 995, 11-20.
- CERVERA, M. I., BELTRAN, J., LOPEZ, F. J. & HERNANDEZ, F. 2011. Determination of volatile organic compounds in water by headspace solid-phase microextraction gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry with triple quadrupole analyzer. *Analytica Chimica Acta*, 704, 87-97.
- CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H. & JARDIM, I. C. S. F. 2008. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31, 623-636.
- DELGADILLO, M. A., GARROSTAS, L., POZO, Ó. J., VENTURA, R., VELASCO, B., SEGURA, J. & MARCOS, J. 2012. Sensitive and robust method for

- anabolic agents in human urine by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 897, 85-89.
- EBELER, S. E. & THORNGATE, J. H. 2009. Wine Chemistry and Flavor: Looking into the Crystal Glass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8098-8108.
- FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., DA SILVA, E. G. P., DOS SANTOS, W. N. L., QUINTELLA, C. M., DAVID, J. M., DE ANDRADE, J. B., BREITKREITZ, M. C., JARDIM, I. C. S. F. & NETO, B. B. 2007. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1158, 2-14.
- HAYASAKA, Y., BALDOCK, G. A. & POLLNITZ, A. P. 2005. Contributions of mass spectrometry in the Australian Wine Research Institute to advances in knowledge of grape and wine constituents. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 188-204.
- HOWARD, K. L., MIKE, J. H. & RIESEN, R. 2005. Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for Headspace Analysis of Wine Aroma Components. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 37-45.
- JIANG, B., XI, Z., LUO, M. & ZHANG, Z. 2013. Comparison on aroma compounds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China. *Food Research International*, 51, 482-489.
- LIBERATORE, M. T., PATI, S., NOBILE, M. A. D. & NOTTE, E. L. 2010. Aroma quality improvement of Chardonnay white wine by fermentation and ageing in barrique on lees. *Food Research International*, 43, 996-1002.
- MEDINA, K., BOIDO, E., FARIÑA, L., GIOIA, O., GOMEZ, M. E., BARQUET, M., GAGGERO, C., DELLACASSA, E. & CARRAU, F. 2013. Increased flavour

- diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, 141, 2513-2521.
- MEINHART, A. D., BIZZOTTO, C. S., BALLUS, C. A., PRADO, M. A., BRUNS, R. E., FILHO, J. T. & GODOY, H. T. 2010. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. *Food Chemistry*, 120, 1155-1161.
- PAWLISZYN, J. 2000. Theory of Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38, 270-278.
- PAWLISZYN, J. 2009. Handbook of SPME. Chemical Industry Press, Beijing, China.
- POLASKOVA, P., HERSZAGE, J. & EBELER, S. E. 2008. Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*, 37, 2478-2489.
- RISTICEVIC, S., NIRI, V., VUCKOVIC, D. & PAWLISZYN, J. 2009. Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 781-795.
- SAN-JUAN, F., PET'KA, J., CACHO, J., FERREIRA, V. & ESCUDERO, A. 2010. Producing headspace extracts for the gas chromatography–olfactometric evaluation of wine aroma. *Food Chemistry*, 123, 188-195.
- SAPOZHNIKOVA, Y. & LEHOTAY, S. J. 2013. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 758, 80-92.
- SMYTH, H. & COZZOLINO, D. 2012. Instrumental Methods (Spectroscopy, Electronic Nose, and Tongue) As Tools To Predict Taste and Aroma in

- Beverages: Advantages and Limitations. *Chemical Reviews*, 113, 1429-1440.
- TSUGAWA, H., TSUJIMOTO, Y., SUGITATE, K., SAKUI, N., NISHIUMI, S., BAMBIA, T. & FUKUSAKI, E. Highly sensitive and selective analysis of widely targeted metabolomics using gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- WELDEGERGIS, B. T., DE VILLIERS, A. & CROUCH, A. M. 2011. Chemometric investigation of the volatile content of young South African wines. *Food Chemistry*, 128, 1100-1109.
- WELKE, J. E., ZANUS, M., LAZAROTTO, M., SCHMITT, K. G. & ZINI, C. A. 2012. Volatile characterization by multivariate optimization of headspace-solid phase microextraction and sensorial evaluation of chardonnay base wines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 678-687.
- WHITON, R. S. & ZOECKLEIN, B. W. 2000. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 379-382.
- ZHANG, M., PAN, Q., YAN, G. & DUAN, C. 2011. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. *Food Chemistry*, 125, 743-749.
- ZHANG, Z. & PAWLISZYN, J. 1993. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 65, 1843-1852.
- ZHANG, Z., YANG, M. J. & PAWLISZYN, J. 1994. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 66, 844A-853A.



## Capítulo 3

---

### Caraterização da Fração Volátil de Vinhos Chardonnay brasileiros utilizando HS-SPME-GC- MS/MS

**Sabrina de Bona Sartor, Mateus Petrarca, Diogo Noin de Oliveira, Rodrigo  
Ramos Catharino, Helena Teixeira Godoy**



**CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE VINHOS CHARDONNAY  
BRASILEIROS UTILIZANDO HS-SPME-GC-MS/MS**

Sabrina de Bona Sartor<sup>a</sup>, Mateus Petrarca<sup>a</sup>, Diogo Noin de Oliveira<sup>b</sup>, Rodrigo  
Ramos Catharino<sup>b</sup>, Helena Teixeira Godoy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Análise Instrumental de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

<sup>b</sup> *Laboratório Innovare de Biomarcadores, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil.*

Artigo preparado para submissão conforme as normas do periódico *Talanta*,  
Elsevier B.V. (2013).



## RESUMO

O estudo da fração volátil de vinhos tem sido o objetivo de muitas iniciativas de pesquisa, sendo a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas a técnica tradicionalmente empregada para este fim. O objetivo deste trabalho foi, pela primeira vez na literatura, desenvolver e validar um método analítico para a identificação e quantificação de compostos voláteis em vinhos Chardonnay produzidos em diferentes regiões brasileiras, utilizando a técnica de extração por microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (GC-MS/MS). As amostras utilizadas foram produzidas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e em Minas Gerais. A aquisição dos dados foi realizada utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM), com íons precursores ( $m/z$ ) escolhidos como qualificadores e os íons produto ( $m/z$ ) como identificadores. A faixa de massas analisada foi de 30 - 400  $m/z$  com 50 milissegundos do tempo de aquisição. Foram identificados e quantificados 31 compostos voláteis nas amostras. Os compostos observados em maior quantidade foram: álcoois, ésteres e ésteres etílicos de ácidos graxos. Estes compostos são formados durante a etapa de fermentação e contribuem para a formação de aromas frutados. Diferenças significativas foram observadas, principalmente quanto à origem geográfica das amostras, e confirmadas pela análise de componentes principais (PCA) e pela análise de agrupamento hierárquico (HCA). C<sub>13</sub>-norisoprenoides, produzidos na uva a partir de carotenoides, e responsáveis pela formação do aroma varietal de vinhos Chardonnay também foram detectados, principalmente em amostras produzidas

na região da Campanha e Serra Catarinense, podendo atuar como marcadores de aroma de vinhos Chardonnay produzidos nessas regiões.

**Palavras-chave:** vinho; aroma; compostos voláteis; Chardonnay; HS-SPME; GC-MS/MS.

**ABSTRACT**

Wine aroma is formed by a large number of chemical compounds in different concentrations. Many studies and researches aimed the study of the volatile fraction of wines and gas chromatography. Traditionally, gas chromatography coupled to mass spectrometry is the technique used for this purpose. The objective of this work was, for the first time in the literature, develop and validate an analytical method for the identification and quantification of volatile compounds in Chardonnay wines produced in different regions of Brazil, using headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode (GC-MS/MS). Samples were produced in Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Minas Gerais, wine and grape major's producers in Brazil. Data acquisition was performed using multiple reaction monitoring (MRM) with precursor ions ( $m/z$ ) chosen as qualifiers and product ions ( $m/z$ ) as identifiers. Mass range ( $m/z$ ) was 30-400, with a 50 milliseconds of acquisition time. A total of 31 volatile compounds were identified and quantified in the samples. Alcohols, esters and ethyl esters of fatty acids were the major's compounds quantified. These compounds formed during fermentation process, contribute to floral and fruity aromas. Significant differences were observed, especially regarding the geographical origin of the samples, and confirmed by principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA).  $C_{13}$  – norisoprenoids, produced in grapes from carotenoids, and responsible for the formation of varietal aroma of Chardonnay wines were also detected, mainly in samples produced in the region of Campanha, in Rio Grande do Sul state, and

Serra Catarinense Santa Catarina. These compounds can act as markers for aroma of Chardonnay wines produced in these regions.

**Key words:** wine; aroma; volatile compounds; Chardonnay; HS-SPME; GC-MS/MS.

## 1. Introdução

O aroma de um vinho é considerado uma mistura de centenas de compostos com baixo ponto de ebulição, voláteis, formando uma matriz capaz de estimular uma resposta sensorial pelo sistema olfativo humano [1]. Estes compostos pertencem a diferentes classes químicas, tais como ésteres, álcoois, cetonas, aldeídos, monoterpenos, C<sub>13</sub>-norisoprenoides, metoxipirazinas e compostos sulfurados [2]. Estes compostos podem interagir e combinar entre si, atuando como sinergistas (por exemplo, a presença de um composto melhora a percepção da outra) ou como antagonistas (um composto que suprime a percepção de outro). Mais de 1000 compostos já foram identificados em vinhos de diferentes origens, cujas concentrações variam entre mg.L<sup>-1</sup>, ng.L<sup>-1</sup> até traços [3, 4]. As origens dos compostos de aroma são variadas e dependem da cultivar de uva utilizada para a produção de vinho (aroma varietal), das condições edafoclimáticas do local de cultivo da uva, normalmente agrupadas sob o conceito de "*terroir*" (macro, meso e micro-clima, solo, topografia), das técnicas agronômicas aplicadas no manejo do vinhedo, dos microrganismos utilizados no processo de fermentação (em particular, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni*), das condições do processo de fermentação (principalmente os fatores tempo e temperatura), das condições de armazenamento e de envelhecimento do vinho, entre outros [3, 5-7].

O estudo da fração volátil de vinhos tem sido o objetivo de muitas iniciativas de pesquisa desde a década de 1940, porém o desenvolvimento da cromatografia

gasosa, na década de 1950, permitiu a amplificação dos estudos de identificação e de quantificação de compostos de aroma de vinhos, tornando-se ferramenta indispensável até os dias atuais [2, 3].

Previamente à análise por cromatografia gasosa, um processo de extração dos compostos voláteis é necessário, devido à grande complexidade química de vinhos, com os objetivos de isolar os analitos alvo da matriz e servir como uma ferramenta de pré-concentração, aumentando a sensibilidade do sistema analítico empregado. Vários métodos de extração são relatados na literatura para a análise de compostos voláteis em vinhos, tais como técnicas de destilação, extração de solvente e extração de fase sólida (SPE) [4].

Atualmente, o método de extração mais utilizado em análise de compostos voláteis em uvas e vinhos é a microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) [3, 5, 8]. Introduzido por Arthur e Pawliszyn em 1990 [9], a SPME é uma técnica sortiva de preparo de amostras isenta de solventes, que envolve a exposição de uma pequena quantidade de fase extratora dispersa em um suporte sólido com a matriz de amostra. O processo envolve duas etapas básicas: a primeira, onde há a partição entre os analitos da amostra e o material do recobrimento da fibra (fase extratora), e a segunda etapa, onde ocorre a dessorção dos analitos concentrados na fibra para um instrumento analítico [10]. Dentre as principais vantagens desta técnica estão: o preparo das amostras em menor tempo, uso de pequenos volumes de amostras, a possibilidade de concentração de analitos em amostras líquidas e sólidas, reduzida manipulação

por parte do analista e, principalmente, o não uso de solventes orgânicos, sem, conseqüentemente, a geração de grandes volumes de solventes residuais [10, 11]. A SPME tem sido utilizada, rotineiramente, em conjunto com a cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), e aplicado com sucesso a uma grande variedade de compostos, especialmente para a extração de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de matrizes complexas [10].

Atualmente, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), é a instrumentação analítica mais utilizada para determinar a concentração dos compostos voláteis do aroma de uvas e vinhos [3, 12]. A vasta gama de aplicações do acoplamento entre cromatografia gasosa e espectrometria de massas se deve à combinação entre a alta seletividade e eficiência da separação cromatográfica com a obtenção de informação estrutural proporcionada pela espectrometria de massas [13].

Na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (GC-MS/MS), as moléculas de interesse são fragmentadas por duas vezes e, em seguida, o sistema é capaz de isolar um fragmento selecionado e refragmenta-lo gerando um espectro específico obtido a partir dos íons selecionados. Yost e Enke introduziram a técnica em 1979 utilizando um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo [14].

O uso de GC-MS/MS proporciona um elevado grau de segurança na identificação do analito, com maior seletividade e sensibilidade. Assim, esta

técnica vem sendo amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, tais como a determinação de pesticidas em frutas e vegetais [15], e em suplementos alimentares [16], determinação de aminas heterocíclicas em diferentes matrizes alimentares [17], determinação de drogas anabólicas em urina humana [18], análise de compostos orgânicos voláteis em água [19], análises metabolômicas [20], entre outros.

