



FLAMYS LENA DO NASCIMENTO SILVA

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VINHOS E UVAS**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

FLAMYS LENA DO NASCIMENTO SILVA

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VINHOS E UVAS**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
FLAMYS LENA DO NASCIMENTO SILVA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCOS
NOGUEIRA EBERLIN.**

Assinatura do Orientador

**Campinas
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si38a Silva, Flamys Lena do Nascimento (1979-).
Aplicação da espectrometria de massas na avaliação
da composição química de vinhos e uvas / Flamys Lena
do Nascimento Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Espectrometria de massas. 2. ESI-MS. 3. Vinho.
4. Uva. 5. Fenólicos. I. Eberlin, Marcos Nogueira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Application of mass spectrometry in determination of chemical composition of wine and grape

Palavras-chave em inglês:

Mass spectrometry

ESI-MS

Wine

Grape

Phenolics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]

Ronei Jesus Poppi

Claudio Luiz Messias

Eduardo Costa de Figueiredo

Jesui Vergilio Visentainer

Data de defesa: 21/03/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedicatória

Ao meu pai do céu todo poderoso e criador Jeová e aos meus pais biológicos, Francisco Rocha da Silva e Francisca Pereira do Nascimento Silva pela vida plena de amor e perseverança, assim também como aos meus irmãos Fabíola do Nascimento Silva, Francisco Rocha da Silva Filho, Silvana Lopes Batista, Paulo Lopes Batista, aos meus sobrinhos Matheus Silva Leal (príncipe lindo), Marcos Emanuel Silva Leal, Felipe Lopes Batista, Gabriel Lopes Batista, Paula Vitória Lopes da Silva e aos meus queridos cunhados Ayala, Rosa, Osivan e Acimar.

SEM VOCÊS, NADA DISSO SERIA POSSÍVEL...

SALMO 23

O Senhor é o meu pastor; nada me faltará.

Ele me faz repousar em pastos verdejantes.

Leva-me para junto das águas de descanso:

Refrigera-me a alma.

Guia-me pelas veredas da justiça

Por amor do seu nome.

Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum.

Porque tu estás comigo:

a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas-me uma mesa

Na presença dos meus adversários.

Unge-me a cabeça com óleo:

O meu cálice transborda.

Bondade e misericórdia certamente me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na Casa do Senhor para todo o sempre.

Amém!

AGRADECIMENTOS

Ao amigo, pai e orientador prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin pela sua imensa benevolência e apoio primordial que fez com eu pudesse vencer, a você minha mais sincera e eterna gratidão.

À Dra. Rosy Simas que foi a chave que abriu meus caminhos e meu escudo nas situações difíceis. Uma irmã, amiga por quem serei eternamente grata á Deus, pois através de seu carinho e amor pude vivenciar da mais absoluta bondade humana.

À Dra. Chistina Ramires, meu anjo da guarda enviado pelo Senhor, pela acolhida, amizade e carinho, principalmente com minha mãezinha. O ser angelical mais lindo que pude conhecer na forma de mulher.

À minha amiga Cármen, sempre exuberante e pronta a apoiar-me com palavras, lições de vida e carinho. A sua amizade é minha maior conquista, por isso meu sincero obrigada.

Ao prof. Dr. Cláudio Messias pela co-orientação, principalmente pela disponibilidade de atenção, aconselhando e participação em todas as fases do trabalho.

Ao meu amigo José, pela paciência, conhecimento e parceria desde o início da realização deste trabalho.

À Dra. Alexandra Sawaya pelo seu apoio e acolhida tão especial. Uma colega que se fez amiga, parceira e grande treinadora na área de espectrometria de massas.

Às minhas queridas amigas e irmãs Lilia Basílio e Eva Lúcia pelo apoio inicial e amizade incondicional, meu eterno amor.

A minha querida amiga, irmã e parceira Adriana Godoy (Dri) pela imensa e pura amizade, por quem sentirei eterno amor.

À Raquel Fernades, maior incentivadora e amiga na minha jornada no ThoMSon.

A todos os colegas do laboratório de espectrometria de massas ThoMSon aos quais agradeço o carinho e ajuda: Mirela, Deninha, Rosana, Regina, Boniek, Priscila, Elaine, Heliara, Maíra, Eduardo, Vanessa, Núbia, especialmente à dona Cida.

A todos os irmãos, amigos e conterrâneos que fazem parte dessa longa jornada na UNICAMP: Euzébio, Lenilson, Magale, Clécio, Márcia, Reginaldo, Herbert, Adriano (sol), Samuel, Letícia, Irlene, Thiaguinho, Lucas, Michel, Gleidstone, Samyr, Olímpio, Diana, Lili, Bruno, Cícero, Laiane, Lívia, Sérgio e Edmundo. Que Deus nos abençoe!! Amém

À CAPES pelo incentivo financeiro, CPG e FAEPEX.

Curriculum Vitae

Flamys Lena do Nascimento Silva

Formação Acadêmica/Titulação

2008-2013 Doutorado em Química-IQ-UNICAMP

Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

Título: Aplicação da espectrometria de massas na avaliação da composição química de vinhos e uvas

2005-2008 Mestrado em Química-UFPI

Universidade Federal do Piauí

Título: Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Lina G. do N. P. da Silva.

199-2005 Graduação em Química-UFPI

Bacharelado em Química com Atribuições tecnológicas

Universidade Federal do Piauí

Artigos completos publicados em periódico

1. Silva, F.L.N.; Jara, J.L.P.; Queiroga, C.L.; Bechara, I.J.; Messias, C.L.; Eberlin, M.N. *Br J Anal Chem*, 2011, 06, 271–275.
2. Silva, F.L.N.; Santos J.R.Jr.; Moita Neto, J.M.; da Silva, R.L.G.N.P.; Flumignan, D.L.; Oliveira, J.E. *Quim. Nova*, vol.32, N^o,1, 56-60, 2009.

Trabalhos apresentados em congressos

1. Apresentação do trabalho “3 D Wine Analysis by Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry”, na forma de pôster durante a 59 th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, realizada de 5 a 9 de junho de 2011, em Denver/Colorado-Estados Unidos.

2. Apresentação do trabalho "Avaliação do perfil químico do extrato, suco, vinho e vinagre das uvas Carmem e Bordô por espectrometria de massas", na forma de pôster durante a 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizada de 23 a 26 de maio de 2011, em Florianópolis-SC
3. Apresentação de pôster no IV Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO 2010), realizado de 13 a 16 de setembro de 2010, sob o tema "Avaliação da composição Volátil de Vinho por HS-SPME-GC-MS".
4. Apresentação de pôster durante 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas realizado em Campinas, de 12 a 15 de Dezembro de 2009, sob o tema "Análise de Compostos Voláteis e polares em vinhos por HS-SPME-GC-MS e FT-ICR-MS.
5. Apresentação de pôster no XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XII), realizado de 28 a 30 de Outubro de 2008, sob o tema "Avaliação Estatística da Quantificação de BETEX por CG em Gasolina Comercializada nos Postos Piauienses".
6. Apresentação de pôster no XLIII Congresso Brasileiro de Química, de 22 a 26 de setembro de 2003 no Centro de Artes e Convenções da universidade Federal de Ouro Preto-Minas Gerais, sob o título "Recuperação de Resíduos Laboratoriais".

Atuação profissional

1. Técnica química II na companhia de Bebidas das Américas Ambev, no período de 18.11.2005 a 02.01.2007.
2. Analista de laboratório júnior na companhia Grupo Schincariol, no período de 09.08.2004 a 20.03.2005.
3. Professora de química da secretaria da educação do Piauí, no período de agosto/05 a outubro/05.
4. Professora substituta de química do nível médio de ensino da secretaria da educação do Piauí, no período de maio/99 a dezembro/04.
5. Analista química júnior na empresa Norsa Refrigerantes Ltda, no período de agosto/04 a julho/04.

RESUMO

Silva, F.L.N., 2013. APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VINHOS E UVAS. Campinas: Tese de Doutorado – Instituto de Química-Unicamp, 164p.

As variedades de uvas do gênero *Vitis vinífera*, incluindo a uva Syrah, são amplamente utilizadas na vinificação. O híbrido (Máximo-IAC 138-22), obtida do cruzamento entre Syrah e Seibel 11342 tem mostrado grande capacidade de adaptação ao clima de São Paulo e, aparentemente, produz um vinho de boa qualidade. A primeira parte deste estudo consistiu em comparar a composição volátil no headspace do vinho tinto paulista com outros vinhos originados da casta fina Syrah de diferentes regiões do mundo. Para isso foi empregada a técnica de microextração em fase sólida (SPME) com a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Na segunda parte foi estudado o perfil fenólico de vinhos empregando a técnica de ionização por eletrospray (ESI) acoplada com a espectrometria de massas de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) que permitiu a detecção de milhares de compostos polares no vinho sem separação cromatográfica e simples preparo de amostra. Constatou-se que o vinho paulista possui um perfil fenólico similar aos outros vinhos comerciais da uva Syrah. No terceiro e quarto estudos empregou-se a técnica ESI-MS por inserção direta para quantificar os ácidos orgânicos em vinho e em uva. Apesar de o vinho constituir uma matriz complexa, a técnica ESI-MS por inserção direta permitiu quantificar os compostos polares majoritários tais como ácido málico, ácido tartárico e ácido cítrico. Nas uvas *Vitis vinífera*, *Vitis labrusca* e híbridos a análise de componentes principais (PCA) mostrou clara distinção entre vinhos de uvas diferentes e o agrupamento do vinho paulista com os vinhos da uva Syrah. O método ESI-MS por inserção direta está sendo proposto pela primeira vez para quantificação de ácidos em vinhos e uvas. O método aqui desenvolvido foi validado segundo as normas do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Silva, F.L.N., 2013. APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY IN DETERMINATION OF CHEMICAL COMPOSITION OF WINE AND GRAPE. Campinas: PhD thesis – Chemistry Institute-UNICAMP, 164p.

ABSTRACT

Varieties of grapes from the *Vitis vinifera* group included the Syrah grape are the most widely used for winemaking. A hybrid grape (Maximum-IAC 138-22) obtained by crossing Syrah and Seibel 11342 grapes has shown great adaptability in São Paulo State, producing apparently a high quality wine. This part first has compared the headspace aroma volatile composition of wine made from the Maximum IAC 138-22 grape with wines made from Syrah varieties originated from different regions of the world. Using static solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis, main volatile compounds were identified. Hierarchical clustering analysis (HCA) showed that the wine from the hybrid grape Maximum 138-22 has volatile aroma composition very similar to most high quality Syrah grape wines studied. In the second part the phenolic profile wine using the technique of electrospray ionization (ESI) coupled with mass spectrometry ion cyclotron resonance Fourier transform (FT-ICR MS) that allows detection of thousands of polar compounds in wine without chromatographic separation and simple sample preparation. Was found that the wine paulista has a profile similar phenolic other commercial wines from Syrah grapes. The ESI-MS technique for direct insertion allows us to obtain qualitative and quantitative results without chromatographic separation of wine. In the third and fourth studies employed the technique ESI-MS by direct insertion for quantifying organic acids in wine and grapes. As the wine is a complex matrix, pre concentration and filtration ESI-MS for direct insertion quantify the major polar compounds such as malic acid, tartaric acid and citric acid. In *Vitis vinifera* grape, *Vitis labrusca* and hybrid the principal component analysis (PCA) showed a clear distinction between wines from different grapes and wine group in São Paulo with wines from Syrah grapes. The ESI-MS method for direct insertion is first proposed for quantification of acids in wines and grapes. The method ESI-MS by direct insertion is first proposed for quantification acid in wines and grapes. The method developed here was validated according to the standards of the National Health Surveillance Agency and National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO).

Lista de abreviaturas

CAR – carboxen

CID – dissociação induzida por colisão

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CV – coeficiente de variação

DVB - divinilbenzeno

GC - cromatografia em fase gasosa

GC-MS - cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

HCA – análise de agrupamento hierárquico

HS-SPME - microextração em fase sólida no *headspace*

HPLC-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HPLC-ESI-MS - cromatografia líquida de alta eficiência com ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas

HPLC-ESI-MS/MS - cromatografia líquida de alta eficiência com ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas sequencial

EI – ionização por elétrons

ESI - ionização por eletrospray

ESI-MS – ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas

ESI-MS/MS - ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas sequencial

ESI (-)-MS – ESI-MS em modo negativo

ESI (-)-MS/MS – ESI-MS/MS em modo negativo

FT-ICR MS - espectrometria de massas com ressonância ciclôtrica de íons e transformada de Fourier

MALDI - ionização por dessorção a laser assistida por matriz

m/z - razão massa sobre carga

MS/MS – espectrometria de massas seqüencial

LD - limite de detecção

LQ - limite de quantificação

PCA - análise de componentes principais

PDMS – polidimetilsiloxano

Q- analisador de massas quadrupolar

RF- radio frequência

SPE - extração em fase sólida

SPME- microextração fase sólida

TQD - analisador triplo quadrupolo

UAE – extração assistida por ultrassom

Lista de tabelas

Tabela 2.1. Relação dos alcoóis simples originados de plantas e leveduras.....	69
Tabela 2.2. Mudanças de concentração de ésteres de ácidos graxos (μmolL^{-1}) no vinho dependendo do tempo de envelhecimento a 25 °C em dois valores de pH (3,0 e 3,5).....	75
Tabela 3.1 Relação dos compostos com seus índices de retenção e áreas percentuais médias encontrados nas amostras de vinho por <i>HS-SPME-GC-MS</i>	87
Tabela 4.1. Compostos identificados em vinhos por ESI (-) FT-ICR MS.....	99
Tabela 4.2 Antocianinas encontradas no vinho por ESI (+) FT ICR MS.....	102
Tabela 5.1. Resultados obtidos no teste de seletividade para os ácidos: málico, tartárico e cítrico.....	112
Tabela 5.2. Parâmetros analíticos obtidos para análise quantitativa dos ácidos em vinho.....	113
Tabela 5.3. Resultados de repetibilidade do instrumento e do método.....	114
Tabela 5.4. Concentrações dos ácidos orgânicos (tartárico, málico, e cítrico) em amostras de vinhos tintos nacionais e importados por ESI-MS com inserção direta...	115
Tabela 5.5 Parâmetros de validação de outros métodos para quantificação de ácidos orgânicos em vinho.....	117
Tabela 6.1. Massas da casca, polpa e semente das uvas frescas e liofilizadas.....	130
Tabela 6.2 Parâmetros analíticos obtidos para linearidade, limites de detecção e quantificação e exatidão para os analitos estudados.....	133
Tabela 6.3. Concentrações dos ácidos orgânicos (málico e tartárico) em amostras de uvas <i>Vitis labrusca</i> , <i>Vitis vinífera</i> e híbridos cultivados nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo.....	134

Lista de figuras

Figura 1.1. Ilustração das principais variedades de uvas desenvolvidas pelo grupo de pesquisa IAC.....	9
Figura 1.2 Principais países de cultivo de uva e produção de vinho no mundo.....	10
Figura 1.3 Esquema da árvore genealógica da vinha e as principais variedades cultivadas no mundo.....	11
Figura 1.4 Principais etapas de produção do vinho tinto.....	13
Figura 2.1. Fibra de SPME: (A) fibra retraída na agulha do suporte; (B) fibra exposta.....	18
Figura 2.2. Esquema das etapas de extração por SPE.....	20
Figura 2.3. Esquema geral do funcionamento da fonte de ionização por elétron (EI)....	21
Figura 2.4. Desenho simplificado de uma fonte de ionização por eletrospray.....	22
Figura 2.5. Analisador de massas quadrupolar.....	23
Figura 2.6. Esquema geral do funcionamento de uma cela de ICR.....	25
Figura 2.7. Diagrama de um instrumento triplo quadrupolo.....	26
Figura 2.8. Estrutura química dos principais ácidos orgânicos encontrados na uva e no vinho.....	28
Figura 2.9. Estruturas dos principais ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação do mosto encontrado no vinho.....	31
Figura 2.10. Estruturas químicas dos ácidos fenólicos e seus derivados do vinho.....	33
Figura 2.11. Estrutura química dos flavonóides: 1) flavona ($R_3=H$), e flavonol ($R_3=OH$); 2) flavanona ($R=H$), flavanonol ($R_3=OH$) e suas formas glicosiladas.	40
Figura 2.12. Estruturas químicas das antocianinas encontradas nos vinhos por ESI (+).....	44
Figura 2.13. Estruturas dos hidroxicinamatos encontrados em uvas e vinhos	51

Figura 2.14. Estrutura de tanino condensado hipotético formado por quatro subunidades de flavonas: catequina, epicatequina, epigalocatequina e galato de epicatequina.....	52
Figura 2.15. Rota de bioquímica das principais classes fenólicas mais solúveis encontradas na uva e vinho.....	53
Figura 2.16. Rota bioquímica dos principais flavonóides encontrados na baga da uva. Os compostos que se acumulam na fruta são delineados por retângulos e os intermediários estão presentes em baixos níveis.....	54
Figura 2.17 Rota da biossíntese de Flavan-3,4-diol a partir de cafeil-CoA e Malonil-CoA. CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, Flavanona-3-hidroxilase; DFR, dihidroflavonol-4-redutase.....	56
Figura 2.18 Formação de catequina, epicatequina, antocianidina (cianidina), cianidina-3-glucosídeo. LAR, leucoantocianidina redutase; ANS, antocianidina sintase; ANR, antocianidina redutase; UFGT, UDP glucose-flavonoide 3-O-glucosil transferase.....	56
Figura 2.19 Estrutura dos principais monoterpênicos e derivados identificados em uvas e vinhos.....	65
Figura 2.20 Quebra na ligação do composto carotenóide levando a formação de C ₉ , C ₁₀ , C ₁₁ e norisoprenóides C ₁₃ da uva.....	66
Figura 2.21 Estruturas dos principais compostos da família de derivados do norisoprenóide C ₁₃ em uvas.....	67
Figura 2.22 Biossíntese dos álcoois superiores de acordo com Ehrlich.....	71
Figura 2.23 Equilíbrio de esterificação de um álcool.....	74
Figura 2.24 Mecanismo da biossíntese de um ácido graxo.....	74
Figura 3.1 Análise de componentes principais PC1 x PC2 x PC3 de vinhos.....	84
Figura 3.2 Cromatogramas de vinhos tintos empregando <i>HS-SPME-GC-MS</i> : A) vinho paulista; B) Valle de Maipo/Chile e C) Côtes de Rhône/França.....	85
Figura 3.3 Dendrograma HCA dos cromatogramas dos vinhos tintos analisados por <i>HS-SPME-GC-MS</i>	86

Figura 3.4 Análise de componentes principais dos <i>escores</i> e <i>loadings</i> : PC1 x PC3 (A); PC1 x PC2 (B) dos compostos voláteis encontrados nos vinhos. As letras A-I correspondentes aos vinhos e os números 1-32 correspondentes aos compostos voláteis (variáveis) listados na tabela 3.1.....	88
Figura 4.1 Perfis químicos no modo ESI (-) MS dos vinhos.....	95
Figura 4.2 a) Espectro de ESI (-) ICR-FT MS para amostra do vinho paulista com mais de 600 sinais resolvidos (b) expansão para diferentes intervalos de massas mostrando 11 íons resolvidos e característicos de compostos polares ácidos com suas fórmulas moleculares (ácido succínico <i>m/z</i> 117,01929; ácido málico <i>m/z</i> 133,01421; ácido citramálico <i>m/z</i> 147,02987; ácido cítrico <i>m/z</i> 191,01970; ácido D-glucônico <i>m/z</i> 195,05104; ácido siríngico <i>m/z</i> 197,04554 e ácido cumariltartárico <i>m/z</i> 295,04630).....	96
Figura 4.3 Espectros de massas (ESI) com alguns flavonóides identificados no vinho chileno (V5): taxifolinaraminosilada <i>m/z</i> 449.13076, taxifolinaglicosilada <i>m/z</i> 465.01970; 3-O-raminosilmiricetina <i>m/z</i> 463.09347 e miricetina <i>m/z</i> 317.03840.....	98
Figura 4.4 Perfis químicos no modo ESI (+) MS de vinhos tintos.....	101
Figura 5.1 Gráfico de área x concentração para o teste de linearidade- (A) ácido málico, (B) tartárico e (C) cítrico.....	110
Figura 5.2 PCA dos <i>escores</i> : PC1 x PC2 das amostras de vinhos da Tabela 5.4: (2) vinho Bordô, PR-Brasil; (3) e (4) vinho Bordô e Merlot; (9) vinho Merlot, PR-Brasil; (16) vinho Isabel, SP; (17) vinho Syrah da Argentina; (26) vinho Syrah, USA; (27) vinho Merlot, RS-Brasil.....	120
Figura 5.3 Gráfico dos <i>loadings</i> da PCA: PC1 (ácido tartárico); PC2 (ácido málico) e PC3 (ácido cítrico).....	121
Figura 5.4 Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (A) vinho Bordô, Serra Gaúcha; (B) vinho Bordô + Merlot, Serra Gaúcha; (C) vinho Merlot, Serra Gaúcha; ác. málico (<i>m/z</i> 133); ác. tartárico (<i>m/z</i> 149) e ác. cítrico (<i>m/z</i> 191).....	122
Figura 5.5 Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (D) vinho Syrah, Argentina; (E) vinho Máximo, São Paulo; (F) vinho Syrah, França; ác. málico (<i>m/z</i> 133); ác. tartárico (<i>m/z</i> 149) e ác. cítrico (<i>m/z</i> 191).....	123

Figura 6.1 Dendrograma das amostras de casca, polpa e semente de uvas.....	135
Figura 6.2 Gráfico da PCA dos <i>fingerprints</i> das amostras de casca, polpa e semente de uvas com amostras de vinhos.....	136
Figura 6.3 Gráfico da PCA dos <i>fingerprints</i> das amostras de vinhos e casca de uvas por ESI-MS: uva Niágara (3), uva Syrah (5), uva Máximo (6), vinhos tintos (7-32).....	136
Figura 6.4 Gráfico dos <i>loadings</i> PC1 x PC2.....	137
Figura 6.5 <i>Fingerprints</i> obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de casca de uva: CS) casca Syrah, CN) casca Niagara, CM) casca Máximo, CC) casca Carmem e CB) casca Bordô.....	139
Figura 6.6 <i>Fingerprints</i> obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de sementes de uvas (SB, semente Bordô; SS, semente Syrah; SN, semente Niagara; SM, semente Máximo; SC, semente Carmem).....	140
Figura 6.7 <i>Fingerprints</i> obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de polpas de uvas (PS, polpa Syrah; PN, polpa Niagara; PM, polpa Máximo; PC, polpa Carmem; PB, polpa Bordô).....	141

Sumário

Introdução geral.....	1
Objetivo geral.....	3
Objetivos específicos.....	3
Capítulo 1. Aspectos importantes do vinho.....	5
1.1 O vinho no Brasil e no mundo.....	7
1.2 Etapas de produção do vinho.....	11
1.3 Composição do vinho.....	13
Capítulo 2. Análise do perfil químico do vinho e da uva.....	15
2.1 Introdução.....	17
2.1.2 Extração dos compostos voláteis por HS-SPME.....	17
2.1.3 Extração dos ácidos orgânicos por SPE.....	19
2.1.4 Ionização por elétron (EI).....	20
2.1.5 Ionização por eletrospray (ESI).....	21
2.1.6 Analisador de massas quadrupolar (Q).....	23
2.1.7 Espectrometria de massas com ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS).....	24
2.1.8 Analisador de massas triploquadrupolo (TQD).....	25
2.2 Ácidos orgânicos simples.....	27
2.3 Ácidos da fermentação.....	30
2.4 Ácidos fenólicos e seus derivados.....	31
2.5 Flavonóides.....	39
2.6 Antocianinas.....	43
2.7 Hidroxinamatos.....	50
2.8 Taninos.....	51
2.9 A fenilalanina e a biossíntese dos compostos fenólicos.....	52
2.10 As antocianidinas e a biossíntese de taninos.....	55
2.11 Aroma varietal.....	62
2.12 Terpenos odoríferos.....	64
2.13 Norisoprenóides - C ₁₃	66

2.14	Álcoois e outros compostos voláteis.....	68
2.14.1	Álcoois superiores da fermentação	68
2.14.2	Ésteres	72
2.14.3	Acetato de etila	73
2.14.4	Acetato de etila de ácidos graxos e ésteres acéticos de álcoois superiores	73
2.14.5	Aldeídos e cetonas.....	75
Capítulo 3. Avaliação da composição volátil do vinho paulista obtido do cultivar Máximo IAC 138-22 comparado a outros vinhos da varietal Syrah de diferentes origens por HS-SPME-GC-MS		
3.1	Objetivos.....	81
3.2	Parte Experimental.....	81
3.3	Resultados e Discussão.....	83
3.4	Conclusão.....	89
Capítulo 4. Análise dos compostos polares do vinho por FT- ICR MS		
4.1	Objetivos.....	93
4.2	Parte experimental.....	93
4.3	Resultados e discussão	94
4.3.1	Ácidos orgânicos encontrados nos vinhos tintos.....	96
4.3.2	Flavonóis encontrados no vinho	98
4.3.3	Antocianinas.....	100
4.4	Conclusão.....	103
Capítulo 5. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinho por ESI-MS105		
5.1	Objetivos.....	107
5.2	Parte experimental.....	1077
5.2.1	Reagentes e soluções analíticas	107
5.2.2	Amostras	107
5.2.3	Procedimentos gerais experimentais	108
5.2.4	Análise estatística dos dados	108
5.2.5	Validação do método	108
5.2.5.1	Seletividade	109
5.2.5.2	Exatidão	109
5.2.5.3	Linearidade.....	109
5.2.5.4	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	110
5.2.5.5	Precisão	111

5.2.5.6 Repetitividade (precisão intra-corrída)	111
5.2.5.7 Precisão intermediária (precisão inter-corrída)	111
5.2.5.8 Exatidão	111
5.3 Resultados e Discussão.....	112
5.3.1 Comparação de métodos	116
5.3.2 Fingerprints dos vinhos por ESI-MS	118
5.4 Conclusão.....	124
Capítulo 6. Quantificação de ácidos orgânicos em casca, polpa e semente de uvas por ESI-MS125	
6.1 Objetivos.....	127
6.2 Parte experimental.....	127
6.2.1 Reagentes e soluções analíticas	127
6.2.2 Amostras de uvas.....	128
6.2.3 Preparo, extração e recuperação das amostras de uvas	128
6.2.4 Procedimentos experimentais.....	129
6.3 Ensaios de recuperação do ácido tartárico e málico em uvas	131
6.3.1 Preparo de soluções padrão de ácido tartárico e málico.....	131
6.3.2 Ensaios de recuperação do ácido tartárico em uvas.....	131
6.3.3. Ensaios de recuperação do ácido málico em uvas	132
6.4 Resultados e discussão	132
6.5 Conclusão.....	142
6.6 Conclusão geral.....	143
7.0 Referências bibliográficas	145

Introdução geral

O vinho fino é produzido pela fermentação alcoólica de suco de uvas (*Vitis vinífera*) e seu consumo está geralmente associado aos benefícios à saúde e ao bem estar humano, bem como a aspectos culturais. Os melhores e mais famosos vinhos do mundo são produzidos a partir de cultivares *Vitis vinífera*, de origem europeia. A uva dessa vitácea é cultivada há milhares de anos por diversos povos europeus, dando origem a dezenas de castas vinícolas, como por exemplo, a variedade Syrah (Santos Neto, 1955). A importância dos cultivares americanos e seus híbridos são inegáveis para a viticultura americana. No entanto, apesar das variedades americanas serem dotadas de características que melhor se adaptam ao nosso ambiente, frequentemente não exibem o excelente sabor e aroma intrínsecos às diversas variedades europeias e seus híbridos (TERRA et al., 1999).

No Brasil a viticultura surgiu com a chegada dos portugueses, mas se consagrou como atividade comercial somente no início do século XX. Nesta época o cultivo de uvas americanas era predominante, embora limitado apenas às regiões sul e sudeste. Com o passar do tempo, o panorama mudou e no final do século XX as fronteiras vinícolas se expandiram e propiciaram o progresso no cultivo. No Brasil, mais de 75% da produção de vinho é obtida a partir de cultivares de uvas americanas ou seus híbridos. No estado de São Paulo, a produção de vinho (3% da produção nacional) baseia-se principalmente em cultivares de uva Isabel, Bordô, Niagara Branca e Niagara Rosada. A implementação de uvas europeias e híbridos no início de 1960 permitiu difusão de novas castas. O híbrido Máximo (IAC 138-22) também está sendo cada vez mais utilizada para produção de vinhos de mesa em São Paulo. Esse híbrido, originalmente obtido em 1946 com o trabalho de Santos Neto (1955) em um grande programa de castas adaptadas ao estado de São Paulo para produção de vinhos de mesa é resultado do cruzamento entre as variedades Syrah e Seibel 11342 (TERRA et al., 1990; CAMARGO, TONIETO E HOFFMANN, 2011). A uva Máximo (IAC 138-22) pertence às vitáceas de ciclo curto, são bastante resistentes a pragas e rachaduras. O vinho paulista, produto deste híbrido, é considerado neutro, equilibrado com aroma agradável e sabor similar aos de outros vinhos nacionais (OJIMA et al., 1978).

O foco deste estudo recai sobre vinhos, uvas e a composição química. As mais diversas metodologias já foram aplicadas ao estudo da composição química do vinho e da uva, dentre as quais se destaca mais recentemente a espectrometria de massas. Para a análise dos componentes voláteis do vinho, a técnica de Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com Microextração em Fase Sólida (HS-SPME-GC-MS) foi usada. Porém, o vinho contém muitos compostos de baixa volatilidade e de alta polaridade com importantes propriedades antioxidantes, mas que não são adequadamente analisados por GC-MS, mesmo com derivação. Por esse motivo é importante empregar técnicas mais modernas de ionização, como a ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas (ESI-MS). A ESI-MS pode ser usada com inserção direta de amostra, obtendo um perfil químico da amostra, chamado de *fingerprint*, sem separação cromatográfica fazendo-se uso de um preparo simples de amostra antes de inseri-la diretamente no espectrômetro. Os compostos detectados podem ser identificados a partir de seu padrão de fragmentação (MS/MS) obtidos por dissociação induzida por colisão. A análise por ESI-MS foi efetuada em dois espectrômetros de massas: o primeiro com um analisador de ressonância ciclotrônica de íons e transformada de Fourier (FT-ICR) e o segundo com um analisador de massas triplo quadrupolo (TQD). O espectrômetro de altíssima resolução FT ICR-MS é uma ferramenta muito eficiente, porém onerosa por isso utilizamos as análises em um segundo espectrômetro de alta resolução (TQD MS) que nos proporcionasse menor custo de análise.

Assim, neste trabalho a composição química do vinho paulista obtido da uva híbrida, Máximo IAC 138-22, foi avaliada e comparada com outros vinhos de diferentes origens empregando a técnica HS-SPME-GC-MS. Além disso, foram determinados os compostos fenólicos e os ácidos orgânicos simples (málico, tartárico e cítrico) devido suas propriedades antioxidantes no vinho e na uva através dos métodos FT ICR-MS e ESI-MS, respectivamente.

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil químico de vinhos e uvas através da aplicação das técnicas de espectrometria de massas.

Objetivos específicos

A - Investigar se o vinho paulista produzido a partir do híbrido Máximo IAC 138-22 possui composição química similar aos vinhos tintos de diferentes regiões obtidos da uva Syrah, que é um dos parentais deste híbrido. Para isso, realizou-se uma pesquisa comparativa entre a composição química de compostos voláteis do vinho paulista e outros vinhos utilizando as técnicas HS-SPME-GC-MS (Capítulo 3).

B - Avaliar a composição química de compostos polares em vinhos nacionais e importados, determinando a presença de compostos fenólicos empregando a alta resolução e exatidão da técnica ESI FT-ICR MS (Capítulo 4).

C - Desenvolver e validar o método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por ESI-MS com inserção direta (Capítulo 5).

D - Aplicar o método ESI-MS com inserção direta na quantificação de ácidos orgânicos em uvas (Capítulo 6).

CAPÍTULO 1

Aspectos importantes do vinho

Capítulo 1. Aspectos importantes do vinho

1.1 O vinho no Brasil e no mundo

A viticultura brasileira teve início no século XVI com a chegada dos colonizadores portugueses. Martin Afonso de Souza foi o responsável pelo plantio das primeiras videiras, originárias da Espanha e Portugal, na capitania de São Vicente. As vinhas cultivadas na época eram castas finas europeias (*Vitis vinífera*) propícias para a produção de vinho (SANTOS NETO, 1955). Com isso, o cultivo se espalhou por outras regiões, porém com a lei de proibição do cultivo de uvas no Brasil em 1789, a produção e comercialização de vinho no Brasil tornou-se uma atividade doméstica e somente no início do século XX com a chegada dos imigrantes italianos, veio a se tornar uma atividade comercial. As finas castas européias, contudo, tiveram problemas no início da viticultura comercial brasileira devido à incidência de doenças fúngicas. Através do advento de fungicidas específicos foi que o cultivo das videiras europeias progrediu nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo.

Durante 300 anos, a vitivinicultura brasileira esteve fundamentada em variedades originárias da Europa, nunca chegando a constituir cultura de relevante importância. Somente entre 1830 e 1840 as variedades americanas aqui chegaram, entre estas a Isabel, que logo prosperaram em razão da maior resistência às doenças fúngicas, além de acentuadas características de adaptação às nossas condições ambientais. Se por um lado estas trouxeram benefícios, por outro foram responsáveis pela introdução de inúmeras pragas, como a filoxera, e outras moléstias causadas por fungos como o oídio e o míldio. Ainda hoje as variedades americanas correspondem por 76% da área do vinhedo nacional. A liderança é da *Vitis labrusca*, com 67%. Os 9% restantes cabem à *V. aestivalise* e *V. bourquina*. No grupo de *V. labrusca*, temos as variedades Isabel, Bordô, Ives, Niagara Branca, Niagara Rosada e Concord. Todas podem originar bons vinhos e servem para a mesa e a produção de sucos (CAMARGO et al., 2011). No entanto, é sabido que os melhores vinhos são obtidos de *Vitis vinífera*. Assim, a busca por híbridos produtivos, aptos para vinificação e resistentes às doenças e pragas, foi o objetivo de muitos pesquisadores europeus. Nos últimos anos, vem aumentando a área cultivada com o híbrido Máximo IAC

138-22, originado do programa de melhoramento genético da videira no instituto agrônomo de Campinas (IAC) (OJIMA et al., 1978).

No Brasil, na década de 1940, teve início no IAC um programa de melhoramento varietal da videira, que contou com a participação de destacados pesquisadores, como José Ribeiro de Almeida Santos Neto, da Seção de Viticultura, Júlio Seabra Inglês de Sousa da Estação Experimental de Jundiaí e Wilson Corrêa Ribas, da Estação Experimental de São Roque. No que se refere às uvas destinadas à vinificação, o foco do trabalho de melhoramento era reunir em uma mesma variedade as qualidades das finas castas de *Vitis vinifera*, com a maior resistência às doenças fúngicas e maior adaptação as nossas condições ambientais apresentadas pelas variedades americanas e híbridas. Entre as obtidas, uma se constitui a uva tinta mais promissora: conhecida pelo nome de **Máximo** ou, tecnicamente, **IAC 138-22** que foi obtida por Santos Neto em 1946 como resultado do cruzamento das variedades **Seibel 11342 e Syrah**. É reputada como a melhor entre todas as variedades lançadas pelo Instituto Agrônomo para a elaboração de vinhos tintos. Suas plantas são vigorosas, muito produtivas, com boa resistência às doenças, comportando-se bem quando conduzidas sob o regime de poda curta. Os cachos são médios a grandes, cilíndricos e pouco compactos, com bagas pequenas, oval-arredondadas, de coloração preto-azulada, sucosas, com sabor neutro e de maturação precoce. Atualmente, o plantio desta variedade vem sendo feito em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Entre os municípios que se destacam, tem-se: São Miguel Arcanjo, Indaiatuba, Jundiaí, Jarinu, Louveira, Vinhedo, Valinhos e Monte Alegre do Sul. Vários produtores de vinho da região têm utilizado esta variedade para a obtenção de um vinho de excelente qualidade, obtido com as tecnologias atuais de vinificação (MESSIAS, 2007). A **Figura 1.1** mostra algumas variedades de uvas, inclusive a Máximo IAC 138-22, desenvolvidas pelo grupo de pesquisa de Campinas.

O vinho é considerado historicamente como a mais higiênica e saudável das bebidas. Ele é produzido em todo mundo, do Chile à África do sul, à Nova Zelândia e à China. O coração do mundo do vinho é a Europa - o Velho Mundo-, principalmente França, Itália, Espanha e Portugal. Hoje, entretanto, há vinhos de qualidade em todo o planeta, e o Novo Mundo (Austrália, Nova Zelândia, EUA, África do Sul e América do sul) têm papel relevante. A Europa mediterrânea, com 240 horas de luz solar por mês, uma média de 17 graus de

temperatura nos períodos de plantios, índices pluviométricos anuais de cerca de 600 mm e frio seco no inverno, que proporciona às vinhas um período de hibernação. As regiões tradicionais de Bordeaux, Borgonha, Vale do Rhône, Rioja e a Toscana se beneficiam dessas condições ideais e, conseqüentemente, seus vinhos

O legado dos pesquisadores do IAC conta com uma série de variedades que estão sendo avaliadas, para características quanto ao manejo e qualidades físico-químicas e na vinificação, frente às novas tecnologias desenvolvidas. Entre essas variedades, podemos citar:

- **Madalena (IAC21-14)** ●
 Produto do cruzamento de Seibel 11342 com Moscatel de Canelli, textura fundente e sabor moscatel. Presta-se para a elaboração de vinho espumante, com ténue e agradável sabor moscatel.
- **Rainha (IAC 116-31)** ●
 Produto do cruzamento entre Seibel 7053 e Burgunder Kastenholz, realizado em 1946. Possui bagas de sabor neutro e agradável e baixa acidez, qualidades que são transmitidas aos vinhos. No Estado de Santa Catarina, sobre o porta-enxerto SO4, tem-se sobressaído entre as variedades híbridas destinadas à elaboração de vinhos brancos, dando produto considerado de ótima qualidade.
- **Máximo (IAC 138-22)** ●
 Resultante do cruzamento entre as variedades Seibel 11342 e Syrah, realizado em 1946, é reputado como a melhor entre todas as variedades lançadas pelo Instituto Agronômico, para a elaboração de vinhos tintos.
- **Sanches (IAC 960-9)**
 Híbrido complexo, resultado do cruzamento entre IAC 577-8 e Máximo, realizado em 1960. Bagas com textura fundente e sabor neutro. Indicada para a elaboração de vinhos tintos.
- **IAC 960-12**
 Tem a mesma origem da Sanches, ou seja, é um híbrido complexo obtido do cruzamento entre IAC 577-8 e Máximo, realizado em 1960. Origem vinhos brancos de boa qualidade, que também proporciona bons cortes com os tintos elaborados com a variedade Máximo.
- **Moscatel de Jundiá (Jd 930)** ●
 Resultado do cruzamento de Seyve Villard 5276 com Pirovano 4. Além de se prestar como matéria-prima para a elaboração de vinhos moscatéis brancos licorosos, pode ser consumida como boa uva de mesa.
- **Dr. Júlio (SR 496-15)**
 Produto do cruzamento entre Seibel 7053 e Gewürztraminer, realizado em 1949. É produtora de vinhos brancos de qualidade, com características de aroma e sabor próprios.
- **Dr. Seabra (SR 496-16)**
 Tem a mesma origem da Dr. Júlio, ou seja, é produto do cruzamento entre Seibel 7053 e Gewürztraminer, realizado em 1949. Produz vinho branco de qualidade, bem equilibrado, de aroma e sabor neutros, características que o tornam excelente base para vinhos compostos ou correção de cortes.



Figura 1.1 Ilustração das principais variedades de uvas desenvolvidas pelo grupo de pesquisa IAC (MESSIAS, 2007).

tornaram-se padrões globais. Nessas regiões da Europa, o conjunto de condições geográficas e climáticas de um local (*terroir*) é de suma importância. No *terroir* certo, a

composição do vinho terá o equilíbrio perfeito de açúcar, ácidos, sabores frutados e taninos. Foi à busca por novos *terroirs* que levou viticultores a se aventurarem em áreas inexploráveis de outros países do Novo Mundo (KEEVIL, *et al.*, 2008). A **Figura 1.2** ilustra os principais países de cultivo de uva e produção de vinho no mundo.

O *terroir* e as técnicas vinícolas exercem um papel importante, mas é a cepa específica ou a combinação de uvas que mais influencia o sabor de um vinho.



Figura 1.2 Principais países de cultivo de uva e produção de vinho no mundo.

A vinha pertence à família de plantas Vitaceae, cujo gênero *Vitis* é o único importante para a produção de vinho. Existem diversas espécies de *Vitis*, contudo a mais importante é a *Vitis vinífera*, da qual é produzida a maioria dos vinhos. As uvas populares, tais como a Chardonnay ou a Cabernet Sauvignon, são *Vitis vinífera*. Em algumas regiões do mundo são produzidos vinhos a partir de outras espécies, como a *Vitis labrusca* no estado de Nova York,

mas a principal função dessas outras espécies é servirem como porta-enxertos. Após a devastação dos vinhedos europeus pela filoxera (que ataca as raízes das vinhas), no séc. XIX praticamente toda *Vitis vinífera* é hoje enxertada nas raízes por espécies resistentes como *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia* e *Vitis rupestris*. Isso permite que a *Vitis vinífera* produza seus sabores característicos e fique protegida dessa praga (KEEVIL *et al.*, 2008). A **Figura 1.3** mostra um esquema da árvore genealógica da vinha e as principais variedades cultivadas no mundo.