Assim, o objetivo deste trabalho foi, pela primeira vez em literatura, validar um método de identificação e quantificação dos principais compostos voláteis presentes em vinhos Chardonnay varietais produzidos em diferentes regiões brasileiras utilizando microextração em fase sólida no modo de headspace (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas *tandem* (GC-MS/MS) e identificar os compostos voláteis que formam o aroma dos vinhos Chardonnay brasileiros e através do uso de ferramentas estatísticas de análise, evidenciar suas diferenças e similaridades regionais, traçando um perfil aromático desses vinhos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Reagentes e Padrões**

Os padrões analíticos dos compostos de aroma foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), com uma pureza igual ou superior a 99%, para uso em cromatografia gasosa. O padrão interno utilizado foi 3-octanol, obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Uma solução sintética de vinho foi preparada utilizando

água Milli- Q<sup>®</sup>, 12% (v/v) de etanol grau HPLC (JT Baker, Xalostoc, México) e 2 g.L<sup>-1</sup> de ácido tartárico (Merck, Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 3,2 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M . Cloreto de Sódio (NaCl) foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Para elaboração das curvas analíticas, soluções de padrões foram preparadas adicionando quantidades conhecidas de cada padrão em etanol grau HPLC (JT Baker, Xalostoc, México). Para a validação do método analítico cada padrão foi adicionado à solução de vinho sintético previamente preparada. Todas as soluções preparadas foram mantidas a 4°C, durante a elaboração do trabalho.

## 2.2 Amostragem

As amostras de vinhos Chardonnay produzidos em diferentes regiões brasileiras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais na cidade de Campinas, São Paulo. As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz e temperatura de 16°C até a realização das análises A tabela 3.1 apresenta os locais e safras de cada amostra.

Tabela 3.1. Origem e safra das amostras de vinhos Chardonnay.

Amostra	Estado	Região	Município	Safra
CP 010	Rio Grande do Sul	Campanha	Santana do Livramento	2010
CP 080	Rio Grande do Sul	Campanha	Santana do Livramento	2008
CP 090	Rio Grande do Sul	Campanha	Candiota	2009
CP 092	Rio Grande do Sul	Campanha	Dom Pedrito	2009
SG 010	Rio Grande do Sul	Serra Gaúcha	Bento Gonçalves	2010
SG 090	Rio Grande do Sul	Serra Gaúcha	Bento Gonçalves - Vale dos Vinhedos <sup>a</sup>	2009
SG 092	Rio Grande do Sul	Serra Gaúcha	Bento Gonçalves	2009
SJ 080	Santa Catarina	Serra Catarinense	São Joaquim	2008
SJ 010	Santa Catarina	Serra Catarinense	São Joaquim	2010
SJ 0102	Santa Catarina	Serra Catarinense	São Joaquim	2010
CN 090	Santa Catarina	Região de Altitude	Campos Novos	2009
AG 090	Santa Catarina	Região de Altitude	Água Doce	2009
SM 010	Santa Catarina	Região de Altitude	Tangará	2010
MG 011	Minas Gerais	Sul de Minas	Andradas	2011
MG 012	Minas Gerais	Sul de Minas	Andradas	2012

<sup>a</sup> Denominação de Origem (D.O.)

### 2.3 Preparo de Amostra e Extração por SPME

Alíquotas de 10 mL de vinho foram transferidas para vials de SPME de 40 mL, com tampa de rosca e septo de PTFE/silicone (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA). Foi adicionado 3,0 g de cloreto de sódio, para promover o “*salting out*” dos compostos voláteis da matriz aumentando os seus coeficientes de partição [21]. Durante o tempo de amostragem, a amostra foi agitada constantemente com uma pequena barra de agitação magnética. A fibra de SPME utilizada foi de 50/30 mM de Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA.), condicionada antes do uso de acordo com as instruções do fabricante. A fibra foi exposta no *headspace* da amostra após 10 minutos de tempo de equilíbrio. A temperatura da amostra utilizada foi 30°C, com exposição

da fibra durante 45 minutos. Os fatores tempo e temperatura de extração foram otimizados conforme descrito no Capítulo 2. Após a extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo à gás para a dessorção dos analitos a uma temperatura de 270°C, no modo *splitless* durante um período de 15 minutos.

#### **2.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em *tandem* (GC - MS/MS)**

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo à gás Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) acoplado ao detector de massas do tipo triplo quadrupolo Agilent 7000 Triple Quad (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). O gás de arraste utilizado foi Hélio ultra puro (White Martins, Brasil), em fluxo constante de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi estabelecida em 270°C, com injeção no modo *splitless*. O *liner* utilizado no experimento foi específico para SPME, com diâmetro interno de 0,75mm, obtido da Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna capilar do tipo Supelcowax<sup>®</sup> 10 (100% polietilenoglicol) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA.) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25µm. A programação de temperatura foi realizada conforme metodologia proposta por Weldegergis e colaboradores [22], onde a temperatura inicial foi 30°C, mantida por 2 minutos, aumentando 4°C/min<sup>-1</sup> até 130°C e mantida por 2 minutos, aumentando a uma taxa de 8°C/min<sup>-1</sup> até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. O tempo de corte de solvente foi estabelecido em 2,5 minutos.

Os espectros de massa foram obtidos usando ionização por impacto de elétrons (EI, *Electron Impact*) com energia de colisão de -70eV. As temperaturas da interface, fonte e quadropolos (Q1, Q2 e Q3) utilizadas foram 250, 260 e 150°C, respectivamente. Nitrogênio e Hélio foram utilizados na célula de colisão (Q2) com fluxos de 2,25 mL.min<sup>-1</sup> e 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*). Os íons precursores foram escolhidos como qualificadores e os íons produto como identificadores após otimização dos valores de energia de colisão e fragmentação (CID, *Collision-Induced Dissociation*), sendo estabelecidos de acordo com cada analito analisado. A faixa de massas analisada foi de 30 até 400 *m/z*, com 50 milissegundos de tempo de aquisição. O *dwell time*, tempo de aquisição dividido pelo número de transições, utilizado foi de 1 milissegundo para cada analito. As condições específicas de MS/MS estão apresentadas na Tabela 3.2.

Os dados foram adquiridos e processados utilizando o programa Agilent MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis (versão B.06.00, Agilent Technologies Inc.) e Agilent MassHunter Workstation Software Quantitative Analysis for QQQ (versão B.05.02, Agilent Technologies Inc.).

Tabela 3.2. Tempo de retenção ( $t_R$ ) e parâmetros de MS/MS para os compostos analisados.

Composto	Transição Monitorada	Íon Precursor Selecionado (m/z)	Íon Produto Selecionado (m/z)	Energia de Colisão (V)	Tempo de Retenção (min)
<i>Álcoois</i>					
1-hexanol	69.0→43.0	69	43	40	21.76
1-propanol	42.0→31.0	42	13	15	13.70
2-butanol	59.0→31.0	59	31	20	21.80
2-metil-1-butanol	70.0→57.0	70	57	25	30.90
3-metil-1-butanol	77.0→55.0	77	55	20	29.39
2-feniletanol	91.0→65.0	91	65	40	34.61
Metanol	32.0→15.0	32	15	10	13.41
Acetaldeído	43.0→29.0	43	29	10	5.51
<i>Ésteres</i>					
Acetato de 2-feniletila	121.0→104.0	121	104	40	24.36
Acetato de hexila	84.0→56.0	84	56	25	27.78
Acetato de isoamila	87.0→70.0	87	70	25	37.16
Lactato de etila	75.0→45.0	75	45	25	16.03
Succinato de dietila	129.0→101.0	129	101	25	29.02
<i>Ésteres etílicos de ácidos graxos</i>					
Butanoato de etila	101.0→29.0	101	29	25	21.65
Hexanoato de etila	115.0→27.0	115	27	25	21.71
Octanoato de etila	143.0→73.0	143	73	35	27.78
Decanoato de etila	155.0→101.0	155	101	35	30.93
<i>Ácidos graxos</i>					
Ácido butírico	60.0→45.0	60	45	30	21.69
Ácido decanóico	129.0→57.0	129	57	30	21.66
Ácido hexanóico	99.0→55.0	99	55	30	14.68
Ácido isobutírico	73.0→41.0	73	41	30	21.72
Ácido isovalérico	87.0→60.0	87	60	30	21.70
Ácido octanóico	115.0→85.0	115	85	30	37.14
<i>C<sub>13</sub>-norisoprenoides</i>					
α-ionona	136.0→109.0	136	109	40	35.40
β-ionona	177.0→135.0	177	135	40	24.29
β-damascenona	175.0→121.0	175	121	40	40.23
<i>Monoterpenos</i>					
α-terpineol	136.0→59.0	136	59	35	19.89
Geraniol	123.0→93.0	123	93	35	34.63
Linalol	121.0→80.0	121	80	35	28.78
Nerol	139.0→84.0	139	84	35	27.14
<i>Compostos furânicos</i>					
Furfural	67.0→39.0	67	39	30	21.70

A identificação dos compostos foi realizada por comparação entre tempos de retenção dos compostos analisados e com padrões analíticos presentes em uma solução sintética de vinho, injetada sob mesmas condições. Os íons qualificadores e identificadores foram considerados quando apresentaram mais que 75% de similaridade entre os padrões preparados e analisados, além de comparados com os padrões de fragmentação disponíveis nos espectros de massa presente na biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2011). A quantificação foi realizada através da construção de curvas analíticas para cada composto investigado, utilizando a área do pico cromatográfico de cada composto versus a concentração correspondente. As faixas de concentração variaram para cada composto, individualmente.

## **2.5 Validação do Método Analítico**

O processo de validação do método analítico foi realizado através da elaboração de curva analítica e da análise dos seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão e exatidão [23].

### **2.5.1 Curva de Calibração e Linearidade**

Para o cálculo do intervalo de linearidade, foram elaboradas curvas de calibração para cada composto analisado. As curvas foram elaboradas utilizando a solução sintética de vinho e concentrações conhecidas dos compostos presentes em um *pool* de padrões, composto pelos padrões analíticos de cada grupo

químico analisado (*pool* de álcoois, *pool* de ésteres, *pool* de ésteres etílicos, *pool* de ácidos graxos, *pool* de C<sub>13</sub>-norisoprenoides, *pool* de monoterpénos e furfural). Cada curva de calibração foi elaborada com seis níveis de concentração e cada nível foi realizado em três repetições. As concentrações utilizadas cobriram os intervalos de concentração previstos para os vários compostos presentes em vinhos brancos. As injeções foram feitas de forma aleatória a fim de eliminar possíveis efeitos de memória. O padrão interno 3-octanol foi utilizado.

### **2.5.2 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)**

Os limites do equipamento foram determinados utilizando a solução sintética de vinho. Os limites de detecção (LOD) foram estabelecidos considerando-se as concentrações dos compostos que geraram a razão sinal/ruído de 3:1 e os limites de quantificação, as concentrações dos compostos que geraram a razão sinal/ruído e 10:1 [23, 24].

### **2.5.3 Precisão**

A precisão do método foi determinada através de ensaios de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi calculada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, expresso em percentagem, %) de seis ensaios (n=6), realizados sob mesmas condições e em um mesmo dia. Para o cálculo de precisão intermediária, 15 ensaios foram realizados durante 3 dias consecutivos, divididos em 5 ensaios/dia. Para cada ensaio, foram calculados os valores médios,

desvio padrão e coeficientes de variação. Os ensaios foram realizados utilizando volumes de solução sintética de vinho com  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cada padrão analítico.

#### **2.5.4 Exatidão**

Para avaliar a exatidão do método, foram realizados ensaios de recuperação, onde alíquotas da solução sintética de vinhos foram fortificadas com três diferentes níveis de concentração, dentro da faixa linear de cada composto analisados (10, 50 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Cada ensaio foi realizado em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente cada nível de concentração.

#### **2.6 Análises Estatísticas**

As determinações foram realizadas em triplicata com avaliação da diferença entre as médias através da aplicação da ANOVA e o teste de Tukey, considerando o nível de 5% de significância. Os resultados foram tratados e interpretados através do software STATISTICA<sup>®</sup> versão 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

A técnica de Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) foram realizadas visando visualizar as similaridades entre as amostras. Para estas análises, foi utilizado o software Pirouette<sup>®</sup> versão 4.5 (Infometrix Inc., 2007).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Validação do Método

Conforme a Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003, foram avaliados os parâmetros de: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão e exatidão para validação do método de quantificação de compostos voláteis em vinhos Chardonnay [23]. Os valores utilizados para avaliar o desempenho do método analítico para cada um dos compostos analisados estão apresentados na Tabela 3.3.

##### 3.1.1 Curva de Calibração e Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado [23, 24]. Para o cálculo do intervalo de linearidade, foram elaboradas curvas de calibração para cada composto analisado. A Tabela 3.3 apresenta os valores obtidos para os cálculos de linearidade,  $r^2$  e faixa linear. Os coeficientes de correlação encontrados foram considerados aceitáveis ( $r^2 > 0,99$ ), assim como os valores de linearidade para os intervalos em estudo, cujos valores foram calculados pela fórmula Linearidade (%) =  $100 - \text{RDS} (\%)$ , onde RSD é o desvio padrão relativo da inclinação da curva [23, 24]. Os valores de linearidade observados foram superiores a 97%.

Tabela 3.3. Parâmetros de validação do método analítico utilizado na determinação de compostos voláteis em vinhos Chardonnay brasileiros: faixa linear,  $r^2$ , linearidade, limite de detecção e quantificação, repetitividade e precisão intermediária (precisão), recuperação e (exatidão).

Composto	Faixa Linear <sup>a</sup>	$r^2$	Linearidade <sup>b</sup>	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>	Repetitividade		Precisão Intermediária <sup>c</sup>		Recuperação <sup>b</sup>		
						RSD <sup>b</sup>		RSD <sup>b</sup>		10 µg.L <sup>-1</sup>	50 µg.L <sup>-1</sup>	100 µg.L <sup>-1</sup>
<i>Álcoois fúseis</i>												
1-hexanol	37,81–945,55	0,995	97,56	0,06	0,19	2,1		4,6		102,4	102,7	101,8
1-propanol	22,50–305,91	0,999	98,76	0,14	0,42	0,9		1,3		95,8	93,4	98,8
2-butanol	22,65–566,25	0,998	99,47	0,64	1,79	1,1		4,8		93,6	93,1	92,9
2-metil-1-butanol	8,62–862,00	0,997	98,55	0,34	0,95	2,0		3,7		102,4	102,7	101,8
3-metil-1-butanol	1,42–142,20	0,987	97,51	0,15	0,45	1,7		6,7		77,9	81,8	84,7
2-feniletanol	3,38–2706,24	0,997	98,71	0,10	0,29	0,8		3,5		88,9	90,3	89,0
Metanol	0,47–35,09	0,995	97,94	0,07	0,09	1,2		2,1		76,1	77,3	75,2
Acetaldeido	1,96–196,00	0,998	98,91	0,12	0,36	1,0		4,3		75,5	75,7	75,0
<i>Ésteres</i>												
Acetato de 2-feniletala	3,11–777,75	0,995	98,25	0,23	0,68	1,7		1,4		110,7	111,8	110,0
Acetato de hexila	29,69–2226,75	0,990	98,47	0,08	0,20	3,5		0,9		100,5	103,6	101,0
Acetato de isoamila	46,50–2823,75	0,996	98,23	0,06	0,09	2,7		1,3		96,6	98,7	96,0
Lactato de etila	16,29–1221,75	0,998	98,86	0,13	0,31	3,3		3,2		84,7	86,2	86,5
Succinato de dietila	0,75–751,00	0,993	97,38	0,15	0,44	1,5		1,8		90,0	88,6	88,0
<i>Ésteres etílicos</i>												
Butanoato de etila	13,13–1093,75	0,999	99,20	0,14	0,38	8,5		4,8		105,4	102,5	105,1
Hexanoato de etila	9,02–2310,00	0,994	97,99	0,10	0,15	5,5		7,9		110,5	100,1	100,7
Octanoato de etila	25,18–5812,00	0,998	98,79	0,15	0,18	5,6		5,3		89,5	90,8	91,2
Decanoato de etila	6,73–1682,50	0,996	97,94	0,36	0,47	4,1		3,1		95,8	94,3	96,0
<i>Ácidos graxos</i>												
Ácido butírico	0,15–153,50	0,998	99,02	0,25	0,15	3,0		3,5		109,6	109,0	108,6
Ácido decanóico	7,15–206,50	0,996	97,80	0,95	1,02	2,8		4,6		103,1	103,4	104,0
Ácido hexanóico	1,46–1216,50	0,997	98,75	0,55	0,63	1,9		4,9		77,3	79,0	81,0
Ácido isobutírico	0,11–380,75	0,999	99,22	0,27	0,11	1,3		6,4		84,9	99,0	95,2
Ácido isovalérico	11,63–387,50	0,996	97,79	0,20	0,59	4,1		2,1		88,8	85,7	89,5

Ácido octanóico	47,19–1179,75	0,997	98,83	0,40	0,61	5,6	8,5	99,3	100,5	100,6
<i>C13-norisoprenoides</i>										
α-ionona	2,84–283,74	0,994	97,62	0,02	0,05	0,9	1,3	77,8	80,5	79,9
β-ionona	1,41–236,60	0,990	98,81	0,04	0,06	1,6	2,7	80,4	81,4	89,1
β-damascenona	14,60–321,20	0,996	97,65	0,06	0,08	1,7	1,0	90,9	101,0	99,2
<i>Monoterpenos</i>										
α-terpineol	2,42–727,65	0,999	99,02	0,02	0,07	2,9	2,0	105,9	109,7	112,5
Geraniol	2,35–141,06	0,995	97,91	0,03	0,09	3,7	6,2	78,9	77,0	95,4
Linalol	0,36–108,15	0,998	99,16	0,10	0,12	4,4	4,0	94,7	95,9	97,0
Nerol	28,17–704,25	0,996	97,99	0,07	0,09	2,5	1,9	101,2	104,0	102,7
<i>Compostos furânicos</i>										
Furfural	2,30–325,8	0,997	98,46	0,09	0,28	6,3	5,9	78,5	80,4	84,1

<sup>a</sup>expresso em µg.L<sup>-1</sup><sup>b</sup>expresso em %

### 3.1.1 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O limite de detecção representa a menor concentração do composto que está sendo analisado e que pode ser detectado pelo sistema analítico, não sendo, necessariamente, passível de quantificação. Por sua vez, o limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser mensurada pelo sistema analítico utilizado [23, 24]. Os limites calculados para o método estão apresentados na Tabela 3.3. Os menores limites de detecção observados foram para os compostos  $\alpha$ -ionona e  $\alpha$ -terpineol, com valores de  $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Os valores calculados são considerados baixos, quando comparados aos métodos descritos em literatura, geralmente expressos na ordem de  $\text{mg.L}^{-1}$  [25-27]. O uso de GC-MS/MS proporciona elevado grau de seletividade e sensibilidade quando comparado à técnica tradicional de GC-MS pela possibilidade de "subtrair" a matriz no método de análise, selecionando apenas os íons dos compostos de interesse. Assim, o limite de detecção, calculado em função da relação sinal/ruído, apresenta valores menores, justificando o emprego da técnica na detecção e quantificação de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas [15-18].

### 3.1.2 Precisão

Os valores obtidos para estes parâmetros variaram entre 0,8% para o 2-feniletanol até 8,5% calculado para o ácido octanóico. Nenhum valor ultrapassou 10%, podendo ser considerados ótimos para este tipo de quantificação [23, 24].

### 3.1.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre resultados individuais de um determinado ensaio. Os processos mais utilizados para a determinação da exatidão são o uso de material de referencia, estudos comparativos de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão [23, 24]. Os resultados, apresentados na Tabela 3.3, indicam que os valores calculados das recuperações variaram entre 75,5 e 112,5% entre os compostos, nos três níveis analisados. Estes valores são considerados aceitáveis para os níveis de concentração avaliados, indicando que o método utilizado é exato [23, 24].

## 3.2 Determinação dos Compostos Voláteis

Um total de 31 compostos foram identificados e quantificados em amostras de vinho Chardonnay brasileiros. Os valores (em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dos compostos voláteis presentes nas amostras de vinhos avaliadas estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Concentração dos 31 compostos voláteis quantificados por GC-MS/MS em vinhos Chardonnay produzidos em diferentes regiões brasileiras.

Composto	Amostras																
	CP 010		CP 080		CP 090		CP 092		SG 010		SG 090		SG 092		SJ 010		
	valor	RSD <sup>†</sup>	valor	RSD													
<i>Álcoois</i>																	
1	1-hexanol	1,29E+03 <sup>a</sup>	0,3	1,55E+03 <sup>a</sup>	3,2	1,69E+03 <sup>a</sup>	0,7	2,03E+03 <sup>a</sup>	1,1	3,96E+03 <sup>b</sup>	0,9	4,59E+03 <sup>b</sup>	0,6	5,60E+03 <sup>b</sup>	1,3	1,55E+03 <sup>a</sup>	1,2
2	1-propanol	5,80E+03 <sup>a</sup>	1,1	6,78E+03 <sup>a</sup>	1,2	7,63E+03 <sup>a</sup>	2,0	6,00E+03 <sup>a</sup>	1,6	4,65E+03 <sup>b</sup>	1,4	3,77E+03 <sup>b</sup>	0,9	3,01E+03 <sup>b</sup>	1,4	8,13E+03 <sup>a</sup>	2,5
3	2-butanol	nd <sup>†</sup>		nd		nd		nd		7,70E+02 <sup>a</sup>	2,4	8,73E+02 <sup>a</sup>	3,3	7,91E+02 <sup>a</sup>	2,8	nd	
4	2-metil-1-butanol	8,03E+02 <sup>a</sup>	2,9	9,50E+02 <sup>a</sup>	2,2	8,69E+02 <sup>a</sup>	3,6	7,66E+02 <sup>a</sup>	2,8	1,79E+03 <sup>b</sup>	1,6	1,50E+03 <sup>b</sup>	3,9	1,64E+03 <sup>b</sup>	4,7	8,04E+02 <sup>a</sup>	2,8
5	3-metil-1-butanol	2,85E+03 <sup>a</sup>	4,3	2,43E+03 <sup>a</sup>	3,0	1,99E+03 <sup>a</sup>	4,0	1,87E+03 <sup>a</sup>	2,9	4,43E+03 <sup>b</sup>	2,0	6,00E+03 <sup>b</sup>	2,1	4,18E+03 <sup>b</sup>	2,8	1,65E+03 <sup>a</sup>	4,5
6	2-feniletanol	4,20E+04 <sup>a</sup>	3,1	3,69E+04 <sup>a</sup>	4,5	3,40E+04 <sup>a</sup>	3,8	3,19E+04 <sup>a</sup>	2,5	4,59E+04 <sup>a</sup>	1,0	4,31E+04 <sup>a</sup>	1,1	4,09E+04 <sup>a</sup>	1,6	6,04E+04 <sup>b</sup>	0,6
7	Metanol	nd		nd													
8	Acetaldeido	2,89E+04 <sup>a</sup>	10,0	2,58E+04 <sup>a</sup>	3,2	2,68E+04 <sup>a</sup>	6,3	2,59E+04 <sup>a</sup>	4,2	6,42E+04 <sup>b</sup>	4,4	5,97E+04 <sup>b</sup>	5,0	5,74E+04 <sup>b</sup>	3,9	7,02E+04 <sup>c</sup>	2,7
	<i>Total álcoois:</i>	8,16E+04		7,44E+04		7,30E+04		6,84E+04		1,26E+05		1,20E+05		1,13E+05		1,43E+05	
<i>Ésteres</i>																	
9	Acetato de 2-feniletila	5,38E+02 <sup>a</sup>	1,1	3,90E+02 <sup>b</sup>	2,2	4,39E+02 <sup>a</sup>	0,5	5,08E+02 <sup>a</sup>	1,2	2,99E+02 <sup>b</sup>	0,6	3,03E+02 <sup>b</sup>	0,9	3,23E+02 <sup>b</sup>	1,2	5,64E+02 <sup>a</sup>	1,0
10	Acetato de hexila	1,79E+02 <sup>a</sup>	0,8	1,03E+02 <sup>a</sup>	0,9	1,68E+02 <sup>a</sup>	0,4	1,43E+02 <sup>a</sup>	0,7	2,08E+02 <sup>a</sup>	0,5	1,71E+02 <sup>a</sup>	0,4	1,80E+02 <sup>a</sup>	1,7	2,22E+02 <sup>a</sup>	0,5
11	Acetato de isoamila	3,88E+04 <sup>a</sup>	0,8	3,47E+04 <sup>a</sup>	1,6	4,02E+04 <sup>a</sup>	0,9	3,80E+04 <sup>a</sup>	0,6	4,27E+04 <sup>a</sup>	1,3	3,43E+04 <sup>a</sup>	0,7	3,30E+04 <sup>a</sup>	1,9	4,20E+04 <sup>a</sup>	0,2
12	Lactato de etila	2,74E+03 <sup>a</sup>	1,4	1,01E+03 <sup>b</sup>	0,7	1,86E+03 <sup>b</sup>	1,0	1,75E+03 <sup>b</sup>	0,4	1,57E+03 <sup>b</sup>	2,0	1,42E+03 <sup>b</sup>	1,4	1,37E+03 <sup>b</sup>	0,8	2,44E+03 <sup>a</sup>	1,1
13	Succinato de dietila	1,08E+02 <sup>a</sup>	2,9	1,13E+02 <sup>a</sup>	0,5	1,20E+02 <sup>a</sup>	0,8	1,19E+02 <sup>a</sup>	0,3	7,79E+01 <sup>b</sup>	2,7	6,46E+01 <sup>b</sup>	3,0	6,59E+01 <sup>b</sup>	2,4	1,21E+02 <sup>a</sup>	1,3
	<i>Total ésteres:</i>	4,23E+04		3,63E+04		4,28E+04		4,05E+04		4,49E+04		3,62E+04		3,49E+04		4,53E+04	
<i>Ésteres etílicos</i>																	
14	Butanoato de etila	9,73E+02 <sup>a</sup>	3,3	8,98E+02 <sup>a</sup>	1,3	9,03E+02 <sup>a</sup>	1,5	9,10E+02 <sup>a</sup>	0,7	7,75E+02 <sup>b</sup>	0,6	7,01E+02 <sup>b</sup>	0,4	7,04E+02 <sup>b</sup>	0,7	9,79E+02 <sup>a</sup>	0,5
15	Hexanoato de etila	1,00E+03 <sup>a</sup>	2,5	9,00E+02 <sup>a</sup>	0,8	9,88E+02 <sup>a</sup>	2,3	9,50E+02 <sup>a</sup>	1,1	7,87E+02 <sup>b</sup>	0,9	7,05E+02 <sup>b</sup>	0,7	7,10E+02 <sup>b</sup>	0,6	1,11E+03 <sup>a</sup>	0,4
16	Octanoato de etila	1,27E+03 <sup>a</sup>	1,7	1,01E+03 <sup>a</sup>	0,6	1,19E+03 <sup>a</sup>	3,0	1,25E+03 <sup>a</sup>	1,3	9,81E+02 <sup>b</sup>	1,0	8,76E+02 <sup>b</sup>	0,9	8,81E+02 <sup>b</sup>	1,2	1,13E+03 <sup>a</sup>	0,6
17	Decanoato de etila	3,10E+02 <sup>a</sup>	3,1	2,10E+02 <sup>a</sup>	1,9	3,08E+02 <sup>a</sup>	2,3	3,06E+02 <sup>a</sup>	2,5	1,77E+02 <sup>b</sup>	2,9	1,56E+02 <sup>b</sup>	1,4	1,46E+02 <sup>b</sup>	1,8	2,99E+02 <sup>a</sup>	1,3
	<i>Total ésteres etílicos:</i>	3,55E+03		3,02E+03		3,39E+03		3,42E+03		2,72E+03		2,44E+03		2,44E+03		3,52E+03	
<i>Ácidos graxos</i>																	