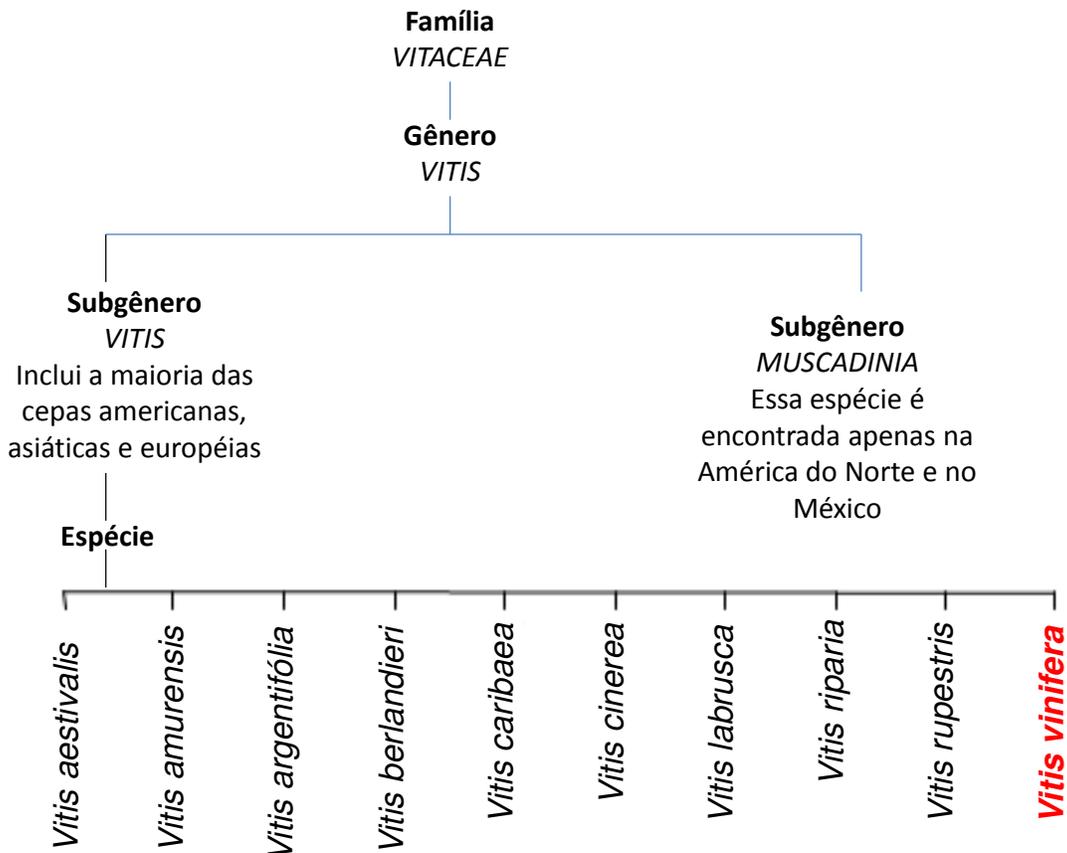


Figura 1.3 Esquema da árvore genealógica da vinha e as principais variedades cultivadas no mundo.

1.2 Etapas de produção do vinho

O vinho é produzido pela fermentação alcoólica do suco de uvas e as etapas iniciais do processo de vinificação, como ilustrado na **Figura 1.4** transformam as uvas colhidas no

sumo. Tecnicamente já é vinho, mas ainda precisa passar por várias etapas até ser distribuído.

1- Esmagamento e desengação das uvas: depois de colhidos, os cachos são transportados até um esmagador/desengaçador, onde as uvas são esmagadas por rolos para expor o sumo rico em açúcar às leveduras e aos engaços. Esses são removidos, e o sumo (mosto) é peneirado através de um cilindro rotativo perfurado (MEYEN et al., 2013).

2- As leveduras transformam o açúcar das uvas em álcool e dióxido de carbono: gera-se muito calor na fermentação, então a temperatura é controlada para impedir a evaporação dos compostos voláteis do aroma e sabor. A fermentação do vinho tinto geralmente se completa entre 4 a 7 dias, então as uvas permanecem nas cubas para maceração (MEYEN et al., 2013).

3- Prensagem: depois que o álcool for extraído através do processo de destilação, os corantes, taninos e o suco são transferidos para outro recipiente. Os resíduos que permanecem no tanque são então prensados, produzindo um líquido espesso e escuro conhecido como vinho de prensa. Ele pode ser adicionado ao suco durante a mistura para aumentar o tanino e a coloração (MEYEN et al., 2013).

4- Amadurecimento: em geral se aplica ao envelhecimento em barris de carvalho. Normalmente reservado para vinhos tintos de alta qualidade, e pode levar vários anos. A porosidade dos barris de carvalho permite uma oxidação lenta que ajuda a suavizar os taninos e a aumentar a complexidade dos sabores. Nesta etapa ocorre também fermentação maloláctica que é um processo posterior à primeira fermentação alcoólica. Criam-se as condições ideais para certas bactérias transformarem o ácido málico em ácido láctico, suavizando o sabor do vinho que ocorre em barris de carvalho ou em cubas de fermentação (MEYEN et al., 2013).

5- Colagem e filtração: as técnicas de colagem e filtração são conhecidas por clarificação e ajudam a produzir um vinho de aparência clara e estável na garrafa. A colagem remove partículas de proteínas empregando um “agente”, como por exemplo, clara de ovo ou argila bentonita, que se associa às partículas em suspensão e as faz precipitar no fundo do recipiente. A filtragem retira os depósitos sólidos do líquido (MEYEN et al., 2013).

6- Corte e engarrafamento: antes do engarrafamento, a maioria dos vinhos é misturada, e depois descansa em um tanque (nessa etapa também pode ocorrer uma filtragem). O equipamento automático é caro, sendo que muitos pequenos produtores contratam engarrafadores para preservar o caráter inerente ao vinho pelo engarrafamento lento e cuidadoso, protegido do oxigênio pelo nitrogênio ou dióxido de carbono (MEYEN et al., 2013).



Figura 1.4 Principais etapas de produção do vinho tinto.

1.3 Composição do vinho

O conhecimento da composição do vinho permite compreender melhor as mudanças que ocorrem durante o processo de maturação da uva, da fermentação do mosto durante o processo de elaboração do vinho e seu posterior armazenamento e conservação. As principais substâncias que constituem o vinho são: açúcares, alcoóis, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, ésteres, aldeídos e cetonas (IVANOVA et al., 2011). Diversos componentes do vinho afetam o seu paladar, por exemplo, os ácidos orgânicos contribuem

para a estabilidade e qualidades organolépticas do vinho e suas propriedades preservativas aumentam sua estabilidade físico-química e microbiológica da bebida (RIBÉREAU-GAYON et al., 1982). Já os compostos fenólicos são responsáveis pelas principais diferenças entre os vinhos brancos e tintos e são precursores do aroma do vinho (RIBÉREAU-GAYON e SAPIS, 1965). A composição fenólica é um aspecto importante para a boa qualidade dos vinhos tintos. Os fenólicos são responsáveis pela adstringência e sabor, e desempenham papel importante na estabilidade da cor. O perfil fenólico do vinho mostra ser influenciado pelas diferentes práticas vinícolas e diferentes técnicas enológicas. A variedade e a região onde a uva é cultivada também afeta a composição fenólica do vinho (CLIFF, KING e SCHLOSSER, 2007).

As antocianinas são responsáveis pela cor (RIBÉREAU-GAYON, 1959) e os taninos condensados pela adstringência. Os flavonóides possuem propriedades antioxidantes, bactericidas e vitamínicas que protegem o organismo humano de doenças vasculares e câncer (MOUTOUNET et al., 1989). Estes componentes do vinho são provenientes de diversas partes da uva e são extraídos durante o processo de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

CAPÍTULO 2

Análise do Perfil Químico do Vinho e da Uva

Capítulo 2. Análise do perfil químico do vinho e da uva

2.1 Introdução

A espectrometria de massas (MS) tem um papel de suma importância para a pesquisa e controle da qualidade no ramo da vitivinicultura. O potencial analítico da técnica MS é relevante no estudo das estruturas de compostos aromáticos e fenólicos (MONAGAS, BARTOLOMÉ e CORDOVÉS, 2005). A cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é a técnica mais amplamente utilizada na análise da composição volátil do vinho, e geralmente está associada a métodos de concentração e extração dos compostos voláteis, que por sua vez, se encontram em baixa concentração no vinho. Para isso, o método de Microextração em Fase Sólida (SPME) é bastante empregado devido sua alta eficiência, sensibilidade e ausência de solventes, além da facilidade de operação (CABAROGLU et al., 2005). A cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis e espectrometria de massas são as técnicas mais usadas para análises de compostos polares não voláteis no vinho e na uva (por exemplo, ácidos orgânicos, polifenóis e taninos). A espectrometria de massas sequencial (MS/MS) é muito eficiente para elucidação de estruturas de compostos identificados, e permite a caracterização de polifenóis de estruturas complexas, tais como procianidinas e taninos, fornecendo evidências experimentais para estruturas de compostos que foram hipoteticamente deduzidas. A inserção direta em espectrômetros de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) é muito empregada no estudo de caracterização de amostras complexas sem o emprego de cromatografia e preparo de amostra relativamente simples. Outra técnica muito eficiente baseada na espectrometria de massas de alta precisão para determinação da presença de moléculas de alto peso molecular é a espectrometria de massas com ressonância ciclônica de íons e transformada de Fourier com ionização por eletrospray e inserção direta (ESI FT-ICR MS) (FLAMINI, 2003).

2.1.2 Extração dos compostos voláteis por HS-SPME

A extração dos compostos voláteis é uma etapa necessária, realizada antes da introdução da amostra em um cromatógrafo a gás, visando basicamente a eliminação de interferentes e o ajuste da concentração acima do limite detectável. Existem duas formas de isolamento dos compostos voláteis: análise total e a análise do *headspace*. A primeira compreende uma análise de todos os compostos voláteis presentes no alimento, enquanto a segunda envolve apenas a análise do espaço aéreo em equilíbrio com a fase líquido ou sólida da amostra.

A SPME foi desenvolvida em 1990 por Artur e Pawliszyn e tem como vantagens a simplicidade, rapidez além de não fazer uso de solventes orgânicos (PAWLISZYN, 1997). Esta técnica envolve dois processos que são adsorção dos compostos na fase estacionária da fibra quando em contato com a amostra sob determinada temperatura sob agitação, e a dessorção dos compostos químicos na porta do injetor do cromatógrafo. O dispositivo básico de SPME, como ilustra a **Figura 2.1**, consiste de um bastão recoberto com sílica fundida de 0,56 mm de diâmetro, com extremidade recoberta com um filme fino do polímero de PDMS (polimetilsiloxano), PA (poliacrilato), CWX (Carbowax) ou de sólido adsorvente Carboxen (carvão ativo microparticulado).

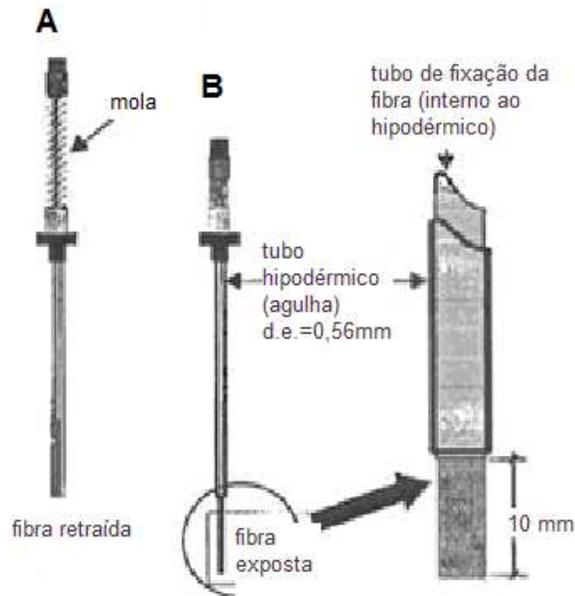


Figura 2.1 Fibra de SPME: (A) fibra retraída na agulha do suporte; (B) fibra exposta.

2.1.3 Extração dos ácidos orgânicos por SPE

A SPE (do inglês, Solid Phase Extraction) pode ser aplicada diretamente para isolar e concentrar compostos químicos de amostras líquidas. Esta técnica, introduzida nos anos 80, é baseada na retenção seletiva de alguns compostos e sua subsequente eluição por um solvente apropriado.

Dependendo do tipo de adsorvente e das características do analito, uma série de interações físicas e químicas ocorre, permitindo que o composto de interesse seja separado do restante dos componentes da amostra. A seletividade na separação estará condicionada pelo tipo de adsorvente e eluente empregados.

Os adsorventes utilizados são similares às fases estacionárias empregadas em cromatografia líquida, e podem ser agrupados em polar, apolar e do tipo troca iônica. A escolha do adsorvente depende da natureza do analito, da matriz e dos possíveis interferentes. De importância particular são os adsorventes poliméricos e de sílica, tais como copolímeros de estireno-divinilbenzeno. Os adsorventes de sílica são caracterizados por apresentar uma capacidade de carga baixa e um elevado consumo de solvente e tempo, além disso, em alguns casos podem ser confrontados com a adsorção e degradação de certos compostos. O segundo tipo, baseado em polímeros de estireno-divinilbenzeno, que são caracterizados por apresentar uma grande capacidade de carregamento, maior estabilidade em valores de pH extremo, além da capacidade de serem empregado no modo reversível e normal.

SPE é uma técnica que tem grande aplicabilidade na enologia, a **Figura 2.2** mostra, resumidamente, as etapas de uma extração por SPE. Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passagem por um cartucho contendo adsorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para extrair os analitos de interesse (CASTRO et al., 2008).

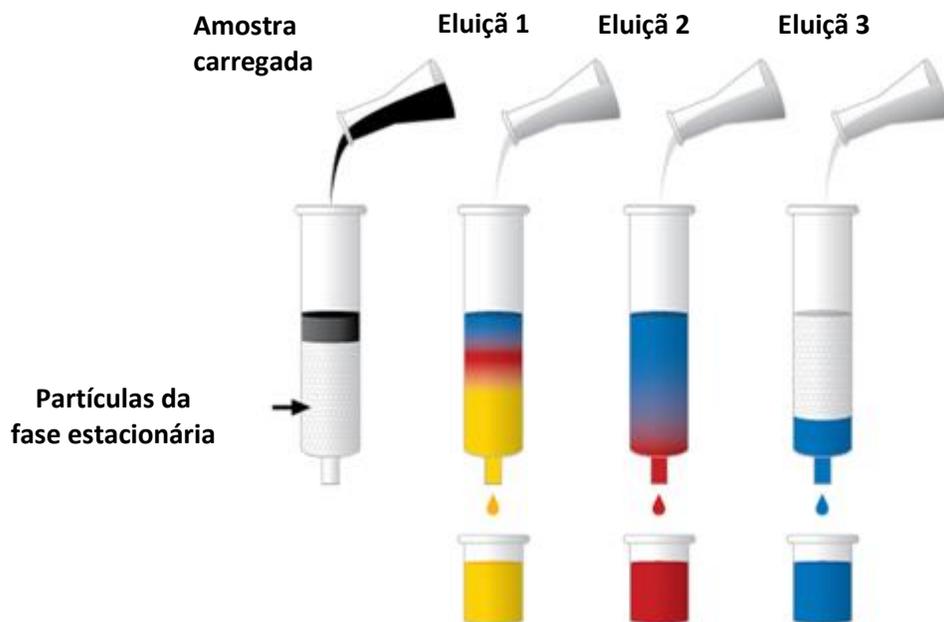


Figura 2.2 Esquema das etapas de extração por SPE.

2.1.4 Ionização por elétrons (EI)

O método de ionização mais empregado para compostos voláteis é a ionização por elétrons EI (do inglês *Electron Ionization*). A **Figura 2.3** mostra um esquema geral do funcionamento da fonte de EI, onde moléculas neutras na fase gasosa (dessorção térmica) a pressão típica de 10^{-5} torr são bombardeados por elétrons, com energia típica de 70 eV, que proporcionam a retirada ou captura de elétron pela molécula formando íons M^+ ou M^- . EI é um processo unimolecular, no qual íons formados são rapidamente extraídos da fonte de ionização pelo eletrodo de repulsão (*repeller*); íons moleculares são formados com excesso de energia interna e se fragmentam total ou parcialmente. A EI é bastante versátil porque produz tanto o íon molecular como também fragmentos com informação sobre estrutura do composto químico. Além disso, os espectros são reprodutíveis proporcionando a construção de bibliotecas de espectros. A ionização por elétron aplica-se a moléculas orgânicas relativamente pequenas de média a baixa polaridade e com baixo peso molecular ($\sim 500u$) (HOFFMANN, 2007).

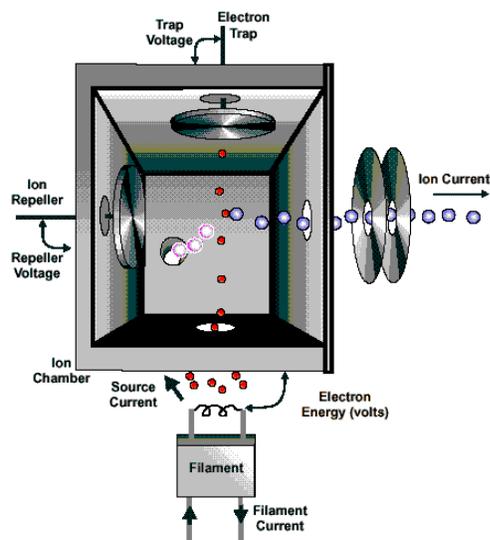


Figura 2.3 Esquema geral do funcionamento da fonte de ionização por elétron (EI).

2.1.5 Ionização por Eletrospray (ESI)

A técnica ESI foi inicialmente desenvolvida por M. Dole em 1968 (DOLE, MACH, e HINES, 1968) e aplicada por J.B.Fenn (FENN, MANN, MENG, e WONG, 1989) para análise de moléculas pequenas e de proteínas. A fonte ESI transfere para a fase gasosa moléculas polares de diversos tamanhos e que frequentemente são termicamente instáveis, permitindo a análise por espectrometria de massas de biomoléculas, tais como proteínas. Fato antes impossível por técnicas clássicas como ionização por elétrons (EI), onde somente moléculas voláteis e termo estáveis poderiam ser ionizadas. Além disso, EI é muito energético, pois fragmenta as moléculas de tal maneira que o íon molecular pode não ser visualizado no espectro e a identificação do composto químico fica comprometida. O método ESI possui uma ionização branda, sendo capaz de ionizar moléculas até 600 Da na sua forma monocarregada, sem fragmentação, possibilitando a visualização de íons individuais em misturas complexas.

Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com fase móvel mais frequentemente utilizados em HPLC com fase reversa (água, metanol e acetonitrila), a fonte ESI pode ser usada como interface entre métodos de separação por HPLC e de identificação

dos compostos por espectrometria de massas (MS) ou seqüencial (MS/MSⁿ). Para facilitar a protonação de sítios básicos ou a desprotonação de sítios ácidos, é comum adicionar um agente modificador à solução. Para analisar as moléculas [M] básicas são adicionados 0,1 a 0,2% de ácido fórmico à solução o que permitirá a protonação mais rápida e eficiente do composto. Neste caso, ocorrerá a formação de íons [M+H]⁺ e sua análise é feita em modo positivo. Para as moléculas ácidas adiciona-se 0,1 a 0,2% de solução de hidróxido de amônio à solução para facilitar a desprotonação da molécula, formando íons [M-H]⁻ com a análise sendo realizada no modo negativo.

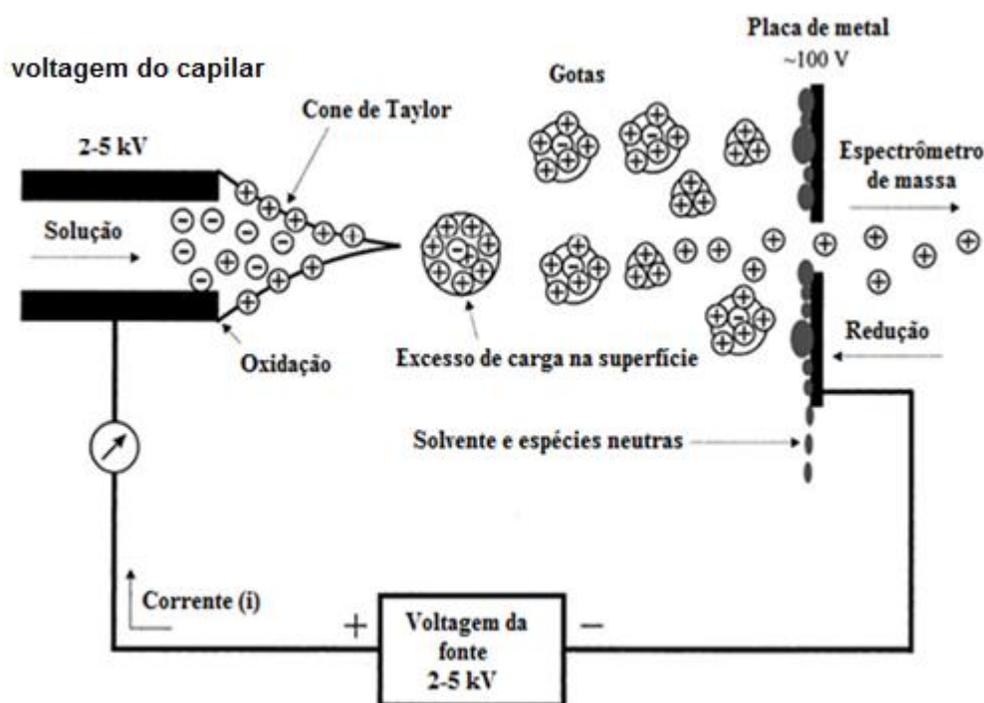


Figura 2.4 Desenho simplificado de uma fonte de ionização por eletrospray.

A **Figura 2.4** apresenta um desenho simplificado de uma fonte de ESI. A solução proveniente de uma bomba seringa ou um sistema de HPLC numa vazão de 1-15 μLmin^{-1} é inserida no capilar em cuja extremidade é aplicada uma alta voltagem que poderá ser positiva quando a protonação (ionização no modo positivo) for requerida ou uma voltagem negativa quando a desprotonação (ionização no modo negativo) for desejada. O gás nitrogênio, mais empregado como gás nebulizador, é aquecido para facilitar ainda mais a

volatilização. Dois mecanismos são propostos para a transferência dos íons do interior das gotículas para a fase gasosa: (1) a “evaporação” dos íons a partir da superfície das gotículas e (2) a subdivisão progressiva das gotículas com evaporação do solvente, sendo que na prática é provável que ocorram ambos os mecanismos. Ou seja, a transferência ocorre através da divisão e evaporação das gotas contendo um excesso de cargas (positivas ou negativas dependendo do modo de aquisição) e os íons são transferidos para a fase gasosa e atraídos para dentro do espectrômetro de massas através de um gradiente de potenciais. Uma contra corrente de gás nitrogênio é aplicada para evitar a formação de agregados de íons (*clusters*) e também para evitar a entrada de moléculas neutras para o interior do espectrômetro de massas (SAWAYA, 2006). A fonte de ionização ESI foi empregada nos estudos dos capítulos 4, 5 e 6.

2.1.6 Analisador de massas quadrupolar (Q)

A **Figura 2.5** mostra um esquema simplificado da estrutura do analisador de massas quadrupolo (Q). Ele é constituído de quatro barras geralmente cilíndricas paralelas que servem de eletrodos. Diferentes potenciais de radiofrequência variável (AC e DC) são aplicados a cada par de barras.

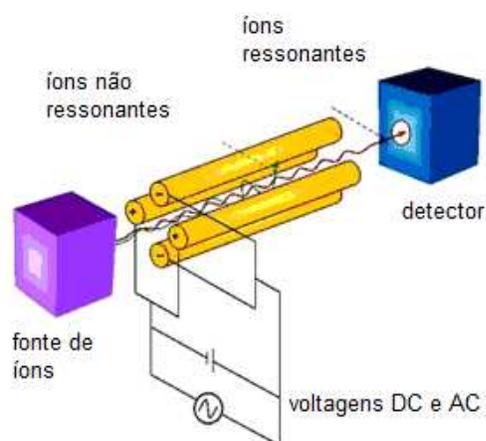


Figura 2.5 Analisador de massas quadrupolar.

Para se obter o espectro de massas com esse dispositivo os íons são acelerados, no espaço entre as hastes, por um potencial de 5 a 10 V. Em um dado instante, todos os íons com determinada razão m/z dentro de um intervalo limitado atingem o detector. Este instrumento é mais compacto, barato e robusto que os outros tipos de espectrômetros de massas, além disso, tem a vantagem de possuir altas velocidades de varredura, possibilitando a obtenção de um espectro inteiro em 100 milissegundos (HOFFMANN, 2007).

2.1.7 Espectrometria de massas com ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS)

O analisador de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR), criado no início da década de 1970, é considerado até o momento o analisador mais complexo em espectrometria de massas (MARSHALL, 1985). O FT-ICR é um híbrido que pode apresentar na sua configuração, por exemplo, um *Linear Ion Trap* (LIT) e uma cela de ICR que une alta sensibilidade do *ion trap* com altíssima resolução do ICR. O LIT é um analisador de massas que faz da sua estrutura básica um quadruplo, ou seja, um arranjo de quatro cilindros metálicos que, no entanto, em vez de filtrar íons de todas as razões m/z , ele é utilizado para aprisionar os íons e fazer ejeção radial para o analisador ICR. A determinação da m/z (relação massa-sobre-carga) no analisador ICR com alta resolução deve-se ao movimento ciclotrônico dos íons na presença de um campo magnético.

A ultra-alta resolução do FT-ICR é devido, portanto, a quantidade de voltas que um determinado íon percorre ao ser excitado na presença de um campo magnético (MARSHALL, HENDRICKSON e JACKSON, 1998). Por exemplo, um íon de 100 Da percorre a distância de 30 Km durante um período de observação de 1 segundo em uma cela de ICR com magneto de 3T (30.000 Gauss). Além disso, quanto maior o campo magnético, menor será o raio ciclotrônico de um íon e maior será sua frequência ciclotrônica, portanto, maior será o poder de resolução.

Um esquema geral do funcionamento da cela ICR é mostraddo na **Figura 2.6**. Os íons gerados por uma fonte de ionização como a ESI são aprisionados na cela de ICR. Neste momento, devido à ação do campo magnético uniforme, cada íon começa a se movimentar

em uma determinada posição. Contudo, o sinal da cela ICR é detectável apenas se os íons apresentarem um movimento sincronizado (em fase). Com intuito de obter essa sincronia, aplica-se um campo elétrico (r.f) espacialmente uniforme de magnitude igual a da frequência ciclotrônica, tornando o movimento dos íons espacialmente coerente e detectável. O sinal de ICR (domínio de tempo) é resultante, portanto, da corrente oriunda da indução (detecção) de uma imagem oscilante de uma carga ao se aproximar dos dois eletrodos condutores opostamente paralelos. O espectro em domínio de frequência é obtido pela transformada de Fourier de um sinal de ICR digitalizado no domínio de tempo, em seguida, após uma simples manipulação matemática, este é transformado em domínio de m/z .

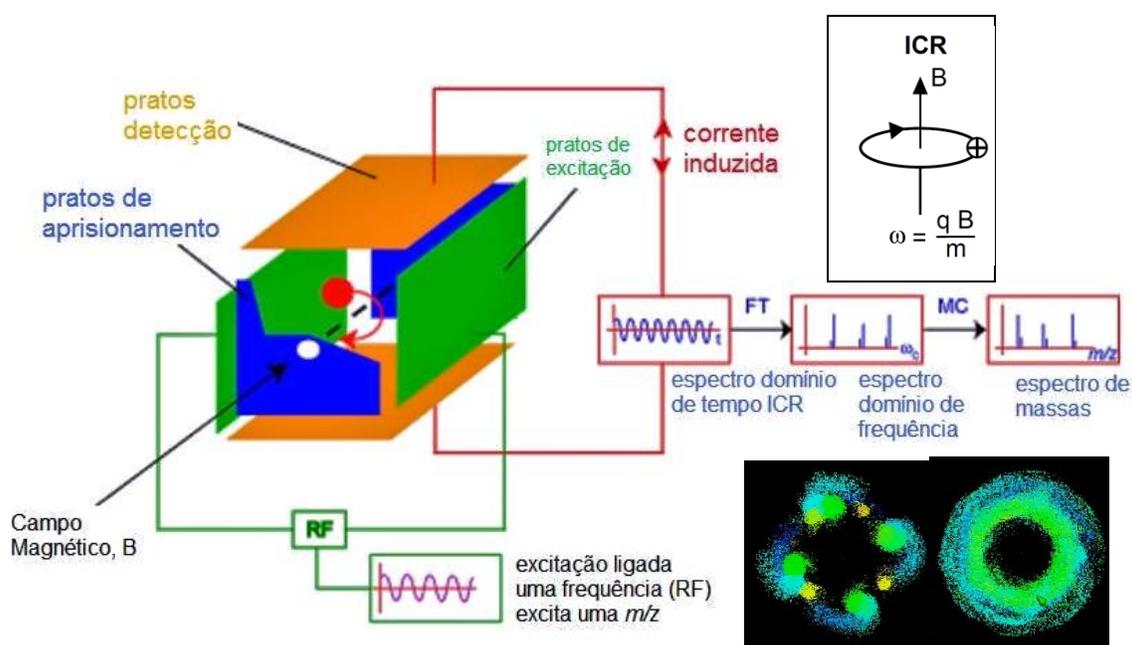


Figura 2.6 Esquema geral do funcionamento de uma cela de ICR.

2.1.8 Analisador de massas triploquadrupolo (TQD)

A **Figura 2.7** mostra um diagrama geral de um instrumento com três quadrupolos. Os espectrômetros de massas são simbolizados pela letra maiúscula Q, e os quadrupolos com apenas frequência RF por letra minúscula q. Um gás de colisão pode ser introduzido no

quadrupolo central a uma pressão tal que um íon ao entrar no quadrupolo sofra uma ou diversas colisões.

Quando o gás é inerte, a energia interna é transferida para o íon através da conversão de uma fração da energia cinética em energia interna. Depois os fragmentos (íons produtos) são analisados pelo quadrupolo Q3. Quando o gás é reativo, reações íon-molécula podem ser induzidas. Os produtos da reação são analisados depois pelo quadrupolo Q3.

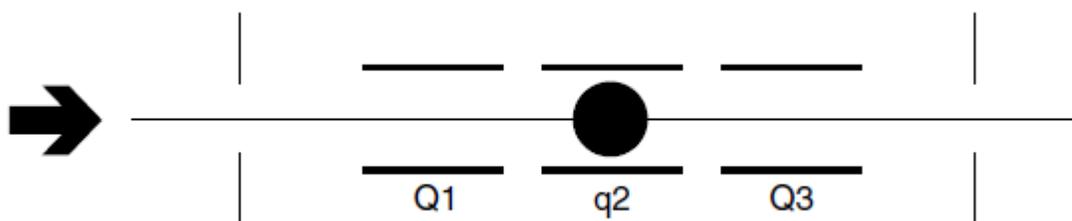


Figura 2.7 Diagrama de um instrumento tipo quadrupolo.

Esses instrumentos com diversos analisadores em série podem realizar todos os tipos de varredura. O primeiro modo de varredura consiste na seleção do íon com razão m/z de interesse pelo primeiro espectrômetro de massas. Este íon colide no interior do quadrupolo central e reage ou fragmenta. Os produtos da reação são analisados pelo segundo espectrômetro de massas. Este é a varredura do íon produto (*Product ion scan*), conhecido antigamente por íon filho (*daughter scan*).

O segundo tipo consiste em focar o segundo espectrômetro (Q3) no íon selecionado durante a varredura das massas usando o primeiro espectrômetro (Q1). Todos os íons que produzem os íons com as massas selecionadas através da reação ou fragmentação são assim detectados. Este método é chamado varredura do íon precursor (*Precursor ion scan*), pois os íons precursorres são identificados. Ele é também chamado varredura dos íons parentes (*Parents scan*).

No terceiro modo de varredura, ambos os espectrômetros são varridos juntos, mas com deslocamento constante de massas entre os dois. Assim, para uma diferença de massas a , quando um íon de massa m atravessa o primeiro espectrômetro de massas, a detecção ocorre se o íon produziu um fragmento do íon de massa $(m-a)$ quando este deixa

a cela de colisão. Este é a varredura de perda neutra (*Neutral loss scan*), com massa neutra a . Por exemplo, na ionização química a molécula de álcool perde uma molécula de água. Os alcoóis são detectados pela varredura de uma perda neutra de 18 unidades de massas. Por outro lado, um dado aumento de massas pode ser detectado se o gás reativo é introduzido dentro da cela de colisão (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Neste capítulo 2, abordaremos um levantamento bibliográfico dos principais compostos químicos do vinho e da uva e aplicações da espectrometria de massas na análise do perfil químico dos mesmos além do uso de diversos métodos de extração, separação e ionização. Alguns dos trabalhos mostram a importância da espectrometria de massas como uma ferramenta poderosa na análise e caracterização de vinhos e uvas.

2.2 Ácidos orgânicos simples

Os ácidos orgânicos são produzidos naturalmente nos alimentos por processos metabólicos, bioquímicos, hidrólise e crescimento bacteriano. Já nos vinhos, estes ácidos, provenientes da uva com cadeias simples C_4 - C_{13} (m/z 133-295, por ESI-MS no modo negativo) são importantes porque contribuem com a cor, aroma, gosto, características de equilíbrio gustativo e também para a estabilidade microbiológica e química (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). As estruturas dos ácidos orgânicos simples mais importantes são mostradas na **Figura 2.8**.

Os ácidos orgânicos mais importantes identificados na uva e no vinho são: os ácidos tartárico e málico. O ácido tartárico (m/z 149,00910) é conhecido como o ácido do vinho porque é encontrado em concentrações elevadas no vinho e na uva e por ser considerado um ácido forte proporcionando ao vinho um pH baixo de 3,0 a 3,5. Os tartaratos, co-produtos provenientes da produção industrial de vinhos são muito empregados na indústria de alimentos e bebidas. O nível de ácido tartárico é um parâmetro de controle crítico na estabilização do vinho. Ele também é usado para fins medicinais (como exemplo: laxativo), em tingimentos de tecido, couro bem como corante de alimentos sob o número de referência E102. O ácido málico (m/z 133,01425) é abundante em maçãs verdes, por isso é conhecido como o ácido da maçã verde, e também está presente em uvas brancas e vermelhas. A concentração desse ácido no início da maturação do vinho é de aproximadamente 4,0 a 6,5

g^L⁻¹ e pode reduzir pela metade na primeira semana de maturação. O ácido cítrico (*m/z* 191,01970) é comumente encontrado na natureza, como por exemplo, no limão. Ele desempenha um papel bioquímico e metabólico muito importante (ciclo de Krebs), inibe o crescimento de leveduras e é usado como agente acidificante de alimentos e bebidas, enquanto os citratos de sódio (E331), de potássio (E332) e de cálcio (E333) são empregados na indústria farmacêutica. Além desses três ácidos majoritários do vinho, existem os ácidos cinâmicos, tais como: o ácido cumárico (*m/z* 163,04015) que pode está esterificado com ácido tartárico, fornecendo o ácido cumariltartárico (*m/z* 295,04630). O ácido D-glucônico (*m/z* 195,05103), originário da glicose pode atingir altas concentrações em sucos de uva e posteriormente no vinho. O ácido mucico (*m/z* 209,03030) originado da oxidação da galactose consiste num produto indesejado do vinho, e sua presença tem sido observada na existência de depósitos formados durante seu envelhecimento (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

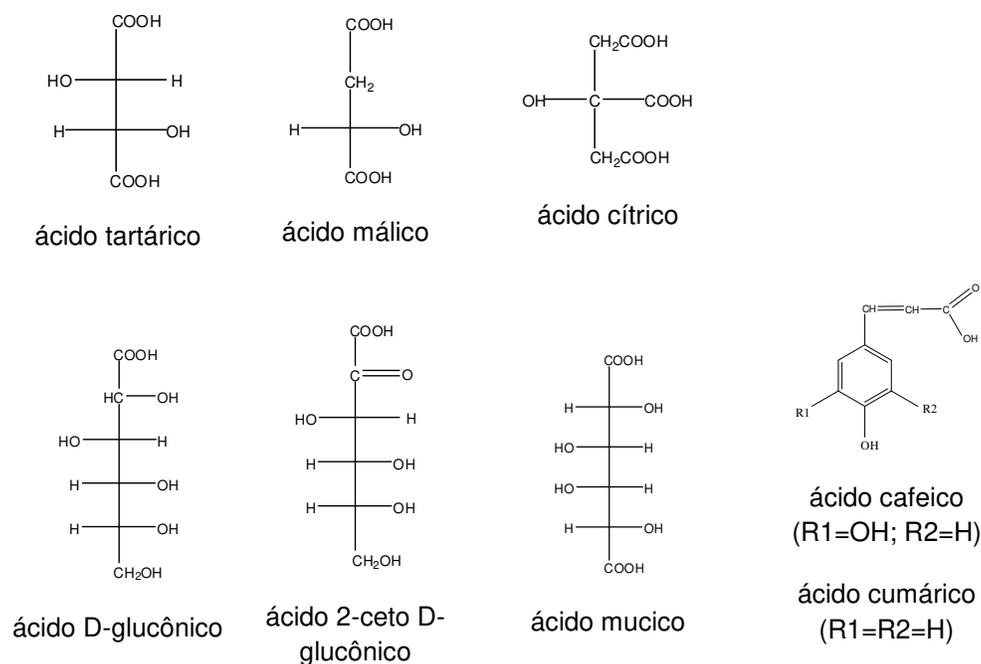


Figura 2.8 Estrutura química dos principais ácidos orgânicos encontrados na uva e no vinho.

São várias as técnicas usadas na separação dos ácidos orgânicos em uvas, sucos e vinhos dentre elas podemos citar a cromatografia, eletroforese e espectrofotometria (ZHENG et al., 2009; MATO, SUÁREZ-LUQUE E HUIDOBRO, 2005; DENIS et al., 2012; PERES et

al., 2009). Entretanto, a técnica de ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas com inserção direta (ESI-MS) é uma ótima alternativa para caracterização de amostras complexas porque não requer pré-tratamento, derivatização, separação cromatográfica, é simples e rápida (EHLING E COLE, 2011). Assim, a infusão direta ESI-MS tem sido aplicada com sucesso como um método de caracterização (*fingerprint*) rápido, capaz de classificar e detectar a adulteração e envelhecimento de amostras tais como própolis (ZOTOU, LOUKOU, E KARAVA, 2004), bebidas (FRAYNE, 1986), whisky (EYÉGHÉ-BICKONG et al., 2012), vinho (VILLAGA et al., 2012; SAWAYA et al., 2011), tempero (CATHARINO et al., 2006), gasolina (MAZZUCA et al., 2005), óleos (AMORIN et al., 2009), óleo vegetal (ROESLER et al., 2008), e óleo de soja (CATHARINO et al., 2007).

No trabalho de CATARINO et al. (2006) o método ESI-MS com inserção direta foi testado para caracterizar amostras de mostos de seis variedades de uvas brasileiras durante o processo de fermentação, bem como amostras dos seus respectivos vinhos após a fermentação malolática. A análise quimiométrica dos espectros obtidos (*fingerprint*s) foi usada para agrupar as amostras e definir os íons diagnósticos de cada grupo. A análise de componentes principais (PCA) dos *fingerprints* separou claramente os mostos dos vinhos em decorrência do processo fermentativo sofrido. De fato, o processo fermentativo fez com que a composição dos vinhos mudasse muito a ponto de ter pouca similaridade com o mosto de origem. SAWAYA et al. (2011) publicou um trabalho onde o método ESI-MS com inserção direta foi usado para monitoramento do processo de envelhecimento de vinhos produzidos a partir de uvas das variedades Pinot noir, Merlot e Cabernet Sauvignon, cultivadas no Rio Grande do Sul. Os *fingerprints* das amostras mostraram as mudanças que ocorrem durante o envelhecimento dos mostos para as três variedades de uvas e a análise de componentes principais dos *fingerprints* em modo negativo foi usado para agrupar as amostras, salientando as principais modificações da composição e indicando os íons marcadores para cada grupo.

BIASOTO et al. (2010) realizaram uma análise descritiva de vinhos tintos, empregando a espectrometria de massas com ionização por eletrospray e inserção direta (ESI-MS). Esta técnica permitiu a identificação de compostos voláteis e não voláteis em alimentos e bebidas, sem a necessidade de extração, isolamento e separação cromatográfica prévia dos constituintes das amostras. Dados descritivos do sabor dos vinhos tintos elaborados a partir

de uvas *Vitis labrusca*, *híbrido* e *Vitis vinífera* foram inicialmente gerados por painel humano e em seguida correlacionados com os dados de ESI em modo negativo. A análise de componentes principais e a correlação entre a análise de dados mostrou que o teor de ácido succínico foi bem determinado ($r = 0,63$, $p = 0,05$). Uma correlação negativa também foi observada entre o sabor da uva e conteúdo de ácido carbônico ($r = -0,76$, $p = 0,02$). Alguns dos ácidos identificados foram indicadores da qualidade sensorial do vinho, tais como acidez (ácido succínico) e amargor (ácido ascórbico). De modo geral, os *fingerprints* obtidos por ESI-MS mostraram que a técnica é confiável com uso em potencial em vinícolas para o controle de qualidade.

2.3 Ácidos da fermentação

Os principais ácidos produzidos a partir da fermentação do mosto e que são transferidos para o vinho são os de cadeia C_3 - C_5 (**Figura 2.9**). As massas teóricas relatadas a seguir são para íons analisados por ESI-MS em modo negativo. O ácido pirúvico (m/z 87,00877) possui função metabólica celular importante. O ácido succínico (m/z 117,01933) é outro que se desenvolve durante a fermentação e juntamente com o ácido fumárico (m/z 115,00540) têm pKa baixo. O ácido succínico tem um sabor intenso amargo que estimula a salivagem, acentuando o sabor do vinho e juntamente com o ácido citramálico (m/z 147,02990) são encontrados em concentrações perceptíveis nos vinhos. Os ácidos orgânicos consistem em moléculas polifuncionais que contém na maioria das vezes grupos hidroxilas que lhes confere características polares, hidrofílicas e reatividade química que podem contribuir para o envelhecimento do vinho ao longo do tempo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

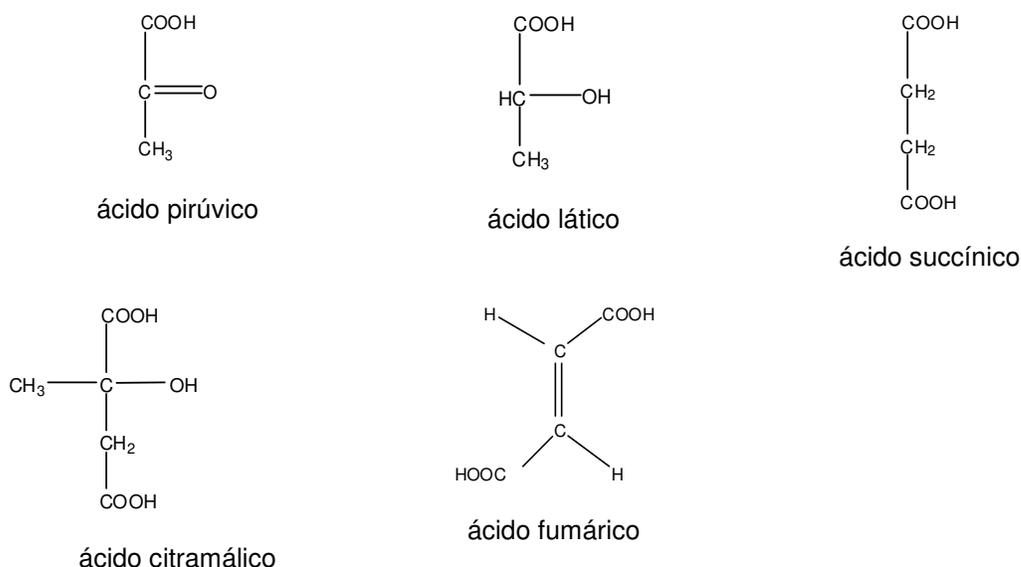


Figura 2.9 Estruturas dos principais ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação do mosto encontrados no vinho.