18	Ácido butírico	2,04E+01 <sup>a</sup>	0,6	1,19E+01 <sup>a</sup>	2,9	1,81E+01 <sup>a</sup>	0,8	1,94E+01 <sup>a</sup>	1,5	9,80E+00 <sup>b</sup>	1,3	9,00E+00 <sup>b</sup>	2,0	8,60E+00 <sup>b</sup>	1,6	1,32E+01 <sup>a</sup>	2,5
19	Ácido decanóico	8,75E+02 <sup>a</sup>	1,1	6,38E+02 <sup>a</sup>	3,1	7,58E+02 <sup>a</sup>	0,9	7,58E+02 <sup>a</sup>	2,3	7,52E+02 <sup>a</sup>	0,8	5,21E+02 <sup>b</sup>	1,7	5,18E+02 <sup>b</sup>	1,7	8,95E+02 <sup>a</sup>	1,4
20	Ácido hexanóico	6,90E+02 <sup>a</sup>	1,0	5,79E+02 <sup>a</sup>	1,0	5,01E+02 <sup>a</sup>	0,8	5,47E+02 <sup>a</sup>	2,2	5,81E+02 <sup>a</sup>	0,5	5,43E+02 <sup>a</sup>	0,3	4,91E+02 <sup>a</sup>	0,4	5,62E+02 <sup>a</sup>	0,3
21	Ácido isobutírico	5,79E+01 <sup>a</sup>	1,0	5,54E+01 <sup>a</sup>	1,8	6,18E+01 <sup>a</sup>	1,4	6,69E+01 <sup>a</sup>	3,1	7,12E+01 <sup>a</sup>	0,9	7,48E+01 <sup>a</sup>	2,3	7,57E+01 <sup>a</sup>	1,8	5,89E+01 <sup>a</sup>	2,7
22	Ácido isovalérico	5,68E+02 <sup>a</sup>	3,3	3,89E+02 <sup>a</sup>	2,6	4,75E+02 <sup>a</sup>	2,1	4,50E+02 <sup>a</sup>	3,6	2,52E+02 <sup>a</sup>	2,6	2,46E+02 <sup>a</sup>	1,7	2,07E+02 <sup>a</sup>	2,3	4,79E+02 <sup>a</sup>	3,6
23	Ácido octanóico	9,88E+02 <sup>a</sup>	2,8	8,66E+02 <sup>a</sup>	1,3	9,07E+02 <sup>a</sup>	1,8	1,01E+03 <sup>a</sup>	0,7	1,26E+03 <sup>b</sup>	0,4	1,16E+03 <sup>b</sup>	0,5	1,00E+03 <sup>a</sup>	0,7	1,25E+03 <sup>b</sup>	0,5
	<i>Total ácidos graxos:</i>	3,20E+03		2,54E+03		2,72E+03		2,85E+03		2,93E+03		2,55E+03		2,30E+03		3,26E+03	
	<i>C<sub>13</sub>-norisoprenoides</i>																
24	α-ionona	6,70E-01 <sup>a</sup>	3,7	5,50E-01 <sup>a</sup>	6,5	7,00E-01 <sup>a</sup>	3,9	7,30E-01 <sup>a</sup>	3,2	2,30E-01 <sup>b</sup>	3,0	3,50E-01 <sup>a</sup>	4,0	4,00E-01 <sup>a</sup>	5,0	7,70E-01 <sup>a</sup>	7,1
25	β-ionona	1,40E-01 <sup>a</sup>	4,5	1,70E-01 <sup>a</sup>	5,5	2,20E-01 <sup>a</sup>	4,2	1,80E-01 <sup>a</sup>	4,0	7,00E-02 <sup>b</sup>	4,2	5,00E-02 <sup>b</sup>	3,3	8,00E-02 <sup>b</sup>	4,3	2,20E-01 <sup>a</sup>	5,3
26	β-damascenona	2,35E+00 <sup>a</sup>	4,9	2,77E+00 <sup>a</sup>	5,9	2,07E+00 <sup>a</sup>	3,6	1,98E+00 <sup>a</sup>	2,9	1,55E+00 <sup>b</sup>	3,6	1,45E+00 <sup>b</sup>	2,8	1,32E+00 <sup>b</sup>	4,1	2,73E+00 <sup>a</sup>	4,4
	<i>Total norisoprenoides:</i>	3,16E+00		3,49E+00		2,99E+00		2,89E+00		1,85E+00		1,85E+00		1,80E+00		3,72E+00	
	<i>Monoterpenos</i>																
27	α-terpineol	4,50E+01 <sup>a</sup>	7,6	2,30E+01 <sup>a</sup>	4,7	3,55E+01 <sup>a</sup>	3,3	4,21E+01 <sup>a</sup>	4,7	2,07E+01 <sup>a</sup>	6,1	1,75E+01 <sup>a</sup>	5,1	1,27E+01 <sup>a</sup>	3,4	7,55E+01 <sup>a</sup>	6,6
28	Geraniol	3,21E+00 <sup>a</sup>	5,3	3,00E+00 <sup>a</sup>	5,0	2,97E+00 <sup>a</sup>	2,8	2,65E+00 <sup>a</sup>	3,9	2,02E+00 <sup>a</sup>	3,5	1,98E+00 <sup>a</sup>	3,8	1,77E+00 <sup>a</sup>	3,1	2,98E+00 <sup>a</sup>	5,4
29	Linalol	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
30	Nerol	3,00E-02 <sup>a</sup>	6,4	8,00E-02 <sup>a</sup>	4,9	6,00E-02 <sup>a</sup>	2,6	5,00E-02 <sup>a</sup>	4,4	nd		nd		nd		4,00E-02 <sup>a</sup>	8,0
	<i>Total monoterpenos:</i>	4,82E+01		2,61E+01		3,85E+01		4,48E+01		2,27E+01		1,95E+01		1,45E+01		7,85E+01	
	<i>Compostos furânicos</i>																
31	Furfural	1,35E+02 <sup>a</sup>	25,4	1,87E+03 <sup>b</sup>	11,4	2,58E+02 <sup>a</sup>	9,8	4,46E+02 <sup>a</sup>	10,3	1,79E+03 <sup>b</sup>	12,7	4,89E+03 <sup>b</sup>	21,3	1,31E+03 <sup>b</sup>	13,5	2,56E+03 <sup>b</sup>	10,5

Tabela 3.4 (continuação).

Compostos	Amostras													
	SJ 080		SJ 0102		CN 090		AG 090		SM010		MG 011		MG 012	
	Valor	RSD <sup>b</sup>	Valor	RSD										
<i>Álcoois</i>														
1 1-hexanol	1,29E+03 <sup>a</sup>	0,9	1,69E+03 <sup>a</sup>	0,6	2,03E+03 <sup>a</sup>	1,0	3,90E+03 <sup>a</sup>	0,9	2,20E+03 <sup>a</sup>	0,7	9,10E+03 <sup>b</sup>	0,8	8,65E+03 <sup>b</sup>	1,6
2 1-propanol	8,67E+03 <sup>a</sup>	2,0	8,57E+03 <sup>a</sup>	1,6	6,24E+03 <sup>a</sup>	1,0	6,15E+03 <sup>a</sup>	2,0	5,73E+03 <sup>a</sup>	0,6	4,65E+03 <sup>b</sup>	1,2	4,63E+03 <sup>b</sup>	2,0
3 2-butanol	nd		nd											
4 2-metil-1-butanol	8,76E+02 <sup>a</sup>	3,0	8,80E+02 <sup>a</sup>	3,3	7,70E+02 <sup>a</sup>	2,4	9,71E+02 <sup>a</sup>	1,9	6,64E+02 <sup>a</sup>	2,6	2,00E+03 <sup>b</sup>	3,3	1,87E+03 <sup>b</sup>	3,4
5 3-metil-1-butanol	1,89E+03 <sup>a</sup>	3,2	1,50E+03 <sup>a</sup>	3,8	1,25E+03 <sup>a</sup>	2,9	1,19E+03 <sup>a</sup>	3,0	1,13E+03 <sup>a</sup>	2,1	8,03E+02 <sup>b</sup>	3,7	9,60E+02 <sup>b</sup>	4,0
6 2-feniletanol	5,75E+04 <sup>b</sup>	0,9	5,94E+04 <sup>b</sup>	1,0	4,39E+04 <sup>b</sup>	0,4	4,01E+04 <sup>b</sup>	0,3	3,78E+04 <sup>a</sup>	0,5	3,02E+04 <sup>a</sup>	0,8	3,82E+04 <sup>a</sup>	0,7
7 Metanol	nd		nd		nd		1,62E+03		nd		nd		nd	
8 Acetaldeído	6,89E+04 <sup>c</sup>	2,2	7,40E+04 <sup>c</sup>	3,1	5,41E+04 <sup>b</sup>	2,9	5,01E+04 <sup>b</sup>	2,5	4,53E+04 <sup>b</sup>	3,2	6,13E+04 <sup>b</sup>	3,3	6,59E+04 <sup>b</sup>	2,6
Total álcoois:	1,39E+05		1,46E+05		1,08E+05		1,04E+05		9,29E+04		1,08E+05		1,20E+05	
<i>Ésteres</i>														
9 Acetato de 2-feniletila	3,90E+02 <sup>b</sup>	0,6	6,00E+02 <sup>a</sup>	0,5	4,75E+02 <sup>a</sup>	0,8	4,02E+02 <sup>a</sup>	0,9	4,52E+02 <sup>a</sup>	0,7	3,98E+02 <sup>b</sup>	0,6	3,60E+02 <sup>b</sup>	0,2
10 Acetato de hexila	2,05E+02 <sup>a</sup>	0,3	2,29E+02 <sup>a</sup>	0,6	1,76E+02 <sup>a</sup>	1,0	1,47E+02 <sup>a</sup>	0,3	1,41E+02 <sup>a</sup>	0,6	1,44E+02 <sup>a</sup>	0,4	1,40E+02 <sup>a</sup>	0,9
11 Acetato de isoamila	3,98E+04 <sup>a</sup>	0,6	4,09E+04 <sup>a</sup>	0,3	3,69E+04 <sup>a</sup>	0,2	3,35E+04 <sup>a</sup>	0,4	3,99E+04 <sup>a</sup>	0,5	4,31E+04 <sup>a</sup>	0,3	4,47E+04 <sup>a</sup>	0,7
12 Lactato de etila	1,39E+03 <sup>b</sup>	0,9	2,36E+03 <sup>a</sup>	1,4	1,87E+03 <sup>b</sup>	1,2	1,78E+03 <sup>b</sup>	0,8	1,48E+03 <sup>b</sup>	1,0	8,93E+02 <sup>c</sup>	1,1	9,84E+02 <sup>c</sup>	0,8
13 Succinato de dietila	1,02E+02 <sup>a</sup>	1,7	1,19E+02 <sup>a</sup>	1,8	1,14E+02 <sup>a</sup>	1,3	8,99E+01 <sup>b</sup>	1,8	1,05E+02 <sup>a</sup>	1,0	7,80E+01 <sup>b</sup>	1,7	8,14E+01 <sup>b</sup>	1,2
Total ésteres:	4,19E+04		4,42E+04		3,95E+04		3,59E+04		4,20E+04		4,46E+04		4,62E+04	
<i>Ésteres etílicos</i>														
14 Butanoato de etila	9,00E+02 <sup>a</sup>	0,9	9,51E+02 <sup>a</sup>	0,9	8,95E+02 <sup>a</sup>	0,9	8,00E+02 <sup>a</sup>	0,5	8,09E+02 <sup>a</sup>	0,8	7,60E+02 <sup>b</sup>	0,4	7,86E+02 <sup>b</sup>	0,9
15 Hexanoato de etila	8,96E+02 <sup>b</sup>	0,3	1,01E+03 <sup>a</sup>	0,7	9,06E+02 <sup>a</sup>	0,2	9,00E+02 <sup>a</sup>	0,4	7,89E+02 <sup>b</sup>	0,3	7,25E+02 <sup>b</sup>	0,2	7,41E+02 <sup>b</sup>	0,6
16 Octanoato de etila	9,98E+02 <sup>b</sup>	1,0	1,21E+03 <sup>a</sup>	0,4	9,13E+02 <sup>b</sup>	0,3	8,97E+02 <sup>b</sup>	0,5	7,90E+02 <sup>b</sup>	0,3	8,52E+02 <sup>b</sup>	0,3	8,78E+02 <sup>b</sup>	0,5
17 Decanoato de etila	2,01E+02 <sup>a</sup>	1,2	2,76E+02 <sup>a</sup>	0,7	3,01E+02 <sup>a</sup>	1,1	2,79E+02 <sup>a</sup>	1,2	2,54E+02 <sup>a</sup>	1,5	1,51E+02 <sup>b</sup>	2,0	1,56E+02 <sup>b</sup>	1,5
Total ésteres etílicos:	2,99E+03		3,45E+03		3,01E+03		2,87E+03		2,64E+03		2,49E+03		2,56E+03	

<i>Ácidos graxos</i>															
18	Ácido butírico	1,84E+01 <sup>a</sup>	3,7	1,07E+01 <sup>a</sup>	2,1	5,00E+00 <sup>c</sup>	3,0	7,60E+00 <sup>b</sup>	2,9	1,19E+01 <sup>a</sup>	2,3	7,30E+00 <sup>b</sup>	1,3	6,00E+00 <sup>c</sup>	1,8
19	Ácido decanóico	7,84E+02 <sup>a</sup>	1,0	7,84E+02 <sup>a</sup>	1,0	6,87E+02 <sup>a</sup>	1,2	5,89E+02 <sup>b</sup>	0,9	6,72E+02 <sup>a</sup>	1,5	5,72E+02 <sup>b</sup>	2,1	6,24E+02 <sup>b</sup>	1,9
20	Ácido hexanóico	6,78E+02 <sup>a</sup>	0,4	4,91E+02 <sup>a</sup>	0,5	5,13E+02 <sup>a</sup>	0,7	5,79E+02 <sup>a</sup>	0,4	5,05E+02 <sup>a</sup>	0,3	6,12E+02 <sup>a</sup>	0,6	6,46E+02 <sup>a</sup>	0,3
21	Ácido isobutírico	6,08E+01 <sup>a</sup>	3,9	4,52E+01 <sup>a</sup>	2,8	3,85E+01 <sup>a</sup>	2,0	4,13E+01 <sup>a</sup>	2,3	3,70E+01 <sup>a</sup>	3,3	7,00E+01 <sup>a</sup>	2,0	7,50E+01 <sup>a</sup>	2,6
22	Ácido isovalérico	4,01E+02 <sup>a</sup>	4,0	4,64E+02 <sup>a</sup>	3,8	3,89E+02 <sup>a</sup>	3,6	3,54E+02 <sup>a</sup>	3,9	3,23E+02 <sup>a</sup>	3,7	2,55E+02 <sup>b</sup>	1,8	2,91E+02 <sup>b</sup>	3,0
23	Ácido octanóico	9,85E+02 <sup>a</sup>	0,5	9,84E+02 <sup>a</sup>	0,6	8,46E+02 <sup>a</sup>	0,2	1,02E+03 <sup>a</sup>	0,3	7,88E+02 <sup>c</sup>	0,4	8,14E+02 <sup>a</sup>	0,5	7,99E+02 <sup>c</sup>	0,3
	<i>Total ácidos graxos:</i>	2,93E+03		2,78E+03		2,48E+03		2,59E+03		2,34E+03		2,33E+03		2,44E+03	
<i>C<sub>13</sub>-norisoprenoides</i>															
24	α-ionona	7,80E-01 <sup>a</sup>	6,6	6,50E-01 <sup>a</sup>	6,9	4,00E-01 <sup>a</sup>	6,0	3,00E-01 <sup>a</sup>	5,8	2,20E-01 <sup>a</sup>	7,3	1,80E-01 <sup>b</sup>	8,6	1,20E-01 <sup>b</sup>	9,0
25	β-ionona	2,00E-01 <sup>a</sup>	4,9	2,80E-01 <sup>a</sup>	4,7	1,60E-01 <sup>a</sup>	3,9	1,40E-01 <sup>a</sup>	6,1	1,70E-01 <sup>a</sup>	5,8	2,00E-02 <sup>b</sup>	9,0	5,00E-02 <sup>b</sup>	10,6
26	β-damascenona	2,90E+00 <sup>a</sup>	5,8	2,63E+00 <sup>a</sup>	5,5	1,99E+00 <sup>a</sup>	5,1	2,01E+00 <sup>a</sup>	4,9	2,03E+00 <sup>a</sup>	4,6	9,00E-02 <sup>c</sup>	9,9	1,10E+00 <sup>c</sup>	8,7
	<i>Total norisoprenoides:</i>	3,88E+00		3,56E+00		2,55E+00		2,45E+00		2,42E+00		2,90E-01		1,27E+00	
<i>Monoterpenos</i>															
27	α-terpineol	7,86E+01 <sup>a</sup>	7,9	8,85E+01 <sup>a</sup>	7,5	4,21E+01 <sup>a</sup>	6,8	6,89E+01 <sup>a</sup>	6,5	6,39E+01 <sup>a</sup>	7,0	3,60E+00 <sup>b</sup>	14,7	4,00E+00 <sup>b</sup>	13,2
28	Geraniol	3,05E+00 <sup>a</sup>	4,9	2,07E+00 <sup>a</sup>	5,3	1,67E+00 <sup>a</sup>	6,1	1,89E+00 <sup>a</sup>	7,3	2,07E+00 <sup>a</sup>	5,8	1,75E+00 <sup>a</sup>	12,8	1,90E+00 <sup>a</sup>	10,7
29	Linalol	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
30	Nerol	1,00E-01 <sup>a</sup>	6,3	7,00E-02 <sup>a</sup>	5,7	1,10E-01 <sup>a</sup>	7,0	4,00E-02 <sup>a</sup>	6,9	6,00E-02 <sup>a</sup>	8,2	nd		nd	
	<i>Total monoterpenos:</i>	8,18E+01		9,06E+01		4,39E+01		7,08E+01		6,60E+01		5,35E+00		5,90E+00	
<i>Compostos furânicos</i>															
31	Furfural	3,65E+03 <sup>b</sup>	9,9	2,10E+03 <sup>b</sup>	11,2	5,45E+02 <sup>a</sup>	12,0	6,86E+02 <sup>a</sup>	10,6	7,79E+02 <sup>a</sup>	12,9	nd		nd	

\* média de três repetições; <sup>†</sup> valor expresso em µg.L<sup>-1</sup>; <sup>†</sup> RSD: desvio padrão relativo, expresso em %; <sup>‡</sup> nd: não detectado; letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Teste de Tukey, p<0,05) entre os locais de produção.

Os compostos observados em maior quantidade foram: álcoois, ésteres e ésteres etílicos de ácidos graxos. Estes compostos secundários são formados durante a etapa de fermentação, juntamente com o etanol, e apresentam intensa capacidade odorífera, desempenhando importante papel na formação do aroma de um vinho, contribuindo para a formação de aromas frutados, característicos de vinhos brancos jovens [28, 29]. Além dos aromas fermentativos, cabe destaque para as concentrações de C<sub>13</sub>-norisoprenoides, produzidos na uva a partir de carotenoides e responsáveis pela formação do aroma varietal de vinhos Chardonnay [28].

### 3.2.1 Álcoois

A fração volátil formada por diferentes álcoois é, quantitativamente, a principal classe de compostos presentes nas amostras de vinhos Chardonnay brasileiros. A concentração total de álcoois variou entre 68.437,1 µg.L<sup>-1</sup> em vinhos produzidos na região da Campanha, Rio Grande do Sul, até 146.010,5 µg.L<sup>-1</sup> em vinhos produzidos na Serra Catarinense.

Os álcoois com mais de dois átomos de carbono são conhecidos como álcoois superiores ou álcoois fúseis, sendo praticamente ausentes em uvas e mostos, mas encontrados em vinhos em concentrações relativamente mais elevadas, atingindo valores superiores a 100 mg.L<sup>-1</sup> [28, 29]. São formados durante a fermentação alcoólica, através da atividade da enzima lipoxigenase, sobre a degradação de aminoácidos, carboidratos e lipídeos. A presença dos diferentes álcoois em vinhos confere aromas que variam entre o floral e doce,

relacionados ao composto 2-feniletanol, até notas herbáceas e vegetais, provenientes do composto 1-hexanol [24].

Nas amostras avaliadas, o álcool que apresentou maior concentração foi o 2-feniletanol. O 2-feniletanol é responsável por notas de rosas e floral em vinhos e seu limiar olfativo em solução hidro alcóolica é de 10 mg.L<sup>-1</sup> [30]. Todas as concentrações observadas estavam acima de seu limiar de percepção (menor concentração de uma substância detectável pelo sistema olfativo), portanto este composto apresenta participação efetiva na formação do aroma final dos vinhos Chardonnay avaliados. A maior concentração observada foi na amostra SJ 010, produzida na Serra Catarinense durante a safra 2010, alcançando 60.400 ug.L<sup>-1</sup>. A menor concentração observada foi na amostra MG 011, produzida na região de Andradas durante a safra 2011, que apresentou 30.200 mg.L<sup>-1</sup>. Em vinhos Chardonnay produzidos na Província de Changli, China, a concentração média de 2-feniletanol encontrada foi de 34.000 ug.L<sup>-1</sup>.

O acetaldeído é um dos mais importantes compostos de carbonílicos formados durante a fermentação, sendo altamente volátil. Este composto pode conferir notas frutadas aos vinhos, principalmente notas de maçã verde, porém quando presente em excesso confere aromas indesejáveis tais como notas de “gramíneas” e aromas pungentes [31]. As concentrações de acetaldeído observadas variaram entre 65.900 ug.L<sup>-1</sup> na amostra MG 012, 64.200 ug.L<sup>-1</sup> na amostra SG 010 e 74.000 ug.L<sup>-1</sup> em SJ 0102. Quantidades significativamente menores, em torno de 26.000 ug.L<sup>-1</sup>, foram observadas nas amostras provenientes da região da Campanha, Rio Grande do Sul. O limiar de percepção sensorial do

acetaldeído é  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , portanto, apesar das concentrações elevadas, o acetaldeído não apresenta participação efetiva na formação do aroma dos vinhos analisados.

Na amostra AG 090, produzida em Santa Catarina, detectou-se a presença de metanol em concentração de  $1.620 \text{ ug.L}^{-1}$ , sendo a única amostra que apresentou tal composto. Na faixa usualmente encontrada em vinhos, entre  $100$  a  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ , o metanol não apresenta efeito sensorial significativo, porém sua presença é indesejada devido à produção de metabolitos tóxicos, tais como o formaldeído e ácido fórmico. A concentração observada nesta amostra,  $1.620 \text{ ug.L}^{-1}$ , está abaixo de suas concentrações usuais. O metanol é gerado a partir da degradação enzimática de pectinas, onde os grupos metílicos associado com pectina são libertados como metanol livre, assim a presença de metanol pode ser explicada pelo uso de enzimas pectolíticas adicionadas ao mosto ou vinho durante o processo de clarificação [29].

O 2-butanol, responsável por notas de álcool e “medicinal”, foi detectado apenas nas amostras provenientes da Serra Gaúcha, porém em concentrações abaixo de seu limiar de percepção. O composto 1-propanol, relacionado à notas de álcool e “frescor”, não foi detectado em concentrações acima de seu limiar de percepção,  $306.000 \text{ ug.L}^{-1}$  [32]. Os compostos 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, relacionados à notas herbáceas, foram encontrados em concentrações acima de seu limiar de percepção,  $1.000 \text{ ug.L}^{-1}$  em praticamente todas as amostras, contribuindo para a percepção destas notas nestes vinhos.