2.4 Ácidos fenólicos e seus derivados

Os compostos não flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, benzóicos, cinâmicos e outros derivados fenólicos como os estilbenos. O vinho tinto contém sete ácidos benzóicos e cinco ácidos cinâmicos numa concentração que varia de 100 a 200 mgL⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). A **Figura 2.10** apresenta as estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos e seus derivados encontrados no vinho. Os ácidos benzóicos possuem uma estrutura com seis átomos de carbono na forma C₆-C₁, sendo o ácido gentísico (*m/z* 153,01920) encontrado em níveis de baixa detecção. Os vários ácidos benzóicos são diferenciados pela substituição em seus anéis e são encontrados na forma livre, monoglicosilada ou na forma de ésteres. Os ácidos cinâmicos constituem a segunda classe mais abundante de ácidos fenólicos com estrutura na forma C₆-C₃. Estes têm sido detectados em pequenas quantidades na forma livre e com maior frequência na forma esterificada, em particular com ácido tartárico. Também podem formar glicosídeos simples ou ésteres de ácido tartárico, como por exemplo, o ácido cafeiltartárico (*m/z* 311,04090) ou

ainda o ácido p-cumariltartárico (m/z 295,04594) e feruliltartárico (m/z 326,25601). Eles são altamente oxidáveis e responsáveis pelo escurecimento do mosto na formação do vinho. Os ácidos cinâmicos podem combinar com as antocianinas monoglicosiladas para formar antocianinas aciladas, via esterificação do ácido cafeíco ou ácido p-cumárico com a glicose da antocianina. Do ponto de vista organoléptico, esses compostos não possuem um odor ou cor particular, contudo são precursores dos fenólicos voláteis produzidos pela ação de certos microorganismos (RIBÉREAU-GAYON, et al., 2006).

EHLING e COLE (2011) descreveram pela primeira vez um método baseado na diluição de isótopo estável e na cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC-MS), aplicado para análise de ácidos orgânicos (cítrico, málico, quínico, e tartárico) em sucos de fruta (romã) para estudos da composição e determinação de autenticidade. Existem trabalhos na literatura que atribuem à presença do ácido tartárico uma forte indicação em potencial de adulteração com suco de uva. Os ácidos tartárico e quínico foram confirmados no suco de romã em concentrações que variam de 1 a 5 mgL^{-1} , respectivamente. Essas concentrações estão a baixo dos resultados de adulteração com sucos de uva e maçã, respectivamente a um nível de 5%. Os dados de confirmação dos ácidos tartárico e quínico em sucos de romã geram importantes implicações para o estudo de autenticidade da bebida. Este também foi o primeiro trabalho de LC-MS realizado para análise de ácido cítrico em sucos de laranja.

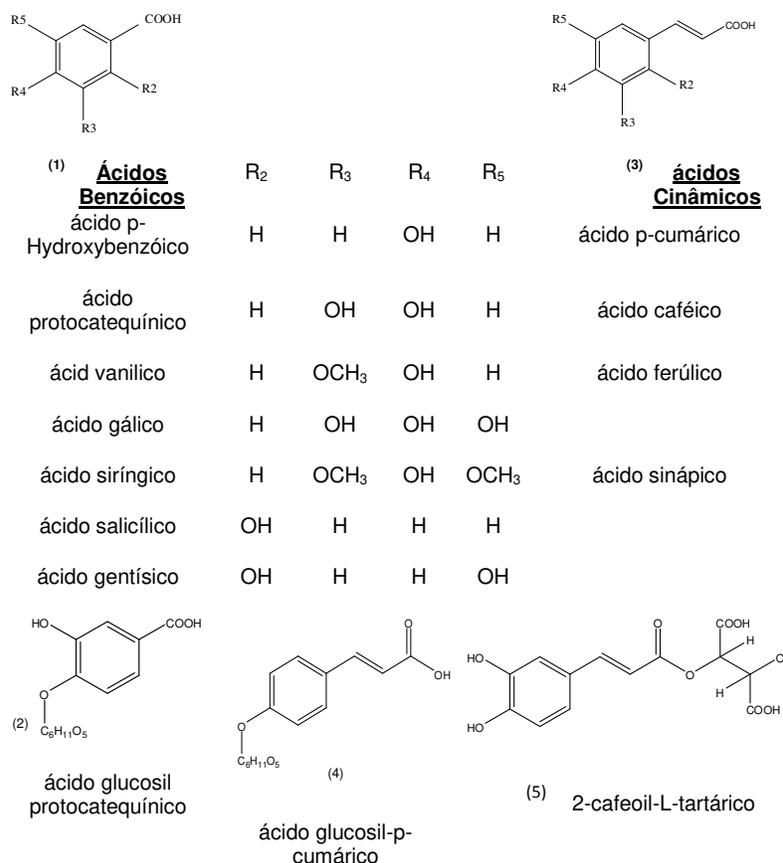


Figura 2.10 Estruturas químicas dos ácidos fenólicos e seus derivados do vinho.

EYÉGHÉ-BICKONG et al. (2012) relataram o desenvolvimento de um método baseado na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) acoplado ao detector de índice de refração (RID) e inserção direta de amostra (ESI-LC-DAD/RID) para análise do perfil dos principais açúcares e ácidos orgânicos em uvas. Os açúcares e ácidos orgânicos foram extraídos com clorofórmio/polivinilpolipirrolidona e separados empregando uma coluna HPLC com troca iônica Aminex HPX-87X acrescida de 5 mM de ácido sulfúrico conforme a fase móvel. As análises foram calibradas usando padrão externo e uma nova equação foi usada para calcular a concentração de ácido málico e frutose para separação não resolvida. Para que o método pudesse ser utilizado para análise de um grande número de amostras de uvas, cada amostra foi injetada diretamente logo depois de extraída, sendo que a etapa de extração da amostra permitiu o uso de pequenas

quantidades de material amostral. As concentrações de açúcares e ácidos orgânicos em uvas foram normalizadas para as concentrações do padrão interno obtidos após a extração de uma mistura padrão. O método foi satisfatório obtendo alta recuperação entre 102,1% e 100,0% para frutose e glicose, respectivamente e 105,5%, 96,7%, 97,6% e 99,0% para o ácido cítrico, ácido málico, e ácido succínico, respectivamente. O método mostrou-se favorável para as amostras fortificadas com a mistura padrão, sendo adequado para traçar o perfil dos principais açúcares e ácidos em amostras de uva em diferentes estágios de maturação. Este é o primeiro trabalho realizado que combina o perfil dos principais açúcares e ácidos orgânicos em uvas usando miligramas de amostras com injeção direta após extração. No trabalho de ZOTOU, LOUKOU, E KARAVA (2004) foi descrito o desenvolvimento do método para determinação de sete ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, detector ultravioleta visível (RP-LC-UV-Vis) e coluna analítica comum C₁₈. Os ácidos galacturônico, tartárico, málico, láctico, acético, cítrico e succínico foram determinados usando xantina como padrão interno. O método foi aplicado em vinhos gregos tintos e brancos, após um pré-tratamento de amostra com polivinilpirrolidona (PVP), seguida por extração em fase sólida (SPE) através de cartuchos SAX, com os quais se obteve recuperações entre 78,0 a 106,8%. Os limites de detecção obtidos foram entre 0,001 a 0,05 gL⁻¹ e a faixa linear entre 0,003 a 2,0 gL⁻¹. Os bons resultados de linearidade e recuperação para todos os ácidos, assim como a alta sensibilidade, precisão e seletividade juntamente com a simplicidade e rapidez permitiram que o método proposto fosse recomendado sempre que a necessidade por resultados de alta qualidade analítica fossem requeridos.

PALMA E BARROSO (2002) determinaram as condições ótimas de extração baseadas em UAE (Extração Assistida por Ultrasson) para determinação dos ácidos málico e tartárico na uva. Um esquema experimental fatorial fracionário permitiu a determinação dos efeitos de sete variáveis. A relação entre todas as variáveis foram examinadas. Pela aplicação das análises gráficas, as melhores condições de extração foram obtidas. As variáveis mais importantes foram o líquido e a temperatura de extração. Depois um composto central foi aplicado para otimizar a temperatura e a composição do líquido de extração. O método otimizado foi aplicado para uvas e co-produtos da vinificação. A repetibilidade do método foi estudada e a recuperação dos ácidos málico e tartárico foi estabelecida. A quantificação foi

realizada empregando a cromatografia líquida (LC) com um tampão pós-coluna e um detector de condutividade.

SÁNCHEZ, BALLESTEROS E GALLEGRO (2011) determinaram 29 ácidos orgânicos em produtos alimentares empregando um método simples e rápido baseado na técnica de extração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPE-GC-MS). Para isso, uma coluna empacotada com 80 mg de material adsorvente (LiChrolut EM-Supelclean ENVI-18) foi empregada para fins de extração e remoção de interferentes. Depois da eluição com 200 μL de metanol, o extrato metanólico foi injetado diretamente no GC-MS sem uma derivatização prévia, usando uma coluna capilar HP-INNOWax (empacotada com fase estacionária de polietileno glicol) para separação cromatográfica. O método forneceu uma boa linearidade (0,5 a 1000 μgKg^{-1}) e uma precisão razoavelmente boa para todos os compostos (RDS menor que 6,2%). A faixa de recuperação das soluções diluídas dos ácidos orgânicos fortificadas com diferentes concentrações (10, 40 e 100 μgKg^{-1}) foi de 93 a 98%. A aplicabilidade do método foi demonstrada através da análise dos ácidos orgânicos em uma ampla variedade de produtos alimentares incluindo amostras de bebidas, vinho, suco de fruta, molho, leite de soja e mel.

FLORES, HELLÍN, E FENOLL (2012) desenvolveram um método que empregou a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria seqüencial (LC-MS/MS) com analisador triplo quadrupolo (TQD) e monitoramento de íon seletivo para determinação de ácidos orgânicos (glutâmico, tartárico, quínico, malônico, málico, chiquínico, α -cetoglutárico, pirúvico, cítrico, succínico e fumárico) em frutas (melão, uva, pêra, laranja e limão) e vegetais (pimenta, tomate e alface). A amostra foi inserida na fonte de ionização eletrospray com inserção direta no modo negativo ESI(-)-MS. Todos os parâmetros de validação foram encontrados dentro das faixas aceitáveis para todos os compostos. Diferentes efeitos de matrizes foram observados no estudo de vegetais e as amostras foram quantificadas pela adição de padrão. As principais vantagens deste método são sua seletividade, que é uma das principais deficiências para a maioria dos métodos quanto à análise de ácidos orgânicos em matrizes complexas, além de sua simplicidade e a necessidade de pouco preparo de amostra.

ZHENG et al. (2009) desenvolveram um novo método para determinação simultânea de ácidos orgânicos em vinho tinto e mosto por cromatografia líquida. A determinação de

ácidos orgânicos em vinhos foi completada em menos de 13 minutos, empregando apenas uma simples diluição de amostra e uma etapa de filtração. Com este método, a separação cromatográfica de oito ácidos orgânicos e picos interferentes presentes no vinho tinto exigiu somente uma coluna de fase reversa (Waters Atlantis C18, 4,6 x 150 mm ID, 5 µm). A fase móvel empregada foi 5% de acetonitrila e 95% de KH_2PO_4 em água, pH 2,7 com taxa de fluxo 0,8 mL/min. O comprimento de onda usado foi 210 nm, exceto para o ácido ascórbico que foi detectado com comprimento de 243 nm. A aplicação desse novo método para vinhos tintos e mosto pôde ser confirmada pela boa repetibilidade e mostrou ampla faixa de variação para concentrações de ácidos orgânicos. ANDRADE LIMA et al. (2010) otimizaram e validaram um método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência (LC-MS). O método analítico utilizado pôde ser aplicado para determinação de ácidos orgânicos, com rapidez (16 minutos) e facilidade de preparação da amostra (diluição e filtração). A otimização da fase móvel pela adição de acetonitrila possibilitou a melhoria da resolução cromatográfica de todos os ácidos. O método apresentou ótimos resultados em todas as etapas de validação – sensibilidade, precisão, exatidão e robustez, demonstrando dessa forma a possibilidade de uma ampla utilização na análise de ácidos orgânicos em vinhos tintos e brancos. FRAYNE (1986) também desenvolveu um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (HPLC-RI) para separação isocrática e quantificação dos principais ácidos, açúcares e alcoóis em vinho e mosto da uva. O método utilizou um sistema com coluna de troca catiônica dupla sem preparo de amostra. A amostra foi filtrada através de uma membrana de 0,45 µm, em seguida foi injetada, separada e quantificada em menos de 40 minutos. A avaliação estatística do método HPLC mostrou que ele foi reprodutível, confiável e estável. Uma comparação foi realizada entre o novo método e os métodos convencionais de análise, tais como volumétrico, destilação, e enzimático. A análise estatística mostrou boa concordância na exatidão e precisão entre os métodos comparados.

CATHARINO et al. (2006) realizaram a caracterização de amostras de mostos e vinhos de seis variedades de uvas (Pinot Noir, Bordô, Isabel, Merlot, Malbec e Cabernet Sauvignon) por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e infusão direta no modo negativo ESI(-)-MS). Os íons diagnósticos dos mostos foram bem diferentes das amostras de vinhos, embora fosse possível observar poucas variações para cada variedade de uva. A

adição de mosto não fermentado ou açúcar ao vinho foi detectado. O espectro foi adquirido em poucos minutos por amostra, indicando que o método ESI-MS pode ser usado para analisar amostras com alto rendimento e foi considerada útil para o controle de qualidade durante e após o processo fermentativo do mosto, monitorando a mudança na sua composição química. Esta mesma técnica foi também empregada na caracterização de amostras de vinho, sem pré-tratamento ou separação cromatográfica, por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e infusão direta, em um processo chamado de *fingerprinting*, que foi aplicado às várias amostras de vinho produzidas com uvas das variedades Pinot noir, Merlot e Carbernet Sauvignon do estado do Rio Grande do Sul. Os *fingerprints* por ESI-MS das amostras detectaram mudanças que ocorreram durante o processo de envelhecimento para as três variedades de uvas. A Análise de Componentes Principais dos *fingerprints* em modo negativo foi usada para agrupar as amostras, salientar as principais modificações na composição e indicar os íons marcadores para cada grupo (SAWAYA et al., 2011).

VILLAGRA et al. (2012) utilizaram o método de espectrometria de massas com ressonância ciclôtrica e transformada de Fourier com ionização por eletrospray e infusão direta (ESI FT-ICR MS) combinada com a estatística multivariada para caracterização e classificação de vinhos chilenos. Um total de 47 amostras de vinhos comerciais como Cabernet Sauvignon, Carménere, Syrah e Pinot noir, além de 25 amostras de vinhos brancos das variedades Chardonnay e Sauvignon Blanc que foram diluídas, em seguida infundidas diretamente no espectrômetro de massas e analisadas no modo negativo. Os resultados da análise de componentes principais permitiram uma boa classificação dos vinhos brancos, porém o mesmo não ocorreu no caso dos vinhos tintos. As três componentes principais explicaram 96,82% e 85,65% da variância para os vinhos brancos e tintos, respectivamente. A análise discriminante linear permitiu uma discriminação entre as amostras de 100% para os vinhos brancos e 95,74% para os vinhos tintos. A validação desses resultados usando o método de validação cruzada, deixando uma de fora gerou baixos valores percentuais de classificação (76,00 % e 61,70 % para amostras de vinho branco e tinto, respectivamente), sugerindo que algumas dessas amostras de vinhos analisados pode ser produto de mais de uma variedade. Conseqüentemente, as análises de vinhos por ESI FT-ICR MS podem ser usadas para discriminação, mas requerem antes um forte modelo matemático junto,

construído com as informações espectrais das amostras puras e misturas de amostras para melhorar as percentagens de classificação.

RIZZON, ZANUZ E MIELE (1997) realizaram um trabalho de avaliação do efeito da fermentação maloláctica (FML) na composição dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Isabel, elaborados em pequena escala, safra de 1995. Dezoito variáveis foram avaliadas antes e após a FML. Os resultados mostraram que houve degradação do ácido málico; diminuição da acidez total, do extrato seco, do extrato seco reduzido e da intensidade de cor; e aumento do pH, da acidez volátil, da relação álcool em peso/extrato seco reduzido. Entre os compostos voláteis, verificou-se a formação de lactato de etila e da acetoína. O ácido tartárico e o ácido málico foram determinados por cromatografia líquida de alta resolução utilizando detector colorimétrico. O lactato de etila, a acetoína (acetil metil carbinol) e o butanodiol-2,3 (2,3-butileno glicol) foram determinados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chamas (GC-FID) e uma coluna com 10% de Carbowax 1540 como fase estacionária. RIZZON e MIELE (2001) também realizaram um trabalho com o objetivo de determinar a concentração de ácido tartárico nos vinhos da Serra Gaúcha. Foram 288 amostras analisadas de vinhos tintos Isabel, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Merlot e de vinhos brancos Chardonnay, Riesling Itálico e Moscato. As análises foram feitas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com um detector de arranjo de diodos, a separação foi realizada em fase reversa, com uma coluna Varian MCH-NCAP-5 e a leitura foi feita a 212 nm. Os resultados evidenciaram que o teor médio do ácido tartárico do vinho Isabel ($5,0 \text{ gL}^{-1}$) foi significativamente maior que o teor dos demais vinhos. Numa classificação inferior ao vinho Isabel, ficou o vinho Riesling Itálico ($3,1 \text{ gL}^{-1}$) que foi similar ao do Chardonnay ($2,6 \text{ gL}^{-1}$), mas significativamente maior que as concentrações dos vinhos Cabernet Sauvignon ($2,2 \text{ gL}^{-1}$), Cabernet Franc ($2,3 \text{ gL}^{-1}$), Merlot ($2,4 \text{ gL}^{-1}$) e Moscato ($2,2 \text{ gL}^{-1}$). Esse mesmo grupo de pesquisadores avaliou em outro trabalho conjunto, a composição físico-química de vinhos Merlot elaborados na Serra Gaúcha (RIZZON E MIELE, 2009), visando a sua identidade varietal, à caracterização regional e à formação de um banco de dados. Foram analisados 34 vinhos, safras 2000 a 2003, de 30 vinícolas. As análises foram feitas na Embrapa uva e vinhos, em Bento Gonçalves, RS. As determinações clássicas foram efetuadas por meio de métodos físico-químicos; os elementos minerais, por espectrofotometria de absorção atômica; e os compostos voláteis, por cromatografia em fase

gasosa. Os resultados mostraram que os vinhos Merlot se enquadraram nos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Foram observados valores elevados de matiz e baixos índices de cor avaliados a 520 nm e 620 nm, variáveis que participam do aspecto visual dos vinhos. Foram constatados teores elevados de acetato de etila e 1-propanol, que são compostos voláteis que influenciam as características sensoriais, e de K, interferindo na acidez e na conservação do vinho. A concentração de metanol também foi elevada. O mosto da uva de Bento Gonçalves-RS também foi avaliado quanto ao teor de ácidos tartárico e málico por RIZZON e SGANZERLA (2007) que analisaram 81 mostos de uvas tintas: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot e Isabel, e 56 mostos de uvas brancas: Chardonnay, Riesling Itálico, Moscato e Niágara. As determinações foram efetuadas por HPLC. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tuckey para comparação das médias. Os resultados evidenciaram predominância do ácido tartárico em relação ao málico, em todos os mostos, e teores mais baixos de ácido tartárico e málico nas uvas do grupo das americanas Isabel e Niágara em comparação com às *Vitis vinífera*.

2.5 Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos caracterizados pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono arranjados na forma de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensada por um oxigênio ($C_6-C_3-C_6$) como mostra a **Figura 2.11**. Os flavonóides são divididos em classes dependendo do estado de oxidação e do padrão de substituição do anel central (RIBÉREAU-GAYONET *al.*, 2006). Dentre as várias classes de flavonóides, temos interesse particular nesse estudo pelos flavonóis, flavanas e antocianinas, pois esses compostos são os mais importantes no vinho. Essas moléculas são encontradas nas formas livres ou glicosiladas, como por exemplo, taxifolina glicosilada (m/z 465,10393), 3-O-taxifolina raminosilada (m/z 449,10930) e 3-O-miricetina raminosilada (m/z 463,08813). Os íons correspondentes ao 3-O-quempferol raminosilada (m/z 431,09951) e quercetina (m/z 301,03529) são encontrados em quantidades relativamente baixas no vinho assim como miricetina (m/z 317,03010) (PIETRA, 2000).

ANDRADE et al. (2001) estudaram sete variedades de uvas do Porto (Tinta Roriz, Tinta Barroca, Tinta amarela, Tinta Cão, Touriga Francesa, Touriga Nacional e Rufete). Nesse trabalho, eles determinaram diferenças de composição entre as variedades de uva e empregaram o método SPE-HPLC. Embora não houvesse variações qualitativas, existem diferenças quantitativas nas concentrações individuais dos compostos fenólicos. Nas variedades Tinta Cão e Rufete, a (-) epicatequina foi o principal composto. Todas as amostras mostraram quantidades significantes de quemferol 3- glicosídeo, com exceção da variedade Rufete, onde este composto estava presente em baixo nível de detecção.

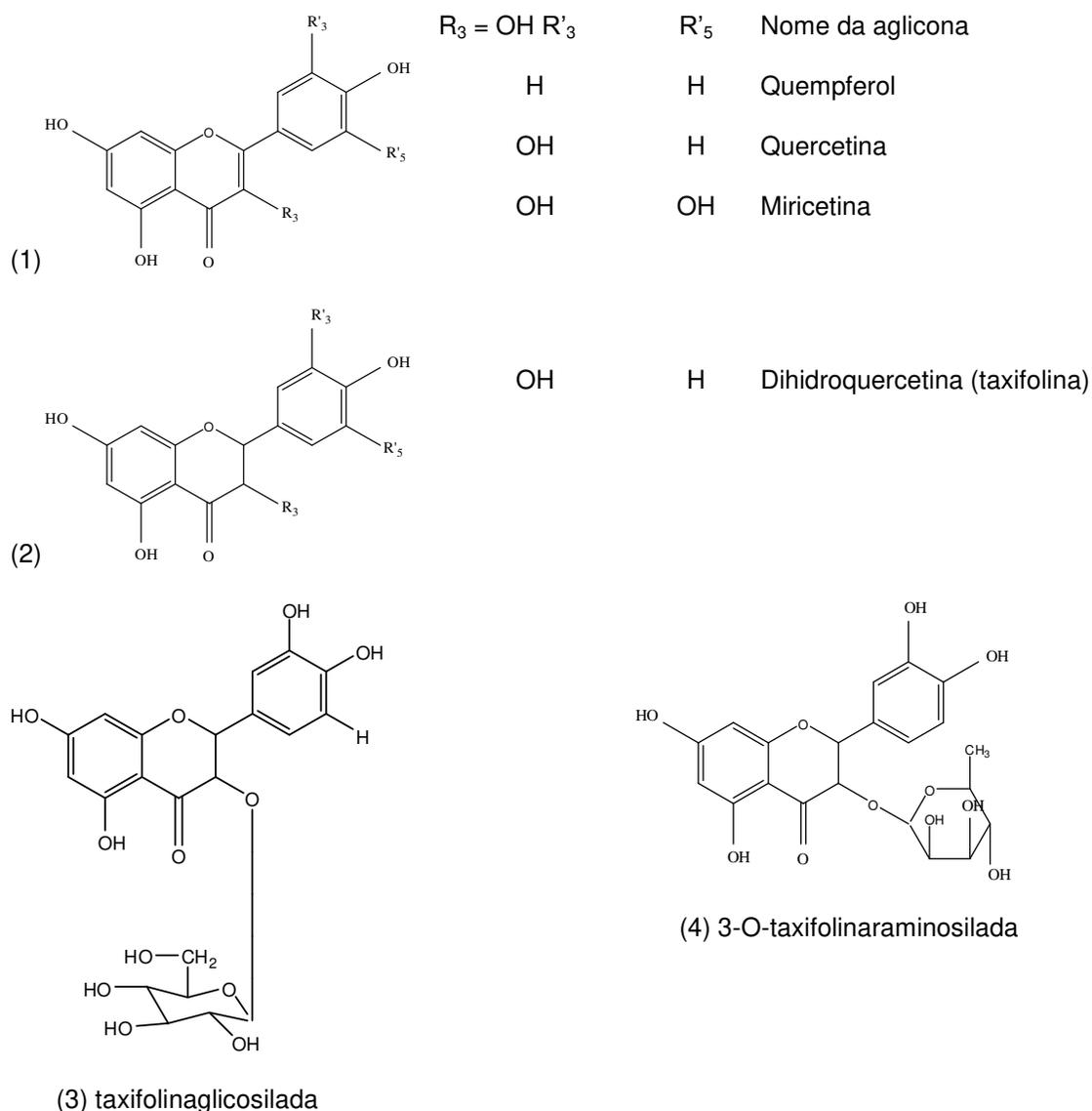


Figura 2.11 Estrutura química dos flavonóides: 1) flavona ($R_3=H$), e flavonol ($R_3=OH$); 2) flavanona ($R=H$), flavanonol ($R_3=OH$) e suas formas glicosiladas.

FANG et al. (2007) desenvolveram um método baseado em HPLC para que 10 flavonóides e duas flavonas pudessem ser identificados em um único experimento. A separação cromatográfica desses flavonóides foi realizada em uma única corrida, usando como fase móvel a mistura acetonitrila-metanol-água (1% tetrahidrofurano, THF) a 20 °C, fluxo de 1,0 mlmin⁻¹ e comprimento de onda 360 nm. Os compostos analisados foram quercetina, quemperol, miricetina, 7-metilquercetina, rutina, morina, galangina, fisetina, apigenina e luteolina. Nesta base, eles investigaram as mudanças de flavonóis e flavonas contidas no vinho tinto estocado em três diferentes barris de carvalho com tempos diferentes de envelhecimento nos mesmos barris, isto porque esta é uma etapa muito importante durante a produção do vinho e grandes mudanças físico-químicas ocorrem durante este período. Estes podem proporcionar uma base substancial para pesquisas futuras no controle de flavonóides durante o processo de vinificação.

STECHEER et al. (2001) investigaram os benefícios causados à saúde pelos flavonóides e estilbenos do vinho tinto, desenvolvendo um novo método de cromatografia líquida de alta eficiência e fase reversa (RP-HPLC) com separação aprimorada e melhoria de seletividade, sensibilidade, e velocidade na determinação dos flavonóides quercetina, miricetina e quemperol e os estilbenos *cis*- e *trans*- resveratrol em uma única corrida. Diferentes detectores de absorvância-UV, fluorescência (FLD), e a espectrometria de massas (MS) também foram avaliados. A detecção por absorvância-UV com comprimento de onda 320 nm para os estilbenos e 377 nm para os flavonóides permitiu sua determinação até a faixa de nanograma com uma linearidade de $R^2 > 0,9999$ (faixa linear 50 ngmL⁻¹ a 50 µgmL⁻¹). Os valores médios calculados para recuperação foram de 95 e 105 % para todos os analitos. Para o resveratrol, a detecção por fluorescência foi altamente seletiva, duas vezes mais sensível que a detecção por UV, e linearidade satisfatória ($R^2 > 0,9996$). Para a detecção de compostos glicosídicos hidrofílicos e rutina, que coeluem com outros compostos hidrofílicos, o método de RP-HPLC validado foi acoplado ao um espectrômetro de massas com analisador *ion-trap* via uma interface de eletrospray (ESI) com 25 % de solução de amônia como aditivo no modo negativo. A detecção empregando MS foi altamente linear ($R^2 > 0,9878$; faixa linear entre 50 ngmL⁻¹ a 50 µgmL⁻¹) para os analitos investigados, e os limites de detecção estavam numa faixa baixa da ordem de nanograma. A detecção por espectrometria de massas quando comparada à detecção de UV resultou num aumento de

200% de intensidade de sinal para a miricetina e 400 % de aumento para quercetina e quemperol, porém sinais de intensidade igual para resveratrol. Os valores médios de recuperação foram 102% para miricetina. A dissociação induzida por colisão (CID) também foi usada para obter os *fingerprints* das fragmentações características e assim facilitar as análises qualitativas e quantitativas até mesmo em matrizes complexas. Finalmente, este método hifenado HPLC-ESI-MS foi altamente adequado e uma melhoria essencial comparado com a detecção por fluorescência e por absorvância-UV.

Os flavonóides são os metabólitos secundários originários de plantas mais difundidos e comuns. Eles possuem ampla atividade fisiológica e biológica e são considerados marcadores quimiotaxonômico. Por isso, têm sido extensivamente investigados desde os períodos mais remotos aos anos recentes, e seu interesse tem aumentado. Na pesquisa por novos compostos, assim como no controle de qualidade, existe a necessidade por novas e confiáveis metodologias para análises de flavonóides. A Espectrometria de Massas fornece uma contribuição inestimável por conta da sua alta sensibilidade, possibilidade de acoplamento com diferentes técnicas cromatográficas, ou seja, GC/MS, CE/MS e especialmente LC/MS uma vez que esta permite a determinação qualitativa e quantitativa, além de informações estruturais mais detalhadas podem ser obtidas quando se recorre à espectrometria de massas seqüencial (MS/MS) combinada à dissociação induzida por colisão (CID). No que dizem respeito à caracterização estrutural de flavonóides, informações podem ser obtidas a partir (1) do radical aglicona, (2) o tipo de carboidrato (mono-, di-, tri- ou tetra sacarídeos e hexoses, desoxihexose ou pentoses) ou ainda outros constituintes presentes, (3) atribuições estereoquímicas de unidades de monosacarídeos terminais, (4) a sequência de unidades gliconas, (5) ligações interglicosídicas e (6) pontos de ligação dos substituintes das agliconas. Um trabalho de revisão completo foi apresentado por CUYCKENS e CLAYES (2004), onde são considerados métodos de preparo de amostras e procedimentos de análises por LC-MS e LC/MS/MS para caracterização de flavonóides agliconas, O-glicosídeos, C-glicosídeos e glicosídeos acilados.

PIETRA (2000) apresentou numa revisão completa os aspectos estruturais e a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* dos flavonóides mais comuns, com seus efeitos antioxidantes endógenos. Os flavonóides são substâncias fenólicas isoladas a partir de uma vasta gama de plantas, com mais de 8000 compostos conhecidos. Eles atuam em plantas

como antioxidantes, fotoreceptores, atratores visuais, repelentes de predadores e para captação de luz. Muitos estudos sugerem que os flavonóides exibem atividades biológicas, incluindo ação antiartrérgica, antiviral, antiinflamatória e vasodiladoras. Contudo, o maior interesse nos flavonóides deve-se a atividade antioxidante dos flavonóides, que ocorre devido sua habilidade em reduzir a formação e aumentar a remoção dos radicais livres. A capacidade dos flavonóides de atuarem como antioxidantes *in vitro* tem sido o assunto de muitos estudos no passado, e a importante relação estrutura-atividade tem sido estabelecida. A eficácia antioxidante dos flavonóides *in vivo* é menos documentada, presumivelmente por causa do conhecimento limitado humano de sua captação. A maioria dos flavonóides ingeridos é extensivamente degradada em ácidos fenólicos, alguns desses ainda possuem a habilidade de limpeza dos radicais. Ambos, os flavonóides e seus metabólitos absorvidos podem exibir uma atividade antioxidante, que é evidenciada experimentalmente pelo estado de aumento de antioxidantes no plasma, poupando o efeito da vitamina E nas membranas eritrócitas e de baixa densidade lipoprotéica, e a preservação das membranas eritrócitas poli insaturadas de ácidos graxos.

2.6 Antocianinas

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides, compostos fenólicos que apresentam como estrutura básica o cátion flavílio 2-fenil-benzopirílio (**Figura 2.12**). O pH exerce forte influência na cor das antocianinas, assim como na sua estabilidade. As antocianinas são mais estáveis em meio ácido do que neutro ou alcalino. No vinho, podem existir sob quatro formas estruturais em equilíbrio, incluindo o catio flavílio $[M^{++H}]^+$ de cor vermelha. Os pigmentos se apresentam na forma de antocianinas, que são mais estáveis que as antocianidinas que não possuem grupos glicosídeos. As antocianinas do gênero *Vitis* são a cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina, e malvidina. As suas quantidades relativas variam com a casta, mas a malvidina é sempre a maioritária. É característico das *Vitis viníferas* encontrar-se uma molécula de glicose na posição 3, uma vez que outras são diglucósidas nas posições 3 e 5. Os principais ácidos que podem esterificar a glicose na posição 6, são o cafeico, p-cumárico e o acético (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

WANG, RACE e SHRIKRANDE (2003) desenvolveram um novo método de cromatografia líquida e fase reversa (RP-HPLC) acoplada à espectrometria de massas com analisador íon trap e interface eletrospray (ESI-MS) para caracterização de antocianinas em

sucos de uva Concord, Rubired e Salvador. As variedades Rubired e Salvador são híbridas de *Vitis vinífera* e *Vitis rupestris*, respectivamente. A Concord é uma uva nativa da variedade americana *Vitis labrusca*. As antocianinas individuais foram identificadas nas três variedades com base nos espectros de UV-vis e de massas, e suas estruturas elucidadas por espectros de MS/MS. As antocianinas encontradas nas uvas Salvador e Concord foram 3-O-glucosídeo, 3-O-(6''-O-cumaril) glicosídeo, 3-O-(6''-O-p-acetil) glicosídeo, 3,5-O-diglicosídeos e 3-O-(6''-O-p-cumaril)-5-O-diglicosídeo de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina. A antocianina Vitisina B foi detectada em suco da uva Salvador. As antocianinas no suco de uva Rubired foram principalmente antocianinas diglicosiladas: peonidina 3,5-O-diglicosídeo, malvidina 3,5-O-diglicosídeo, peonidina 3-O-(6''-O-p-cumaril)-5-O-diglicosídeo e malvidina 3-O-(6''-O-p-cumaril)-5-O-diglicosídeo são as quatro principais antocianinas. A presença de pelargonidina 3-O-glicosídeo, não relatado antes, foi detectada pela primeira vez nos três sucos.

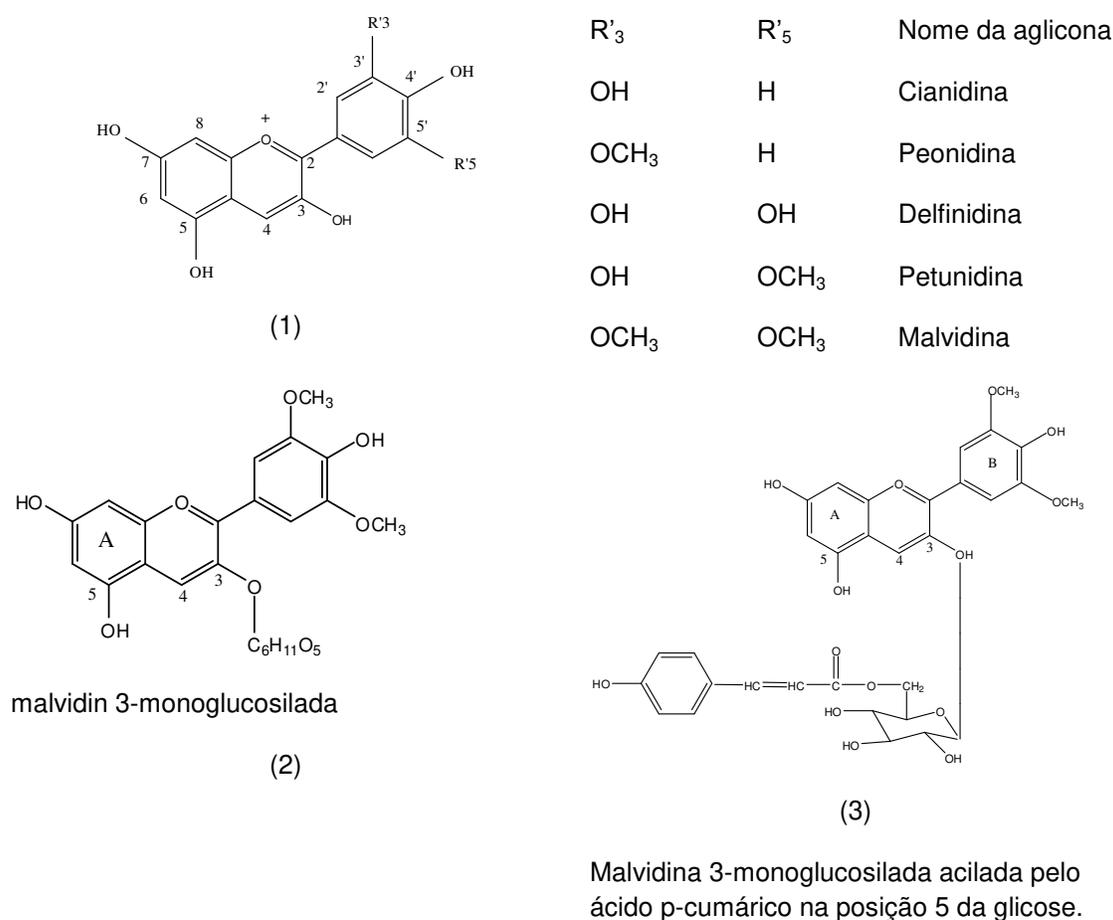


Figura 2.12 Estruturas químicas das antocianinas encontradas nos vinhos por ESI (+).

MATEUS et al (2002) analisaram os pigmentos derivados das antocianinas em vinhos do Porto com o objetivo de tentar identificar novos pigmentos formados nesses vinhos tintos. As amostras foram purificadas por coluna em gel HW-40 (250 x 16 mm i.d.), produzindo duas frações. A primeira fração (A) foi eluída com água: metanol 20% (v/v) e a fração B foi eluída com metanol 100% (v/v). A elucidação estrutural dos pigmentos detectados foi realizada empregando LC/DAD-MS. Diversos pigmentos derivados das antocianinas foram detectados. A primeira fração foi composta principalmente por malvidina-3-glicosídeo e seus derivados com ácidos pirúvicos. Além disso, outros derivados de antocianina com ácido pirúvico foram também detectados. A fração B continha três grupos de pigmentos derivados de antocianinas: (1) pigmentos em que as antocianinas estão ligadas a unidades de catequina via ligação etílica; (2) pigmentos em que as antocianinas estão ligadas a unidade de catequina ou a um dímero de procianidina via ligação vinila; (3) pigmentos em que as antocianinas estão ligadas a grupos 4-vinilfenol. As características espectrais UV-vis da maioria dos pigmentos mostram que eles contribuem para a mudança de coloração do vinho do Porto de roxo avermelhada para uma tonalidade mais laranja avermelhada. BERENTE et al. (2000) desenvolveram um método simples e rápido de HPLC sem pré tratamento de amostra para separação de antocianinas em vinhos tintos usando uma fase estacionária com pH estável. A linearidade e a robustez do método foram avaliadas, e análises investigativas foram feitas para avaliar a conservação das antocianinas nos vinhos em diferentes temperaturas com e sem a presença de ar. A classificação de 52 amostras de vinhos alemães foi realizada através dos métodos estatísticos multivariados. Os dados mostraram que ambos a temperatura e o contato com o ar aceleraram o processo de degradação das antocianinas nos vinhos: a perda de antocianinas em 69 dias foi de 24% quando mantidas em garrafas fechadas a temperatura ambiente, mas sem contato com o ar, de 33% em amostras que foram resfriadas a 4 °C mas em contato com o ar em um refrigerador e perda de 91% em amostras estocadas em temperatura ambiente e em contato com o ar. O armazenamento a -18 °C em freezer foi o mais apropriado para guardar as amostras por períodos longos. Não foram observadas perdas significativas de antocianinas quando as amostras de vinhos foram congeladas e descongeladas várias vezes. REVILLA et al. (1999) identificaram novos compostos derivados de antocianinas em extratos de casca de uva e vinhos tintos por HPLC-DAD-MS. Um método de separação proposto para separação desses compostos, possibilitou

que a identificação das principais moléculas do vinho por análises diretas, sem tratamento prévio da amostra. As antocianinas que compõem os diferentes extratos da casca de uvas tintas e vinhos monovarietais comerciais foram determinadas através desse método. Alguns derivados de antocianinas descritos recentemente e que supostamente são formados durante a maturação do vinho foram também investigados. Os resultados mostraram que alguns desses derivados estão presentes em uvas e vinhos jovens. A combinação do detector de arranjo de diodos com a espectrometria de massas tem se mostrado essencial na identificação de derivados de antocianinas. As análises de MS foram realizadas nas seguintes condições: meio ácido, ionização no modo positivo e baixa voltagem de fragmentação (60 V). Os compostos mais abundantes encontrados em uvas e vinhos são os derivados glicosilados, principalmente delphinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, enquanto quantidades muito pequenas de cianidina 3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo foram encontradas, sendo até mesmo insignificantes. Quantidades baixas de ésteres acéticos de antocianinas foram identificadas, e até mesmo alguns derivados caféicos tais como malvidina-(6 cafeil)-3-glicosídeo foi detectado. Os compostos derivados da mavidina (Vitisina A e Vitisina B) foram distinguidos pela sua alta resistência à perda de coloração com adição de SO₂, exposição a valores elevados de pH, e aumentaram a estabilidade das antocianinas glicosiladas. Por causa da sua grande estabilidade, este grupo de derivados de antocianinas não foi afetado pelas reações de envelhecimento do vinho após vários meses de maturação. Portanto, podem ser em alguns casos as antocianinas mais abundantes. Além disso, podem ser encontradas em vinhos jovens e em extratos de uvas em pequenas quantidades em relação a outras antocianinas.

BURNS et al. (2002) investigaram as variações nos perfis e conteúdo de antocianinas de vinhos feitos a partir de uvas Cabernet Sauvignon e híbridos. A detecção de adulteração de vinhos foi proposta pela relação entre nove antocianinas características conjugadas acetiladas e p-cumariladas que pode ser usada para determinar se um vinho é derivado de uvas Cabernet Sauvignon ou de híbridos. Este teste teve implicações comerciais significativas, uma vez usadas para decidir se os vinhos rotulados como Cabernet Sauvignon seriam autênticos e se poderiam ser importados na Alemanha. Para avaliar a veracidade desta abordagem, 24 vinhos foram analisados, sendo 4 destes produzidos a partir de híbridos e 20 de Cabernet Sauvignon, de vinhas entre 1993 a 2000. Somente 13 dos vinhos Cabernet

Sauvignon continham todas as nove antocianinas características, e a relação entre os derivados acetilados e cumarilados variaram de 1,2 a 6,5. Isto foi uma evidência de que o uso do método da relação entre as antocianinas é falho e que o exame do perfil completo de antocinaininas e/ou a investigação da proporção de antocianinas acetiladas e monoglicosiladas é uma melhor abordagem para distinguir entre vinhos Cabernet Sauvignon e híbridos. Cinco monoglicosilados de antocianinas delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, e malvidina foram identificadas pelo tempo de retenção, ordem de eluição, espectros característicos e ainda pelo uso de LC-MS/MS para confirmar a presença do íon M^+ e $M^+ - 162$ U (correspondente a perda de uma molécula de glicose). Da mesma forma, os conjugados de acetilglicosídeo p-cumarilglicosídeo de malvidina e peonidina pela perda de 204 U, no caso da perda de acetilglicosídeo e pela perda de 308 U para p-cumarilglicosídeo. A técnica de cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) com detecção de absorvância de 520 nm foi usada para quantificar nove principais antocianinas do vinho. Uma característica marcante do vinho híbrido é a presença de delphinidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3,5-diglicosídeo, petunidina 3,5-diglicosídeo, peonidina 3,5-diglicosídeo e malvidina 3,5-diglicosídeo. A presença de malvidina e peonidina conjugadas acetiladas e p-cumariladas têm sido amplamente relatadas e estão entre as nove principais antocinaininas quantificadas para validação desse estudo. Os perfis dos vinhos híbridos foram bem diferentes dos vinhos Cabernet Sauvignon. Os compostos 3-glicosídeo de delphinidina, petunidina, peonidina e malvidina foram detectados nos vinhos híbridos. Comparado aos vinhos Cabernet Sauvignon, os híbridos têm maior proporção de antocianinas mono e diglicosiladas. A validação do método com relação às antocianinas foi falho, uma vez que o nível de fenólicos, incluindo as antocianinas, no vinho depende de muitos fatores (Ex: vinificação). MAZZUCA et al. (2005) utilizaram a cromatografia líquida com a espectrometria de massas e ionização por eletrospray (LC-ESI-MS) como ferramenta básica para diferenciação entre vinhos de *Vitis vinífera* e híbridos através do perfil das antocianinas. As antocianinas 3-O-monoglicosídeo e as acetil-, p-cumaril e cafeil-monoglicosídeo ocorreram somente em *Vitis vinífera*, enquanto que as antocianinas 3,5-O-diglicosídeo e as substituídas acetil-, p-cumaril-, ferulil-, e cafeil-diglicosídeo foram os pigmentos adicionais encontrados nas uvas híbridas. O procedimento foi aplicado para identificação das variedades de uvas vermelhas baseado na determinação do tipo de antocianinas. As variedades de uvas tintas apresentaram, em particular, uma

antocianina 3,5-O-diglicosídeo e novas classes de antocininas monoglicosídeos, tais como cianidina-3-O-, cianidin-3-O-(6-O-acetil) e cinanidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)-pentosídeo, que as classificaram como híbridas. Uma segunda variedade de uva, caracterizada exclusivamente por antocianinas 3-O-monoglicosídeo foi incluída entre as espécies *Vitis vinífera*. A caracterização do perfil das antocianinas pela espectrometria de massas pode representar o núcleo no procedimento quimiotaxinômico para distinção entre uvas Européias e Americanas baseada na identificação de modificações de antocianinas sintetizadas posteriormente. Os resultados baseados no perfil de antocianinas por MS mostraram claras evidências da classificação incorreta da uva *Casavecchia* porque antes acreditava-se pertencer à espécie *Vitis vinífera*, sendo na verdade uma uva híbrida, já a variedade *Pallagrello* foi corretamente classificado como da espécie *Vitis vinífera*. Por revelar a presença de qualquer antocianina 3,5-O-diglicosídeo ou derivados relacionados como marcadores de uvas híbridas usados por vinicultores, o benefício dos procedimentos em longo prazo para obter o perfil de antocianinas reside no fornecimento de um meio para garantir a autenticidade do vinho tinto. HEIER et al. (2002) forneceram um método de HPLC-ESI-MS para análise de antocininas de vinhos tintos capaz de detectar sessenta e seis diferentes antocianinas em uma amostra de vinho produzido no ano de 1997. Essas antocianinas são bem conhecidas no vinho (mono e diglicosídeo). Além desses, os raros ésteres de ácido acético e ésteres de ácido cumárico dos diglicosídeos puderam ser identificados. Alguns recentemente descritos e alguns novos pigmentos derivados de antocininas formados pela maturação do vinho foram também detectados. Dímeros de catequinas bem como derivados de acetaldeído e ácido pirúvico de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, e mavidina estavam presentes no vinho de um ano de idade, estes últimos nas suas formas acetiladas e cumariladas. ZHAO, DUAN e WANG (2010) identificaram as antocianinas da variedade de uva *V. amurensis* através da técnica HPLC-ESI-MS/MS. Como resultado, foram identificadas 17 antocianinas, sendo 11 antocininas monoglicosídeos e 6 diglicosídeos. Dos 15 tipos de antocianinas indentificadas no vinho, seis eram diglicosídeos e nove monoglicosídeos de antocininas, e dessas quatro eram piranoantocianina monoglicosídeo (petunidina-3-O-glucosídeo-4-acetaldeído, malvidina-3-O-glucosídeo-4-pirúvico, malvidina-3-O-glucosídeo-acetaldeído e peonidina-3-O-glucosídeo-4-pirúvico) foram detectadas. Além disso, dos 14 tipos de antocianinas identificadas na casca da uva, seis eram diglicosídeos e oito monoglicosídeos

de antocianinas, sendo duas piranoantocianinas monoglicosídeos (peonidina-3-O-glucosídeo-4-pirúvico, malvidina-3-O-glicosídeo-4-vinilfenol) e uma piranoantocianina acilada monoglicosídeo (malvidina-3-O-(6-O-acetil)-glucosídeo-4-vinilfenol). Os perfis da uva *V. amurensis* e seus híbridos são constituídos por antocianinas monoglicosídeos, diglicosídeos e piranoantocianinas. Os vinhos dessas variedades possuem uma distribuição das antocianinas levemente diferenciada. A pelargonina-3,5-diglucosídeo foi encontrada pela primeira vez na casca e no vinho da uva *V. amurensis*, porém a forma acetilada não foi detectada no vinho. HAYASAKA e ASENSTORFER (2002) desenvolveram e aplicaram um método para rastreamento de pimentos em potencial de vinhos tintos empregando a técnica ESI e nano-ESI-MS/MS. Quatorze agliconas foram identificadas como originárias de malvidina pelos espectros MS/MS. As estruturas propostas de agliconas foram de antocianinas substituídas no C4 na ligação vinil entre C4 e o grupo hidroxila do C5. Os derivados de antocianinas identificados nos extratos dos vinhos foram vinil, vinilmetil, ácido vinilfórmico, 4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol e adutos de vinilcatequina de malvidina bem como os ácidos vinilfórmicos e adutos de 4-vinilfenol de peonidina e petunidina. A presença de álcool vinílico: 4-vinilcatecol, e derivados de 4-vinilsiringol de malvidina também foram propostos.

WANG e SPORNS (1999) aplicaram pela primeira vez a técnica de espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por uma matriz (MALDI-MS) em análises qualitativas e quantitativas de antocianinas em vinhos tintos e sucos de fruta. A técnica MALDI-MS é uma nova poderosa ferramenta que tem grande impacto na análise de alimentos. Este estudo empregou 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP) como matriz para análises das antocianinas pois proporcionou a melhor repetibilidade ponto a ponto na placa de ionização. Após um preparo simples de amostra, a presença das massas molares das antocianinas como cations foram encontradas nas proporções esperadas para as frutas. A quantificação das antocianinas foi possível através da escolha apropriada de padrões internos. A resposta do MALDI-MS foi linear, grupos de derivados de antocianinas tiveram similar resposta, e a adição de padrão interno não teve efeito na resposta relativa de outras antocianinas. Esta técnica pode dar uma contribuição significativa no uso dos *fingerprints* das antocianinas para determinar a autenticidade de amostras de alimentos e bebidas e na exploração de novas variedades de frutas.

2.7 Hidroxinamatos

A terceira classe mais abundante de fenólicos solúveis da uva são os ésteres hidroxinamatos, que se encontram presentes nas células epiteliais da casca e da polpa juntamente com taninos e antocianinas (ADAMS, 2006). Esses compostos são abundantes em vinhos e sucos, sendo a forma estrutural *trans* a mais comum como mostra a **Figura 2.13**. Do ponto de vista químico são compostos biofenólicos que desempenham papel importante na qualidade do vinho. Eles contribuem com as propriedades sensoriais, tais com sabor, adstringência, aroma e cor (ANDRADE et al., 2011). Além disso, são responsáveis pelos efeitos fisiológicos benéficos à saúde humana, devido suas propriedades antioxidantes, sendo sua determinação importante para monitorar variações durante o processo de maturação da uva e mudanças durante o processo de vinificação e envelhecimento do vinho (MONAGA, BARTOLOMÉ e CORDOVÉS, 2005). Os ésteres hidroxinâmicos do ácido tartárico (ácido mono-p-cumariltartárico, ácido monocateiltartárico e ácido monoferuliltartárico) foram separados, identificados e quantificados em diversos vinhos tintos por HPLC-MS/MS. A análise direta do vinho sem preparo de amostra e do suco de uva com o mínimo preparo de amostra foi realizado por ESI-MS. Para a identificação, foram empregados dois tipos de analisadores: Triplo Quadrupolo (TQD) e Quadrupolo Tof (QTof). Os ácidos predominantes no vinho foi o ácido caftárico, seguido pelo ácido cutárico e ácido fertárico, respectivamente (BUIARELLI et al., 2010).

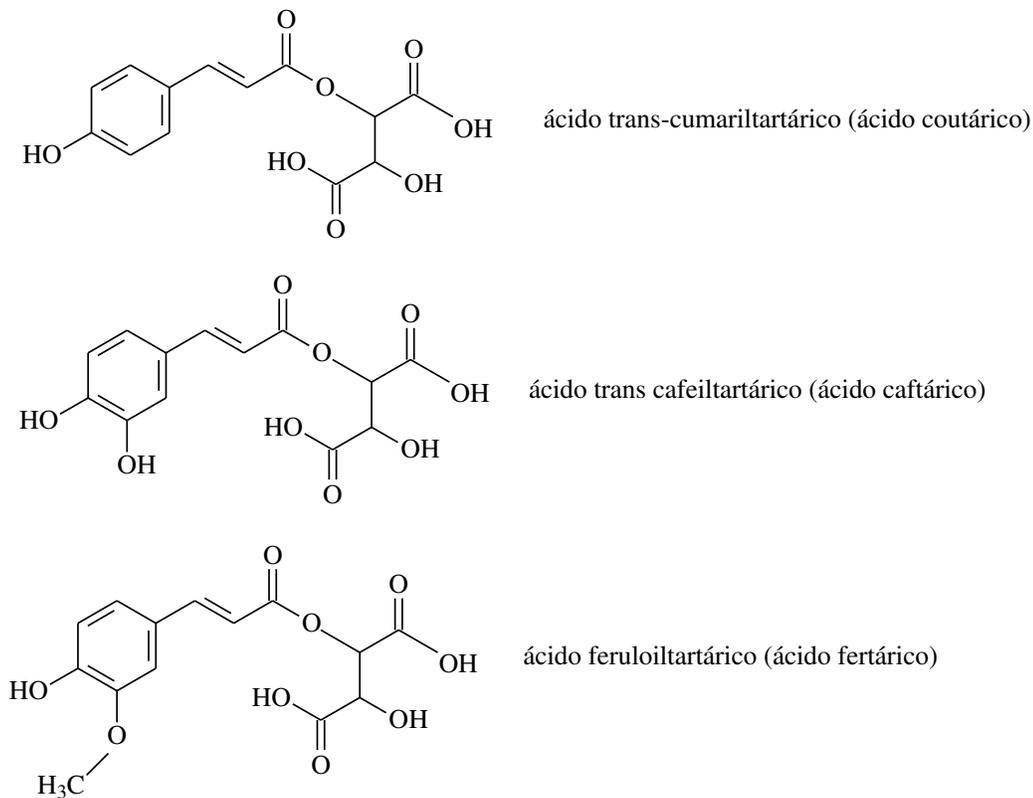


Figura 2.13 Estruturas dos hidroxicinamatos encontrados em uvas e vinhos.

2.8 Taninos

Os taninos consistem na classe mais abundante de polifenóis solúveis da uva formado por unidades poliméricas de flavan-3-ols. A estrutura de um tanino hipotético formado por quatro subunidades poliméricas é mostrada na **Figura 2.14**, onde; catequina, epicatequina, e epigalocatequina, são unidades de extensão, pois participam na ligação interna entre as flavonas através dos átomos de carbono na posição 4 e 8 da unidade adjacente. O galato de epicatequina é uma unidade interna que possui o átomo de carbono livre na posição 4 e ainda possui uma molécula de ácido gálico esterificado com o grupo hidroxila no átomo de carbono na posição 3. A catequina e epicatequina são as duas unidades de extensão mais importantes da uva, sendo a epicatequina a mais abundante dentre elas. Os taninos constituem usualmente o conjunto de biomoléculas mais diversificado da uva. Eles podem variar de tamanho, sendo formados por dímeros, trímeros e oligômeros formados por 30

subunidades de flavan-3-ols. Os taninos da casca diferem dos da semente quanto ao tamanho e ao tipo de unidades poliméricas. Por exemplo, os taninos da casca são maiores que os da semente e contém subunidades de epigalocatequina que por sua vez não são encontradas na semente. Contudo, os taninos menores da semente possuem maior proporção de subunidades de galato de epicatequina, que por sua vez não estão presentes na casca da uva (ADAMS, 2006).

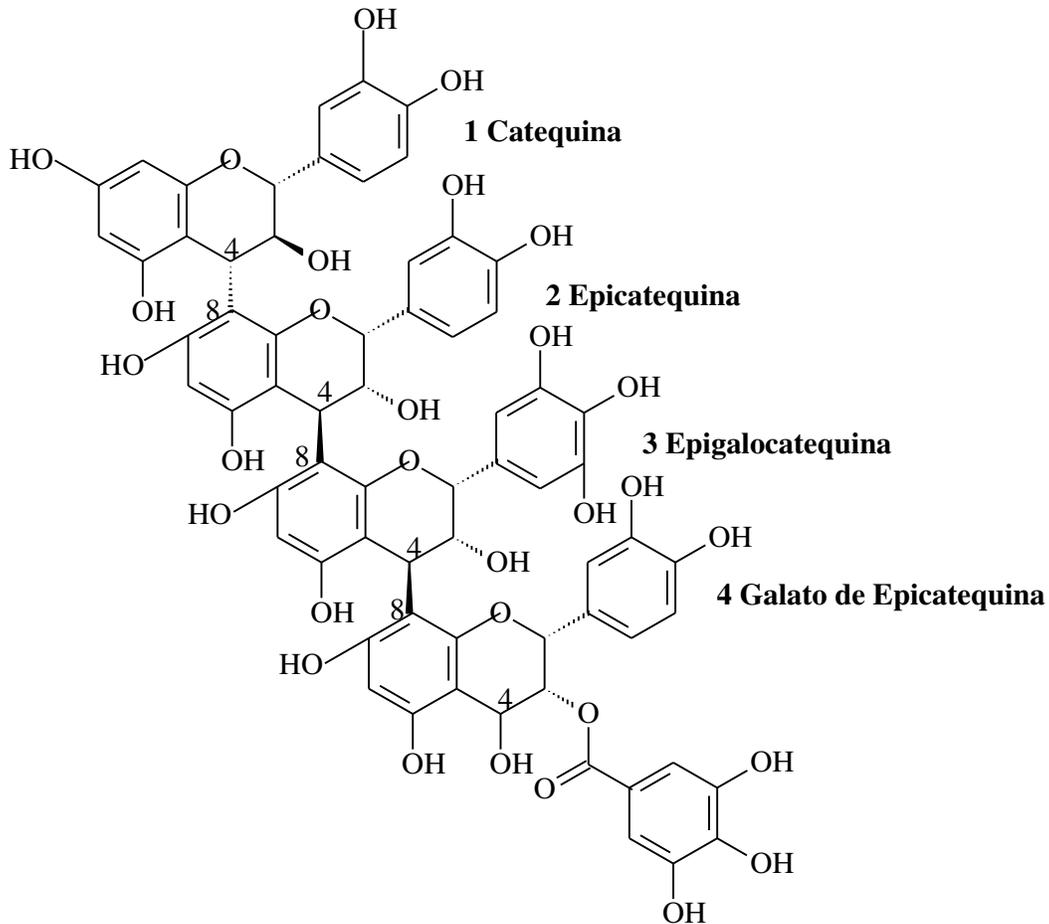


Figura 2.14 Estrutura de tanino condensado hipotético formado por quatro subunidades de flavonas: catequina, epicatequina, epigalocatequina e galato de epicatequina.

2.9 A Fenilalanina e a biossíntese dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de diferentes rotas, motivo pelo qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas

metabólicas básicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico, e a rota do ácido malônico. A rota do ácido chiquímico participa na biosíntese da maioria dos fenólicos solúveis da uva e do vinho, sendo considerada a mais importante (ADAMS, 2006). A biossíntese do fenilpropanóide geralmente se inicia com o aminoácido fenilalanina, que é produto da rota do ácido chiquímico. Um esquema ilustrativo da rota de biossíntese de fenólicos iniciada com fenilalanina é mostrado na **Figura 2.15**, com os compostos que se acumulam como produtos solúveis em uvas delineados por retângulos.

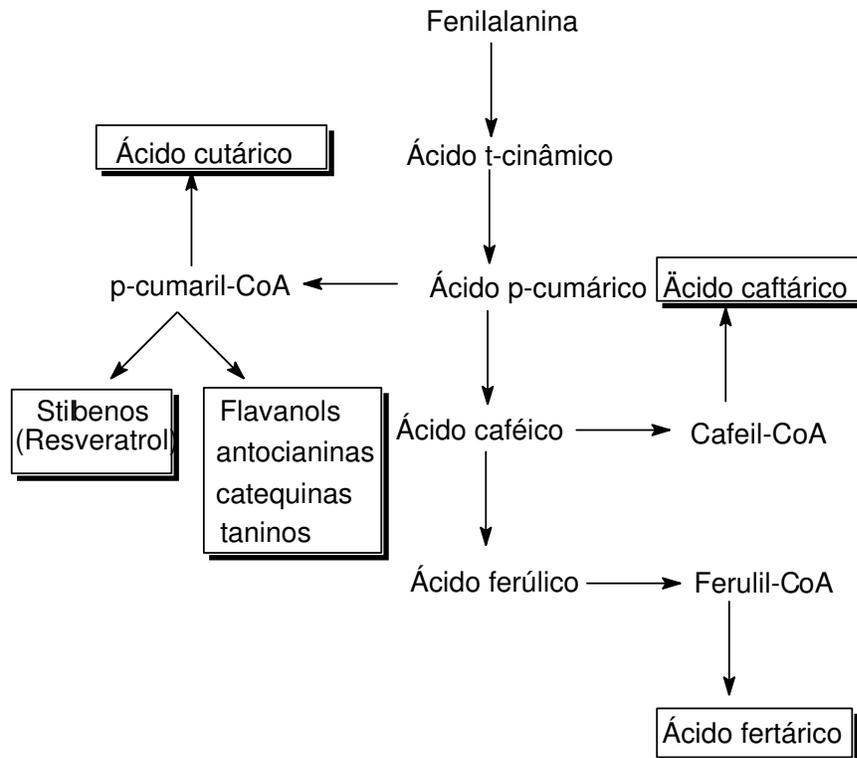


Figura 2.15. Rota de bioquímica das principais classes fenólicas mais solúveis encontradas na uva e vinho.

A concentração de fenilalanina, ácidos cinâmicos livres, e seus ésteres CoA é baixa na ausência de hidrólise de ésteres. Somente as antocianinas na casca parecem comportar-se como um típico produto final e parece mostrar pequenas mudanças desde quando formada. O diagrama da biossíntese dos flavonóides que se acumulam nas várias partes da uva é mostrada na **Figura 2.16**. Nele, as classes que se acumulam são destacadas por retângulos. A principal sequência biossintética dos flavonóides inicia-se com a reação de síntese da

chalcona, onde uma molécula de p-cumaril-CoA combina-se com três moléculas de malonil-CoA, formando uma chalcona e CO₂ (**Figura 2.17**).

A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico (ADAMS, 2006).

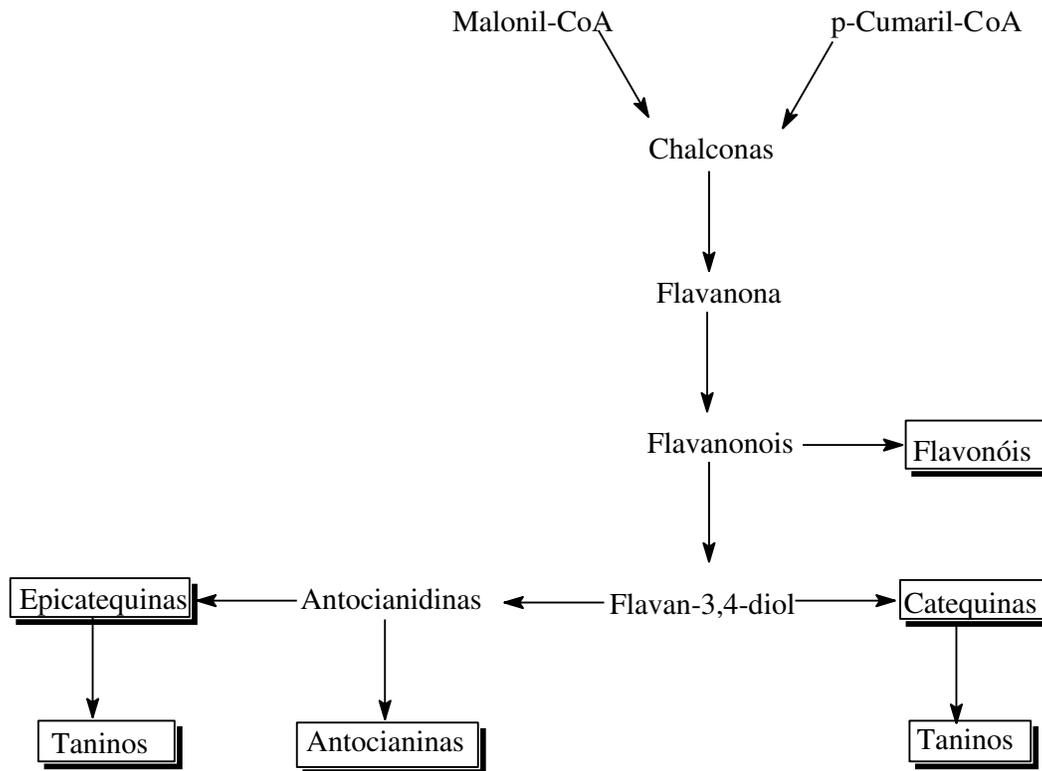


Figura 2.16 Rota bioquímica dos principais flavonóides encontrados na baga da uva. Os compostos que se acumulam na fruta são delineados por retângulos e os intermediários estão presentes em baixos níveis.

2.10 As antocianidinas e a biossíntese de taninos

A rota de biossíntese dos taninos está diretamente relacionada com as antocianidinas, que consistem em compostos intermediários durante todo o seu mecanismo de formação. Como já descrito anteriormente, catequina é 2,3-*trans*-flavan-3-ol, enquanto epicatequina é 2,3-*cis*. Esta estereoquímica é estabelecida pela reação de isomerase da chalcona. Por meio desta a flavan-3,4-diol é produzida pelo flavanonol por redução do dihidroflavanol que agora tendo a configuração 2,3-*trans*, é convertido diretamente em catequina por uma leucoantocianidina reductase (LAR) (**Figura 2.17**). Uma enzima capaz de produzir catequina a partir de 3, 4 - diol foi comprovada (STAFFORD e LESTER, 1984). Contudo, nenhuma enzima capaz de produzir epicatequina (2, 3- *cis*) da 2,3-*trans* flavan-3,4-diol foi descrita. Um estudo posterior mostrou que a epicatequina é produzida a partir da cianidina pela ação de uma enzima (antocianidina reductase: ANR) descrita pela primeira vez por XIE, SHARMA, PAIVA, FERREIRA e DIXON (2003). A ANR converte cianidina e delphinidina em epicatequina e epigallocatequina, respectivamente. Uma vez que a flavan-3,4-diol sofre quiralidade na conversão da correspondente antocianidina, a biossíntese de epicatequina procede através da antocianidina aquiral antes da ação de uma epirase e reductase no 3,4-diol (**Figura 2.18**). A UDP glucose-flavonóide 3-O-glucosil transferase (UGFT) é responsável pela conversão da antocianidina em antocianina (ADAMS, 2006).

FULCRANT et al. (2008) abordaram a aplicação da espectrometria de massas na caracterização de polifenóis de matrizes complexas. Os polifenóis de baixo peso molecular incluindo os oligômeros de proantocianinas foram analisados após a separação por HPLC utilizando colunas de fase normal e fase reversa. Contudo, essas técnicas cromatográficas levam muito tempo e podem atingir baixa resolução com o aumento da cadeia polimérica e da diversidade estrutural. A detecção de compostos de elevada massa molecular, bem como a determinação de distribuições de pesos moleculares são desafios que permanecem em análises poliméricas por MS. Algumas abordagens baseadas em análises por espectrometria de massas (MS) foram propostas por esse grupo de pesquisadores.

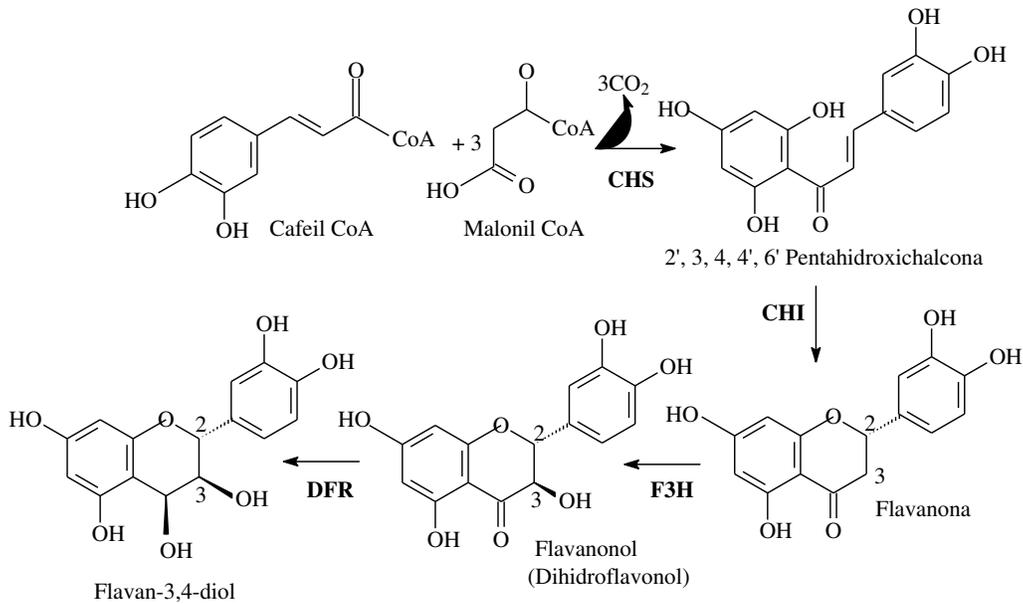


Figura 2.17. Rota da biossíntese de Flavan-3,4-diol a partir de cafeil-CoA e Malonil-CoA. CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, Flavanona-3-hidroxilase; DFR, dihidroflavonol-4-redutase.

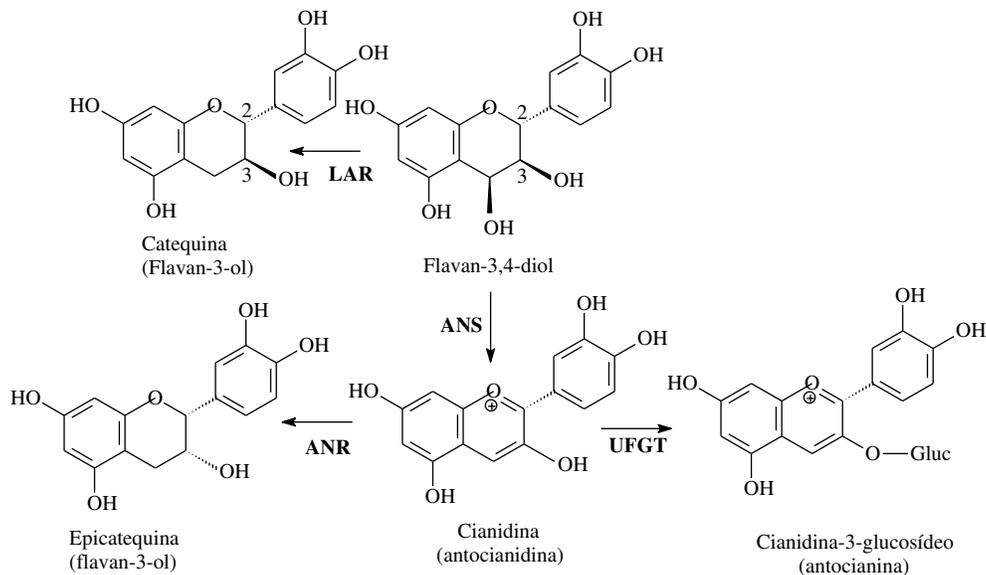


Figura 2.18 Formação de catequina, epicatequina, antocianidina (cianidina), cianidina-3-glucosídeo. LAR, leucoantocianidina redutase; ANS, antocianidina sintase; ANR, antocianidina redutase; UFGT, UDP glucose-flavonoide 3-O-glucosil transferase.

Assim, análises por espectrometria de massas e ionização por eletrospray com inserção direta podem ser usadas na determinação de *fingerprints* de polifenóis de extratos complexos, tais como o vinho. Esta técnica permite discriminar amostras com base no seu perfil fenólico (ou seja, antocianina, ácidos fenólicos e flavan-3-ol), porém oligômeros de massas moleculares elevadas foram pobremente detectados. A detecção de proantocianinas de elevada massa molecular foi também restrita empregando a ionização e dessorção a laser assistida por uma matriz (MALDI-MS), o que sugere dificuldade de dessorção desses íons para a fase gasosa. JAITZ et al. (2010) focaram seus estudos no desenvolvimento de um método analítico para separação e quantificação precisa de compostos fenólicos em vinhos tintos da Austrália. O método rápido de LC-MS/MS com inigualável sensibilidade e excelente limite de detecção foi determinado. A técnica de HPLC empregou a fase reversa e sub partículas de 2 µm como fase estacionária, permitindo análises com alto rendimento e tempo de corrida de 10 minutos para 11 compostos. O padrão fenólico de 97 amostras autênticas de vinhos foi avaliado (estocados sob as mesmas condições sem tratamento prévio de amostra), pertencentes a onze regiões geográficas da Austrália de seis variedades de uvas de cinco safras. A análise discriminante canônica foi aplicada no conjunto de dados, mostrando adequação dos espectros de fenólicos para classificação das amostras de vinhos. O método permitiu uma discriminação geográfica de diversas variedades de uvas de quatro regiões. Assim, uma nova e excelente descoberta baseada na diferenciação de polifenóis de cinco safras (2003-2007) foi conseguida. NUENGCHAMNONG e INGKANINAN (2009) empregaram a técnica de HPLC acoplada a um sistema de eliminação de radicais para identificar e caracterizar os compostos antioxidantes de vinhos de duas frutas da família da Myrtaceae, *Syzygium cumini* e *Cleistocalyx nervosum* var. *papiala*. Os compostos ativos foram identificados por comparação entre os tempos de retenção e dados de massas com os padrões autênticos e espectros de massas por HPLC-ESI-MS/MS. Os principais antioxidantes encontrados no vinho *S. cumini* foram misturas complexas de taninos hidrolisáveis e os ácidos da fruta. Uma quantidade em nível de traço de antocianina, malvidina 3-p-cumaril glicosídeo foi também encontrada. No vinho de *C. nervosum* var. *papiala*, os compostos ativos foram identificados como taninos hidrolisáveis e seus derivados, ou seja, ácido cafeilquínico, ácido gálico, ácido elágico e metoximetilgalato.

COOPER e MARSHALL (2001) introduziram a técnica de espectrometria de massas com ressonância ciclotrônica e transformada de Fourier (FT-ICR MS) para caracterização de cinco

vinhos (California Red, Corbiere, Zinfandel, Beaujolais, and Sauvignon Blanc) sem extração ou separação prévia de amostra. O altíssimo poder de resolução da técnica FT-ICR MS é ideal para o estudo de misturas complexas tais como o vinho, uma vez que os compostos são resolvidos simultaneamente e identificado sua composição elementar. Além disso, a alta faixa dinâmica do instrumento é vantajosa para identificar componentes em baixo nível de detecção. Os espectros de massas obtidos no modo positivo são similares e dominados por sucrose (vinhos tintos) e antocianinas. Mais de trinta compostos (fenólicos e carboidratos) foram identificados. Os espectros de massas no modo negativo exibiram maior variação entre os diferentes vinhos, com diversos compostos peculiar em todos os vinhos. As composições elementares puderam ser atribuídas com alta confiança na faixa de 76 a 94% para íons negativos de abundância relativa maior que 10%. Este trabalho mostrou um progresso na caracterização entre diferentes variedades de vinhos ou da mesma variedade, mas de diferentes idades e diferentes garrafas de uma mesma safra. De forma similar a técnica de FT-ICR MS também foi aplicada na caracterização e classificação de vinhos Chineses, um total de 47 vinhos tintos comerciais originados das uvas Cabernet Sauvignon, Carménère, Syrah e Pinot Noir e 25 vinhos brancos das variedades Chardonnay e Sauvignon Blanc foram diluídos e inseridos diretamente dentro do espectrômetro de massas, e analisados no modo negativo (VILLAGRA et al., 2012). Os íons com intensidade acima de 10% foram empregados como variáveis na análise estatística dos dados. As três primeiras componentes principais explicaram 96,82% e 85,65% da variância para os vinhos brancos e tintos, respectivamente. A análise discriminante linear permitiu a correta discriminação de 100% para os vinhos brancos e 95,74% para os vinhos tintos. A validação desses resultados usando o método de validação cruzada deixando uma de fora gerou porcentagens mais baixas de classificação (76,0% e 61,7% para os vinhos brancos e tintos, respectivamente), sugerindo que algumas das amostras de vinhos analisadas pudessem ter sido misturadas com mais de uma variedade. Consequentemente, as análises por FT-ICR MS puderam ser usadas para discriminação, mas necessitaram antes de um modelo matemático construído com informações espectrais de amostras puras e da combinação de amostras para melhorar as porcentagens de classificação.

CARERI et al. (2003) desenvolveram e validaram um método rápido baseado em cromatografia líquida de fase reversa com detector de arranjo de diodos UV-vis para identificação e quantificação dos compostos fenólicos *trans*-resveratrol e quercetina. Este

método envolve a inserção direta sem pré-tratamento de amostra e uso de coluna C-18 sob condições isocráticas. A quantificação foi realizada em amostras de bagaço de uva, um subproduto da vinificação, obtido na etapa de prensagem da uva para produção do vinho. O bagaço da uva foi analisado por ser uma fonte potencial dos compostos fenólicos (*trans*-resveratrol e quercetina) benéficos à saúde, a fim de encontrar possíveis usos industriais para agregar valor a este material. NIXDORF e GUTIÉRREZ (2010) realizaram o primeiro estudo detalhado sobre a composição de alguns dos compostos fenólicos mais relevantes de baixo peso molar em vinhos tintos da uva Isabel, um híbrido de *V.vinífera* e *V.labrusca*. A análise dos compostos fenólicos do vinho foram realizadas por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ e a capacidade antioxidante foi medida usando o método DPPH. As antocianinas encontradas no vinho tinto Isabel baseiam-se principalmente em malvidinas e seus derivados 3-glicosídeo e os íons 3,5-diglicosídeos já descritos como característicos de uvas híbridas. As análises por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ permitiram a identificação de vários compostos minoritários, tais como os isômeros *cis* mv-3-cmglc-5-glc (malvidina-3-(6''-cumaril)-glicosídeo)-5-glicosídeo). Além disso, o vinho tinto Isabel contém pigmentos vermelhos derivados de antocianinas de baixo peso molecular desenvolvidos durante a fermentação alcólica e envelhecimento do vinho, como por exemplo, piranoantocianinas. O conteúdo de hidroxifenilpiranoantocianinas é importante para o conjunto de pigmentos dos vinhos tintos Isabel. A ocorrência de outros compostos fenólicos que não antocianinas, tais como derivados dos ácidos hidroxinâmicos e flavonóis tem sido relatada pela primeira vez neste trabalho para o vinho tinto Isabel. O vinho Isabel pode ser diferenciado dos outros vinhos tintos de *viníferas* pela presença de antocianinas 3,5-diglicosídeos, ao passo que não houve diferença quanto aos tipos de flavonóis e ácidos hidroxinâmicos encontrados. O teor de flavonóis no vinho Isabel é relativamente baixo; contudo, seu conteúdo de derivados de ácidos hidroxinâmicos é alto o que provavelmente explica os altos níveis de hidroxifenilpiranoantocianinas. Os estudos mostraram que o vinho tinto Isabel possui baixa a média capacidade antioxidante em comparação aos outros vinhos. Embora o vinho Isabel apresente elevado teor de derivados de ácidos hidroxinâmicos, esses compostos fenólicos não são os principais contribuidores para a capacidade antioxidante desses vinhos. É bem provável que outros compostos fenólicos, não analisados, (por exemplo, taninos) possam ser os principais contribuidores da atividade antioxidante determinada pelo vinho Isabel.

MINUTI, PELLEGRINO e TESEI (2006) simplificaram um procedimento de purificação e extração para obtenção de um método baseado em GC-MS mais preciso e sensível para determinação de um grande número de compostos fenólicos do vinho, bem como um método mais simples e rápido para monitoramento rotineiro da concentração de fenólicos individuais do vinho durante seu processo de envelhecimento e produção. O procedimento envolve métodos de derivatização e extração líquido-líquido de flavanóis, fenólicos e ácidos carboxílicos, usando apenas um pequeno volume de vinho. A recuperação média variou de 73 a 107%, e o coeficiente de correlação (r^2) de $0,981 \leq r^2 \leq 0,999$. A técnica de GC-MS/SIM forneceu boa sensibilidade e especificidade, e, portanto pode ser adequado no monitoramento rotineiro da concentração dos fenólicos antioxidantes durante os processos de vinificação. MINUTI e PELLEGRINO (2008) também aperfeiçoaram e validaram as condições do método de extração por Dispersão em Fase Sólida em Matriz (MSPD) para detecção e quantificação de 23 compostos fenólicos em vinhos por GC-MS/SIM. Diferentes parâmetros da técnica MSPD, tais como; dispersão em fase sólida, solvente de eluição, força iônica da amostra e pH foram otimizados. Os procedimentos otimizados de MSPD requerem um pequeno volume da amostra de vinho (1 mL), sílica gel comercial (1,5 g) como fase sólida dispersante e pequeno volume de acetato de etila (5 mL) como solvente eluente. Assim, sob essas condições, a extração dos compostos estudados foi completa (valores médios de recuperação de 87 a 109%) em curto tempo de análise (15 minutos). Além disso, os desvios padrão satisfatórios de repetibilidade ($RSD < 9\%$ na maioria dos casos), coeficiente de regressão linear ($r^2 > 0,993$) e limites de detecção ($< 8 \mu\text{gL}^{-1}$) confirmam a utilidade da metodologia para monitoramento rotineiro da concentração de antioxidantes fenólicos individuais no vinho. A aplicação foi ilustrada para análises de diferentes amostras de vinhos.

DELGADO et al. (2002) quantificaram 15 compostos fenólicos em 55 amostras de vinhos tintos de diferentes regiões da Espanha usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência UV. As principais diferenças entre os vinhos foram estabelecidas, em geral o vinho tinto das Ilhas Canárias teve o menor teor de polifenóis que a faixa normal. A quercetina foi a exceção para este vinho, que apresentou média superior ($17,5 \text{ mgL}^{-1}$) quanto aos demais vinhos, e isto pode ser uma peculiaridade deste vinho em particular. A ferramenta estatística PCA foi empregada para o estudo da estrutura latente. Uma boa diferenciação entre os vinhos foi obtida de acordo com a Análise Discriminante Linear (LDA).

CARERI et al. (2004) desenvolveram, validaram e aplicaram um método robusto baseado em LC-ESI-MS/MS para identificação e quantificação de *cis*-Resveratrol e *trans*-Resveratrol em vinhos tintos, uvas e subprodutos do processo de vinificação (bagaço). A eluição cromatográfica foi realizada sob condições isocráticas em fase reversa usando uma coluna C18, permitindo obter tempos de retenção inferiores à 12 minutos. Os resultados da validação atestaram excelente detectabilidade, linearidade, precisão e sensibilidade da técnica LC-ESI-MS/MS junto a sua capacidade de detectar resveratrol de forma inequívoca em amostras de vinhos tintos. Os limites de detecção e quantificação na matriz foram iguais a 10 e 16 µg/L, respectivamente. Os resultados de aplicação do método em vinhos tintos, uvas e subprodutos foram comparados aos obtidos por LC-UV/DAD. O teor de *trans* resveratrol encontrado no vinho tinto foi superior ao encontrado nos subprodutos das uvas (bagaço).

Uma revisão completa sobre os principais compostos fenólicos presentes no vinho e os mais recentes avanços alcançados no ramo da química dos polifenóis do vinho foi publicado por MONAGAS et al. (2005). Os compostos fenólicos são parcialmente responsáveis pela cor, adstringência, e sabor do vinho, bem como por numerosas propriedades fisiológicas associadas ao consumo do vinho. A espectrometria de massas permitiu grande progresso na identificação e caracterização dos polifenóis do vinho. O objetivo deste estudo foi reunir as numerosas vantagens recentemente encontradas neste ramo de pesquisa. Os principais tipos de compostos fenólicos encontrados no vinho, incluindo ácidos hidrobencóicos e hidrocínâmicos, estilbenos, flavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas foram caracterizadas. As reações químicas e mecanismos envolvendo os compostos fenólicos durante o processo de vinificação são também extensivamente discutidos, incluindo reações de oxidação química e enzimática, reações de condensação direta antocianina-tanino mediada por acetaldeído, reações de condensação tanino-tanino mediada por ácido glioxílico, reações de cicloadição de antocianina C-4/C-5 com 4-vinilfenol, vinilflavanóis e ácido pirúvico, entre outros, levando a formação de piranoantocianinas. Os espectros de massas são úteis para o conhecimento de novos compostos fenólicos recentemente identificados no vinho, detalhes do seu padrão de fragmentação de acordo com as diferentes técnicas de ionização são dados.