O 1-hexanol, quando em concentrações elevadas confere aroma herbáceo indesejado aos vinhos. Apenas as amostras provenientes de Minas Gerais apresentaram concentrações de 1-hexanol acima do seu limiar de percepção, 8.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [30]. As amostras provenientes da região da Campanha e Serra Catarinense apresentaram concentrações deste composto semelhantes às encontradas por Simpson e Miller em vinhos Chardonnay australianos, cuja concentração média foi de 1.250  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [33]. Vinhos Chardonnay chineses apresentaram concentrações de 1-hexanol entre 1.100 e 1.200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [34, 35]

### 3.2.2 Ésteres e Ésteres etílicos de ácido graxos

Os ésteres são um dos principais componentes dos vinhos, logo após a água, etanol e álcoois fúseis. São produzidos enzimaticamente durante a fermentação, através da condensação entre o grupo carboxílico de um ácido orgânico e o grupo hidroxílico de um álcool ou fenol [29]. A concentração destes compostos depende de muitos fatores, principalmente da cepa de levedura utilizada, da temperatura da fermentação, do grau de aeração e do teor de açúcar do mosto. Apresentam, em geral, contribuição positiva na formação do aroma de um vinho, conferindo aromas frutados e florais [24].

A maioria dos ésteres quantificados apresentaram concentrações superiores aos seus limiares de percepção sensorial, contribuindo significativamente na formação do aroma das amostras avaliadas. Apenas o lactato de etila e o succinato de dietila, compostos marcadores de fermentação malolática, apresentaram concentrações abaixo dos seus limiares em todas as

amostras. As concentrações observadas foram menores do que observadas em vinhos Chardonnay produzidos na China [34, 35]. No geral, a concentração total dos ésteres e ésteres etílicos nas amostras variou entre 35.000 e 49.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

O acetato de isoamila, responsável pelo aroma de banana, foi o éster encontrado em maior concentração em todas as amostras, com valores variando entre 30.000 até 45.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em todas as amostras, as concentrações estavam acima de seu limiar de percepção, 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , indicando que este composto apresenta relevante importância na formação do aroma final dos vinhos Chardonnay brasileiros. Em vinhos chineses, safra 2007, a concentração média de acetato de isoamila observada foi 24.849  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [35].

O hexanoato e octanoato de etila também se destacaram, com concentrações muito próximas, entre 700 - 1.200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  cada. O limiar de percepção do hexanoato de etila é de 31  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e do octanoato de etila, 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [30]. Todas as amostras apresentaram concentração superiores aos seus limiares. Estes compostos contribuem para a formação de notas de maçã verde, morango e frutado (hexanoato de etila) e abacaxi, pera e floral (octanoato de etila), característico de vinhos Chardonnay [30].

O decanoato de etila, cujos descritores aromáticos são frutado e “prazeroso”, apresentou concentrações abaixo de seu limiar de percepção (200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) nas amostras produzidas na Serra Gaúcha e em Minas Gerais. Destacou-se a presença em concentrações elevadas, em todas as amostras, do acetato de 2-feniletanol, cujos descritores aromáticos são rosas, floral e mel, com limiar de percepção em 250  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [30].

### 3.2.3 Ácidos Graxos

A presença de ácidos graxos geralmente está associada a notas desagradáveis em vinhos, tais como rançoso, queijo e sabão, no entanto apenas alguns compostos desta família atingem o seu limiar de percepção. Porém, os ácidos graxos são considerados essenciais para o equilíbrio aromático do vinho [5, 29, 30].

Em concentrações entre 4 – 10 mg.L<sup>-1</sup>, a presença de ácidos graxos em vinhos pode conferir aroma “prazeroso”, porém, acima de 20 mg.L<sup>-1</sup>, o impacto destes compostos no aroma torna-se negativo [36]. Em todas as amostras analisadas, apenas os ácidos isovalérico e octanóico apresentaram concentrações acima de seu limiar de percepção, 33,4 ug.L<sup>-1</sup> e 500 ug.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Porém, quando consideramos a soma de todas as concentrações de ácidos graxos, estas não ultrapassam o valor de 4 mg.L<sup>-1</sup>, não apresentando impacto negativo no aroma destes vinhos.

### 3.2.4 Monoterpenos

Os monoterpenos são metabólitos secundários das plantas, que contribuem na formação de aromas florais em vinhos. Estes compostos possuem baixo limiar de percepção olfativa e estão presentes em baixas concentrações nos vinhos, na ordem de µg.L<sup>-1</sup> [28, 29].

Neste trabalho, quatro monoterpenos foram estudados: α-terpineol, geraniol, linalol e nerol. Apenas o linalol não foi detectado nas amostras de vinhos Chardonnay analisados. O α-terpineol foi detectado em todas as amostras, com

destaque para as concentrações observadas nas amostras produzidas na Serra Catarinense (SJ 010, SJ 080 e SJ 0102), com valores entre 76 e 89  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Porém, seu limiar de percepção é de 250 de  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , assim este composto não apresenta participação na formação do aroma das amostras. O mesmo acontece com o geraniol, presente em concentrações abaixo de 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , seu limiar de percepção [30].

O nerol foi detectado em amostras produzidas na região da Campanha, Rio Grande do Sul, e nas amostras produzidas em Santa Catarina, estando ausentes nas amostras da Serra Gaúcha e de Minas Gerais. Este composto contribui para a formação do aroma de rosas em vinhos, quando presente em concentrações acima de 400 – 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [29, 30]. Nas amostras analisadas, as concentrações de nerol não ultrapassaram seu limiar de percepção.

Os monoterpenos são compostos aromáticos de origem varietal, estando intimamente ligados à formação de aroma floral/frutado em uvas Moscatéis. A presença em vinhos Chardonnay já foi relatada em amostras californianas, realizada através de análise descritiva [37]. Porém, através do uso de GC-MS, estes compostos não apresentaram impacto sensorial considerável em vinhos Chardonnay chineses [34].

### 3.2.5 C<sub>13</sub>-norisoprenoides

C<sub>13</sub>-norisoprenoides são formados a partir da degradação oxidativa de carotenoides. A  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona e a  $\beta$ -damascenona são os principais compostos C<sub>13</sub>-norisoprenóides presentes em vinhos, contribuindo na formação de

aromas florais e frutados [29, 30, 38]. A  $\alpha$ -ionona contribui para a formação de aroma floral (violeta) em vinhos e seu limiar de percepção é de  $2,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  [38]. Nenhuma amostra analisada apresentou concentrações de  $\alpha$ -ionona acima de seu limiar de percepção.

A  $\beta$ -ionona é considerada um potente composto odorante, com notas olfativas de amora, violeta e balsâmico, sendo identificada em diferentes vinhos varietais, tanto tintos quanto brancos [26, 39]. Seu limiar de percepção olfativa é  $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$  [27].

As amostras provenientes da Serra Catarinense apresentaram maiores concentrações de  $\beta$ -ionona, com valores entre  $0,20$  e  $0,28 \mu\text{g.L}^{-1}$ . A concentração média de  $\beta$ -ionona em vinhos brancos jovens, avaliados por Silva Ferreira e Guedes de Pinho [40], variou entre  $0,01$  e  $0,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Apenas as amostras SG 090, MG 011 e MG 012 não apresentaram concentrações de  $\beta$ -ionona acima de seu limiar de percepção.

Os descritores olfativos da  $\beta$ -damascenona são bastante variados, incluindo compota de pêsego, maçã cozida, ameixa seca, floral, frutado, mel e rosas [41-43]. Sua presença em vinhos tintos é bastante conhecida, sendo relatada em vinhos de diferentes cultivares de *Vitis vinifera* [41]. Seu limiar de percepção é de  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  [27].

Todas as amostras de vinhos Chardonnay analisados apresentaram concentrações de  $\beta$ -damascenona acima de seu limiar de percepção, contribuindo de forma efetiva na formação do aroma final destas amostras. As menores concentrações foram observadas nas amostras provenientes de Minas Gerais,

cujas concentrações médias variaram entre 0,09 e 0,11  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . As demais amostras apresentaram concentrações entre 1,3 e 2,9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , concentração semelhante à observada em vinhos Chardonnay chineses [34]. Estas concentrações são semelhantes a outros vinhos brancos citados em literatura: em vinhos base para a produção de vinho Fiano doce, onde a concentração encontrada foi de 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [44] e em vinhos da cultivar Zalema produzidos na Espanha [45].

### 3.2.6 Compostos Furânicos

Os compostos furânicos são considerados os principais produtos de degradação de carboidratos em alimentos em bebidas, estando relacionados às reações de escurecimento não enzimático (Reação de Maillard) e atuam como marcadores de tratamento térmico em alimentos [46, 47]. Em vinhos, a presença de compostos furânicos está associada ao processo de envelhecimento em barris de madeira (carvalho), com aumento gradativo da sua concentração em função do tempo de armazenagem e envelhecimento [48].

O composto furânico analisado nas amostras de vinhos Chardonnay foi o furfural. O limiar de percepção deste composto é de 14.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e seu descritor aromático varia de acordo com a sua concentração, desde doce e caramelo até pungente [30, 35].

Todas as amostras de vinho Chardonnay avaliadas apresentaram concentrações de furfural menores que o seu limiar de percepção olfativa. Nas amostras provenientes de Minas Gerais, o furfural não foi detectado, indicando que a amostra não passou pelo processo de envelhecimento em barris de

madeira. Cabe destacar as concentrações observadas nas amostras oriundas da Serra Gaúcha e Catarinense e a amostra CP 080, cujas concentrações foram significativamente superiores. Estas amostras, segundo dados demonstrados nos rótulos dos produtos, passaram por estágio em barris de carvalho, explicando assim, a origem do composto furfural.

### **3.3 Análises Estatísticas**

#### **3.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)**

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para verificar, através da concentração dos compostos voláteis analisados, a diferenciação regional das amostras de vinhos. A Figura 3.1 apresenta o resultado do PCA realizado com as amostras de vinhos Chardonnay de diferentes regiões brasileiras, onde podemos visualizar as amostras (Figura 3.1A) e as variáveis (Figura 3.1B).

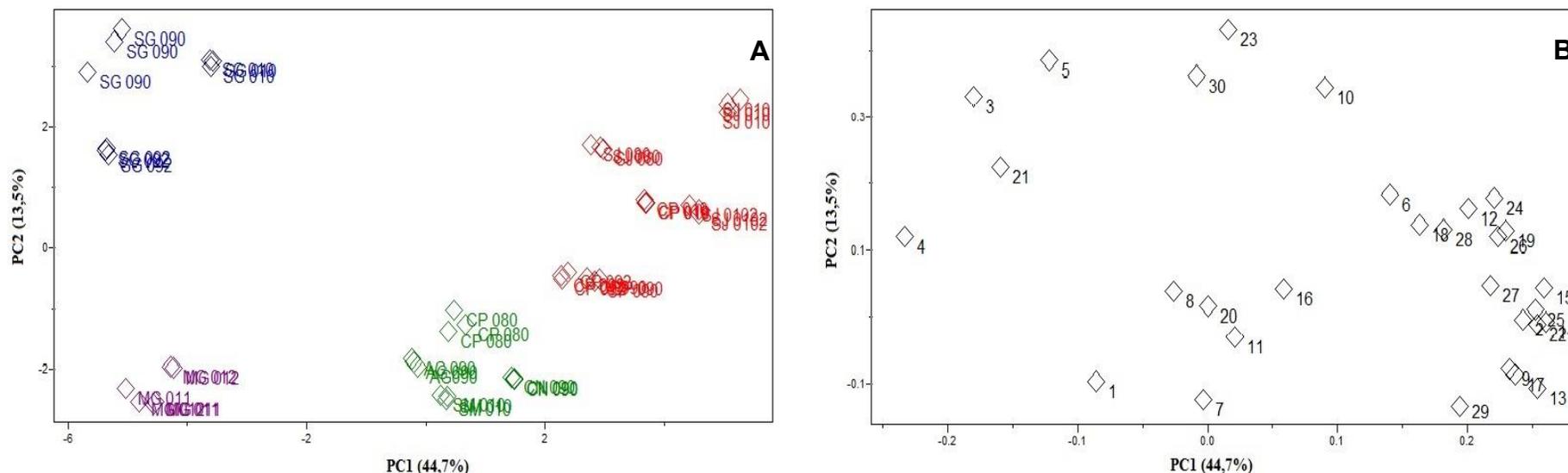


Figura 3.1. Resultado da Análise dos Componentes Principais (PCA) dos compostos voláteis em vinhos Chardonnay brasileiros. (A) gráfico dos escores dos compostos voláteis das amostras avaliadas (B) gráfico das variáveis quantificadas nas amostras de vinhos Chardonnay. Onde: CP 010: Campanha/RS, safra 2010; CP 080: Campanha/RS, safra 2008; CP 090: Campanha/RS, safra 2009; CP 092: Campanha/RS, safra 2009; SG 010: Serra Gaúcha/RS, safra 2010; SG 090: Serra Gaúcha/RS, safra 2009; SG 092: Serra Gaúcha/RS, safra 2009; SJ 080: Serra Catarinense/SC, safra 2008; SJ 010: Serra Catarinense/SC, safra 2010; SJ 0102: Serra Catarinense/SC, safra 2010; CN 090: Região de Altitude/SC, safra 2009; AG 090: Região de Altitude/SC, safra 2009; SM 010: Região de Altitude/SC, safra 2010; MG 011: Andradas/MG, safra 2011; MG 012: Andradas/MG, safra 2012. 1= 1-hexanol; 1= 1-propanol; 3= 2-butanol; 4= 2-metil-1-butanol; 5= 3-metil-1-butanol; 6= 2-feniletanol; 7= metanol; 8= acetaldeído 9=acetato de 2-feniletila; 10= acetato de hexila; 11= acetato de isoamila; 12= lactato de etila; 13= dietil succinato; 14= butanoato de etila; 15= hexanoato de etila; 16= octanoato de etila; 17= decanoato de etila; 18= ácido butírico; 19= ácido decanóico; 20= ácido hexanóico; 21= ácido isobutírico; 22= ácido isovalérico; 23= ácido octanóico; 24=  $\alpha$ -ionona; 25=  $\beta$ -ionona; 26=  $\beta$ -damascenona; 27=  $\alpha$ -terpineol; 28= geraniol; 29= nerol; 30= furfural. Grupo 1: cor azul; Grupo 2: cor lilás; Grupo 3: cor verde; e Grupo 4: cor vermelha.