2.11 Aroma varietal

O aroma do vinho é formado por centenas de compostos voláteis, em concentrações que variam de ngL^{-1} a mgL^{-1} (BONINO et al., 2003). Alguns destes compostos são transferidos da uva para o vinho durante o processo de fermentação do mosto ou pelo processo de envelhecimento em barricas ou garrafas, os quais desempenham papel importante na qualidade organoléptica do vinho (NOGUEROL-PATO et al., 2009).

O limite de percepção desses compostos varia consideravelmente. Conseqüentemente, o impacto olfativo desses compostos voláteis no vinho depende da concentração e tipo dos voláteis. Certos compostos presentes em nível de traço podem desempenhar papel importante no aroma, ao passo que outros em concentrações maiores contribuem de maneira menos significativa.

A complexidade do aroma do vinho se deve a diversidade de mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento:

1. Metabolismo da uva, dependendo da variedade, assim como solo, clima e técnicas de vinificação.
2. Fenômeno bioquímico, (oxidação e hidrólise) que ocorrem antes da fermentação desencadeada durante a extração do suco e maceração.
3. O metabolismo de microorganismos da fermentação responsáveis pela fermentação malolática e alcólica.
4. Reações enzimáticas e químicas que ocorrem após a fermentação, durante o envelhecimento do vinho em barris ou garrafas.

Muitos compostos odoríferos liberados nos barris de envelhecimento do vinho através da madeira de carvalho exercem forte impacto no aroma. Contudo, os compostos odoríferos da uva (refletindo particularmente a variedade, clima e solo) desempenham papel decisivo na qualidade e característica regional do vinho e de outros componentes do aroma. Paradoxalmente, muitos desses diferem dos encontrados em estados livres na uva. As variedades conhecidas como aromáticas, tais como Muscats produzem mosto odorífero similar ao vinho resultante. Contudo, o mosto de muitas variedades de uvas com sabor simples são praticamente sem aroma. Não obstante, essas uvas produzem vinhos com aroma característico que são relativamente específicos da variedade da uva de que foram feitos. Isto

é verdadeiro para a maioria das variedades de uvas: Merlot, Cabernet sauvignon, Carbenet Franc, Sauvignon Blanc, Semillon e outras diferentes variedades tais como, Gamay, Chardonnay, Chenin Blanc, etc. O conceito de precursores, formas odoríferas das substâncias que produzem o aroma varietal em vinhos, é, contudo, muito importante no processo de vinificação (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

O termo “aroma varietal” não deve, contudo, levar a atender que cada variedade de uva tem compostos voláteis específicos. De fato, os mesmos compostos odoríferos e seus precursores são encontrados em mostos e vinhos de diversas variedades de uva da mesma família, assim como outras frutas e plantas. A personalidade aromática individual dos vinhos feitos de cada variedade de uva se deve a uma infinidade de combinações e concentrações de vários compostos.

Os compostos odoríferos em uvas *Vitis vinífera* que têm sido estudados com maior detalhe pertencem à família dos terpenos. Esses compostos são responsáveis pelo aroma característico das uvas Muscat e seus vinhos, embora também presente (baixa concentração) em variedades de uvas de sabor mais simples. Tanto as formas livres quanto as glicosiladas foram identificadas no vinho e uvas.

Outros compostos que também contribuem para o aroma varietal são os norizoprenóides, não considerados estritamente terpenos, são produzidos pela reação enzimática ou química de carotenóides em uvas. Eles também são produzidos como precursores na forma glicosilda.

A função das metoxipirazinas no aroma de herbáceas de certas variedades de uva, tais como Cabernet Sauvignon, é bem conhecido. Esses compostos costumam ser encontrados na forma livre e nunca na forma de precursores glicosilados.

Mais recentemente, alguns compostos sulfurosos altamente odoríferos com funções tiols têm participado no aroma de certas variedades de uva, especialmente Sauvignon Blanc. Esses compostos ocorrem em uvas na forma conjugada com S-cisteína (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Dois diferentes métodos foram desenvolvidos e validados para quantificação de 3-alkil-2-metoxipirazinas em vinhos e mostos (CULLERÉ et al., 2009). A comparação entre ambos os métodos foi feita, sendo que a mais adequada foi aplicada na determinação desses compostos em diferentes amostras de vinhos, produzidos a partir de diversas variedades de uvas, e também diferentes amostras de mosto feito a partir de uvas Cabernet Sauvignon. Os dois métodos consistiram de headspace dinâmico com extração em fase sólida (HS-SPE) e a

extração em fase sólida (SPE) direta da amostra, acoplada com a cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas multidimensional (MDGC-MS). A repetibilidade do método foi avaliada em dois níveis de concentração. O desvio padrão relativo (RSD%) foi aceito em ambos os casos, porém com HS-SPE os valores foram inferiores. A linearidade foi satisfatória na faixa de ocorrência de metoxipirazinas em vinhos e uvas. O limite de detecção para a técnica direta SPE foi muito inferior ao do HS-SPME em todos os casos. Os limites de detecção para o método direto de SPE foram de 0,09 a 0,15 ngL⁻¹. O método baseado em SPE direto foi escolhido finalmente porque ele teve melhores limites de detecção e foi mais fácil e rápido que o método baseado em HS-SPME. A quantidade encontrada desse composto nos vinhos variou de 1,9 a 15 ngL⁻¹.

2.12 Terpenos odoríferos

Os compostos dessa família compreendem os terpenos (compostos com 10 átomos de carbono) e sesquiterpenos (com 15 átomos de carbono), formados por duas e três unidades de isoprenos, respectivamente. Os monoterpenos ocorrem na forma de hidrocarbonetos simples (limoneno, mirceno, etc.), aldeídos (linanal, geranial, etc.), álcoois (linanol, geraniol, etc.), ácidos (ácido gerânico, ácido linânico etc.) e eventuais ésteres (acetato de linalil, etc.).

Aproximadamente quarenta compostos têm sido identificados em uvas, alguns desses álcoois monoterpênicos estão entre os mais odoríferos, especialmente linanol, α -terpineol, nerol, geraniol, citronelol que apresentam um aroma floral de essência de rosas. A percepção olfativa desses compostos é muito baixa, menor que 100 mgL⁻¹. As estruturas dos principais terpenos da uva e vinhos são apresentadas na **Figura 2.19**. Os mais odoríferos são o citronelol e o linanol (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

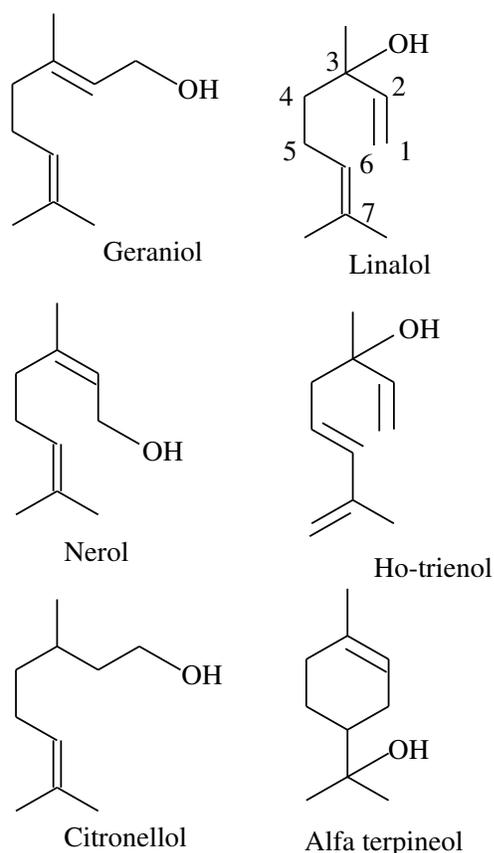


Figura 2.19 Estrutura dos principais monoterpenos e derivados identificados em uvas e vinhos.

NASI et al. (2008) aplicaram uma abordagem analítica baseada no uso combinado de técnicas de espectrometria de massas (GC-MS, LC-ESI-MS e MALDI-TOF-MS), adequadas para caracterização de compostos voláteis varietais e seus precursores em variedades não aromáticas, objetivando a caracterização de uvas Falanghina e vinhos monovarietais derivados dessas uvas e de diferentes áreas produtivas e diferentes empresas comerciais, de modo a obter informações analíticas úteis e possíveis marcadores moleculares que possam descrever a tipicidade e autenticidade desses produtos. Os compostos terpênicos dominantes (limoneno, óxido de *cis*-furanlinalol, geraniol, 4-careno, mirceno, linalol, α -terpeneol), derivados de terpeno (acetato de bornila, mentol) e norisoprenóides (β -damascenona) foram identificadas em uvas e vinhos monovarietais, superando as dificuldades analíticas derivadas da baixa concentração desses compostos relacionadas à variedade. Os compostos voláteis varietais liberados pelas uvas também foram explorados pela hidrólise enzimática.

2.13 Norisoprenóides – C₁₃

A degradação oxidativa dos carotenóides (**Figura 2.20**), terpenos com 40 átomos de carbono (tetra terpeno), produz derivados com 9, 11 ou 13 átomos de carbonos. Dentre esses átomos de carbono, os derivados com 13 átomos de carbono possuem propriedades odoríferas de interesse. Esses compostos são muito comuns no tabaco, onde inicialmente foram estudados, mas eles vêm sendo também estudados na uva e no vinho. Do ponto de vista químico, esses derivados de norisoprenóides estão divididos em duas principais formas: megastigmamos e não megastigmanos, sendo que cada um desses grupos incluem um grande número de compostos voláteis. O esqueleto do megastigmano é caracterizado por um anel benzeno substituído nos carbonos 1, 5 e 6 por uma cadeia alifática insaturada com quatro átomos de carbono ligados ao carbono 6 (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Os megastigmanos são norisoprenóides oxigenados-C₁₃, com esqueletos oxigenados no carbono 7 ou carbono 9 (**Figura 2.21**). Dentre os megastigmanos, a concentração de β -damascenona é variável entre vinhos brancos e tintos. Os derivados de norisoprenóides C₁₃ não megastigmanos também são identificados, inclusive os odoríferos. O mais importante deles é o TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidroftaleno) que tem um distinto odor de querosene. O TDN está geralmente ausente em uvas e vinhos jovens, mas podem aparecer durante o envelhecimento em garrafas, atingindo concentrações de 200 μgL^{-1} , onde seu limite de percepção é da ordem de 20 μgL^{-1} (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

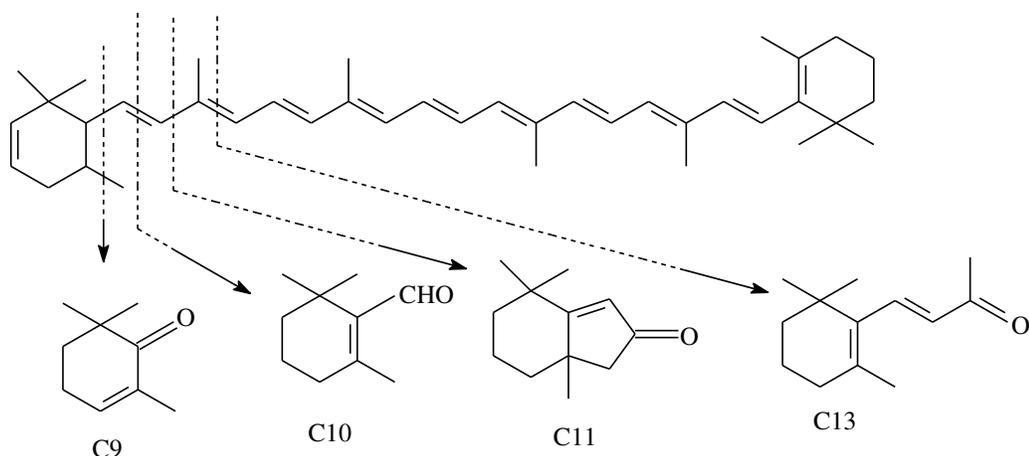
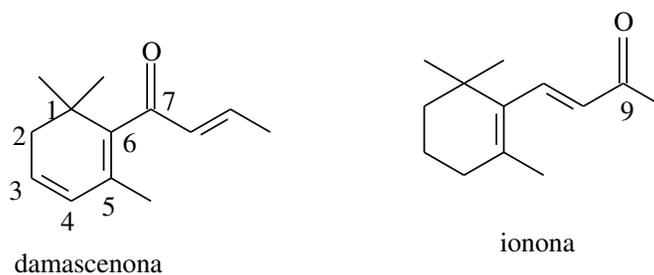


Figura 2.20 Quebra na ligação do composto carotenóide levando a formação de C₉, C₁₀, C₁₁ e norisoprenóides C₁₃ da uva.

Formas estruturais dos megastigmanos oxigenados



Formas dos compostos não megastigmanos

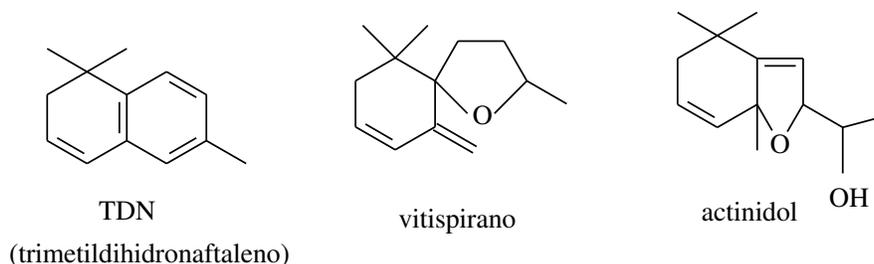


Figura 2.21 Estruturas dos principais compostos da família de derivados do norisoprenóide C_{13} em uvas.

O actinidol e o vitispirano também fazem parte dessa família, e possuem odor de cânfora. Alguns desses norisoprenóides C_{13} não-megastigmanos são derivados de megastigmanos por modificações químicas em meio ácido. Isto possibilita que o vitispirano seja formado durante o processo de envelhecimento em garrafas contribuindo com o cheiro de cânfora em vinhos que tenham sido prematuramente envelhecidos (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Os oligossacarídeos dos vinhos Carignan e Merlot foram caracterizados com sucesso empregando a técnica de ionização por electrospray acoplada à espectrometria de massas com inserção direta (ESI-MS) pela primeira vez. A espectrometria de massas (MS) é muito eficiente na identificação e determinação da estrutura de oligossacarídeos em particular os originados de pectinas. A identificação de oligossacarídeos ricos em xilose por ESI-MS é importante, pois essas moléculas representam a estrutura degradada de polissacarídeos originados das paredes celulares da uva, como resultado da presença de endógenos presentes na uva ou atividade de enzimas exógenas, adicionadas pelos vinicultores, presentes durante os vários estágios de produção do vinho. O uso da espectrometria de massas na análise de oligossacarídeos permite o estudo da influência de várias técnicas de vinificação: fermentação da casca durante a produção do vinho tinto, maceração da casca da uva, tratamento

enzimático, etc. no conteúdo final e na composição estrutural de oligossacarídeos do vinho e as propriedades que poderiam estar relacionadas à presença dessas moléculas na bebida (DUCASSE et al., 2010).

Trinta e seis amostras de vinho originado de quatro variedades de uvas: Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho foram analisadas de modo a estimar a fração livre de monoterpenóides e norisoprenóides (compostos terpenóides) usando a técnica de microextração em fase sólida e headspace dinâmico acoplada à cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS). Os valores médios nas três safras (1998-2000) mostram que esses vinhos têm perfis característicos de compostos terpenóides. Como exemplo, os vinhos Malvazia exibem alta concentração de farnesol. O uso de técnicas analíticas multivariadas permite estabelecer uma relação entre os compostos e as variedades investigadas. A análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante linear (LDA) foram aplicadas para obter dados da matriz. Uma boa separação e classificação entre os quatro grupos como uma função de sua origem varietal foi observada por CÂMARA, ALVES e MARQUES, 2007.

2.14 Álcoois e outros compostos voláteis

Os compostos químicos majoritários encontrados no aroma do vinho são os álcoois, acetatos de etila, ésteres, aldeídos e cetonas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; VAS et al., 1998).

2.14.1 Álcoois superiores da fermentação

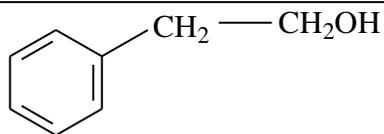
Os alcoóis com mais de dois átomos de carbono são conhecidos como álcoois superiores (**Tabela 2.1**). A maioria deles são produzidos durante a fermentação em concentrações que variam entre 150 a 550 mgL⁻¹ no vinho. Esses alcoóis e seus ésteres possuem um odor intenso e desempenham um papel muito importante no aroma do vinho. Os principais álcoois superiores da fermentação são isobutil (1-metil-2-propanol) e álcoois amílicos (mistura de 1-metil-2-butanol e 1- metil-3-butanol). Esses compostos de baixa concentração (300 mgL⁻¹)

contribuem para a complexidade aromática do vinho. Em elevados níveis, seu odor penetrante que mascara o fino aroma do vinho, os ésteres acéticos desses álcoois, especialmente o acetato de isoamila possui um aroma de banana que desempenha papel importante no aroma de alguns vinhos jovens (*primeur* or *nouveau*) (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Tabela 2.1. Relação dos alcoóis simples originados de plantas e leveduras.

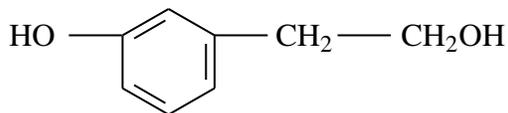
Fórmula	Nome	P.E. (° C)
H— CH ₂ OH	metanol	65
CH ₃ — CH ₂ — OH	etanol	78
CH ₃ — CH ₂ — CH ₂ OH	1-propanol	97
CH ₃ — CHOH— CH ₃	2-propanol	82
CH ₃ — CH ₂ — CH ₂ — CH ₂ OH	1-butanol	117
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{— CH— CH}_2\text{OH} \end{array}$	2-metil-1-propanol	107
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{— COH— CH}_3 \end{array}$	2-metil-2-propanol	82
CH ₃ — CH ₂ — CHOH— CH ₃	2-butanol	99
CH ₃ — CHOH— CHOH— CH ₃	2,3-butanodiol	183
CH ₃ — CH ₂ — CH ₂ — CH ₂ — CH ₂ OH	1-pentanol	137
CH ₃ — CH ₂ — CH ₂ — CHOH— CH ₃	2-pentanol	119
CH ₃ — CH ₂ — CHOH— CH ₂ — CH ₃	3-pentanol	115

$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	3-metil-1-butanol	131
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	2-metil-1-butanol	129
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CHOH} - \text{CH}_3 \end{array}$	3-metil-2-butanol	112
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C} = \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	156
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_2\text{OH}$	1-hexanol	158
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CHOH} - \text{CH}_3$	2-hexanol	138
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{CH}_2\text{OH}$	1-heptanol	177
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CHOH} - \text{CH}_3$	2-heptanol	160
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CH}_2\text{OH}$	1-octanol	194
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{CHOH} - \text{CH}_3$	2-octanol	180
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_2\text{OH}$	1-nonanol	212
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CHOH} - \text{CH}_3$	2-nonanol	
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_8 - \text{CH}_2\text{OH}$	1-decanol	229



2-fenil-etanol

219



tirosol



1-octen-3-ol

Os alcoóis superiores são formados por leveduras ou diretamente de açucars ou ainda de amino ácidos pela reação de *Ehrlich* (**Figura 2.22**).

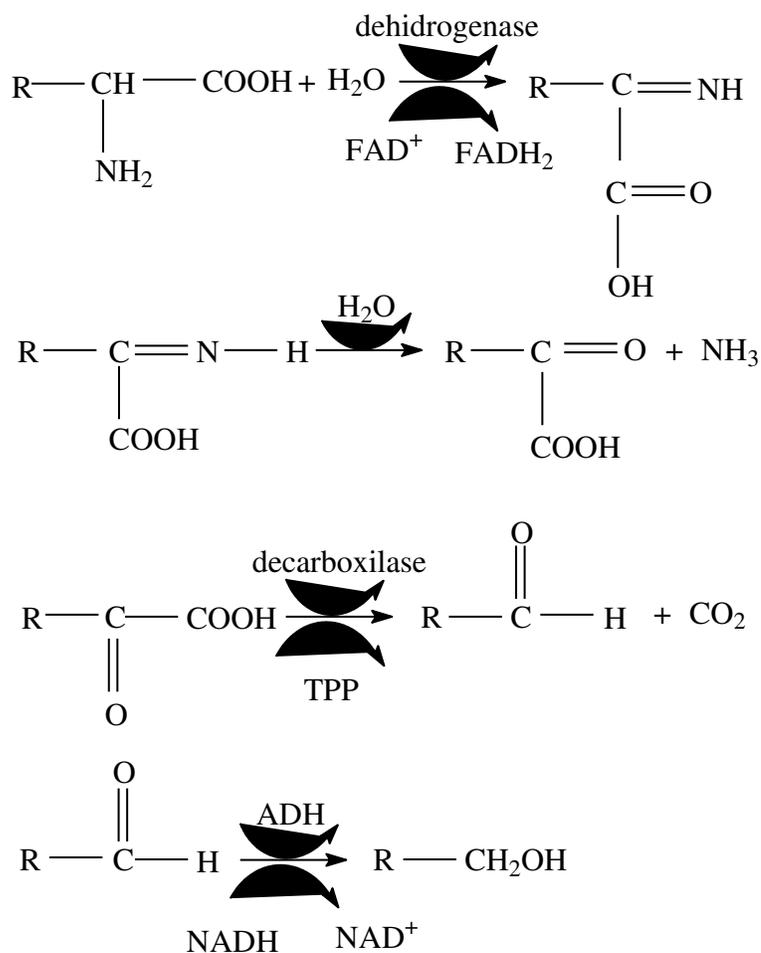


Figura 2.22 Biossíntese dos álcoois superiores de acordo com Ehrlich.

O teor elevado de alcoóis superiores da fermentação do vinho varia com as condições de fermentação, especialmente as espécies de leveduras. Em geral, os fatores que aumentam a velocidade de fermentação (biomassa de leveduras, oxigenação, altas temperaturas e a presença de matéria em suspensão) também aumentam a formação de alcoóis superiores.

O teor de alcoóis superiores de um vinho pode aumentar devido à deterioração microbiológica envolvendo leveduras e bactérias. Nesses casos, o teor amílico pode tornar-se excessivo. Os alcoóis superiores são mantidos como aguardentes após a destilação e contribuem para suas características individuais. Técnicas de destilação têm um maior impacto em suas concentrações globais (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

2.14.2 Ésteres

Os ésteres são formados quando uma função álcool reage com uma função ácida e uma molécula de água é liberada (**Figura 2.23**). Esta reação é reversível, limitada pela reação invertida de hidrólise do éster. Quando o sistema está balanceado, existe uma correlação constante das substâncias presentes, governada pela lei de ação das massas.

Existe um grande número de diferentes alcoóis e ácidos no vinho, de modo que o número de ésteres possíveis é também muito grande. Os acetatos de etila são os mais comuns por razões cinéticas, ou seja, devido à grande quantidade de etanol presente e ao fato dos alcoóis primários serem os mais reativos.

Poucos ésteres estão presentes na uva, moléculas odoríferas, tais como antranilato de metila são responsáveis pelo odor característico das uvas *Vitis Labrusca* e vinhos produzidos a partir delas. Existem também grupos metoxilas nas pectinas que liberam metanol pela hidrólise.

Os ésteres no vinho têm duas origens distintas: esterificação enzimática durante o processo de fermentação e a esterificação química durante o longo tempo de envelhecimento. Os mesmos ésteres podem ser sintetizados pelas duas maneiras (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

2.14.3 Acetatos de etila

O éster mais importante no vinho certamente é o acetato de etila. Uma pequena quantidade é formada pelas leveduras durante a fermentação, mas a grande maioria resulta da atividade de bactérias acéticas aeróbicas, principalmente durante o envelhecimento em barris de carvalho. O acetato de etila é responsável pela característica olfativa do vinho quando afetado por um odor sufocante de vinagre. O limite de percepção olfativa do acetato de etila é de aproximadamente 160 mgL^{-1} . Mesmo a baixo desse valor, em que ele não pode ser identificado, pode estragar o buquê com um odor desagradável e penetrante. Isto é, contudo, possível mesmo que em baixíssimas concentrações ($50 - 80 \text{ mgL}^{-1}$) o acetato de etila contribui para a complexidade olfativa e assim tem um impacto positivo na qualidade.

Além disso, o acetato de etila afeta o sabor do vinho. Em concentrações relativamente altas (acima de 120 mgL^{-1}) que ainda está abaixo do limite de percepção olfativo, ele dá ao vinho tinto um sabor quente que reforça a impressão de amargor no gosto. O acetato de etila contribui para aspereza e dureza de vinhos tintos. Uma concentração mínima de $0,90 \text{ gL}^{-1}$ (uma acidez volátil de $0,95 \text{ gL}^{-1}$ expressa em H_2SO_4) é necessária para produzir um perceptível gosto azedo e amargo. Mesmo em altos teores, o ácido acético não possui odor forte, enquanto o acetato de etila é percebido em baixíssimas concentrações (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

2.14.4 Acetato de etila de ácidos graxos e ésteres acéticos de álcoois superiores

Os acetatos de etila de ácidos graxos são produzidos por leveduras durante a fermentação alcólica. Eles são sintetizados a partir das formas ácidas ativadas pela coenzima A (HS-CoA), Acyl-S-CoA. A molécula de Acyl-S-CoA, originado do ácido pirúvico, pode está envolvida na reação de Claisen com o malonil-S-CoA, produzindo uma nova acil-S-CoA com dois átomos de carbono adicionais (**Figura 2.24**). O acetil-S-CoA produz então butiril-CoA, depois hexanil-CoA, etc. Então, enzimas específicas catalizam a alcohólise de acil-S-CoA em acetatos de etila de ácidos graxos e ao mesmo tempo, as coenzimas A são regeneradas.

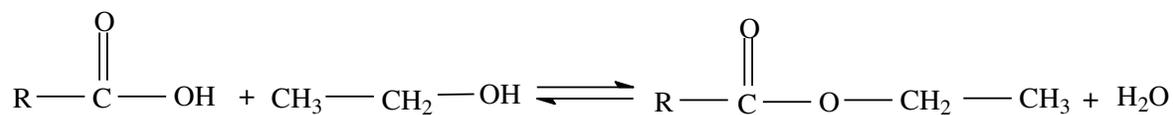


Figura 2.23. Equilíbrio de esterificação de um álcool.

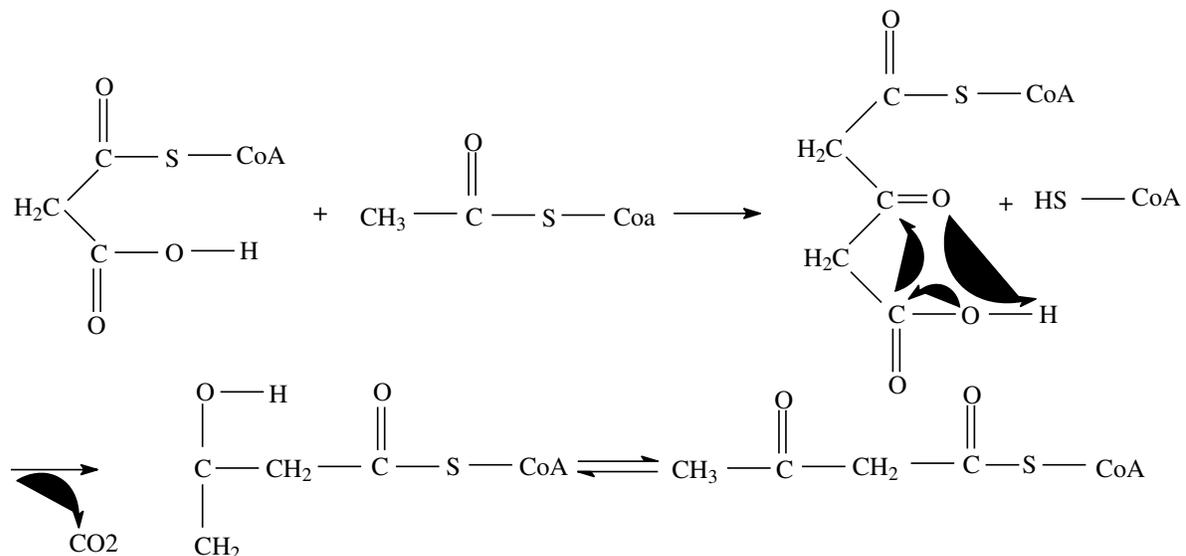


Figura 2.24 Mecanismo da biossíntese de um ácido graxo.

Em geral, a concentração dos ésteres aumenta durante o envelhecimento do vinho. Os acetatos de etila de ácidos graxos são formados por leveduras, sob condições anaeróbicas, em quantidades maiores que as previstas pela lei da ação das massas. Conseqüentemente elas são hidrolisadas durante o envelhecimento e a concentração tende a diminuir (**Tabela 2.2**). Os acetatos de etila possuem um odor muito agradável de cera e mel que contribuem para o aroma fino dos vinhos brancos. Sua concentração varia de poucos mgL⁻¹.

Os ésteres acéticos (acetato de isoamila e acetato de fenila) estão incluídos na classe dos ésteres da fermentação e estão presentes em quantidades moderadas no vinho, contudo possui um odor intenso bastante comum (banana e maçã). Eles contribuem para a complexidade aromática de vinhos naturalmente neutros. Mas podem mascarar alguns aromas varietais. A formação de todos estes ésteres é promovida quando a fermentação é lenta e difícil, devido à ausência de oxigênio, baixa temperatura e mosto clarificado (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Tabela 2.2. Mudanças de concentração de ésteres de ácidos graxos (μmolL^{-1}) no vinho dependendo do tempo de envelhecimento a 25 °C em dois valores de pH (3,0 e 3,5).

composto	pH=3,0				pH=3,5			
	0	2	5	29	0	2	5	29
acetato de isobutila	0,70	0,40	0,00	0,00	0,70	0,60	0,00	0,00
acetato de hexila	1,90	1,20	0,00	0,00	1,70	1,50	0,40	0,00
acetato de isoamila	36,60	13,30	3,10	0,40	36,50	20,60	14,00	2,50
acetato de 2-fenil	11,0	2,40	0,50	0,50	4,80	3,40	2,60	0,88
hexanoato de etila	12,20	8,70	6,40	4,30	11,00	8,80	8,40	4,60
octanoato de etila	9,30	9,0	7,40	6,40	5,70	5,50	5,50	3,69
decanoato de etila	2,70	3,40	3,10	2,00	1,20	1,20	1,40	0,79

* 0, 2, 5 e 29 meses.

2.14.5 Aldeídos e cetonas

O etanal é o mais importante dos compostos carbonilados. As muitas formas em que ele pode ser produzido são através da alta reatividade (o radical CHO possui afinidade química elevada), bem como sua rápida combinação com dióxido de enxofre em baixas temperaturas, e suas propriedades organolépticas fazem do etanal um componente muito importante no vinho. A presença do etanal, produzido pela oxidação do etanol, está intimamente ligada ao fenômeno de oxi-redução. Ele está envolvido no mecanismo de fermentação alcoólica. Além disso, o etanal desempenha um papel durante a mudança de cor que ocorre no vinho tinto durante seu envelhecimento facilitando a copolimerização de fenóis (antocianinas e catequinas). No vinho preservado com regular sulforização leve, a combinação sulfito de etanal ($\text{CH}_3\text{CHOHSO}_3\text{H}$), estável em um meio ácido, é a forma mais prevalente. Quando as uvas são sulfuradas de forma intensa, a concentração de etanal aumenta e pode exceder 100 mgL^{-1} mesmo na forma

combinada com sulfito. Esta combinação de sulfito de etanal protege as leveduras dos efeitos antisépticos do SO₂ (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Os vinhos contêm um excesso de etanal quando comparado a quantidade de SO₂, ou seja, etanal livre (na forma não combinada) são descritos como plana. Um leve traço de etanal é suficiente para produzir um odor característico, que lembra maçã recém cortada. Este problema desaparece rapidamente se uma pequena quantidade de SO₂ é adicionada, uma vez que este combina com o etanal livre.

Outros poucos aldeídos estão presentes no vinho em nível de traço. Os aldeídos superiores contribuem para o buquê de alguns vinhos. O efeito neutralizante do dióxido de enxofre sobre o sabor frutado do vinho branco se deve ao fato da combinação da fração aldeído no buquê. Os aldeídos também estão presentes no vinho na série aromática. O mais significativo é a vanilina associada com o envelhecimento do vinho em barril que possui por sua vez um aroma característico. Aparentemente a uva contém poucos aldeídos, o hexenal e o hexenol têm, contudo, contribuído com o odor herbáceo de compostos C₆.

Diversas moléculas com função cetona têm sido identificadas no vinho, incluindo propanona, butanona e pentanona. Como mencionado anteriormente, as mais importantes são acetilmetilcarbinol, e o diacetil. As moléculas com diversas funções aldeído e cetona têm sido identificadas no vinho: glioxal, metil-glioxal e hidroxipropanedial (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

Os principais macroconstituintes do aroma podem ser analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (FLAMINI e TRALDI, 2010; Silva et al., 2011), mesmo que estes compostos estejam em concentrações muito baixas (ngL⁻¹) (PAWLISZYN, 2003).

Diversos métodos de isolamento e concentração têm sido desenvolvidos para análise de compostos voláteis em vinhos. Alguns métodos são muito trabalhosos e demorados, outros têm níveis de recuperação e limites de detecção muito altos resultando em dados pouco confiáveis devido à contaminação proveniente de solventes e seletividade insuficiente (ORTEGA-HERAS, GONZÁLEZ-SANJOSÉ e BELTRÁN, 2002; HERNANZ et al., 2008; VAS FREIRE, COSTA FREITAS e RELVA, 2001).

A técnica de micro extração em fase sólida do *headspace* com a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS) tem sido muito aplicada (PAWLISZYN, 1997; NASI et al., 2008; ARMANINO et al., 2008; SETKOVA, RISTICEVIC e

PAWLISZYN, 2007; MINUTI e PELLEGRINO, 2008; PEÑA et al., 2005; CALLEJA e FALQUÉ, 2004; BOUTOU e CHATONNET, 2007; CABREDO-PINILLOS, CEDRÓN-FERNÁNDEZ, e SÁENZ-BARRIO, 2008; Tao et al., 2008; Pereira et al., 2010). O HS-SPME, quando acoplada particularmente à MS oferece vantagens tais como: rapidez de análise, alta densidade de informação química, usa de pequena quantidade de amostra e fácil automação (MEURER et al., 2002; SILVA et al., 2007; ROBINSON et al., 2011; CANUTI et al., 2009; PILAR MARTÍ et al., 2004; CÂMARA, ALVES e MARQUES, 2006; DALL'ASTA et al., 2011).

CAPÍTULO 3

**Avaliação da composição volátil do vinho paulista
obtido do cultivar Máximo IAC 138-22 comparado a
outros vinhos da varietal Syrah de diferentes origens
por HS-SPME-GC-MS**

Capítulo 3. Avaliação da composição volátil do vinho paulista obtido do cultivar Máximo IAC 138-22 comparado a outros vinhos da varietal Syrah de diferentes origens por HS-SPME-GC-MS

3.1 Objetivos

O objetivo deste primeiro estudo foi avaliar a composição química volátil de um vinho genuinamente paulista produzido a partir de uma uva híbrida brasileira, empregando a técnica de micro extração em fase sólida do *headspace* com a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS) para análise dos macroconstituintes voláteis em vinho.

3.2 Parte Experimental

3.2.1 Amostras de vinhos: Um total de 32 tipos de vinhos tintos comerciais, de uvas *Vitis vinífera* variedade Syrah provenientes de diferentes países, sendo vinte quatro destes adquiridos em supermercado (todos Syrah, sendo três garrafas de cada): Finca El Retiro (Argentina), Syrah (Portugal), Cave Ladac (França), Cortona (Itália), Oracle (África do sul), Finckman (Argentina), Domaine (Grécia), Santa Rita (Chile). Seis amostras do vinho paulista obtido do cultivar Máximo (IAC 138-22) produzido no estado de São Paulo foram fornecidas pelo Laboratório de pós-colheita FEAGRI-UNICAMP. Dois tipos de vinhos provenientes das uvas americanas Bordô e Isabel foram analisados para fins comparativos.

3.2.2 Índice de Kovats: Com o objetivo de identificar os compostos voláteis nas amostras de vinho, uma mistura padrão de hidrocarbonetos $C_7-C_8+C_{30}-C_{32}$ (pureza 98 %, *Sigma Aldrich*) foi adicionada ao volume de 20 mL de amostra, sendo extraída por HS-SPME e injetada no cromatógrafo nas mesmas condições de análise. Os índices calculados foram comparados com os obtidos na literatura (ARMANINO, CASOLINO, CASALE, e FORINA, 2008).

3.2.3 Materiais e Equipamentos: Os experimentos foram realizados em um Cromatógrafo a Gás GC-MS modelo HP 5890 series II acoplado a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo series 5970 (modelo Agilent). Diversas fibras de SPME com diferentes fases seletivas de polidimetilsiloxano (PDMS), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) e divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) foram inicialmente testadas e a melhor fibra de SPME foi a mista DVB/CAR/PDMS (revestimento com 50/30 μm de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano) da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA). A fibra foi condicionada, antes de ser usada, a 250 °C por 15 minutos de acordo com as instruções de uso para evitar possíveis perdas de fases e para estabilidade.

3.3.4 Procedimentos de análise: Os procedimentos de preparo e extração assim como as condições cromatográficas de análise foram todas otimizadas antes de serem aplicadas aos vinhos. No início de cada análise preparou-se um branco da fibra, da coluna cromatográfica e da água usados nas análises a fim de verificar possíveis contaminações ou sangramentos da coluna e da fibra SPME. Além disso, testaram-se várias diluições da mistura padrão de hidrocarbonetos empregados na identificação dos voláteis em vinhos. A coinjeção de um volume de 1 μL da mistura padrão de hidrocarbonetos foi testada em quatro tempos de extração e agitação (10, 15, 20, 25 e 30 minutos). A temperatura e agitação também foram testadas inicialmente em níveis crescentes iguais a 25 °C, 30 °C e 35 °C a 1200 e 1500 rotações por minutos. Vários testes envolvendo quantidades diferentes de sal adicionadas ao vinho foram realizados para obter melhor liberação dos voláteis da amostra (3 g, 6 g e 10 g). A diluição do vinho em água foi testada nas razões 1:1 e 1:2. A rampa de temperatura do forno e as temperaturas de injeção e detecção foram ajustadas de acordo com os melhores sinais de intensidade obtidos para cada analito. Depois que todos os parâmetros foram testados, estabeleceu-se as melhores condições de trabalho que são descritas a seguir: Transferiu-se 20 mL de vinho para um *vial* de *headspace* de vidro com septo de silicone contendo 6 gramas de NaCl e 20 mL de água MilliQ. As análises foram feitas em triplicata sob condições de pré-concentração e extração por fibra SPME: 15 minutos sob temperatura ambiente e agitação de 1.200 rotações por minutos. Em seguida, a fibra foi inserida no sistema de *headspace* da amostra durante 15 minutos sob mesma agitação. Transcorrido esse tempo, a fibra foi retraída para o *holder* manual e então, inserida manualmente no GC-

MS. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna GC 30m; 0,25 mm; 0,25 µm HP-5MS, rampa de temperatura da coluna: 40 °C – 3 °C/min – 160 °C-10 °C/minutos-260 °C (10 minutos), gás de arraste: Hélio, 1,0 mLmin⁻¹, fluxo constante; temperatura do injetor: 250 °C, temperatura de interface 120 °C, *Splitless*; temperatura do detector: 260 °C. A identificação dos compostos voláteis em vinho foi realizada através do estudo de comparação entre os espectros de massas obtidos com os existentes no banco de dados da biblioteca NIST MS 2.0 e uso do índice de Kovats.

3.2.5 Análise Estatística: O programa *Pirouett 3.11* foi usado no tratamento quimiométrico dos dados efetuando a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA).

3.3 Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação da composição química do vinho paulista obtidos do cultivar Máximo IAC 138-22 através do perfil qualitativo dos compostos voláteis utilizando HS-SPME-GC-MS aqui apresentados foram publicados em periódico especializado na área de química Analítica (SILVA, JARA, QUEIROGA, BECHARA, MESSIAS e EBERLIN, 2011). Inicialmente algumas amostras de vinho de três diferentes uvas (Syrah, Bordô e Isabel) foram analisadas por HS-SPME-GC-MS. Os vinhos tintos Trento e Tordin apresentaram composições diferentes dos outros vinhos porque são originados das uvas americanas Bordô e Isabel, respectivamente como mostra a (**Figura 3.1**), portanto o estudo foi conduzido com foco principal nas diferenças entre o vinho paulista e os outros vinhos tintos Syrah provenientes de diferentes regiões. Um total de 31 compostos foi detectado nos vinhos Syrah, sendo que 14 destes eram comuns a todos, porém em intensidades de sinais diferentes o que pode ser relacionado ao tipo de uva utilizada na produção do vinho tinto ou devido ao tipo de armazenamento dado ao vinho quando em fase de amadurecimento ou estocagem e até mesmo condições de temperaturas ou ação de leveduras sobre determinadas proteínas durante o processo fermentativo.

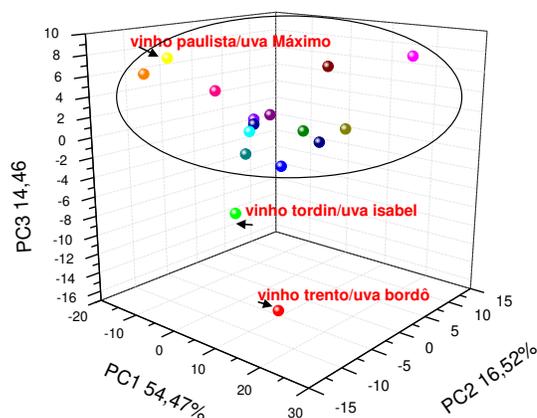


Figura 3.1 Análise de componentes principais PC1 x PC2 x PC3 de vinhos.

A **Figura 3.2** mostra os perfis cromatográficos de alguns dos vinhos estudados com os picos dos compostos majoritários e seus tempos de retenção. Em todos os cromatogramas é possível observar a presença de um conjunto de íons referentes a compostos como alcoóis superiores, ésteres e terpenos. O vinho paulista exibe perfil volátil similar aos vinhos comerciais Syrah. A **Tabela 3.1** apresenta a relação dos vinhos com os compostos voláteis, seus índices de retenção teóricos e experimentais, as áreas percentuais relacionadas à intensidade dos sinais de cada composto encontrado nas diversas amostras de vinhos. As amostras foram agrupadas por país de origem sendo que de cada país adquiriu-se, no mínimo, três garrafas. Nota-se claramente a predominância dos alcoóis superiores e seus ésteres em todas as amostras.

A ferramenta estatística HCA foi usada para comparar a composição volátil do vinho paulista com os demais vinhos tintos. No dendrograma da **Figura 3.3** dois grandes grupos são observados.

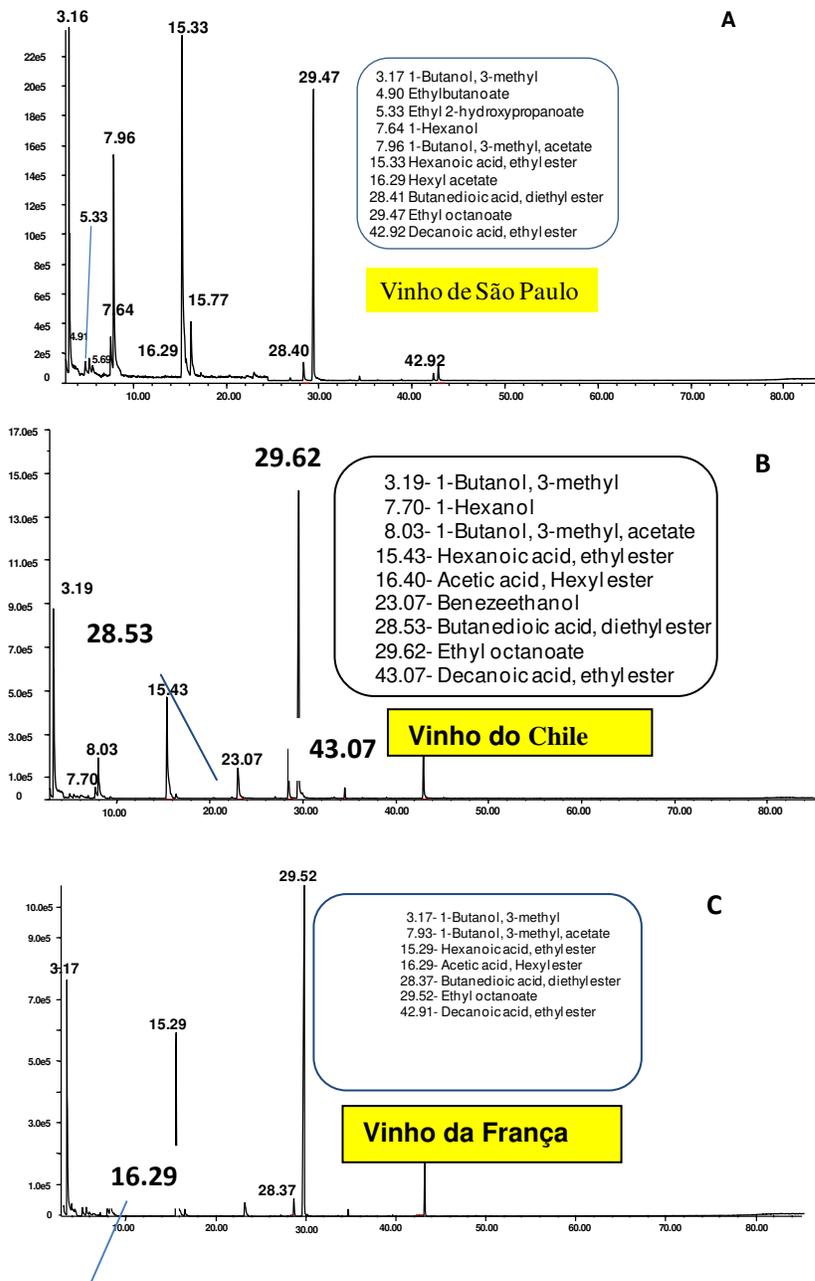


Figura 3.2 Cromatogramas de vinhos tintos empregando *HS-SPME-GC-MS*: A) vinho paulista; B) Valle de Maipo/Chile e C) Côtes de Rhône/França.

O primeiro grupo é constituído pelas amostras do vinho paulista (A), do vinho da região de Mendoza/Argentina (C), de Portugal (D), da França (E), da África do Sul (G) e da Grécia (I). A similaridade entre estes vinhos deve-se à presença dos compostos numerados na **Tabela 3.1**. A **Figura 3.4** mostra os PCAs dos *scores* das amostras de vinhos e dos *loadings* (compostos voláteis usados como variáveis). Podemos observar que os compostos

mais importantes para o primeiro grupo são: 3-metil-1-butanol isobutirato de etila, lactato de etila, butirato de etila, 1,2-dimetil benzeno, 2-metilbutirato de etila, 4-metil-pentanol, 2,3-dimetilhexano, valerato de etila, 2,3-butanodiol, acetato de isoamila, isobutirato de etila, acetato de hexila e 3,3 dimetil-butanol. O segundo grupo é formado pelos vinhos Syrah da região de Rivadalia/Argentina (C), Itália (F) e Chile (B), os quais são agrupados principalmente pela presença do acetato de hexila, 3-hidroxi-2-butanona, 2-feniletanol, vitispirane e isobutil metil éter.

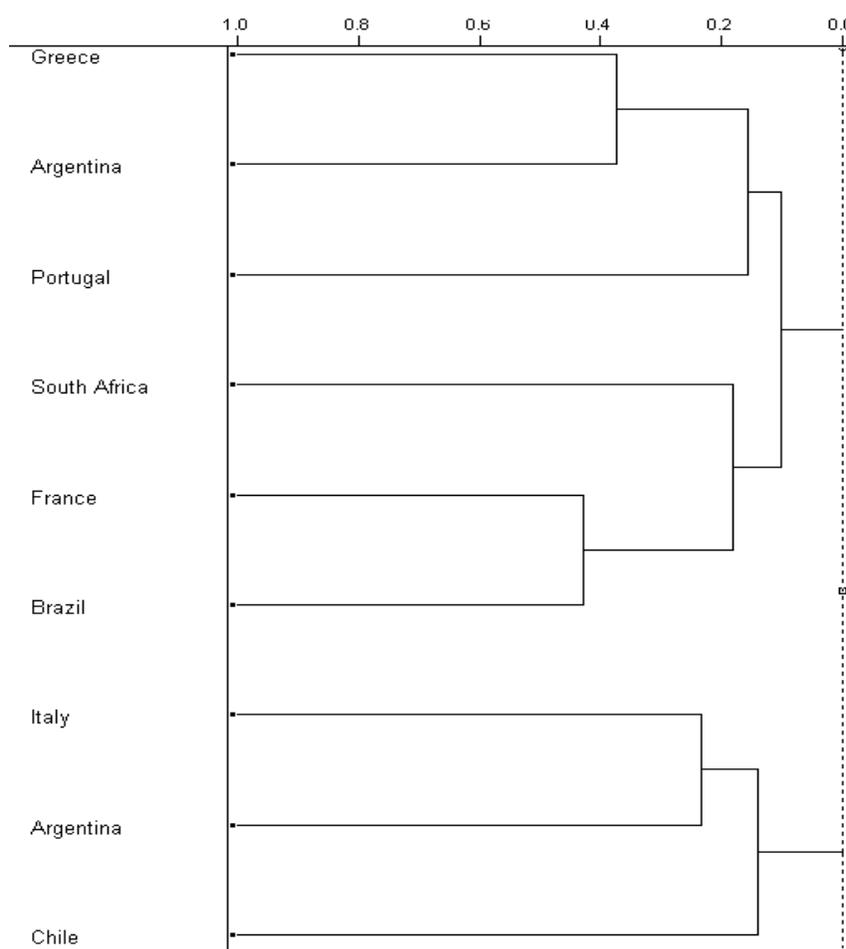


Figura 3.3 Dendrograma HCA dos cromatogramas dos vinhos tintos analisados por *HS-SPME-GC-MS*.

Tabela 3.1 Relação dos compostos com seus índices de retenção e áreas percentuais médias encontrados nas amostras de vinho por *HS-SPME-GC-MS*;

*RI_{lit} índice de retenção da literatura (Adams, NIST2008 mass spectral library), **RI_{cal} índice de retenção calculad, n.d não encontrado.

No	Composto	paulista (A)	Chile (B)	Argentina (C)	Portugal (D)	França (E)	Italia (F)	Africa do Sul (G)	Argentina (H)	Grécia (I)	*RI lit.	**RI calc.
1	3-metil-1-Butanol	14.3	17.99	20.47	41.9	16.83	15.77	40.73	44.02	18.8	734.0	721
2	isobutirato de etila	0	0	1.14	2.1	0	0	1.72	0	1.52	nf	nf
4	butanoato de etila	0.49	0	1.38	0	0.96	0	0	1.4	1.6	800.0	804
5	lactato de etila	0	0	0	0	0.72	0	0	2.67	1.94	nf	nf
6	isovalerato de etila	0	0	0	0	0	0	0	0	1.24	856	850
7	o- xileno	0	0	0	0	0	0	0	1.08	0	nf	863
8	acetate de isoamila	17.85	4.87	0	3.76	6.27	1.84	8.1	7.8	0	876	875
9	acetate de hexila	0	0	0	0	0.92	0	0	0	0	1008.00	1016
10	hexanoato de etila	26.99	14.13	17.49	11.84	22.14	21.17	22.26	8.97	15.93	996	1002
11	feniletanol	0	0	3.86	0	2.25	8.57	2.32	3.54	0	1110	1105
12	octanoato de etila	17.67	39.21	30.16	13.22	41.48	38.17	7.5	13.28	0	1195	1151
13	succinato de dietila	1.33	4.88	8.86	0	1.64	8.22	2.15	1.92	0	1179	1143
14	o-cresol	0	5.36	0	0	0	8.57	0	3.54	0	nf	nf
15	Vitispirane	0	0	0	0	0	2.14	0	0	0	nf	nf
16	decanoato de etila	0.92	5.39	2.33	0	4.64	2.27	1.02	1.72	0	1394	1298
17	4-metil-1-pentanol	3.37	0	0	0	0	0	0	0	0	nf	nf
18	acetate de hexila	5.54	0	0	0	0.92	0	0	0	0	nf	nf
19	2-metil-pentano	0	3.74	0	0	0	0	0	0	0	nf	nf
20	tolueno	0	3.94	4.61	0	0	0	0	0	0	nf	nf
21	2-methyl-decano	0	4.97	0	0	0	0	0	0	0	nf	nf
22	1 hexanol	3.58	7.69	2.07	0	0	0	3.91	0	0	867.00	868
23	1 heptanol	0	16.4	0	0	0	0	0	0	0	nf	nf
24	3-hidroxi-2-butanona	0	0	1.96	0	0	0	0	0	0	nf	nf
25	2-methyl-1-hidroxi-propano	0	0	2.62	0	0	0	0	0	0	nf	nf
26	3,3-dimetill -1-butanol	0	0	0	0.74	0	0	0	0	0	nf	nf
27	Pentanoato de etila	0	0	0	1.29	0	0	0	0	0	nf	nf
28	2,3-dimetill -hexano	0	0	0	2.53	0	0	0	0	0	nf	nf
29	4-metil-1-pentanol	0	0	0	0	0	0.98	0	3.18	1.78	nf	833
30	Acetaldeído	0	0	0	0	0	0	2.6	0	0.71	nf	nf
31	2,3-butanodiol	0	0	0	0	0	0	1.64	0	0	nf	nf

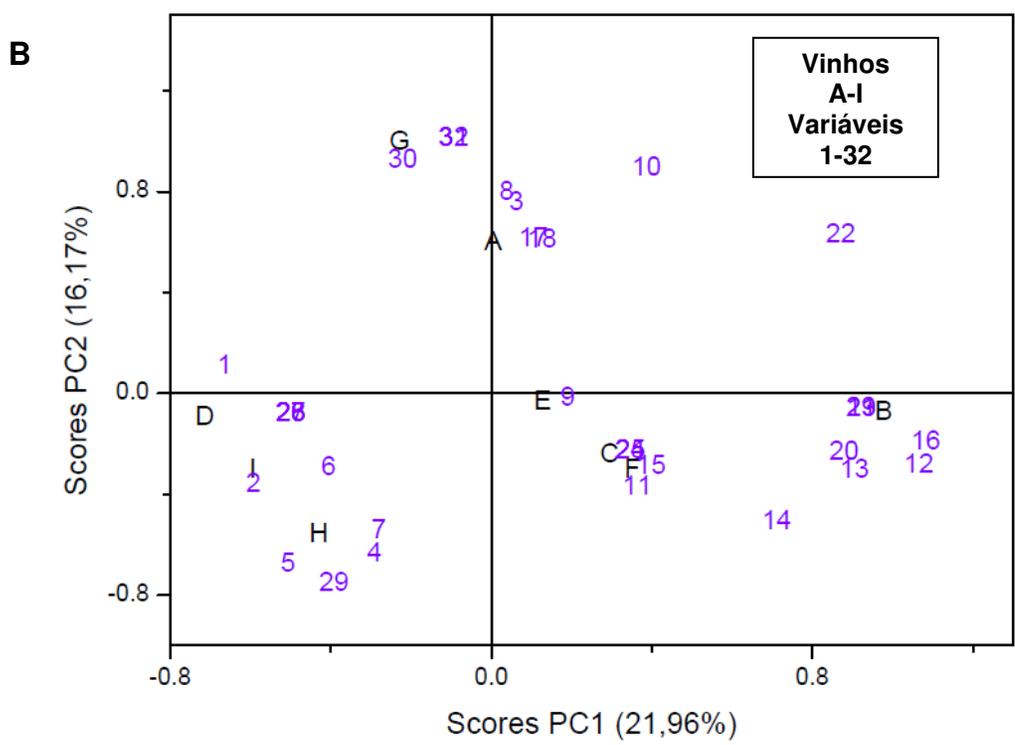
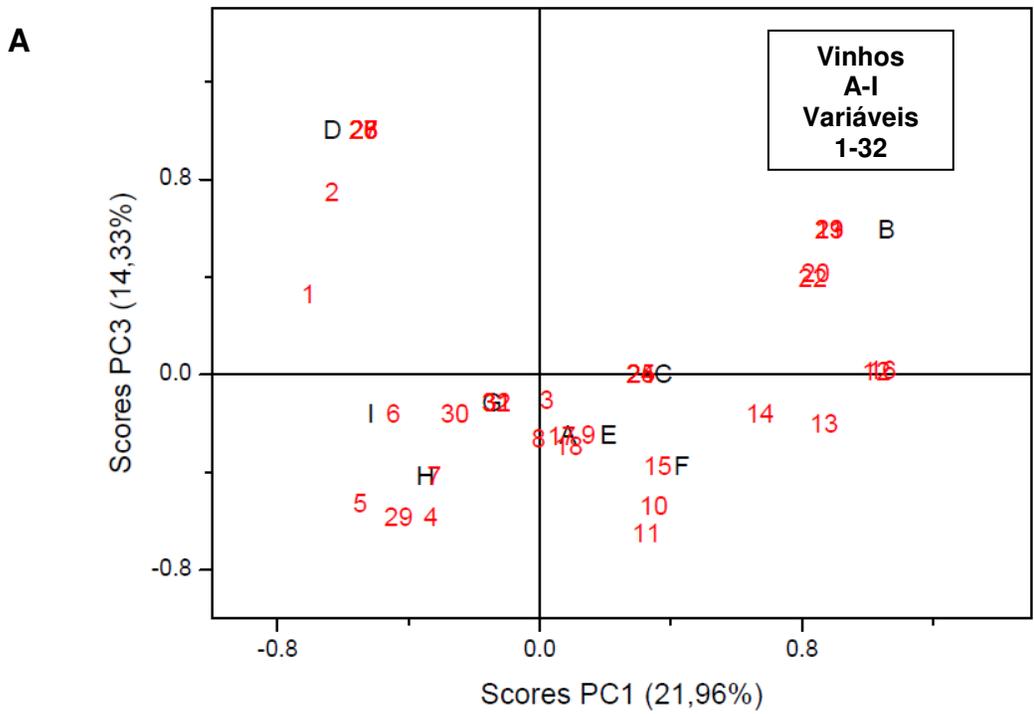


Figura 3.4 Análise de componentes principais dos *scores* e *loadings*: PC1 x PC3 (A); PC1 x PC2 (B) dos compostos voláteis encontrados nos vinhos. As letras A-I correspondentes aos vinhos e os números 1-32 correspondentes aos compostos voláteis (variáveis) listados na tabela 3.1.

3.4 Conclusão

Usando a técnica HS-SPME-GC-MS, foi possível avaliar a composição química, detectar e identificar os macroconstituintes voláteis do vinho paulista produzido a partir do híbrido Máximo IAC 138-22. Quando os perfis cromatográficos foram comparados através de análise estatística HCA, observou-se que a composição volátil do vinho paulista produzido a partir do híbrido Máximo IAC 138-22 é similar aos dos vinhos Syrah (*Vitis vinífera*) originários de diferentes regiões do mundo. Isto nos leva a crer que a uva híbrida desenvolvida no estado de São Paulo com maior resistência às doenças e melhor adaptadas às nossas condições ambientais seja capaz de produzir vinhos de composição química similar às *Vitis vinífera* europeias. A técnica de espectrometria de massas pode contribuir para um melhor controle de qualidade do vinho paulista e assim auxiliar no melhoramento genético e introdução de novos varietais.

Capítulo 4

Análise dos compostos polares do vinho por ESI FT-ICR MS

Capítulo 4. Análise dos compostos polares do vinho por FT- ICR MS

4.1 Objetivos

O objetivo deste segundo estudo foi analisar a composição química polar do vinho através da técnica de ionização por eletrospray com inserção direta combinada com a espectrometria de massas com ressonância ciclotrônica de íons e transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS).

4.2 Parte experimental

4.2.1 Amostras de vinhos: Foram analisadas amostras de vinhos de diferentes países produzidos a partir de uvas Syrah, Merlot, Tempranillo e Máximo. As amostras de vinhos foram: Vale do São Francisco-Brasil (V1); Argentina (V2); África do sul (V3); França (V4); Chile (V5); São Paulo-Brasil (V6); Itália (V7); Valinhos-SP (V8); Portugal (V9); Grécia (V10); Austrália (V11); Rio Grande do Sul (V12). Todos foram analisados em duplicata.

4.2.2 ESI-MS: Inicialmente foram feitos vários testes de diluição das amostras de vinhos de forma a obter a melhor ionização dos compostos para atingir melhor intensidade dos sinais dos compostos polares dos vinho. Várias razões de diluição dos vinhos em metanol 1:9, 1:2, 1:1 (v/v) bem como o vinho puro adicionando solução ácida ou básica foram testadas. A solução aquosa de ácido fórmico e hidróxido de amônio, quando adicionados foram nas concentrações de 0,1 e 0,2 % (v/v), respectivamente. Dessa forma, uma vez avaliadas as diluições das amostras, a melhor ionização foi obtida para a diluição de 1:9 (MeOH:vinho), assim uma alíquota de vinho de 100 µL foram dissolvidas em 900 µL de metanol. Para análise no modo positivo, um volume de 1µL de uma solução aquosa 0,1% de ácido fórmico (CH₂O₂, Fluka, 98%) foi adicionada aos 1000 µL da solução final para induzir a protonação das moléculas [M+H]⁺. Para a análise no modo negativo, um total de 1 µL de solução aquosa de hidróxido de amônio 0,1% (NH₄OH) foi adicionada no mesmo volume de amostra (1000 µL) para induzir a desprotonação dos íons [M-H]⁻. As amostras foram inseridas no

espectrômetro de massas com magneto de 7,2T, LTQ FT Ultra (ThermoScientific, Bremen, Germany). Para a inserção da amostra no modo positivo foi usado o sistema automatizado nano-ESI-MS (Triversa NanoMate 100 system, Advision BioSciences, Ithaca, NY, USA) sendo as amostras dispostas em 96 posições.

4.3 Resultados e discussão

A **Figura 4.1** mostra os espectros de massas obtidos por ESI FT-ICR MS no modo negativo dos vinhos analisados, sendo oito da uva Syrah, um da uva Merlot, um da uva Tempranillo, um da uva Bordô e um da uva Máximo. A calibração interna do equipamento com erro menor que 1 ppm na faixa de m/z 100-800, indica que a composição elementar atribuída aos íons pode ser assegurada com boa confiabilidade.

A **Figura 4.2** mostra o espectro de massas em modo negativo obtido por ESI (-) FT-ICR MS para uma amostra do vinho paulista. A expansão para três intervalos de massas (espectros superiores) mostra a resolução e atribuição de composição elementar para 11 íons característicos de compostos polares ácidos.

As moléculas de massas molares variadas, alta polaridade e complexidade estrutural tais como ácidos orgânicos simples, ácidos de fermentação e os hidroxinamatos foram facilmente ionizadas por ESI (-) e analisados por MS. Esses compostos apresentaram os sinais mais intensos nos espectros de massas de todos os vinhos.

Os espectros obtidos permitiram descrever a amostra do vinho pelos íons característicos dos compostos químicos polares. Utilizou-se a fórmula molecular para identificar os compostos encontrados, desde que atribuídas com erro menor ou igual a 1 ppm. O tratamento da grande quantidade de dados gerados é laborioso e requer um estudo prévio e minucioso das fórmulas estruturais dos compostos identificados de interesse na amostra, a fim de evitar erros na constatação das estruturas químicas.

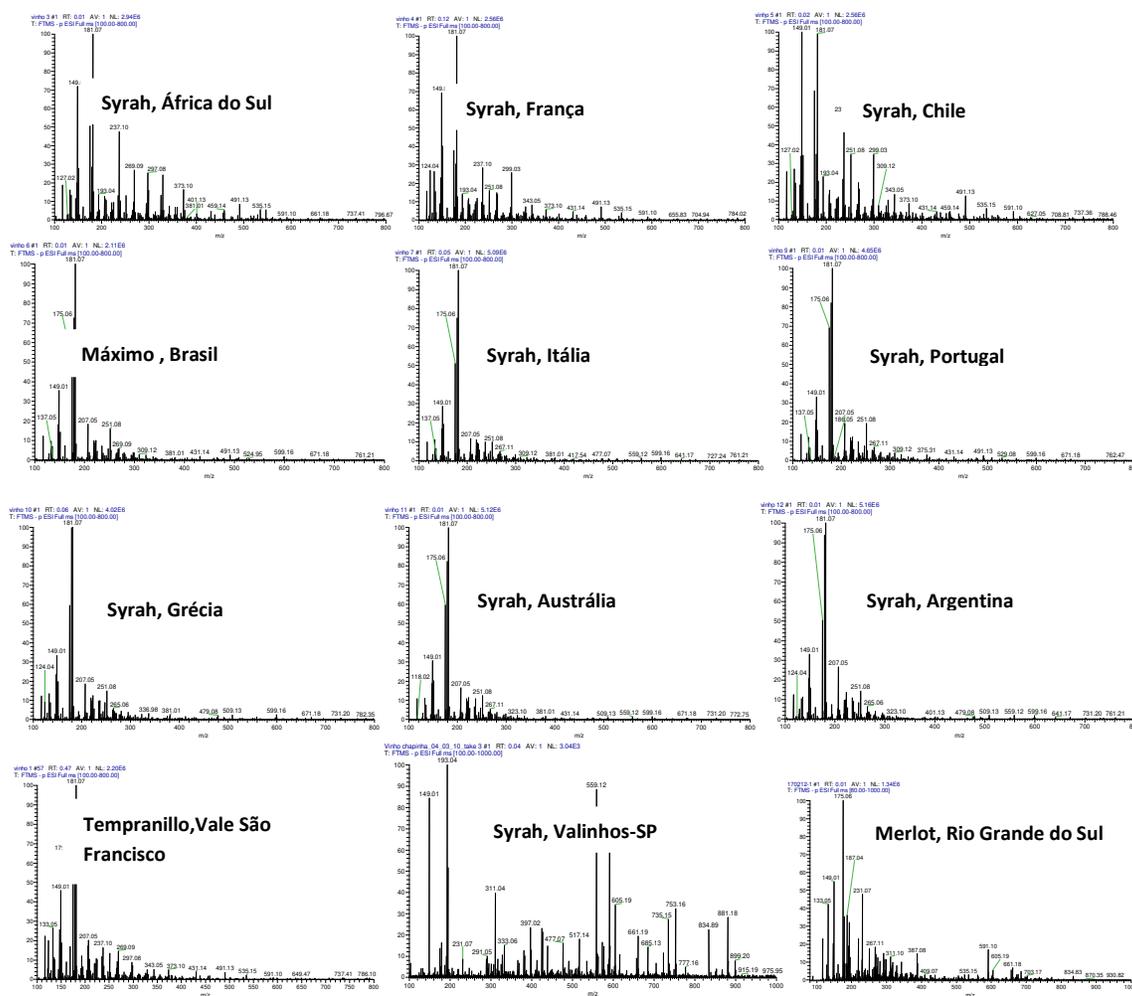


Figura 4.1 Perfis químicos no modo ESI (-) MS dos vinhos.

A **Tabela 4.1** apresenta uma lista contendo os compostos com os valores m/z teórica calculada a partir de combinações dos átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio com suas respectivas fórmulas moleculares e os erros correspondentes em relação à m/z experimental. Os valores de m/z experimentais são indicativos da presença de íons diagnósticos característicos de compostos ácidos (ácidos orgânicos simples, da fermentação e ácidos fenólicos). Esses últimos podem ser encontrados nas formas livres, glicosiladas ou na forma de dímeros. Dessa maneira, este trabalho proporcionou a identificação de aproximadamente 32 compostos químicos importantes do vinho, no modo negativo, através da atribuição de fórmula molecular única confirmada a partir de dados desses compostos previamente identificados na literatura.

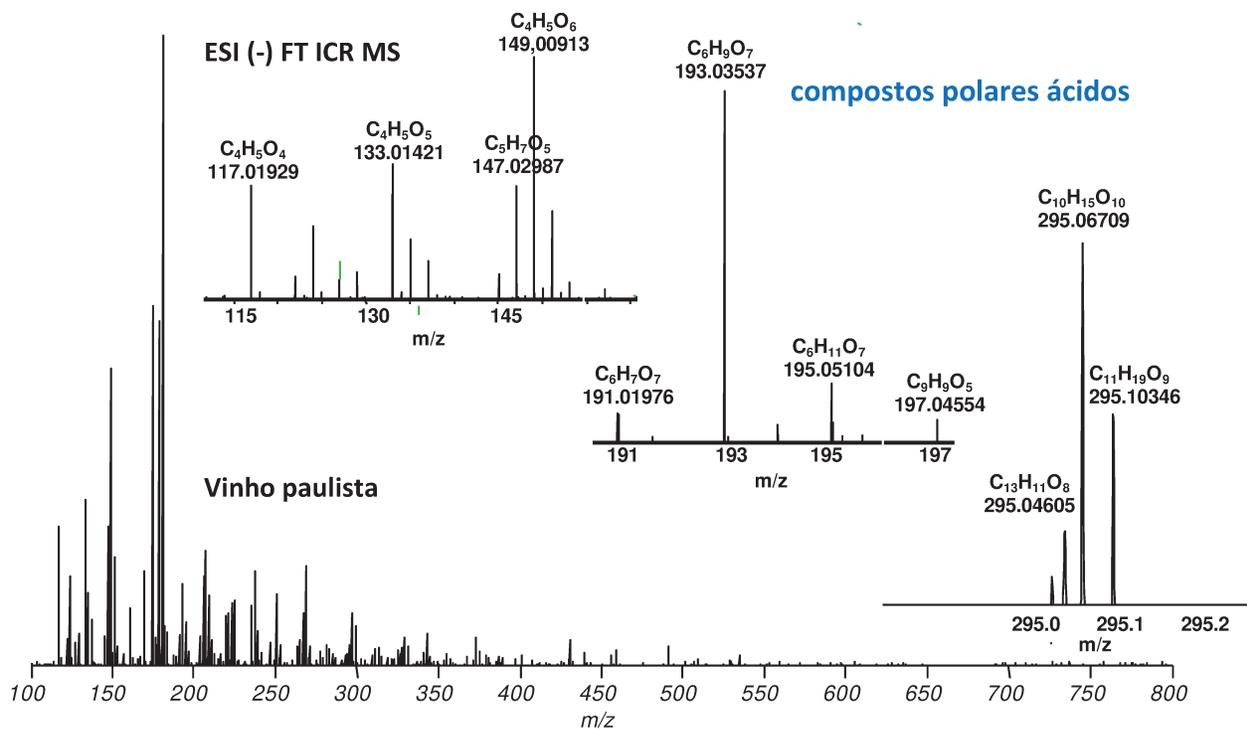


Figura 4.2 (a) Espectro de ESI (-) ICR-FT MS para amostra do vinho paulista com mais de 600 sinais resolvidos (b) expansão para diferentes intervalos de massas mostrando 11 íons resolvidos e característicos de compostos polares ácidos com suas fórmulas moleculares (ácido succínico m/z 117,01929; ácido málico m/z 133,01421; ácido citramálico m/z 147,02987; ácido cítrico m/z 191,01970; ácido D-glucônico m/z 195,05104; ácido siríngico m/z 197,04554 e ácido cumariltartárico m/z 295,04630).

4.3.1 Ácidos orgânicos encontrados nos vinhos tintos

Os ácidos orgânicos simples que foram identificados nos vinhos e originários da uva são: tartárico (m/z 149,00910), málico (m/z 133,01425) e cítrico (m/z 191,01970). Além desses três ácidos, foram detectados os ácidos fenilpropanóicos, tais como: o ácido cumárico (m/z 163,04015) que uma vez esterificado com uma função álcool e ácido tartárico fornece o ácido cumariltartárico (m/z 295,04630); o ácido D-glucônico (m/z 195,05103), originário da glicose que pode atingir altas concentrações em sucos de uva e vinho; o ácido mucico (m/z 209,03030) originado da oxidação da galactose, que é um produto indesejado no vinho. A presença deste último tem sido observada em depósitos formados durante o envelhecimento do vinho. A classe dos ácidos orgânicos simples foi detectada em

praticamente todos os vinhos tintos analisados e com intensidades de sinais elevadas e característica.

Os principais ácidos da fermentação detectados no vinho foram o ácido pirúvico (m/z 87,00877), ácido láctico (m/z 89,02431) e ácido fumárico (m/z 115,00540) detectados no vinho Merlot do Rio Grande Sul (V12). O ácido succínico (m/z 117,01933) foi identificado juntamente com o ácido citramálico (m/z 147,02990) em todos os vinhos. Esses dois últimos ácidos acentuam o sabor do vinho.

Os ácidos fenólicos foram detectados na forma livre, monoglicosilada e na forma de ésteres. Dentre os ácidos fenólicos encontrados nos vinhos, tem-se o ácido protocatéico (m/z 153,01930) que foi detectado em praticamente todos os vinhos, exceto nos vinhos argentino (V2) e francês (V4); o ácido gentísico (m/z 153,01920) foi detectado somente no vinho do Rio Grande do Sul (V12); o ácido cafeico (m/z 179,03470) apareceu nos vinhos da Argentina, África do sul, Chile, Portugal e Rio Grande do Sul; o ácido gálico (m/z 169,01430) foi detectado no vinho do Vale do São Francisco, África do Sul e Chile; O ácido ferúlico (m/z 193,05390) foi detectado somente no vinho da França; o ácido siríngico (m/z 197,04550) foi detectado no vinho do Vale do São Francisco, Chile, SP-Brasil, Itália e do Rio Grande do Sul; o ácido *p*-cumárico (m/z 163,04010) foi encontrado somente no vinho argentino e sua forma monoglicosilada (ácido glucosil *p*-hidroxibenzóico, m/z 299,07720) foi detectada nos vinhos do Chile, Itália e Austrália. O ácido glucosilprotocatéico e o ácido glucosilgentísico (m/z 315,07216) foram detectados em todas as amostras de vinhos. O ácido glucosilvanílico (m/z 329,08780) não foi detectado nos vinhos do Vale do São Francisco, França e Paulista; O ácido glucosilgálico (m/z 331,06710) foi identificado nos vinhos da África, França e Chile; já o ácido glucosilcafeico foi detectado somente no vinho da Austrália; o ácido glucosilferúlico foi detectado nos vinhos do Vale do São Francisco, África, França e Chile; o ácido glucosil *p*-cumárico foi detectado na maioria dos vinhos, menos no Paulista e da Grécia; o ácido glucosilsinápico apareceu somente no vinho da Argentina. Os ácidos cinâmicos foram detectados na forma livre e com maior frequência na forma esterificada, em particular com ácido tartárico, dando origem aos hidroxinamatos que são precursores dos flavonóides e taninos. Também podem formar glicosídeos simples ou ésteres de ácido tartárico, como por exemplo, o ácido cafeoiltartárico (m/z 311,04090) detectado em muitas amostras, exceto nos vinhos do Vale do São Francisco, Argentina e Chile. O ácido *p*-cumariltartárico (m/z

295,04594) foi detectado em todas as amostras de vinhos. Os hidroxinamatos foram detectados na composição de outros vinhos já estudados (Buiarelli, *et al.*, 2010).

4.3.2 Flavonóis encontrados no vinho

Esses compostos foram encontrados nas formas livres e glicosiladas, como por exemplo, a taxifolina glicosilada, conhecida como dihidroxiquercetina glicosilada (m/z 465,10393), 3-O-taxifolina raminosilada (m/z 449,10930) e 3-O-miricetina raminosilada (m/z 463,08813) foram identificados no vinho chileno (V5). Os flavonóis 3-O-quempferol raminosilada (m/z 431,09951) e quercetina (m/z 301,03529) foram identificados somente no vinho paulista (V6). A miricetina (m/z 317,03010) foi identificada nos vinhos argentino (V2), chileno (V5), paulista (V6) e gaúcho (V12). A **Figura 4.3** mostra o espectro de massas do vinho chileno (V5) com alguns dos flavonóides identificados. De acordo com os resultados obtidos, o vinho chileno e o paulista possuem perfil químico similar quanto à presença desses compostos. Isto caracteriza o vinho paulista genuinamente brasileiro como uma bebida com propriedades químicas benéficas à saúde humana, assim como de qualidade similar aos vinhos tintos Syrah.

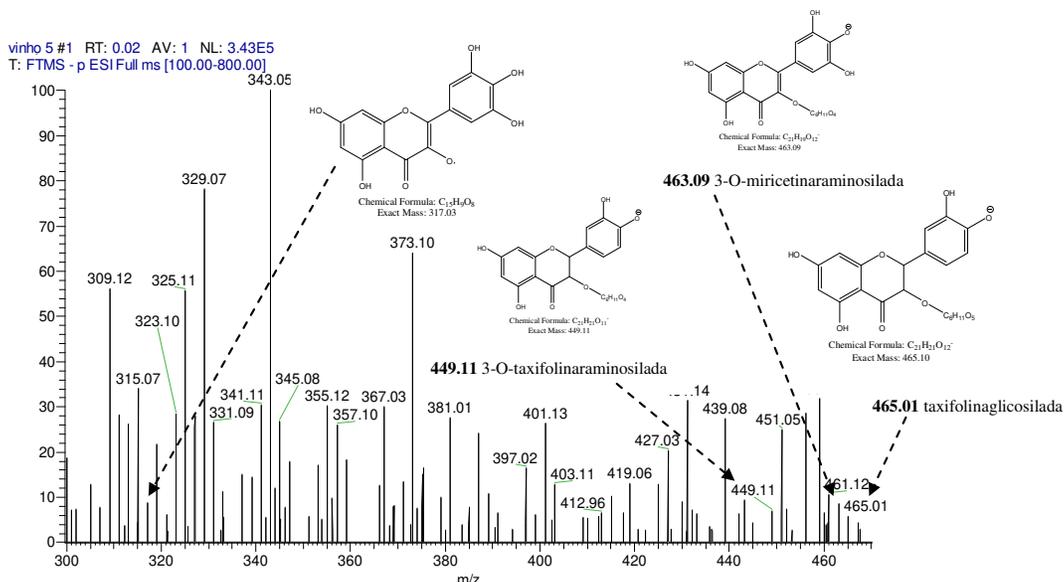


Figura 4.3 Espectros de massas (ESI) com alguns flavonóides identificados no vinho chileno (V5): taxifolinaraminosilada m/z 449.13076, taxifolinaglicosilada m/z 465.01970; 3-O-raminosilmiricetina m/z 463.09347 e miricetina m/z 317.03840

Tabela 4.1. Compostos identificados em vinhos por ESI (-) FT-ICR MS.

Classe/composto	Fórmula [M-H] ⁻	Massa teórica	Erro ppm	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
Ácidos orgânicos simples															
ácido málico	C ₄ H ₅ O ₅	133,01425	-0,04	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ácido tartárico	C ₄ H ₅ O ₆	149,00916	-0,95	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
ácido cumárico	C ₉ H ₇ O ₃	163,04015	-0,12	x											
ácido D-glucônico	C ₆ H ₁₁ O ₇	195,05103	-0,01	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ácido cítrico	C ₆ H ₇ O ₇	191,01970	0,01	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ácido 2-ceto-D-glucônico	C ₆ H ₉ O ₇	193,03540	0,00	x	x	x	x	x		x		x	x	x	x
ácido mucico	C ₆ H ₉ O ₈	209,03030	-0,04	x											
ácido cumariltartárico	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	295,04630	0,34	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ácidos orgânicos da fermentação															
ácido pirúvico	C ₃ H ₃ O ₃	87,00877	-0,89												x
ácido láctico	C ₃ H ₅ O ₃	89,02431	-0,11												x
ácido fumárico	C ₄ H ₃ O ₄	115,00540	0,67												x
ácido succínico	C ₄ H ₅ O ₄	117,01933	-0,95	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x
ácido citramálico	C ₅ H ₇ O ₅	147,02990	-0,89	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ácidos fenólicos															
ácido protocatequínico	C ₇ H ₅ O ₄	153,01930	-0,01	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x
ácido gentísico	C ₇ H ₅ O ₄	153,01920	-0,20												x
ácido caféico	C ₉ H ₇ O ₄	179,03470	-0,55		x	x		x				x			x
ácido gálico	C ₇ H ₅ O ₅	169,01430	0,03	x		x		x							x
ácido ferúlico	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,05390	-0,07				x								
ácido sirínico	C ₉ H ₉ O ₅	197,04550	-0,01	x				x	x	x					x
ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₁ O ₅	223,05600	0,60	x											
ácido- <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₇ O ₃	163,04010	0,51		x										
ácido glucosil- <i>p</i> -hidroxibenzóico	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	299,07720	0,80					x		x				x	
ácido glucosilprotocatequínico	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,07216	0,01	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ácido glucosilgentísico	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	315,07216	0,27	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ácido glucosilvanílico	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	329,08780	0,38		x	x		x		x		x	x		x
ácido glucosilgálico	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	331,06710	-0,34			x	x	x							x
ácido glucosilsirínico	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	359,09840	0,50		x	x									
ácido glucosilcaféico	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	341,08780	-0,30											x	
ácido glucosilferúlico	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	355,10346	-0,11	x		x	x	x							
ácido glucosil- <i>p</i> -cumárico	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	325,09289	0,04	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x
ácido glucosilsinápico	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	385,11402	-0,46		x										
2-Cafeoil-L-tartárico	C ₁₃ H ₁₁ O ₉	311,04090	0,32			x	x		x	x		x	x	x	x

V1 (Vale São Francisco); V2 (Argentina); V3 (África do Sul); V4 (França); V5 (Chile); V6 (paulista); V7 (Itália); V8 (Valinhos); V9 (Portugal); V10 (Grécia); V11 (Austrália), V12 (Rio Grande do Sul).

4.3.3 Antocianinas

Quanto às antocianinas, uma ou mais de suas hidroxilas estão ligadas a uma ou mais moléculas de açúcares, sendo a glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos os mais comuns, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, tais como p-cumárico, ferúlico, caféico, p-hidroxibenzóico, sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico. A malvidina na forma livre (m/z 331,07530), malvidina-3-O-monoglicosilada (m/z 493,13405) foi detectada em quase todas as amostras de vinhos, exceto no vinhos da Grécia; a petunidina-3-O-monoglucosídeo (m/z 479,1184) foram identificadas nos vinhos do Chile (V5), São Paulo (V6), Itália (V7), Portugal (V9), Austrália (V11), do Rio Grande do sul (V12); a delphinidina 3-monoglucosídeo (m/z 465,10275) foi detectada nos vinhos paulista (V6) e italiano (V7); a peonidina 3-monoglucosídeo (m/z 463,1235) foi encontrada nos vinhos do Chile (V5) e da Itália (V7); a malvidina-3-O-(6-O-acetil) monoglucosídeo (m/z 535,1446) foi identificada nos vinhos da Argentina, África do Sul, Grécia, Austrália e Rio Grande do Sul; a petunidina-3-O-(6-O-acetil) monoglucosídeo (m/z 521,1290) foi encontrada somente no vinho da Austrália; a delphinidina-3-O-(6-O-p-cumaril) monoglucosídeo (m/z 611,1395) juntamente com a cianidina-3-O-(6-O-p-cumaril) monoglucosídeo (m/z 595,1446) foram encontradas no vinho do Rio Grande do Sul.

A detecção das antocianinas aciladas e glicosiladas foram detectadas no modo positivo de ionização e os espectros de massas das mesmas amostras da **Figura 4.1** são mostrados na **Figura 4.4**. Embora a protonação e a desprotonação de uma molécula sejam processos que ocorrem simultaneamente dentro do capilar, a extensão dos mesmos depende, entre outros parâmetros, da estrutura da molécula (Crotti *et al.*, 2006). Moléculas que apresentam grupamente básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas, como por exemplo, antocianinas. Por outro lado, moléculas contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente são analisadas no modo negativo como os ácidos orgânicos e os hidroxinatos.