Através do PCA é possível explicar 58,2% da variabilidade entre as regiões produtoras das amostras. Verifica-se que 44,7% da variação ocorrida entre as amostras foi explicada pelo primeiro componente principal (PC1), enquanto o segundo componente principal (PC2) explicou 13,5% da variabilidade entre as amostras. Foram utilizados 16 fatores, com total de 99,5% de explicação e autoescalamento conferindo pesos iguais para todas as variáveis. Para fins estatísticos, o linalol foi descartado desta análise, pois não foi detectado em todas as amostras.

Os componentes diferenciaram as amostras de vinhos, de acordo com a região produtora, sendo possível visualizar a formação de 4 grupos distintos: (1) grupo SG, em azul na Figura 3.1A, com vinhos provenientes da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul; (2) grupo MG, em lilás na Figura 3.1A, com as amostras da região de Andradas, Minas Gerais; (3), um grupo formado pelas amostras CN 090, SM010, AG 090, produzidas na região de altitude, Santa Catarina, juntamente com a amostra CP 080, proveniente da região da Campanha, Rio Grande do Sul e representado em verde na Figura 3.1A; (4) e um grupo formado pelas demais amostras CP, produzidas na região da Campanha, Rio Grande do Sul e por amostras SJ, originárias da região da Serra Catarinense, Santa Catarina, representado em vermelho na Figura 3.1A.

O grupo 1, formado pelas amostras provenientes da Serra Gaúcha, SG 010, SG 090 e SG 092, apresentaram forte correlação negativa com o grupo 3, formado pelas amostras CN 090, SM010, AG 090 e CP 080. As variáveis que

apresentam forte influencia sobre o grupo 1 são 3, 5 e 21, 2-butanol, 3-metil-1-butanol e ácido isobutírico, respectivamente. Estes compostos possuem impacto negativo no aroma final de um vinho, porem apenas o composto 3-metil-1-butanol, relacionado à notas herbáceas, foi encontrado em concentrações acima de seu limiar de percepção nestas amostras. Estes compostos podem atuar como marcadores para os vinhos Chardonnay produzidos nesta região, pois foram detectados nas amostras de safras diferentes. Além disso, as amostras SG apresentaram forte correlação negativa com as variáveis (compostos) que atuam na formação de aromas florais e frutados em vinhos: os ésteres, monoterpenos e C<sub>13</sub>-norisoprenoides.

O grupo 2, formado pelas amostras produzidas em Minas Gerais, apresentou forte correlação negativa com o grupo 4, formados pelas amostras produzidas na região da Campanha/RS e Serra Catarinense/SC, demonstrando a influência da origem geográfica na composição volátil dessas amostras. As variáveis fortemente correlacionadas à esse grupo são 1 e 4, 1-hexanol e 2-metil-1-butanol, respectivamente. Ambos os compostos contribuem na formação de aromas herbáceos e vegetais em vinhos. Porém apenas o composto 1-hexanol está presente acima do seu limiar de percepção, 8.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Este composto pode atuar como marcador químico para os vinhos Chardonnay desta região, pois foi detectado em ambas as safras analisadas (2011 e 2012). As amostras MG apresentaram correlação negativas com os monoterpenos, C<sub>13</sub>-norisoprenoides e com o 2-feniletanol, cujo descritor aromático é rosa.

As amostras CN 090, SM010, AG 090, produzidas na região de altitude, Santa Catarina, e CP 080, proveniente da região da Campanha, Rio Grande do Sul formaram o grupo 3. Este grupo encontra-se fortemente influenciado pelas variáveis acetaldeído, acetato de isoamila, octanoato de etila e ácido hexanóico. O acetaldeído está presente em concentrações abaixo do seu limiar de percepção, não apresentando participação efetiva na formação do aroma dos vinhos analisados. Este grupo também apresenta correlação com os compostos que conferem aromas florais e frutado aos vinhos, os monoterpenos, C<sub>13</sub>-norisoprenoides e ésteres. Os compostos acetato de isoamila e octanoato de etila estão fortemente correlacionados a estas amostras. Os descritores aromáticos para estes compostos são: banana, para o acetato de isoamila, e abacaxi, pera e floral para o octanoato de etila [30]. Neste grupo uma única amostra é proveniente da região da Campanha, Rio Grande do Sul, enquanto as demais amostras foram produzidas em Santa Catarina.

O grupo 4 agrupa as amostras produzidas na Serra Catarinense, SJ 080, SJ 010 e SJ 0102, e demais amostras provenientes da região da Campanha, CP 010, CP 090 e CP 092. Essas regiões apresentam características edafoclimáticas diferenciadas das demais regiões avaliadas: grande amplitude térmica diária (variação entre temperatura máxima e mínima em um mesmo dia), invernos com frio intenso e baixa umidade relativa do ar [49-51]. Estes parâmetros geográficos podem ter influenciado positivamente a composição aromática destes vinhos, pois as amostras destes grupos apresentaram forte correlação com aromas varietais, os monoterpenos e C<sub>13</sub>-norisoprenoides, responsáveis por

diversos aromas florais e frutados. Reforçando a sua tipicidade, de acordo com a origem geográfica, este grupo apresenta correlação fortemente negativa com os grupos 1 e 2, formados pelas amostras produzidas na Serra Gaúcha e em Minas Gerais, respectivamente.

Todos os monoterpenos avaliados encontraram-se abaixo de seu limiar de percepção, não apresentando, a princípio, papel relevante na formação do aroma final dos vinhos analisados. Por sua vez, os compostos  $\beta$ -ionona e a  $\beta$ -damascenona, pertencentes à classe de  $C_{13}$ -norisoprenoides, apresentaram concentrações acima de seu limiar de percepção, contribuindo de forma efetiva na formação do aroma final destas amostras. A  $\beta$ -ionona possui notas olfativas de amora, violeta e balsâmico e limiar de percepção de  $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$  [27]. Para a  $\beta$ -damascenona os descritores olfativos são bastante variados, desde compota de pêssigo, maçã cozida, ameixa seca, floral, frutado, mel e rosas [41-43]. Seu limiar de percepção é de  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  [27]. Considerando a relevante contribuição destes compostos na formação de aroma de vinhos, estes compostos podem atuar como marcadores químicos para os vinhos Chardonnay destas regiões. Além destas classes, esse grupo apresenta forte correlação positiva com ésteres, que também contribuem com descritores aromáticos florais e frutados.

### **3.3.2 Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)**

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi aplicada aos dados normalizados e autoescalados, empregando a distância euclidiana para

investigar similaridades entre as diferentes amostras analisadas e fornecendo os clusters de similaridade [52]. Os resultados obtidos podem ser observados no dendograma da Figura 3.2, onde quatro agrupamentos distintos, com similaridade de aproximadamente 56,6%, podem ser observados. Para fins estatísticos, o composto linalol foi descartado desta análise.

Os 4 grupos formados classificaram as 15 amostras analisadas: (1) duas amostras representadas em azul, produzidas em Minas Gerais; (2) três amostras em lilás, produzidas na Serra Gaúcha; (3) quatro amostras em vermelho, três delas produzidas na Região de Altitude /SC, e a amostra CP 080, produzida na região da Campanha/RS); (4) seis amostras em verde pertencem ao grupo das amostras produzidas na Campanha/RS e na Serra Catarinense/SC. Apesar de não fornecer informação sobre a importância das variáveis para a diferenciação das amostras, a análise por HCA fornece informações confiáveis sobre a diferenciação regional das amostras, um dos principais objetivos deste trabalho.

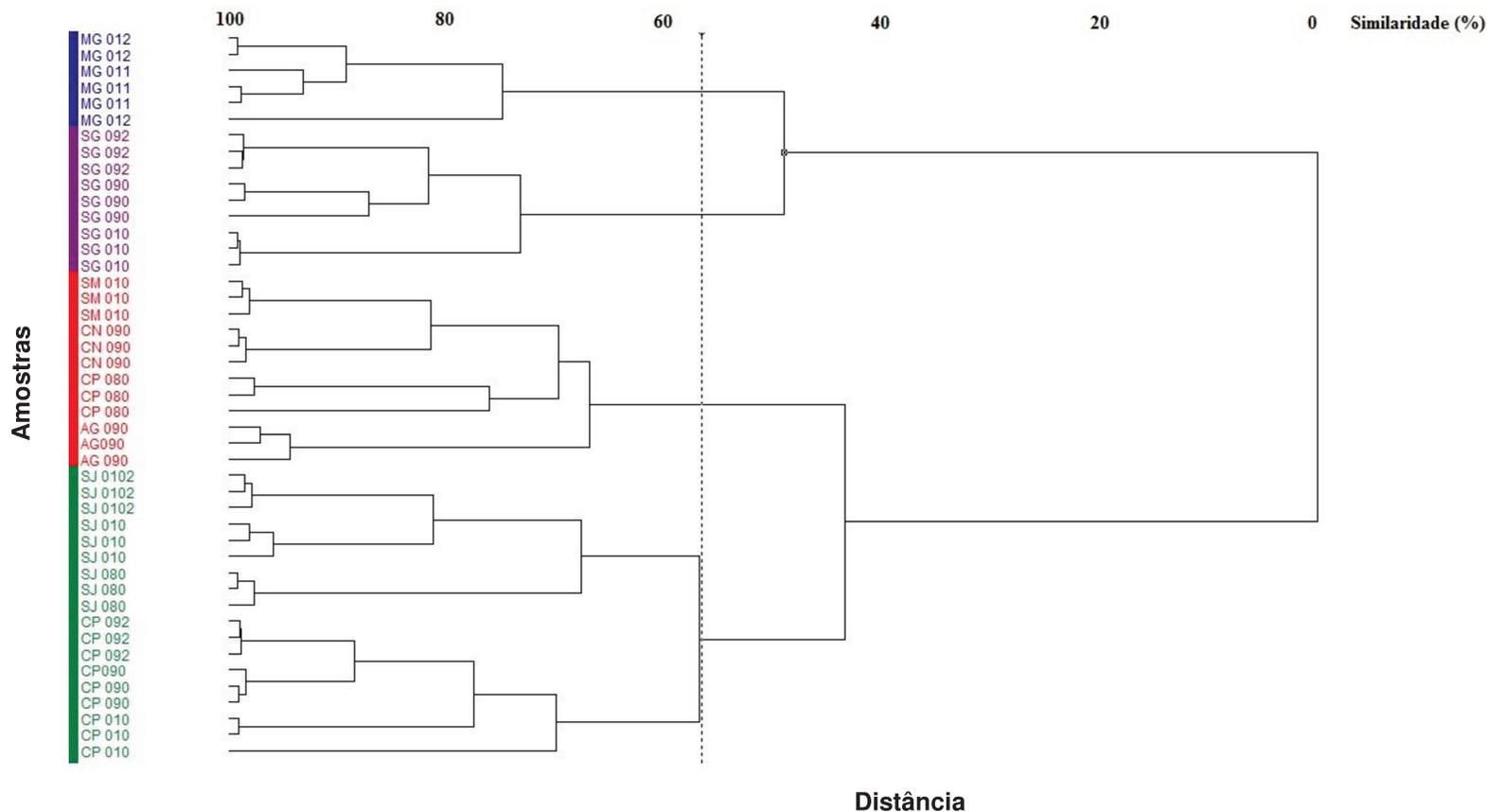


Figura 3.2. Dendrograma da Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), com 56,6% de similaridade, dos compostos voláteis em vinhos Chardonnay brasileiros. Onde: CP 010: Campanha/RS, safra 2010; CP 080: Campanha/RS, safra 2008; CP 090: Campanha/RS, safra 2009; CP 092: Campanha/RS, safra 2009; SG 010: Serra Gaúcha/RS, safra 2010; SG 090: Serra Gaúcha/RS, safra 2009; SG 092: Serra Gaúcha/RS, safra 2009; SJ 080: Serra Catarinense/SC, safra 2008; SJ 010: Serra Catarinense/SC, safra 2010; SJ 0102: Serra Catarinense/SC, safra 2010; CN 090: Região de Altitude/SC, safra 2009; AG 090: Região de Altitude/SC, safra 2009; SM 010: Região de Altitude/SC, safra 2010; MG 011: Andradas/MG, safra 2011; MG 012: Andradas/MG, safra 2012.