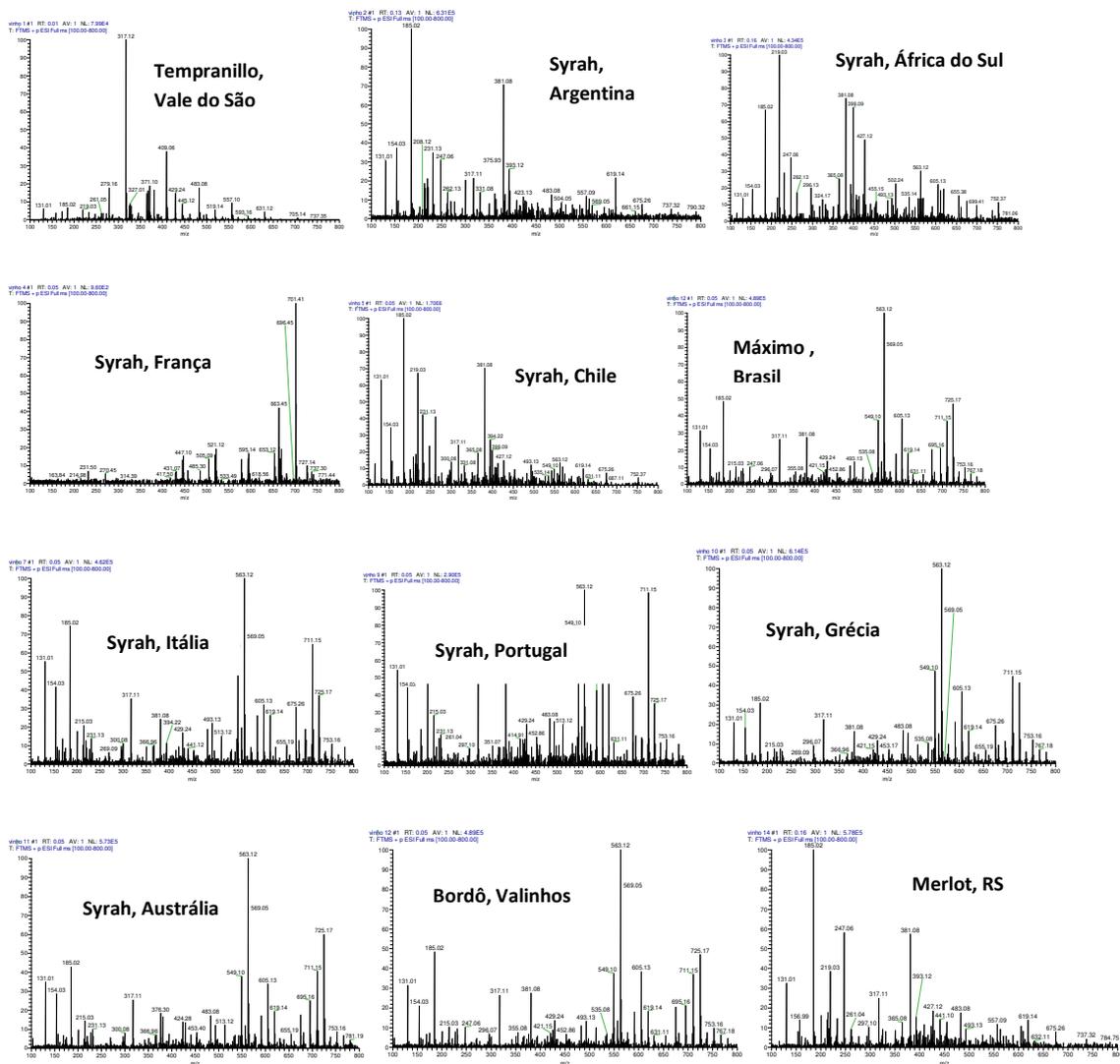


Figura 4.4 Perfis químicos no modo ESI (+) MS de vinhos tintos.

A **Tabela 4.2** apresenta uma lista contendo os valores m/z teórica calculada a partir de combinações dos átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio com suas respectivas fórmulas moleculares e os erros correspondentes em relação à m/z experimental. Os valores de m/z experimentais são indicativos da presença de íons diagnósticos característicos de antocianinas. Em todos os vinhos as antocianinas monoglicosiladas foram predominantes no modo positivo, embora com baixa intensidade de sinal, o que é comum, porém em nenhum dos vinhos foi identificado uma antocianina diglicosilada o que não era de se esperar, principalmente no caso do vinho híbrido Máximo. A ausência das antocianinas diglicosiladas

e taninos podem estar relacionados a vários motivos, tais como a baixa concentração desses compostos na bebida, a ausência de método de extração específico para esses compostos e a ocorrência de reações químicas entre antocianinas e diversos compostos que levam a formação de novos constituintes bem mais complexos difíceis de ionizar ou detectar apenas com a diluição da amostra em solvente.

Tabela 4.2 Antocianinas encontradas no vinho por ESI (+) FT ICR MS.

Classe/composto	Fórmula [M ⁺ +H] ⁺	Massa teórica	Erro ppm	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
malvidina-3-O-monoglicosídeo	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493,13405	-0,57	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
petunidina-3-O-monoglicosídeo	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479,1184	-0,53	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x
delfinidina-3-O-monoglicosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465,10275	-0,50						x	x					
peonidina-3-O-monoglicosídeo	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463,1235	-0,22					x		x					
malvidina-3-O-(6-O-acetil)monoglicosídeo	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃	535,1446	-0,57		x	x					x		x	x	x
petunidina-3-O-(6-O-acetil)monoglicosídeo	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃	521,1290	-0,82											x	
delfinidina-3-O-(6-O-p-cumaril)monoglicosídeo	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	611,1395	-0,45												X
cianidina-3-O-(6-O-p-cumaril)monoglicosídeo	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	595,1446	-0,09												x

Os resultados obtidos por ESI FT-ICR MS mostram que o vinho paulista é caracterizado por um perfil químico similar aos vinhos tintos Syrah de excelente qualidade tais como sul americano, francês e grego, principalmente quanto à presença de ácidos orgânicos simples, de fermentação, fenólicos e os flavonóides (flavonóis, flavanóis e antocianinas).

4.4 Conclusão

A técnica ESI FT-ICR-MS foi empregada com sucesso na caracterização do perfil químico de vinhos, provendo assim um método inovador, preciso e de alto detalhamento molecular e extremamente rápido, sendo capaz de elucidar estruturas químicas dos compostos fenólicos presentes no vinho a partir de combinações dos átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio com suas respectivas fórmulas moleculares e os erros correspondes à m/z experimental. Uma série de compostos polares pôde ser analisada em poucos minutos e sem extração ou separação prévia. Os compostos fenólicos foram encontrados na sua maioria nas formas livre, glicosilada e acilada. Os compostos fenólicos ácidos e os polifenóis constituem os analitos majoritários encontrados no modo ESI (-) FT ICR MS em relação às antocianidinas e taninos que foram pouco visualizadas no modo de ionização positivo. Nessa segunda fase do estudo constatou-se que o vinho brasileiro paulista possui um perfil químico similar aos outros vinhos tintos comerciais produzidos a partir da uva Syrah.

Capítulo 5

Validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinho por ESI-MS

Capítulo 5. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinho por ESI-MS

5.1 Objetivos

O objetivo deste terceiro estudo foi realizar a validação de um método para determinação de ácidos orgânicos em vinho empregando a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray e inserção direta (ESI-MS). Também foi empregada a ferramenta estatística, PCA, para agrupar as amostras.

5.2 Parte experimental

5.2.1 Reagentes e soluções analíticas

Os padrões utilizados, com grau de pureza superior a 99,0%, foram ácido L-(-) málico, ácido tartárico e ácido cítrico (Sigma Aldrich), os quais foram preparados em um vinho de-acidificado (vinho tinto sem os ácidos orgânicos) na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dessas soluções estoque, foram preparadas as soluções padrão para as curvas analíticas. O vinho de-acidificado foi obtido pela extração dos ácidos, inicialmente ativando-se os cartuchos de SPE fase C18 (Supelco) de 2,5 mL com a adição de 1 mL de metanol grau analítico HPLC (J.T.Baker, 99,97%), em seguida lavou-se os cartuchos com 1 mL de água ultrapura, Milli-Q, Millipore. Depois se transferiu 5 mL de vinho tinto e adicionou-se 5 mL de água ultrapura para retirada dos ácidos. A matriz retida nos cartuchos foi extraída em seguida com 5 mL de metanol e armazenada em frasco limpo de vidro com tampa de silicone a 6°C em geladeira.

5.2.2 Amostras

Foram utilizadas amostras de vinhos de diferentes países produzidos a partir de uvas Syrah e Merlot (*Vitis viníferas*), Máximo (híbrido de Syrah com Seibel 11342), Carmem

(híbrido de Muscat Belly com BRS-Rúbea) e Bordô (*Vitis labrusca*). As amostras de vinhos comerciais caracterizadas estão indicadas na **Tabela 5.4**.

5.2.3 Procedimentos gerais experimentais

As amostras foram analisadas por infusão direta com ionização por eletrospray (ESI) num espectrômetro de massas TQD ESI Waters ACQUITY (USA), sendo as amostras dispostas em 96 posições com injeção automática (volume total de 100 µL em cada posição). As condições otimizadas para ESI foram: voltagem do capilar +3,5 KV, cone +30 V, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação 300 °C fluxo do gás 450 L h⁻¹, faixa de massas 100-620. As amostras de vinho utilizadas para caracterização por ESI (-) MS foram representativas do conteúdo do extrato final. Uma alíquota de 100 µL de vinho foi dissolvida em 900 µL de metanol. Para análise no modo positivo, um volume de 1 µL de uma solução aquosa 0,1% de ácido fórmico (CH₂O₂, Fluka, 98%) foi adicionada aos 1000 µL da solução final para induzir a protonação das moléculas [M+H]⁺. Para a análise no modo negativo, um total de 1 µL de solução aquosa de hidróxido de amônio 0,1% (NH₄OH) foi adicionada no mesmo volume de amostra (1000 µL) preparado no modo negativo para induzir a desprotonação dos íons [M-H]⁻.

5.2.4 Análise estatística dos dados

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada empregando o software Pirouette versão 2.60 da Infometrix, Woodinville, WA, USA e o programa Origin 6.0.

5.2.5 Validação do método

Após definidas as melhores condições de análises por ESI-MS, e as diluições das amostras, a validação do método foi efetuada abrangendo as seguintes figuras de mérito (INMETRO, 2010):

5.2.5.1 Seletividade

Neste trabalho foram analisados dois conjuntos de padrões na faixa de concentração igual a 1,25-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$: o primeiro conjunto foi preparado com os padrões (ácido málico, ácido tartárico e ácido cítrico) em metanol e o segundo conjunto de padrões foi preparado na solução de vinho de-acidificado. Cada concentração do padrão foi preparada e injetada três vezes para avaliar o efeito matriz. Aplicou-se um teste estatístico simples, chamado teste F definido como a razão entre as duas variâncias das amostras ($F = s_1^2/s_2^2$) que é calculado e comparado com o valor crítico de F em um determinado nível de confiança de 95% é igual a 19,0 para os três ácidos.

5.2.5.2 Exatidão

Neste trabalho três amostras das soluções padrão dos ácidos foram preparadas nas concentrações 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras também foram injetadas em triplicata para melhor verificação do método. A exatidão do método analítico é expressa pela relação entre a média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, tendo o resultado como % de recuperação.

5.2.5.3 Linearidade

A faixa linear para este trabalho foi estabelecida através da inserção de 5 soluções padrão de concentrações diferentes obtidas a partir de diluições da solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada ácido (málico, tartárico e cítrico) em vinho de-acidificado conforme segue: 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram inseridas em triplicata e a curva analítica para cada ácido orgânico foi obtida pela correlação entre a concentração e área do sinal analítico, através do modelo linear dos mínimos quadrados (Origin 6.0). **Figura 5.1.**

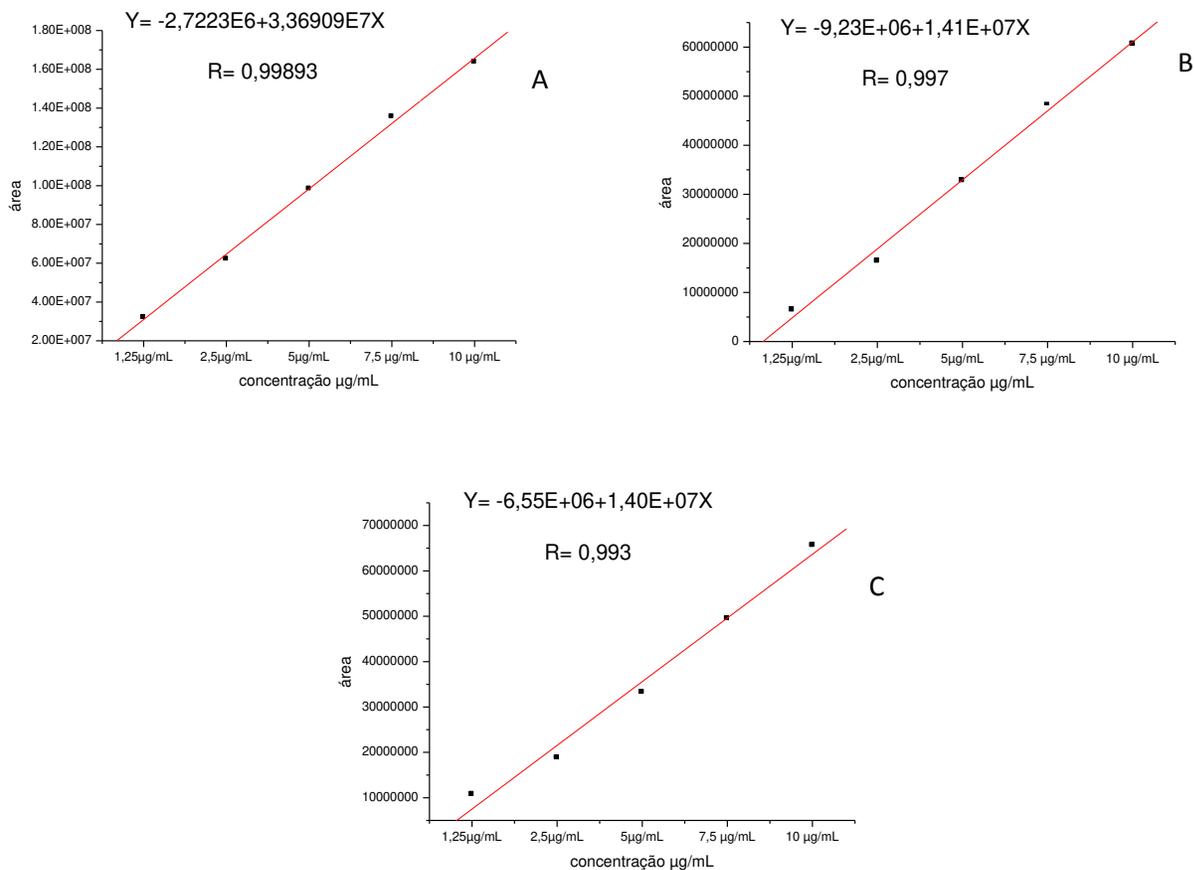


Figura 5.1 Gráfico de área x concentração para o teste de linearidade- (A) ácido málico, (B) tartárico e (C) cítrico.

5.2.5.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração detectável e não necessariamente quantificada, utilizando um determinado método. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida empregando determinado método. O LD e LQ foram calculados baseados em parâmetros da curva analítica, expressos como: $LD = 3,3 \times s/S$; $LQ = 10 \times s/S$

Onde, s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

5.2.5.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV) também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) é calculado da seguinte forma:

C.V. = DPR = $DP/CMD \times 100$, sendo DP= desvio padrão; CMD = concentração média determinada.

5.2.5.6 Repetitividade (precisão intra-corrída)

A repetitividade pôde ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e foi avaliada por meio da análise da solução padrão dos ácidos em três valores de concentração ($2\mu\text{g mL}^{-1}$, $4\mu\text{g mL}^{-1}$ e $8\mu\text{g mL}^{-1}$) preparados em metanol e no vinho de-acidificado. Foram analisadas cinco réplicas de cada nível de concentração do analito.

5.2.5.7 Precisão intermediária (precisão inter-corrída)

Para a determinação da precisão intermediária foram analisadas 5 réplicas em três níveis de concentração: baixa ($2\mu\text{g mL}^{-1}$), média ($4\mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($8\mu\text{g mL}^{-1}$) de cada ácido em dias diferentes e com o mesmo analista.

5.2.5.8 Exatidão

Neste trabalho três amostras das soluções padrão dos ácidos foram preparadas nas concentrações: $1,25\mu\text{g mL}^{-1}$, $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$ e $5\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras também foram injetadas

em triplicata para melhor verificação do método. A exatidão do método analítico é expressa pela relação entre a média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, tendo o resultado como % de recuperação.

5.3 Resultados e Discussão

A seletividade do método foi satisfatória para todos os ácidos orgânicos, pois de acordo com os dados obtidos, observou-se que não há diferença significativa entre os desvios do conjunto de amostras diluídas em metanol e as diluídas em vinho de-acidificado e, portanto não há efeito de matriz, ou seja, a matriz não interfere na análise, pois o F calculado para os três ácidos foi menor que o F crítico, como mostra a **Tabela 5.1**.

Tabela 5.1. Resultados obtidos no teste de seletividade para os ácidos: málico, tartárico e cítrico.

	ácido málico 1,25 µg mL ⁻¹		ácido tartárico 1,25 µg mL ⁻¹		ácido cítrico 1,25 µg mL ⁻¹	
	Padrão/MeOH	Padrão/vinho de-acidificado	Padrão/MeOH	Padrão/vinho de-acidificado	Padrão/MeOH	Padrão/vinho de-acidificado
área média	39,275,447	32,137,030	8,126,197	6,433,442	12,724,429	10,743,383
variância	3,452,670	1,260,729	166,591	214,953	315,201	381,724
observações	3	3	3	3	3	3
F _{calculado}		7,5		0,60		0,68
F _{crítico 95%}		19,0		19,0		19,0

*Critério de aceitação: $F < F_{crit}$

Os dados de linearidade da curva analítica, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão do método, cujos resultados são expressos em recuperação percentual, são mostrados na **Tabela 5.2**. Nela observa-se que a curva analítica, nas condições otimizadas, apresenta linearidade nas faixas de concentrações estudadas e os coeficientes lineares variam de 0,993 (ác. cítrico), 0,997 (ác. tartárico) e 0,999 (ác. málico). Os limites de detecção e quantificação foram relativamente baixos iguais a 0,278-0,711 µg mL⁻¹ e 0,843-2,157 µg mL⁻¹ respectivamente, e foram similares aos valores encontrados na literatura (MATO et al. (2007); PERES et al. (2009); ANDRADE LIMA et al. (2010); ZOTOU et al. (2004); ZHENG et al. (2009). O resultado também mostra que a variação dos valores de áreas nos 5 níveis de concentração não excedeu 5%, demonstrando repetibilidade instrumental e similaridade com

os valores encontrados em outros trabalhos (Mato, Suárez-Luque, e Huidobro, 2007; Zheng, Duan, Zhang, Pan, Li, e Huang, 2009).

Tabela 5.2. Parâmetros analíticos obtidos para análise quantitativa dos ácidos em vinho.

Composto	Dados de linearidade da curva	Limites do instrumento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Exatidão (recuperação%)		
		R	LD	LQ	1	2	3
ác. málico	Equação da reta $Y = -2,7223E6 + 3,36909E7X$	0,999	0,278	0,843	95.30	107.58	117.63
ác. tartárico	$Y = -9,23E+06 + 1,41E+07X$	0,997	0,456	1,383	93.15	98.87	103.01
ác. cítrico	$Y = -6,55E+06 + 1,40E+07X$	0,993	0,711	2,157	45.59	82.41	87.25

*Critério de aceitação: 70% <Recuperação <120%. (1) $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$; (2) $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; (3) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados da exatidão nas concentrações estudadas são considerados satisfatórios por estarem dentro dos limites aceitos para validação pelo INMETRO-2010 (70-120%), exceto para o nível inferior de concentração ($1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) para o ácido cítrico, fato que esse justificado pela dificuldade de extração do ácido cítrico existente em baixa concentração nos vinhos.

A **Tabela 5.3** mostra os resultados da precisão do instrumento e do método ESI-MS. A precisão do método foi satisfatória para todos os ácidos, pois os valores de repetibilidade do instrumento e do método não ultrapassaram os limites máximos aceitos para validação, 5 e 15 %, respectivamente. A precisão intermediária do método foi avaliada pela comparação entre as áreas obtidas para cada composto em dias diferentes e constatou-se não haver diferença significativa entre elas ($p < 0,01$) em todos os ácidos orgânicos, o que mostra a precisão intermediária do instrumento. Como se pode notar também, os CVs (%) para a precisão intra-dia variam no intervalo 0,82-2,99 e para precisão inter-dia entre 0,82 e 4,26%, indicando alto grau de precisão para o método proposto para ESI-MS.

Os resultados das concentrações de ácido málico, tartárico e cítrico encontrado nas amostras de vinhos são apresentados na **Tabela 5.4**. Nela verifica-se que os vinhos brasileiros e importados apresentam concentrações de ácido tartárico superior aos demais ácidos.

Tabela 5.3. Resultados da repetibilidade do instrumento e do método.

Composto	Repetibilidade instrumento (CV%)			Repetibilidade método (CV%)								
	1	2	3	1			2			3		
				1 ^o dia	2 ^o dia	3 ^o dia	1 ^o dia	2 ^o dia	3 ^o dia	1 ^o dia	2 ^o dia	3 ^o dia
ác. Málico	0,82	1,20	1,24	0,87	0,82	1,84	1,20	1,93	1,96	3,17	3,10	1,24
ác. Tartárico	2,99	0,93	1,04	3,38	2,99	3,74	1,83	1,50	0,93	1,04	2,77	2,09
ác. Cítrico	2,20	1,76	1,12	4,26	4,21	2,20	1,76	2,89	2,51	1,40	1,12	2,77

*(1) ác. Tartárico, málico e cítrico 2,0 µgmL⁻¹; (2) ác. Tartárico, málico e cítrico 4,0 µgmL⁻¹; (3) ác. Tartárico, málico e cítrico 8,0 µgmL⁻¹.

Constatou-se teor médio mais elevado de ácido tartárico nos vinhos Bordô da Serra Gaúcha-RS. Isto ocorre, devido à composição da uva, especialmente da casca e polpa onde há maior concentração de ácido tartárico comparada às tintas americanas, híbridas e *Vitis vinífera*. Outro fator que pode ter contribuído para o teor mais elevado de ácido tartárico é a região de cultivo. A Serra Gaúcha é uma região muito conhecida por suas condições climáticas e solo favoráveis para o cultivo de uvas, permitindo melhor desenvolvimento das bagas de excelente qualidade e conseqüentemente vinhos com alto teor de ácido tartárico. Os vinhos Bordô e Isabel de Valinhos-SP, que apresentaram teores inferiores de ácido tartárico mesmo quando originados das mesmas uvas, porém cultivadas na região serrana. Podemos observar que mesmo na região de Valinhos-SP, o teor de ácido tartárico no vinho Bordô continua sendo superior ao vinho Isabel também de Valinhos-SP. Isto comprova a superioridade da uva americana Bordô quanto ao teor ácido e o efeito da região serrana no cultivo destas uvas.

Tabela 5.4. Concentrações dos ácidos orgânicos (tartárico, málico, e cítrico) em amostras de vinhos tintos nacionais e importados por ESI-MS com inserção direta.

vinho	uva	origem	ácido málico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ácido tartárico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ácido cítrico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
2	Bordô	Serra Gaúcha-RS	2,79 \pm 0,27	7,63 \pm 0,21	1,82 \pm 0,05
3	Bordô+Merlot	Serra Gaúcha-RS	2,88 \pm 0,11	9,94 \pm 0,40	3,88 \pm 0,11
4	Bordô+Merlot	Serra Gaúcha	2,05 \pm 0,30	2,58 \pm 0,15	1,77 \pm 0,06
5	Syrah	Nova Zelândia	4,18 \pm 0,34	5,48 \pm 0,17	1,70 \pm 0,04
6	Isabel+Bordô	Serra Gaúcha-RS	5,07 \pm 0,22	5,93 \pm 0,20	2,77 \pm 0,11
7	Syrah	França	5,38 \pm 0,11	4,91 \pm 0,21	2,62 \pm 0,10
8	Carmem	Serra Gaúcha-RS	2,75 \pm 0,12	4,24 \pm 0,18	2,48 \pm 0,10
9	Merlot	Serra Gaúcha-RS	6,30 \pm 0,23	3,01 \pm 0,16	1,49 \pm 0,08
10	Syrah	Austrália	2,99 \pm 0,27	3,47 \pm 0,14	1,47 \pm 0,05
11	Syrah	Itália	4,56 \pm 0,11	3,49 \pm 0,20	1,61 \pm 0,06
12	Syrah	Chile	5,01 \pm 0,23	4,60 \pm 0,22	1,74 \pm 0,05
13	Syrah	Grécia	4,58 \pm 0,03	2,83 \pm 0,11	3,59 \pm 0,21
14	Syrah	Portugal	3,61 \pm 0,20	5,55 \pm 0,15	1,78 \pm 0,08
15	Bordô	Valinhos-SP	4,16 \pm 0,20	4,52 \pm 0,11	1,35 \pm 0,07
16	Isabel	Valinhos-SP	8,72 \pm 0,21	3,56 \pm 0,10	1,43 \pm 0,05
17	Syrah	Argentina	4,49 \pm 0,30	6,73 \pm 0,21	2,85 \pm 0,60
18	Syrah	Portugal	4,57 \pm 0,11	5,52 \pm 0,17	2,19 \pm 0,11
19	Syrah	África do Sul	2,81 \pm 0,15	4,34 \pm 0,18	1,82 \pm 0,10
20	Syrah	Vale do São Francisco	4,20 \pm 0,03	3,74 \pm 0,14	1,39 \pm 0,12
21	Syrah	Chile	4,79 \pm 0,20	6,32 \pm 0,21	2,46 \pm 0,11
22	Syrah	Argentina	3,38 \pm 0,21	4,44 \pm 0,18	1,54 \pm 0,05
23	Máximo	São Paulo	2,90 \pm 0,16	3,66 \pm 0,11	1,28 \pm 0,04
24	Syrah	Chile	3,16 \pm 0,18	4,44 \pm 0,21	1,45 \pm 0,02
25	Máximo	São Paulo	3,15 \pm 0,22	4,61 \pm 0,19	1,21 \pm 0,05
26	Syrah	França	7,46 \pm 0,11	14,23 \pm 0,40	4,32 \pm 0,21
27	Merlot	Serra Gaúcha-RS	6,37 \pm 0,13	3,02 \pm 0,13	1,67 \pm 0,01

Os vinhos híbridos (Máximo e Carmem) não apresentam diferenças significativas com relação ao teor de ácido tartárico, ambos originados da região paulista e serrana, respectivamente. Uma vez que a região de cultivo pode influenciar na composição das uvas, deduzimos que o vinho híbrido teria um maior teor de ácido tartárico se produzido a partir de

uvas Máximo cultivadas na região serrana, o contrário poderia ser observado com o vinho Carmem quando processado a partir de bagas cultivadas na região paulista.

Quanto aos demais vinhos, foram constatados teores similares de ácido tartárico, exceto para os Syrah da região de Sendero de Chile e da Argentina, que tiveram teores superiores aos vinhos de uvas do grupo das americanas, *Vitis vinífera* e híbridos, porém ainda inferiores ao vinho Bordô da Serra Gaúcha-RS.

Quanto ao ácido málico, foram detectados os teores mais elevados na cultivar americana Isabel da região de Valinhos-SP, seguida pelas *Vitis vinífera* Merlot e Syrah da França. Os teores de ácido málico nos vinhos da Serra Gaúcha, exceto Merlot, são baixos em comparação aos vinhos de Valinhos, Vale do São Francisco, São Paulo e demais regiões do mundo. Com relação ao ácido cítrico, constataram-se os teores médios baixos em praticamente todos os vinhos, exceto os Syrah da França, Grécia, e o Bordô da Serra Gaúcha. Isto ocorre em parte devido a fermentação malolática que converte o ácido cítrico em málico. A correção da acidez do ácido tartárico também contribui para a redução do nível de ácido málico no vinho.

5.3.1 Comparação de métodos

Recentemente, uma revisão completa com diversos trabalhos sobre novas técnicas analíticas para caracterização de vinhos foi publicado (Mato, Suárez-Luque, e Huidobro, 2005). Contudo, este estudo é o primeiro que utiliza o método ESI-MS com inserção para quantificar ácidos orgânicos. Com isso, para comparar os resultados analíticos deste método proposto com os resultados obtidos por outros trabalhos; cinco trabalhos sobre análise de ácidos orgânicos em vinhos foram selecionados (três métodos de cromatografia líquida (LC) e dois de eletroforese capilar (CE), onde os fatores selecionados para efeito de comparação foram: a categoria de ácidos orgânicos detectados, LD, LQ, precisão, recuperação e DPR, indicados na **Tabela 5.5**. Em geral, o método de CE separa os ácidos orgânicos em menos tempo e possui maior faixa de trabalho (Peres, Moraes, Micke, Tonin, Tavares, e Rodriguez-Amaya, 2009; Mato, Suárez-Luque, e Huidobro, 2007) ao passo que a maior sensibilidade e precisão são obtidos quando os métodos por LC são adotados (Zotou, Loukou, e Karava, 2004; Zheng, Duan, Zhang, Pan, Li, e Huang, 2009), indicando que o método LC é mais adequado

para determinar os ácidos presentes em mais baixa concentração no vinho. Os dados obtidos de linearidade, precisão e recuperação para o método proposto em nosso estudo indicam que ESI-MS com inserção direta pode ser empregado para os mesmos fins que os métodos mencionados. As principais vantagens do método ESI para quantificação, são: 1) não faz uso de separação cromatográfica, 2) simples preparo de amostras com apenas diluição e filtração prévia da amostra, 3) tempo curto de análise (<5 minutos).

Tabela 5.5 Parâmetros de validação de outros métodos para quantificação de ácidos orgânicos em vinho.

Método	LD	LQ	análise intradia	Análise interdía	Recuperação	RSD	Referências
	(µg/mL)		(%)				
<i>ácido tartárico</i>							
CZE-UV	0,38	1,31	1,09	2,44	102,5	0,9	Mato et al. (2007) ²¹
CE-UV	1,02	3,42	-	-	98,1	1	Peres et al. (2009) ²⁰
CLAE	2,6	13	1,12	0,4	108-115	-	Andrade Lima et al. (2010) ¹
RP-HPLC-UV	0,025	0,05	0,5-3,3	1,5-6,4	79,8-102	-	Zotou et al. (2004) ¹⁹
RP-LC	0,6	2	0,04	0,1	89,1	-	Zheng et al. (2009) ²²
<i>ácido málico</i>							
CZE-UV	0,05	0,53	2,19	3,98	99	4,3	Mato et al. (2007) ²¹
CE-UV	0,64	2,12	-	-	99	1	Peres et al. (2009) ²⁰
CLAE	4,2	20,9	1,35	5,5	109-114	-	Andrade Lima et al. (2010) ¹
RP-HPLC-UV	0,25	1	0,5-1,0	0,5-2,0	90,0-92,0	-	Zotou et al. (2004) ¹⁹
RP-LC	1,6	5,3	0,2	1,1	95,6	-	Zheng et al. (2009) ²²
<i>ácido cítrico</i>							
CZE-UV	0,23	0,71	2,86	1,15	99,5	0,4	Mato et al. (2007) ²¹
CE-UV	1,55	5,15	-	-	102	1	Peres et al. (2009) ²⁰
CLAE	5,4	7,3	0,43	3,6	97-103	-	Andrade Lima et al. (2010) ¹
RP-HPLC-UV	0,1	0,2	0,5-1,0	1,0-1,7	78,3-89,2	-	Zotou et al. (2004) ¹⁹
RP-LC	2,3	7,7	1,6	5,5	106,3	-	Zheng et al. (2009) ²²

5.3.2 Fingerprints dos vinhos por ESI-MS

Os gráficos dos *escores* (amostras) e dos *loadings* (variáveis) da componente principal 1 versus a componente principal 2 são mostrados nas **Figura 5.2** e **Figura 5.3**, respectivamente. Através dos pesos dos teores dos três principais ácidos quantificados por ESI (málico, tartárico e cítrico), percebemos que os ácidos tartárico e málico são os mais importantes para o agrupamento das amostras na **Figura 5.2**. O PCA explica 96% da variação total dos dados; sendo que a PC1 explica 71% e a PC2 explica 25% de variância dos dados. A amostra 26 (vinho da França, uva Syrah) destaca-se das demais amostras na região positiva da PC1 e da PC2 por apresentar maior concentração de ácido málico, tartárico e cítrico. As amostras 2 (vinho artesanal de adega do Paraná, uva Bordô), 3 (união de vinhos da Serra Gaúcha, uvas Bordô e Merlot) e 17 (vinho da Argentina, uva Syrah) se destacam na região positiva da componente principal 1 por apresentarem as maiores concentrações de ácido tartárico. As amostras 9 (vinho da Serra Gaúcha, uva Merlot), 27 (vinho da Serra gaúcha, uva Merlot) e 16 (vinho de Valinhos-SP, uva Isabel) se destacam na parte positiva da PC2 por apresentarem maiores concentrações de ácido málico. As amostras que mais se assemelham formam um grupo central e são provenientes das uvas Syrah, Máximo e Carmem. Os vinhos provenientes das uvas Bordô e Merlot se diferenciam dos demais. A **Figura 5.3** mostra o segundo gráfico dos *escores* e *loadings* da análise de PCA (PC1 x PC2 x PC3) dos *fingerprints* dos vinhos. Os pesos das três principais componentes principais explicam 95% da variância dos dados, sendo que a PC1 explica 78%, a PC2 explica 12% e PC3 explica 5%. Podemos observar no gráfico dos *loadings* (**A**) que a componente 1 é representada pelo íon de m/z 149, referente ao ácido tartárico. A componente 2 é representada pelos íons m/z 133 e 117, referentes aos ácidos málico e succínico, respectivamente. E a componente 3 é representada pelos íons m/z 117, 129, 175 e 133. O gráfico dos *escores* (**B**) mostraram que o conjunto dos vinhos Sendero, Finca El Retiro, Libra, Syrah português, Campo largo, Bordô, FE, Bullnose e Oracle além das amostras 1 e 2 se destacam na região positiva da PC1 quanto ao teor de tartárico, ao passo que os vinhos Charboneau, Trento, Cortona, Finca Fickman, Santa Rita e principalmente o Tordin se destacaram quanto ao teor de ácidos málico e succínico. Os vinhos Máximo, Trento, Santa Rita, Charboneau, Coonawarra, Bullnose, Sendero, Oracle, Felipe Eduardo,

Finca Finckman, Syrah de Portugal e amostras 1 e 2 se destacam na região positiva da PC3 (C), ou seja, possuem maior intensidade quanto aos íons de m/z 117, 129 e 175 e negativamente quanto a concentração do ácido málico.

Este estudo comparativo revela que existe uma diferença de teores ácidos entre as amostras de vinhos produzidos a partir de dois conjuntos de uvas: o grupo de vinhos originados das uvas Merlot e Bordô apresenta maior variabilidade entre os valores de ácidos málico, tartárico e cítrico que o grupo de vinhos produzidos a partir das uvas Syrah, Máximo e Carmem, indicando que a composição do segundo conjunto de vinhos é menos diversificada. Os *fingerprints* com os íons característicos dos vinhos que mais se diferenciaram quanto ao teor de ácidos orgânicos são mostrados nas **Figuras 5.4 e 5.5**.

Os *fingerprints* das amostras de vinhos originados da uva Bordô, Merlot e da combinação das duas são muito similares, variando apenas em intensidade de sinais dos íons característicos comuns de m/z [M-H]⁻ 103, 117, 129, 133, 147, 149, 175, 191 e 193. No *fingerprint* do vinho do Rio Grande do Sul produzido somente a partir da uva Merlot, observa-se além dos íons característicos comuns em maior intensidade outros íons de menor intensidade de m/z 125, 143 e 161. O vinho de adega da uva Bordô possui um *fingerprint* simples com além dos íons comuns característicos o íon de m/z 187. O vinho Syrah de uva do mesmo nome cujo *fingerprint* mostra os mesmos íons do grupo de vinhos Bordô, Merlot e de adega artesanal também outros íons de m/z 115, 159, 177 e 307. Já o vinho Máximo apresenta além dos íons comuns característicos a todos os vinhos tintos mais dois íons de m/z 295 e 325.

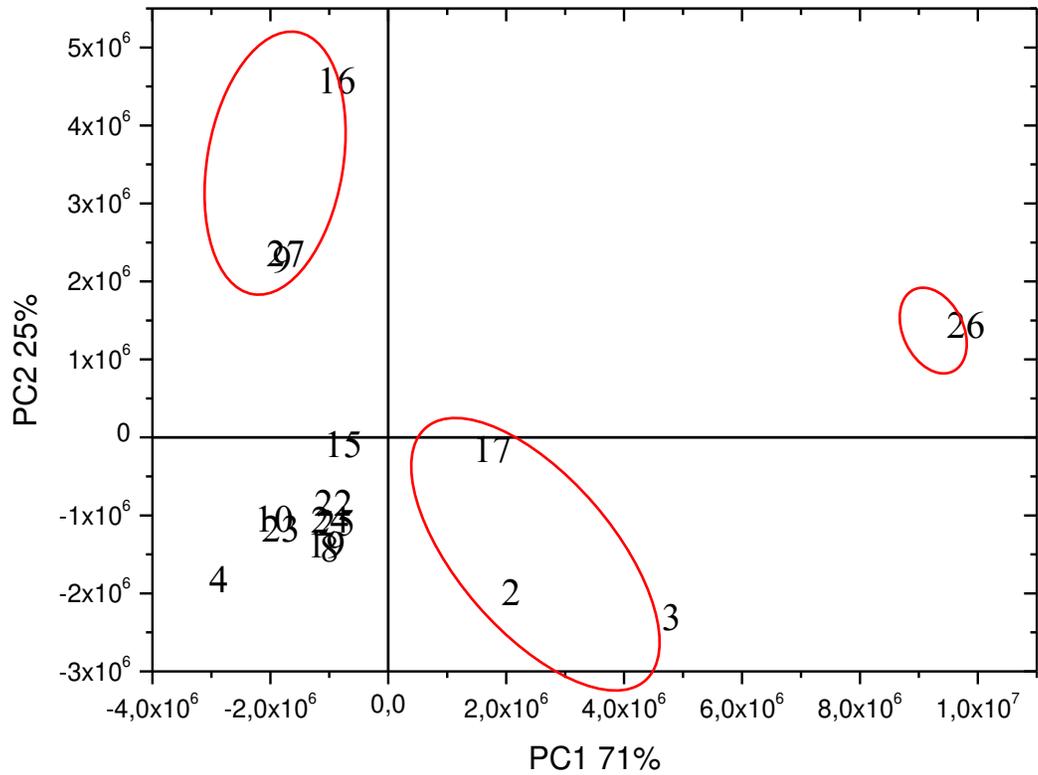


Figura 5.2 PCA dos escores: PC1 x PC2 das amostras de vinhos da Tabela 5.4: (2) vinho Bordô, PR-Brasil; (3) e (4) vinho Bordô e Merlot; (9) vinho Merlot, PR-Brasil; (16) vinho Isabel, SP; (17) vinho Syrah da Argentina; (26) vinho Syrah, USA; (27) vinho Merlot, RS-Brasil.

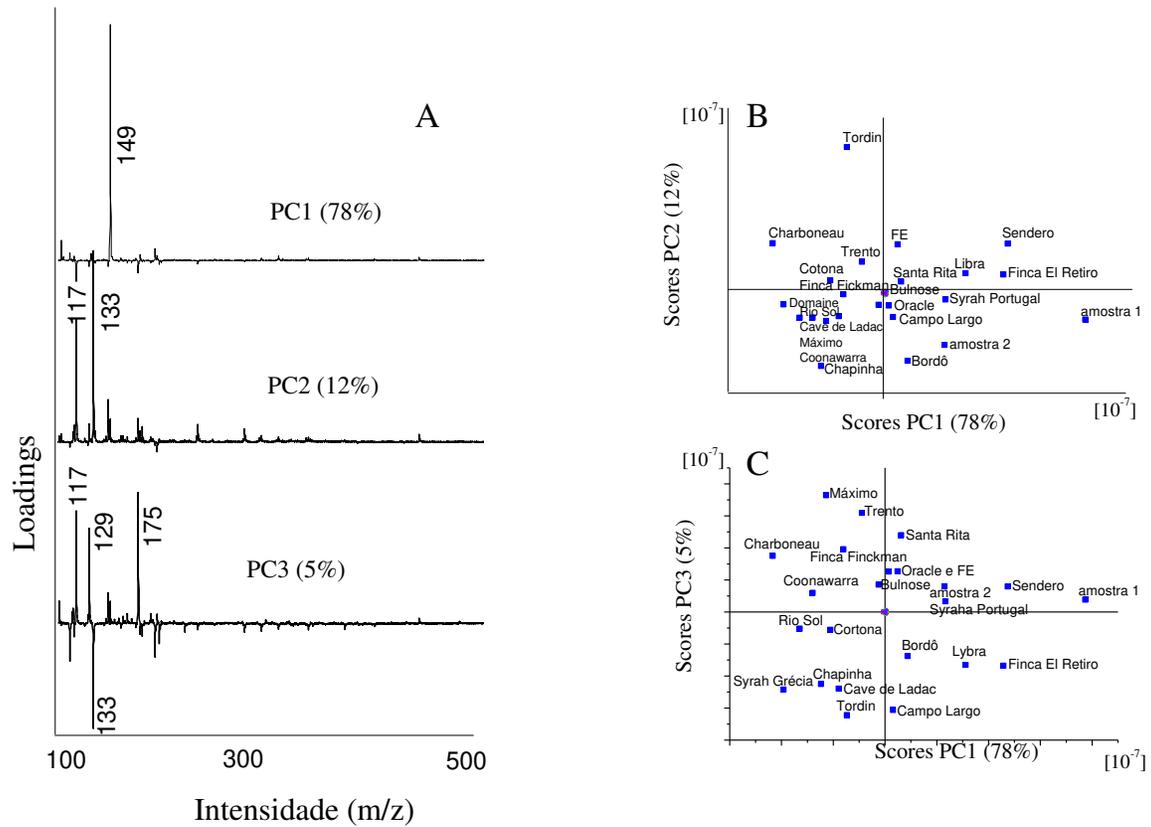
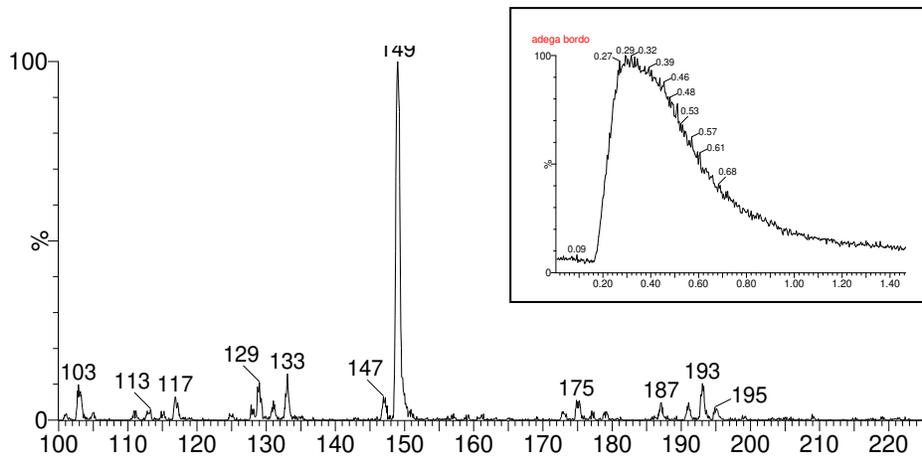


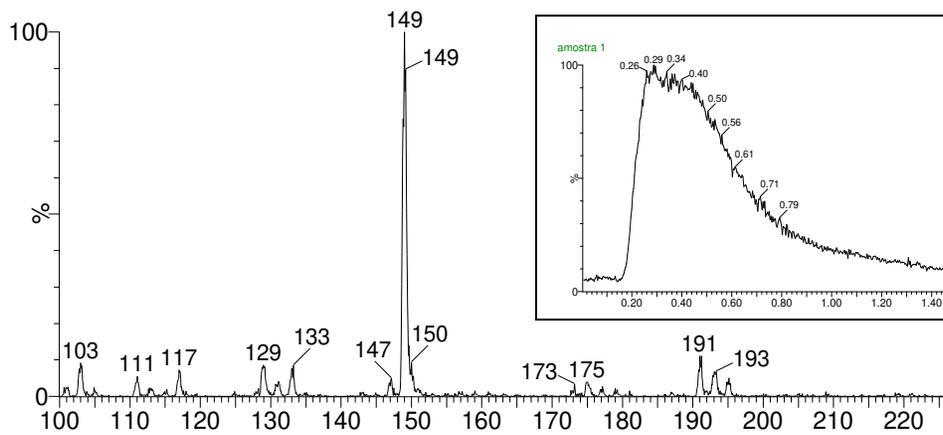
Figura 5.3 Gráfico dos *loadings* da PCA: PC1 (ácido tartárico); PC2 (ácido málico) e PC3 (ácido cítrico)

Os espectros dos demais vinhos tintos analisados estão em figuras em anexos.