#### 4. Conclusões

Um método de análise utilizando a técnica de GC-MS/MS foi validado e aplicado com sucesso para a identificação e quantificação de 31 compostos voláteis de vinhos Chardonnay de diferentes regiões brasileiras. Este método permitiu a caracterização da fração volátil destes vinhos, possibilitando a realização de PCA e HCA visando a diferenciação regional dos vinhos. As amostras produzidas em Minas Gerais e na Serra Gaúcha possuem marcadores olfativos herbáceos e vegetais, enquanto as amostras produzidas na região da Campanha/RS, Serra Catarinense e Região de Altitude/SC possuem marcadores florais e frutados, reforçando a diferenciação pela origem geográfica, confirmada pelo HCA.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (número de processo: 2011/17094-2) pelo suporte financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela disponibilização de bolsa de doutorado (S. B. Sartor).

#### 6. Referencias

1. Smyth, H. and D. Cozzolino, *Instrumental Methods (Spectroscopy, Electronic Nose, and Tongue) As Tools To Predict Taste and Aroma in Beverages: Advantages and Limitations*. Chemical Reviews, 2012. **113**(3): p. 1429-1440.

2. Ebeler, S.E. and J.H. Thorngate, *Wine Chemistry and Flavor: Looking into the Crystal Glass*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(18): p. 8098-8108.
3. Styger, G., B. Prior, and F. Bauer, *Wine flavor and aroma*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011. **38**(9): p. 1145-1159.
4. Polaskova, P., J. Herszage, and S.E. Ebeler, *Wine flavor: chemistry in a glass*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**(11): p. 2478-2489.
5. Saberi, S., M.A. Cliff, and H.J.J. van Vuuren, *Impact of mixed S. cerevisiae strains on the production of volatiles and estimated sensory profiles of Chardonnay wines*. Food Research International, 2012. **48**(2): p. 725-735.
6. King, E.S., et al., *Regional sensory and chemical characteristics of Malbec wines from Mendoza and California*. Food Chemistry, 2014. **143**(0): p. 256-267.
7. Xi, Z.-m., et al., *Impact of cover crops in vineyard on the aroma compounds of Vitis vinifera L. cv Cabernet Sauvignon wine*. Food Chemistry, 2011. **127**(2): p. 516-522.
8. Zhang, M., et al., *Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine*. Food Chemistry, 2011. **125**(2): p. 743-749.
9. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
10. Risticvic, S., et al., *Recent developments in solid-phase microextraction*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **393**(3): p. 781-795.
11. Zhang, Z., M.J. Yang, and J. Pawliszyn, *Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(17): p. 844A-853A.
12. Hayasaka, Y., G.A. Baldock, and A.P. Pollnitz, *Contributions of mass spectrometry in the Australian Wine Research Institute to advances in knowledge of grape and wine constituents*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005. **11**(2): p. 188-204.
13. Cordero, C., et al., *Chapter 11 - Gas Chromatography*, in *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* 2012, Academic Press: Boston. p. 311-373.

14. Yost, R.A. and C.G. Enke, *Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation*. Analytical Chemistry, 1979. **51**(12): p. 1251-1264.
15. Koesukwiwat, U., S.J. Lehotay, and N. Leepipatpiboon, *Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(39): p. 7039-7050.
16. Hayward, D.G., et al., *Multiresidue Pesticide Analysis of Botanical Dietary Supplements Using Salt-out Acetonitrile Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup Column, and Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(9): p. 4686-4693.
17. Zhang, F., et al., *Determination of trace food-derived hazardous compounds in Chinese cooked foods using solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1209**(1–2): p. 220-229.
18. Delgadillo, M.A., et al., *Sensitive and robust method for anabolic agents in human urine by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2012. **897**(0): p. 85-89.
19. Cervera, M.I., et al., *Determination of volatile organic compounds in water by headspace solid-phase microextraction gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry with triple quadrupole analyzer*. Analytica Chimica Acta, 2011. **704**(1–2): p. 87-97.
20. Tsugawa, H., et al., *Highly sensitive and selective analysis of widely targeted metabolomics using gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry*. Journal of Bioscience and Bioengineering, (0).
21. Whiton, R.S. and B.W. Zoecklein, *Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds*. American Journal of Enology and Viticulture, 2000. **51**(4): p. 379-382.
22. Weldegergis, B.T., A. de Villiers, and A.M. Crouch, *Chemometric investigation of the volatile content of young South African wines*. Food Chemistry, 2011. **128**(4): p. 1100-1109.
23. Brasil, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. , in *Diário Oficial da União, Brasília*2003.

24. Perestrelo, R., et al., *Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **563**(1–2): p. 154-164.
25. Kotseridis, Y., et al., *An Analytical Method for Studying the Volatile Compounds of Merlot noir Clone Wines*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1998. **49**(1): p. 44-48.
26. López, R., et al., *Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **966**(1–2): p. 167-177.
27. Ferreira, V., R. López, and J.F. Cacho, *Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000. **80**(11): p. 1659-1667.
28. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Varietal aroma*. *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, Volume 2, 2nd Edition, 2006: p. 205-230.
29. Jackson, R.S., *Wine science: principles and applications* 2008: Access Online via Elsevier.
30. Guth, H., *Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. **45**(8): p. 3027-3032.
31. Zoecklein, B.W., et al., *Wine analysis and production* 1995: Chapman & Hall New York.
32. Rapp, A. and H. Mandery, *Wine aroma*. *Experientia*, 1986. **42**(8): p. 873-884.
33. SWIPSON, R. and G. Miller, *Aroma composition of Chardonnay wine*. *Vitis*, 1984. **23**: p. 143-158.
34. Li, H., et al., *Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China)*. *European Food Research and Technology*, 2008. **227**(1): p. 287-292.
35. Jiang, B. and Z. Zhang, *Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China*. *Molecules*, 2010. **15**(12): p. 9184-9196.
36. Shinohara, T., *Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985. **49**(7): p. 2211-2212.

37. Arrhenius, S.P., L.P. McCloskey, and M. Sylvan, *Chemical Markers for Aroma of Vitis vinifera Var. Chardonnay Regional Wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(4): p. 1085-1090.
38. Winterhalter, P. and R. Rouseff, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction*, in *Carotenoid-Derived Aroma Compounds* 2001, American Chemical Society. p. 1-17.
39. Kotseridis, Y., et al., *An analytical method for studying the volatile compounds of Merlot noir clone wines*. American Journal of Enology and Viticulture, 1998. **49**(1): p. 44-48.
40. Ferreira, A.C.S. and P.G.U. De Pinho, *Analytical Method for Determination of Some Aroma Compounds on White Wines by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography*. Journal of Food Science, 2003. **68**(9): p. 2817-2820.
41. Pineau, B., et al., *Which Impact for  $\beta$ -Damascenone on Red Wines Aroma?* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(10): p. 4103-4108.
42. Aznar, M., et al., *Identification and Quantification of Impact Odorants of Aged Red Wines from Rioja. GC-Olfactometry, Quantitative GC-MS, and Odor Evaluation of HPLC Fractions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(6): p. 2924-2929.
43. Ferreira, V., et al., *Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(14): p. 4048-4054.
44. Genovese, A., et al., *Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine*. Food Chemistry, 2007. **103**(4): p. 1228-1236.
45. Gómez-Míguez, M.J., et al., *Volatile components of Zalema white wines*. Food Chemistry, 2007. **100**(4): p. 1464-1473.
46. Pereira, V., et al., *Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions*. Food Research International, 2011. **44**(1): p. 71-76.
47. Antonelli, A., F. Chinnici, and F. Masino, *Heat-induced chemical modification of grape must as related to its concentration during the production of traditional balsamic vinegar: A preliminary approach*. Food Chemistry, 2004. **88**(1): p. 63-68.
48. Spillman, P.J., et al., *Formation and Degradation of Furfuryl Alcohol, 5-Methylfurfuryl Alcohol, Vanillyl Alcohol, and Their Ethyl Ethers in Barrel-*

- Aged Wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(2): p. 657-663.
49. Pötter, G.H., et al., *Desfolha parcial em videiras e seus efeitos em uvas e vinhos Cabernet Sauvignon da região da Campanha do Rio Grande do Sul, Brasil*. Ciência Rural, 2010. **40**(9): p. 2011-2016.
  50. Falcade, I. *Paisagens vitícolas brasileiras*. in *X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*. Bento Gonçalves. 2005.
  51. Rosier, J.P. *Novas regiões: vinhos de altitude no sul do Brasil*. in *Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*. 2003. Embrapa Uva e Vinho Bento Gonçalves.
  52. Patras, A., et al., *Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on in vitro antioxidant activity*. Journal of Food Composition and Analysis, 2011. **24**(2): p. 250-256.

## CONCLUSÃO GERAL

O método de extração de compostos voláteis em vinhos Chardonnay utilizando microextração em fase sólida (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas *tandem* (GC-MS/MS) foi desenvolvido através de otimização multivariada. A estratégia de otimização foi conduzida utilizando análise multivariada com delineamento composto central rotacional (CCRD) baseado em planejamento fatorial  $2^2$  e metodologia de superfície de resposta. Os fatores temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo (minutos) foram otimizados e variaram entre 30 e  $50^{\circ}\text{C}$  e 30 e 60 minutos.

Através dos resultados obtidos, obteve-se o modelo matemático que descreve a superfície de resposta para o CCRD, sendo validado através do uso de análise de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança. O modelo gerado apresentou uma falta de ajuste, baseado nos valores de média dos quadrados dos resíduos e do erro puro de cada resposta, não podendo ser utilizado para fazer previsões sobre a resposta. Contudo, o modelo apresentou coeficientes da equação úteis, principalmente os lineares, além de os resultados observados no ponto central indicarem adequada repetibilidade do método nesta condição.

Assim, o modelo pode ser utilizado para compreensão do comportamento sistemático nos valores de respostas em função dos níveis dos fatores. O ponto ótimo de extração observado neste método foi com temperatura em  $30^{\circ}\text{C}$  e 45 minutos de tempo de extração.

Um método de análise utilizando a técnica de GC-MS/MS foi validado para a separação, identificação e quantificação de 31 compostos voláteis de vinhos Chardonnay de diferentes regiões brasileiras. O processo de validação do método analítico foi realizado através da elaboração de curva analítica e da análise dos seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão e exatidão. Todos os parâmetros avaliados mostraram-se adequados, de acordo com a literatura, tornando o método válido para aplicação em amostras reais.

Este método permitiu a caracterização da fração volátil destes vinhos, onde 31 compostos foram analisados com base em suas transições (íons precursores( $m/z$ )→íons produto( $m/z$ )). Os compostos observados em maior quantidade foram: álcoois, ésteres e ésteres etílicos de ácidos graxos. Estes compostos secundários são formados durante a etapa de fermentação, juntamente com o etanol, e apresentam intensa capacidade odorífera, desempenhando importante papel na formação do aroma de um vinho, contribuindo para a formação de aromas frutados, característicos de vinhos brancos jovens. Além dos aromas fermentativos, cabe destaque para as concentrações de  $C_{13}$ -norisoprenoides, produzidos na uva a partir de carotenoides e responsáveis pela formação do aroma varietal de vinhos Chardonnay.

Através das análises estatísticas, PCA e HCA, foi possível observar a diferenciação regional dos vinhos. As amostras provenientes da Serra Gaúcha, apresentaram forte associação com 2-butanol, 3-metil-1-butanol e ácido

isobutírico, compostos relacionados às notas herbáceas. Estes compostos podem atuar como marcadores para os vinhos Chardonnay produzidos nesta região, pois foram detectados nas amostras de safras diferentes. As amostras produzidas em Minas Gerais apresentaram associação com o 1-hexanol e 2-metil-1-butanol. Ambos os compostos contribuem na formação de aromas herbáceos e vegetais em vinhos. O 1-hexanol pode atuar como marcador químico para os vinhos Chardonnay desta região, pois foi detectado em ambas as safras analisadas (2011 e 2012).

As amostras produzidas na Região de Altitude, Santa Catarina, apresentaram influência dos compostos acetaldeído, acetato de isoamila, octanoato de etila e ácido hexanóico, além de compostos que conferem aromas florais e frutado aos vinhos, os monoterpenos, C<sub>13</sub>-norisoprenoides e ésteres. As amostras produzidas na Serra Catarinense e na Região da Campanha, no Rio Grande do Sul apresentaram forte correlação com aromas varietais, os monoterpenos e C<sub>13</sub>-norisoprenoides, responsáveis por diversos aromas florais e frutados.

Em conclusão, o perfil aromático das amostras produzidas em Minas Gerais e na Serra Gaúcha apresentaram marcadores olfativos herbáceos e vegetais, enquanto as amostras produzidas na região da Campanha/RS, Serra Catarinense e Região de Altitude/SC possuem marcadores florais e frutados, reforçando a diferenciação pela origem geográfica, confirmada pelo HCA.