(A)



(B)



(C)

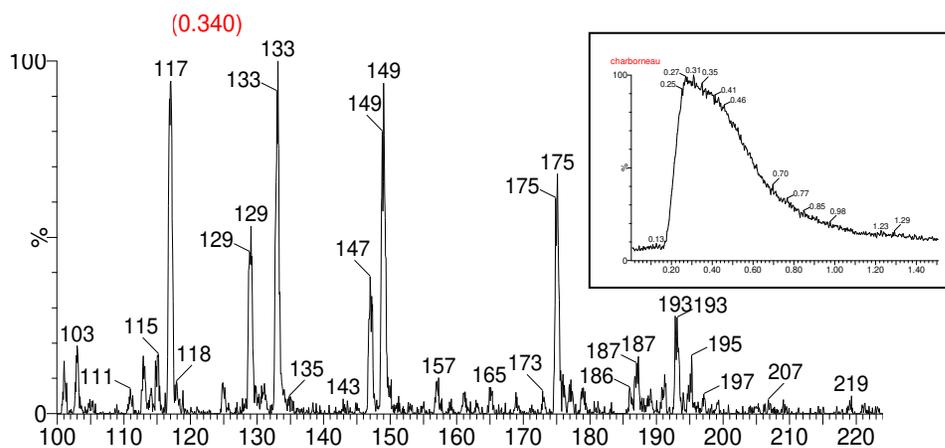


Figura 5.4 Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (A) vinho Bordô, Serra Gaúcha; (B) vinho Bordô + Merlot, Serra Gaúcha; (C) vinho Merlot, Serra Gaúcha; ác. málico (m/z 133); ác. tartárico (m/z 149) e ác. cítrico (m/z 191).

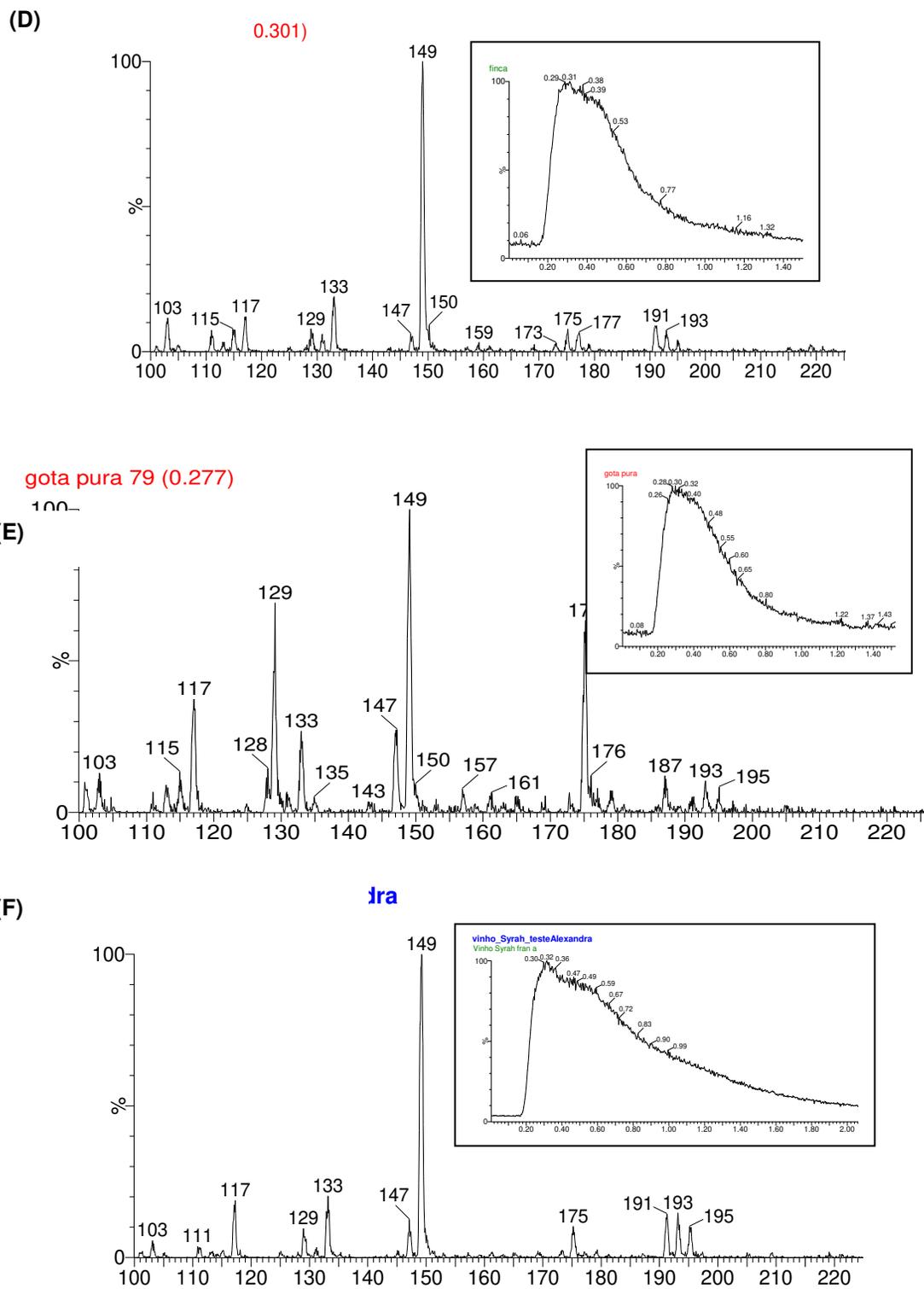


Figura 5.5 Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (D) vinho Syrah, Argentina; (E) vinho Máximo, São Paulo; (F) vinho Syrah, França; ác. málico (m/z 133); ác. tartárico (m/z 149) e ác. cítrico (m/z 191).

Através da comparação entre espectros encontrados na literatura de padrões de fragmentação e uso da espectrometria de massas em série (MS/MS), os íons $[M-H]^-$ de nove compostos foram identificados no vinho, são eles: ácido málico (m/z 133), ácido tartárico (m/z 149), ácido cítrico (m/z 191), ácido fumárico (m/z 115), ácido succínico (m/z 117), ácido citramálico (m/z 147), ácido 2-ceto-gluconico (m/z 193), ácido cumaril tartárico (m/z 295) e o ácido glucosil p-cumárico (m/z 325).

5.4 Conclusão

O método ESI-MS descrito neste estudo pode ser aplicado na quantificação de ácidos orgânicos em vinho. Ele apresenta vantagens tais como: rapidez de análise (<5 minutos), simples preparo de amostra e ausência de separação cromatográfica. Nele, os resultados em todas as etapas de validação foram satisfatórios- sensibilidade, precisão, linearidade e exatidão, demonstrando a possibilidade de uma extensa utilização na análise de ácidos orgânicos comparado a outros métodos convencionais empregados na determinação de ácidos em vinhos. A análise de componentes principais e de agrupamento hierárquico permitiu agrupar as amostras similares quanto aos teores de ácidos orgânicos de forma que foi possível constatar a divergência entre dois grupos, o primeiro formado por vinhos originados das uvas (Merlot e Bordô) e o segundo grupo constituído por vinhos das uvas (Syrah, Máximo e Carmem). O teor de ácido tartárico é relativamente superior aos demais ácidos em todos os vinhos nacionais e importados. Os *fingerprints* indicaram os íons característicos comuns em todas as amostras de vinhos bem como os íons diagnósticos de amostras individuais através de MS/MS, possibilitando a caracterização e identificação de compostos ácidos importantes da acidez do vinho.

Capítulo 6

Quantificação de ácidos orgânicos em casca, polpa e semente de uvas por ESI-MS

Capítulo 6. Quantificação de ácidos orgânicos em casca, polpa e semente de uvas por ESI-MS

6.1 Objetivos

O objetivo deste quarto estudo foi determinar os ácidos orgânicos (málico e tartárico) em uvas pelo método ESI-MS. Nesse estudo também se procurou observar se as análises por ESI (-)-MS poderiam ser usadas para correlacionar o teor de ácidos orgânicos das amostras de vinhos com as uvas indicadas como fontes vegetais desses compostos. Para isso, amostras de vinhos, previamente caracterizadas (capítulo 5), e uvas da região sul e sudeste do Brasil foram analisados por ESI (-)-MS. Este é o segundo estudo realizado na tentativa de empregar a técnica ESI-MS com inserção direta na quantificação de ácidos orgânicos.

6.2 Parte experimental

6.2.1 Reagentes e soluções analíticas

Os padrões utilizados, com grau de pureza superior a 99,0%, foram ácido L-(-) málico e ácido tartárico (Sigma Aldrich), os quais foram preparados em solução contendo 50% (v/v) de metanol grau cromatográfico (99,97%, J.T.Baker) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore) nas seguintes concentrações: ácido málico, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ácido tartárico 1010 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dessas soluções estoques, obtiveram-se as soluções padrão com a concentração de ácido málico e tartárico: 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 3,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 8,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas e analisadas rapidamente sem intervalo de armazenamento ou condicionamento para se evitar a degradação dos analitos. Todas as soluções padrão foram preparadas e analisadas em triplicata.

6.2.2 Amostras de uvas

A uva híbrida BRS Carmem, derivada de Muscat Belly A com BRS-Rúbea foi desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agricultura (Embrapa), as amostras foram cedidas pela indústria de suco da Cooperativa Corol, localizada na cidade Rolândia, Estado do Paraná, Brasil. As amostras de uvas Bordô (*Vitis labrusca*) foram adquiridas de agricultores de Santa Catarina, Brasil. As uvas Máximo (híbrido Syrah), Niágara(*Vitis labrusca*) e Syrah (*Vitis vinífera*) foram doadas pela Faculdade de Engenharia Agrícola de Campinas (FEAGRI), localizada em Campinas, Estado de São Paulo. Todas as amostras de uvas foram congeladas a -20°C para posterior análise.

6.2.3 Preparo, extração e recuperação das amostras de uvas

Para extrair e isolar os ácidos orgânicos das uvas foram empregados os métodos de extração assistida por ultrason (UAE) e a extração em fase sólida SPE, respectivamente. A combinação dos dois métodos permitiu a remoção de interferentes na ionização dos analitos de interesse. Inicialmente, as amostras de uvas frescas foram preparadas separando-se manualmente a casca, polpa e semente, pesou-se certa de 2-10 g de casca, polpa e semente de uva separadamente em tubos Falcon de plástico de 50 mL graduado com tampa e fundo cônico, congelou-se as amostras em freezer a temperatura de -40°C recobertas com alumínio por 24 horas, em seguida liofilizou-se as amostras congeladas por aproximadamente 8 horas seguidas, macerou-se as amostras liofilizadas (cerca de 100 mg) em cadinho com pistilo na presença de N_2 líquido, depois pesou-se todas as amostras maceradas em frascos de plástico com tampa. Na sequência a amostra foi extraída com 1 mL de metanol:água (1:1), em seguida agitada em sorbex (BenchMixer-Benchmark) por 1 minuto e depois colocada em banho de ultrassom (UNIQUE computadorizada 1400) por 30 minutos, em seguida centrifugou-se em uma centrífuga (Quimis) por 2 minutos e separou-se o sobrenadante em um segundo tubo de ensaio plástico. Repetiu-se o experimento anterior por três vezes seguidas e analisou-se as frações separadamente de cada fase do extrato. Depois de extraídas, as amostras foram filtradas através de uma membrana de fluoreto de polivinidileno (PVDF) de 33 mm x 0,22 μm e diluída novamente em metanol:água (1:1) antes

de inseridas no equipamento. Analisaram-se as quatro amostras de extratos diferentes, partindo da última fase extraída (extrato mais diluído) para a primeira fase (extrato mais concentrado), no total foram quatro etapas de extração. Esses testes serviram para nos mostrar quantas extrações seriam necessárias para se remover todos os ácidos nos extratos das uvas. Observou-se que três extrações era o suficiente para retirar a totalidade desses compostos. Após todas as condições acima serem testadas e aperfeiçoadas o método de extração, ou seja, as condições de extração dos ácidos málico, tartárico e cítrico das uvas melhoraram e o processo tornou-se mais rápido e eficiente. As cascas, polpas e sementes foram preparadas, extraídas e analisadas separadamente e em triplicata. A **Tabela 6.1** indica a massa da amostra fresca, da liofilizada (originada a partir da fresca) e da pesada e extraída. Os dados mostraram que o ácido cítrico estava em baixa intensidade de sinal de massa m/z 133 devido à baixa concentração na amostra, dessa forma prosseguiu-se realizando a quantificação somente dos ácidos majoritários tartárico e málico na casca, polpa e semente das uvas.

A recuperação dos ácidos málico e tartárico foi realizada utilizando os extratos das cascas das uvas Máximo e Syrah em três níveis de concentração: baixo ($1\mu\text{g/mL}$), médio ($2\mu\text{g/mL}$) e alto ($3\mu\text{g/mL}$).

6.2.4 Procedimentos experimentais

A diluição para cada parte da uva foi otimizada uma vez que as concentrações destes ácidos variam nas diferentes partes da fruta. Dessa forma, prepararam-se todas as amostras seguindo o padrão ideal para cada caso. Por exemplo, no caso da casca, pesou-se cerca de 100 a 120 mg de amostra liofilizada, extraiu-se com metanol:água (1:1) e depois diluiu-se o extrato da casca em metanol:água na razão 1:25. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e no mesmo dia. No caso da polpa, foram feitas diluições do extrato de 1:50, 1:100 e 1:150 em metanol:água (1:1) e para a semente realizam-se duas diferentes diluições, na primeira o extrato da semente foi diluído na razão 1:20 e na segunda diluição, preparou-se o extrato na razão 1:40 em metanol:água (1:1). As amostras foram analisadas por infusão direta ESI por meio de um espectrômetro de massas TQD ESI Waters ACQUITY (USA), sendo as amostras dispostas em 96 posições com injeção automática (volume total de 100

μL em cada posição). As condições otimizadas para ESI foram: voltagem do capilar -3,5 KV, cone -30 V, temperatura da fonte 350 °C, temperatura de dessolvatação 300 °C fluxo do gás 450 Lhr^{-1} , faixa de massas 100-620. Os compostos foram quantificados através de curvas de calibração externa baseadas nos valores de áreas obtidas através da integração dos sinais espectrais. O modo negativo foi usado por ser considerado o mais adequado para análise de compostos ácidos em uvas.

Tabela 6.1. Massas da casca, polpa e semente das uvas frescas e liofilizadas.

<i>uvas</i>	<i>amostra fresca (g)</i>	<i>amostra liofilizada (g)</i>	<i>amostra extraída (g)</i>
Niagara (casca)	4,4740	1,0068	0,1109
Niagara (polpa)	18,4152	2,5379	0,1174
Niagara (semente)	1,6706	0,82345	0,1048
Syrah (casca)	6,3155	1,4718	0,1116
Syrah (polpa)	9,3015	1,4931	0,1175
Syrah (semente)	2,5340	1,2064	0,1020
Máximo (casca)	3,8375	1,0317	0,1200
Máximo (polpa)	9,1300	1,6440	0,1107
Máximo (semente)	1,4945	0,7653	0,1191
Cármem (casca)	8,7291	1,7831	0,1094
Cármem (polpa)	8,5639	1,2790	0,1128
Cármem(semente)	2,1379	1,2712	0,1173
Bordô (casca)	9,2175	1,7282	0,1201
Bordô (polpa)	6,4386	1,0350	0,1010
Bordô (semente)	1,9823	1,3102	0,1140

6.3 Ensaios de recuperação do ácido tartárico e málico em uvas

A recuperação dos ácidos tartárico e málico em uvas foi realizada separadamente empregando os extratos das cascas das uvas Máximo e Syrah fortificados com três níveis de concentração do padrão: baixo ($1\mu\text{g mL}^{-1}$), médio ($2\mu\text{g mL}^{-1}$) e alto ($3\mu\text{g mL}^{-1}$).

6.3.1 Preparo de soluções padrão de ácido tartárico e málico

Preparou-se cada solução estoque de ácido (tartárico e málico) $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, pesando-se em uma balança analítica a massa $0,010\text{ g}$ de ácido, separadamente, em Ependorff plástico e em seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL , depois adicionou-se a solução água:metanol (1:1). Em seguida, homogeneizou-se a solução estoque e guardou-se em geladeira até o momento de uso.

6.3.2 Ensaios de recuperação do ácido tartárico em uvas

Pesou-se cerca de $100\mu\text{g}$ de casca da uva Máximo em tubos Falcon de plástico, os valores exatos foram: $0,1049\text{ g}$ (frasco 1); $0,1074\text{ g}$ (frasco 2); $0,1055\text{ g}$ (frasco 3) e $0,1071\text{ g}$ (frasco 4). A recuperação foi realizada em três níveis de concentração: baixo, médio e alto. Para isso, adicionaram-se diferentes volumes da solução estoque ácida para obter nos extratos finais da casca da uva as concentrações: $1\mu\text{g mL}^{-1}$, $2\mu\text{g mL}^{-1}$ e $3\mu\text{g mL}^{-1}$. No primeiro frasco (massa = $0,1049\text{ g}$) não adicionou-se padrão, no segundo, terceiro e quarto frasco adicionaram-se $225\mu\text{L}$, $450\mu\text{L}$ e $675\mu\text{L}$ de ácido tartárico $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Depois de deixadas em repouso por cerca de 30 minutos, adicionou-se 1 mL de solução metanol:água (1:1), depois de agitadas por 5 minutos, as amostras foram sonicadas em banho de ultrasson por 20 minutos e centrifugadas por 2 minutos para precipitação de particulados do extrato. Depois de remover o primeiro sobrenadante, transferindo para outro tubo Falcon, repetiu-se a extração das amostras por três vezes consecutivas até obter-se um volume final de 3 mL de extrato. Esse volume final foi filtrado com filtro $0,22\mu\text{m}$ PVDF numa seringa descartável de 5 mL . Depois de filtrada, a amostra foi diluída em solução metanol:água (1:1) na razão 1:25, ou seja, transferiu-se uma alíquota de

40 µL da amostra e completou-se para 1 mL em vial de vidro de 1,5 mL e homogenizou-se por 5 segundos em um agitador de vial. Depois, analisaram-se as amostras.

6.3.3. Ensaio de recuperação do ácido málico em uvas

Os materiais, reagentes e métodos empregados na recuperação do ácido málico foram os mesmos empregados para o ácido tartárico na casca da uva. Dessa forma, as únicas mudanças foram nas massas pesadas dos extratos das uvas. Sendo que as massas exatas foram: 0,1061 g (primeiro frasco); 0,1049 g (segundo frasco); 0,1067 (terceiro frasco); 0,1029 (quarto frasco) onde foram adicionados 0 µL, 227 µL, 455 µL e 682 µL da solução 990 µg/mL de ácido málico respectivamente nos frascos. Depois de adicionados os volumes anteriores de solução padrão, deixaram-se todas as amostras em repouso por 30 minutos, antes do início das extrações. As análises foram realizadas no mesmo dia das extrações e os resultados são mostrados a seguir. Neste trabalho as amostras foram injetadas em triplicata para melhor verificação da precisão do método. A exatidão do método analítico é expressa pela relação entre a média da concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, tendo o resultado expresso como % de recuperação.

6.4 Resultados e discussão

O método adaptado para extração e determinação de ácido málico e tartárico em uvas foi otimizado para se obter as condições ótimas para análise por ESI-MS, assim como foi realizado com amostras de vinhos.

Após a realização de vários ensaios, optou-se por efetuar três sucessivas extrações em cartuchos SPE com 1 mL de solução metanol:água (1:1) para garantir maior remoção dos ácidos orgânicos das uvas. A partir desse extrato final, seguiu-se com vários testes de diluição nas razões 1:25 (casca); 1:100 e 1:150 (polpa); 1:40 (semente). Nestas condições foram obtidas melhores ionizações dos analitos e melhor integração dos seus sinais. A **Tabela 6.2** mostra os resultados de linearidade da curva analítica, limites de detecção e quantificação do instrumento e exatidão do método, cujos resultados foram expressos em recuperação percentual. Observou-se que a curva analítica, nas condições otimizadas de

extração e diluição, apresentou linearidade nas faixas de concentrações estudadas, com coeficientes de correlação que variam de 0,992 (málico) e 0,998 (tartárico) que evidenciam o ajuste das correlações na regressão linear entre as respostas de áreas e as concentrações para todos os compostos. Os resultados obtidos da exatidão nas concentrações estudadas são considerados satisfatórios, por estarem dentro dos limites aceitos pela INMETRO (INMETRO, 2010), 70 a 120 % de recuperação. A determinação do CVs%, recuperação e parâmetros de linearidade, LD, LQ permitem assegurar a precisão e exatidão do método. Neste estudo, os valores de CV% e percentagem de recuperação dos extratos fortificados com mistura padrão em diferentes concentrações mostraram uma boa precisão e boa recuperação como mostra a **Tabela 6.2** similares aos valores da literatura (EYÉGHÉ-BICKONG et al. (2012); FLORES et al. (2012)).

Tabela 6.2 Parâmetros analíticos obtidos para linearidade, limites de detecção e quantificação e exatidão para os analitos estudados.

Composto	Equação da reta	R	Limite do instrumento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Exatidão (recuperação%)		
			LD	LQ		1	2	3
ác.tartárico	$Y = 2,88E6 + 4,98E6X$	0,998	0,65	1,98		114%	91%	84%
ác.málico	$Y = 9,08E6 + 2,07E6X$	0,992	1,50	4,55		88,71%	90,11%	91,19%

*Critério de aceitação: 70% < Recuperação < 120%; (1) ácido málico, ácido tartárico $1\mu\text{g mL}^{-1}$; (2) ácido málico, ácido tartárico $2\mu\text{g mL}^{-1}$; (3) ácido málico, ácido tartárico $3\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em suma, foi constatada uma predominância do ácido málico em comparação ao ácido tartárico em todas as amostras de uvas analisadas. As uvas do grupo das *Vitis labruscas* e híbridas (Bordô, Niágara, BRS Carmem e Máximo) apresentam cascas e polpas com teores mais altos de ácido tartárico em comparação com a cultivar *Vitis vinífera* Syrah. Com as sementes, o processo se inverte e a cultivar de *Vitis vinífera* apresenta maior teor de ácido tartárico que as do grupo das *Vitis vinífera* e híbridas. Quanto ao ácido málico, foi detectado teor mais baixo na cultivar americana *Vitis labrusca* Bordô desde a casca, polpa e semente. Na **Tabela 6.3** estão dispostos os resultados de quantificação dos ácidos orgânicos em uvas pelo método ESI-MS.

Tabela 6.3. Concentrações dos ácidos orgânicos (málico e tartárico) em amostras de uvas *Vitis labrusca*, *Vitis vinífera* e híbridos cultivados nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo.

amostra	Concentração de ácido tartárico $\mu\text{g mL}^{-1}$			Concentração de ácido málico $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	amostra diluída	cv%	extrato concentrado	amostra diluída	cv%	extrato concentrado
casca Carmem	4,66	1,14	18,65	9,82	0,77	39,30
casca Niagara	4,41	2,61	17,63	8,41	2,86	33,65
casca Bordô	2,91	0,64	11,63	4,88	1,32	19,51
casca Syrah	1,73	6,34	6,90	8,19	4,54	32,77
casca Máximo	4,55	6,29	18,18	6,05	3,26	24,22
polpa Bordô	6,69	1,15	334,41	7,25	1,59	725,48
polpa Carmem	2,83	1,21	141,36	8,13	12,83	813,15
polpa Máximo	4,72	1,65	236,02	9,55	6,05	954,79
polpa Niagara	6,04	2,36	301,85	8,04	6,15	1218,12
polpa Syrah	4,53	0,79	226,54	7,63	8,26	762,78
semente Bordô	2,02	20,61	40,39	1,22	9,74	48,99
semente Niagara	4,05	13,13	81,07	4,60	11,78	184,15
semente Syrah	3,32	4,70	132,72	7,86	10,04	314,31
semente Carmem	0,94	3,42	37,55	5,51	6,56	220,25
semente Máximo	2,60	7,85	104,03	5,24	9,21	209,77

A **Figura 6.1** mostra o dendrograma dos espectros *fingerprints* da casca, polpa e semente das cinco variedades de uvas. Nela observa-se a separação nítida entre as sementes, polpas e cascas, sendo a uva Máxima também agrupada às demais amostras.

A **Figura 6.2** mostra o gráfico dos escores com as componentes principais PC1 x PC2 que explica 99,99% da variação dos dados. A PC1 explica 99,22% e PC2 explica 0,77% da variância dos dados. Podemos observar que o comportamento dos vinhos mais se aproxima

das cascas das uvas, e que por conta disso eles se agrupam melhor. Isto é justificável uma vez que a casca da uva possui menor concentração desses ácidos quando comparada à polpa e a semente. Além disso, as concentrações dos ácidos orgânicos, uma vez extraídos da uva, tende a diminuir durante o processo de maceração da baga e fermentação do mosto. Ao término desses processos, o vinho terá menores taxas de ácidos orgânicos málico e succínico e maior de ácido tartárico. No entanto, quando as amostras de vinhos e cascas de uvas são avaliadas separadamente, observamos que se formam dois grupos distintos como mostra o gráfico dos escores das PCAs que explica 97% da variância dos dados, sendo a PC1 com 73% e PC2 24 % como na **Figura 6.3**. Isto ocorre porque as cascas das uvas apresentam maior concentração de ácido tartárico e málico que as amostras de vinhos. Através do gráfico dos *loadings* na **Figura 6.4**, percebemos que os vinhos se destacam na região positiva da PC1 e por isso possuem mais ácido tartárico e as cascas se destacam na PC2, apresentando mais ácido málico e succínico.

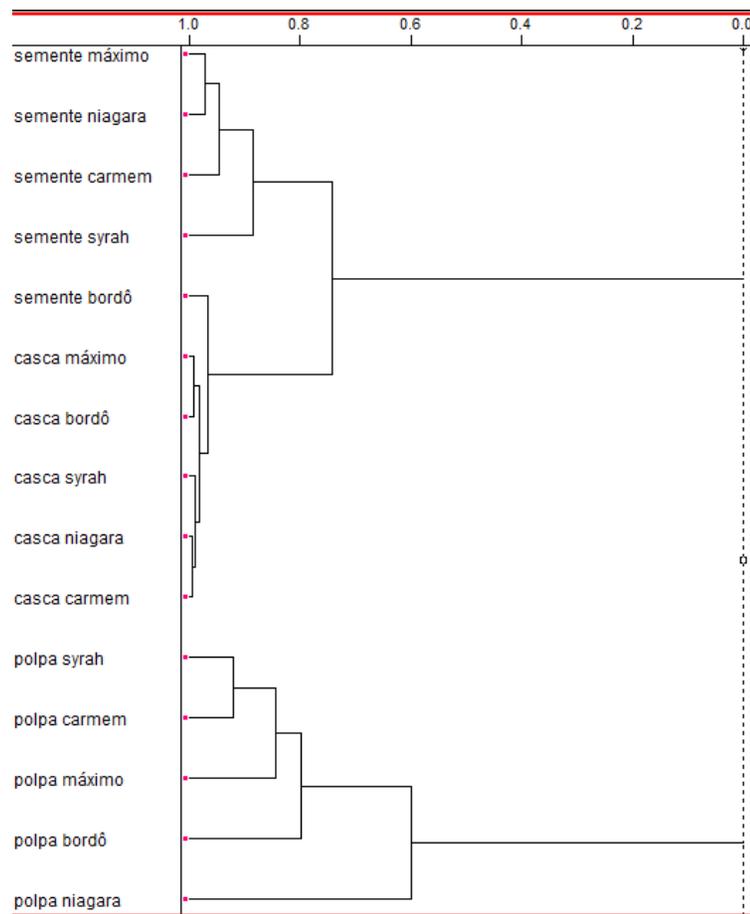


Figura 6.1. Dendrograma das amostras de casca, polpa e semente de uvas.

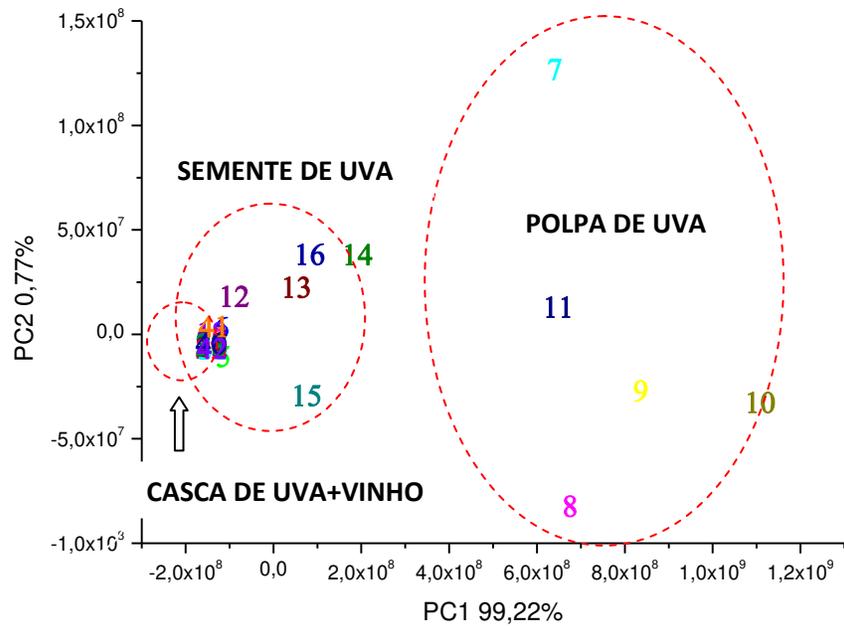


Figura 6.2. Gráfico da PCA dos *fingerprints* das amostras de casca, polpa e semente de uvas com amostras de vinhos.

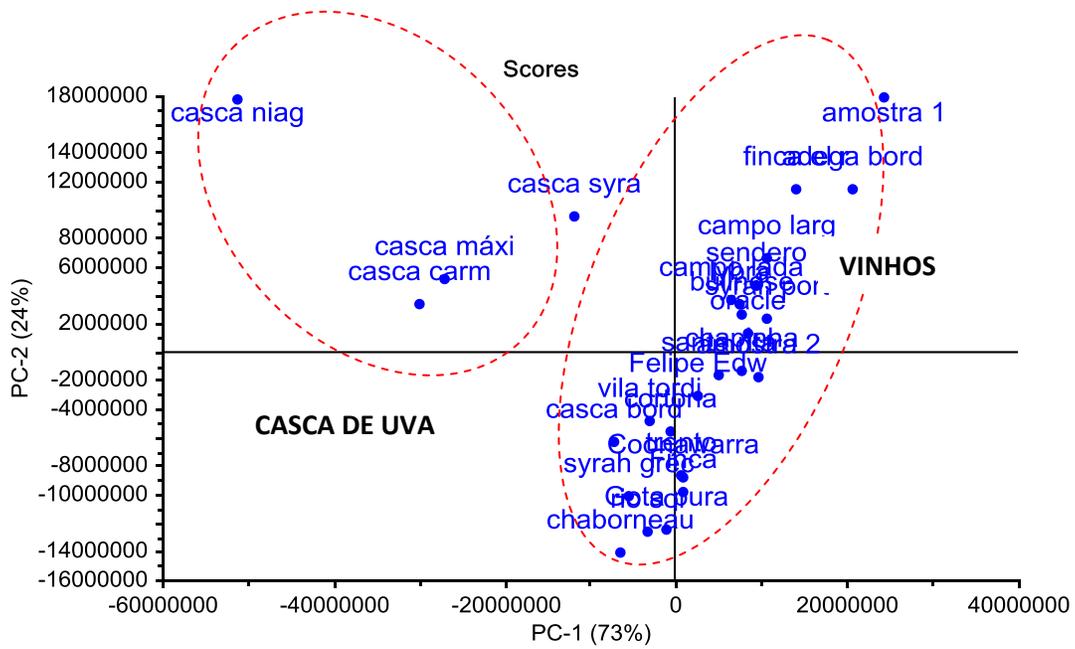


Figura 6.3 Gráfico da PCA dos *fingerprints* das amostras de vinhos e casca de uvas por ESI-MS: uva Niágara (3), uva Syrah (5), uva Máximo (6), vinhos tintos (7-32).

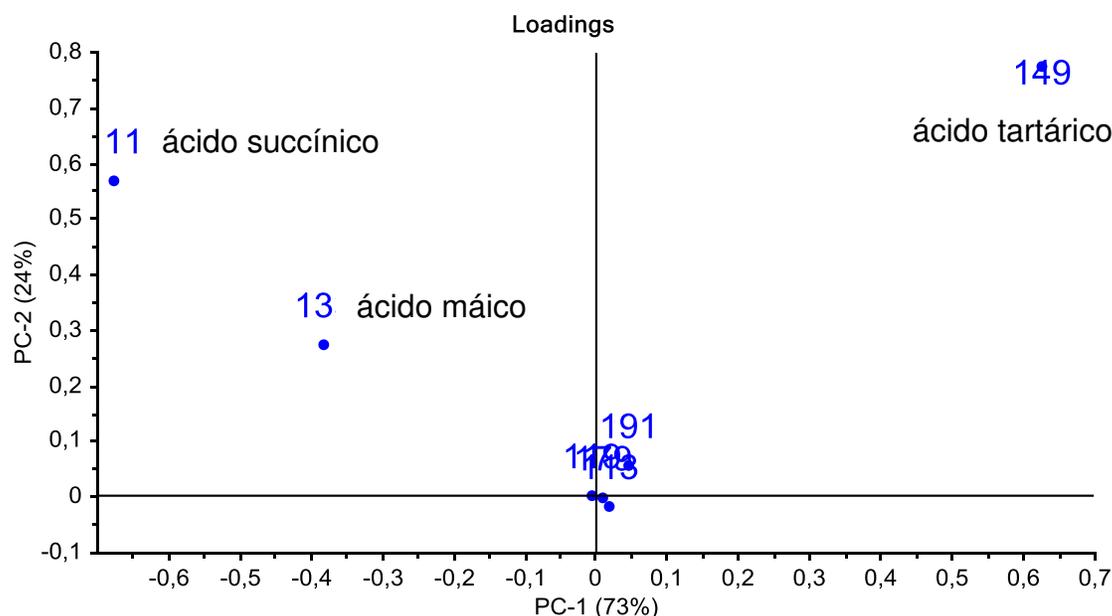


Figura 6.4 Gráfico dos *loadings* PC1 x PC2.

Observando os *fingerprints* das amostras dos extratos das cascas, polpas e sementes das uvas, pôde-se observar que existe diferença entre cada parte da fruta com relação a um conjunto de íons característicos, como mostram as **Figuras 6.5, 6.6 e 6.7**. A inspeção visual dos *fingerprints* mostra que as amostras de casca, polpa e semente de uva da região sul e sudeste brasileiro apresentam um conjunto de íons principais comuns em m/z 115, 133, 149 e 179. Nas cascas, os íons de m/z 113, 119, 321 e 367 foram sempre detectados e bem intensos. As polpas apresentaram espectros mais simples e limpos, neles observou-se a presença dos íons de m/z 321 e 367 com baixíssima intensidade de sinal. Nas sementes, alguns íons com alta abundância relativa de sinal aparecem em todas as amostras, demonstrando serem íons diagnósticos da semente da uva como os de m/z 289, 341 e 440.

As regiões brasileiras produtoras de uvas *Vitis labrusca* e híbridas estão sob influência de climas do tipo temperado e subtropical. Nelas, os elementos climáticos apresentam comportamento diferenciado ao longo do ano, incluindo a temperatura, a insolação, umidade relativa do ar, a precipitação pluviométrica e os índices climáticos vitícolas. Tal fato confere as uvas um conjunto de características próprias, inclusive quanto ao teor de ácidos orgânicos, em grande parte influenciada pelo efeito clima, principalmente a temperatura.

Dessa forma, as características climáticas da região do Rio Grande do Sul, Serra Gaúcha, Paraná, Santa Catarina e São Paulo são bastante particulares e distintas daquelas encontradas na maioria dos países vitivinícolas, e possivelmente por isso os *fingerprints* dessas uvas diferem quanto à intensidade dos íons característicos málico (m/z 133) e tartárico (m/z 149).

De maneira geral, pode-se dizer que o conteúdo de ácido tartárico depende sobre tudo de condições climáticas, particularmente umidade e temperatura, enquanto que o ácido málico depende da conjunção da variedade/solo e clima ("*terroir*"). Fatores de hereditariedade também afetam o conteúdo de algumas variedades tais como "Zinfandel, Cabernet Franc, Chenin Bland, Syrah e Pinot Noir que possuem maior proporção de ácido málico, enquanto as variedades Riesling, Sèmillon, Merlot, Grenache and Palomino são mais ricas em ácido tartárico (KLIEWER *et al.*, 1967).

Os ácidos málico e tartárico são os dominantes nas uvas e os seus níveis são dados frequentemente utilizados para determinar a data da colheita, uma vez que cada ácido apresenta um comportamento particularmente diferente durante o processo de maturação. O ácido málico mostra uma queda contínua durante o amadurecimento ao passo que o ácido tartárico permanece quase inalterada. Por conta disso, diferentes proporções podem ser obtidas durante o amadurecimento e a melhor época de colheita pode ser estabelecida a partir da sua razão. Dessa forma, a técnica ESI seria facilmente aplicável no monitoramento de diferentes estágios de maturação da uva.

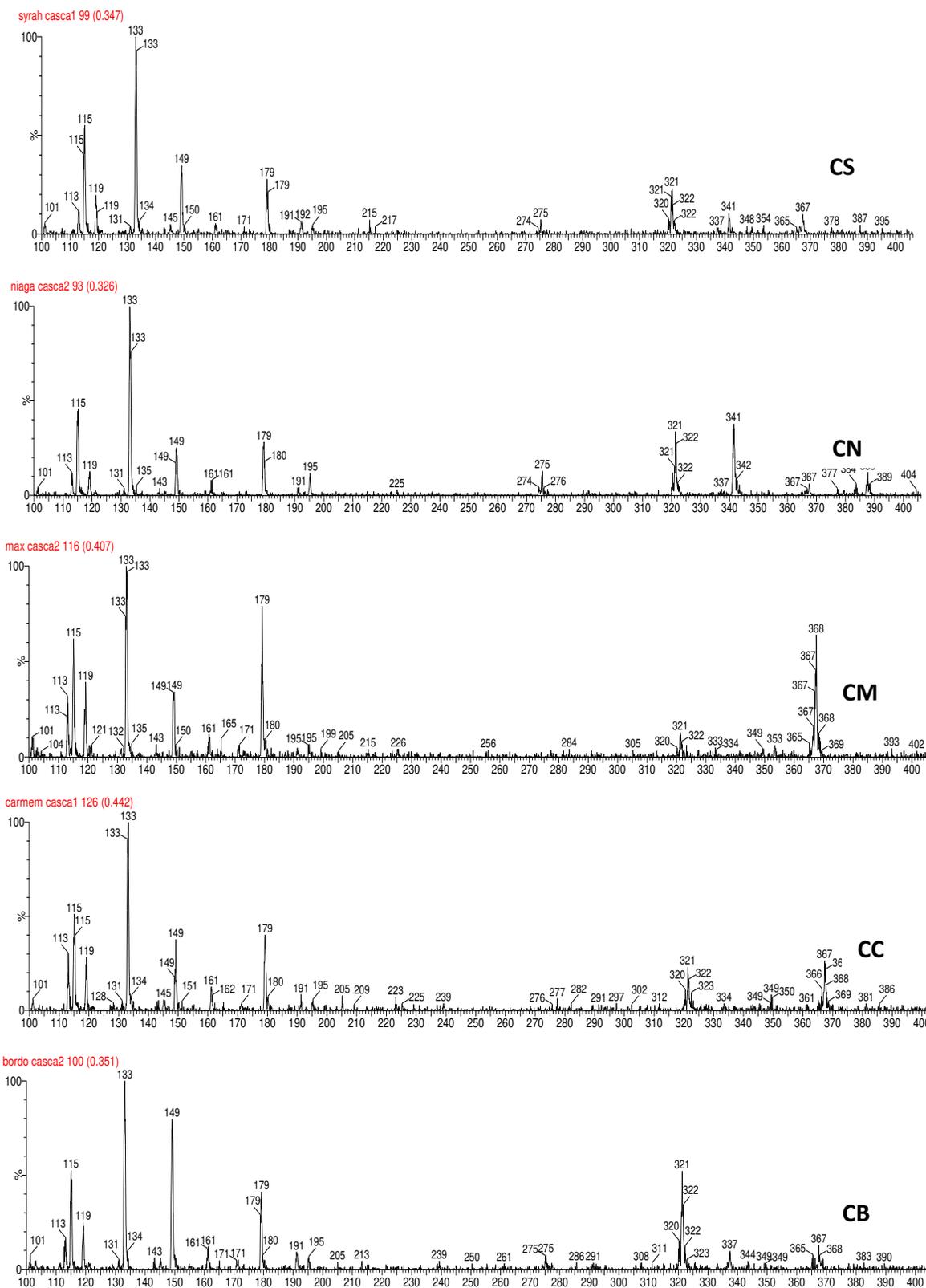


Figura 6.5 Fingerprints obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de casca de uva: CS) casca Syrah, CN) casca Niagara, CM) casca Máximo, CC) casca Carmem e CB) casca Bordô.

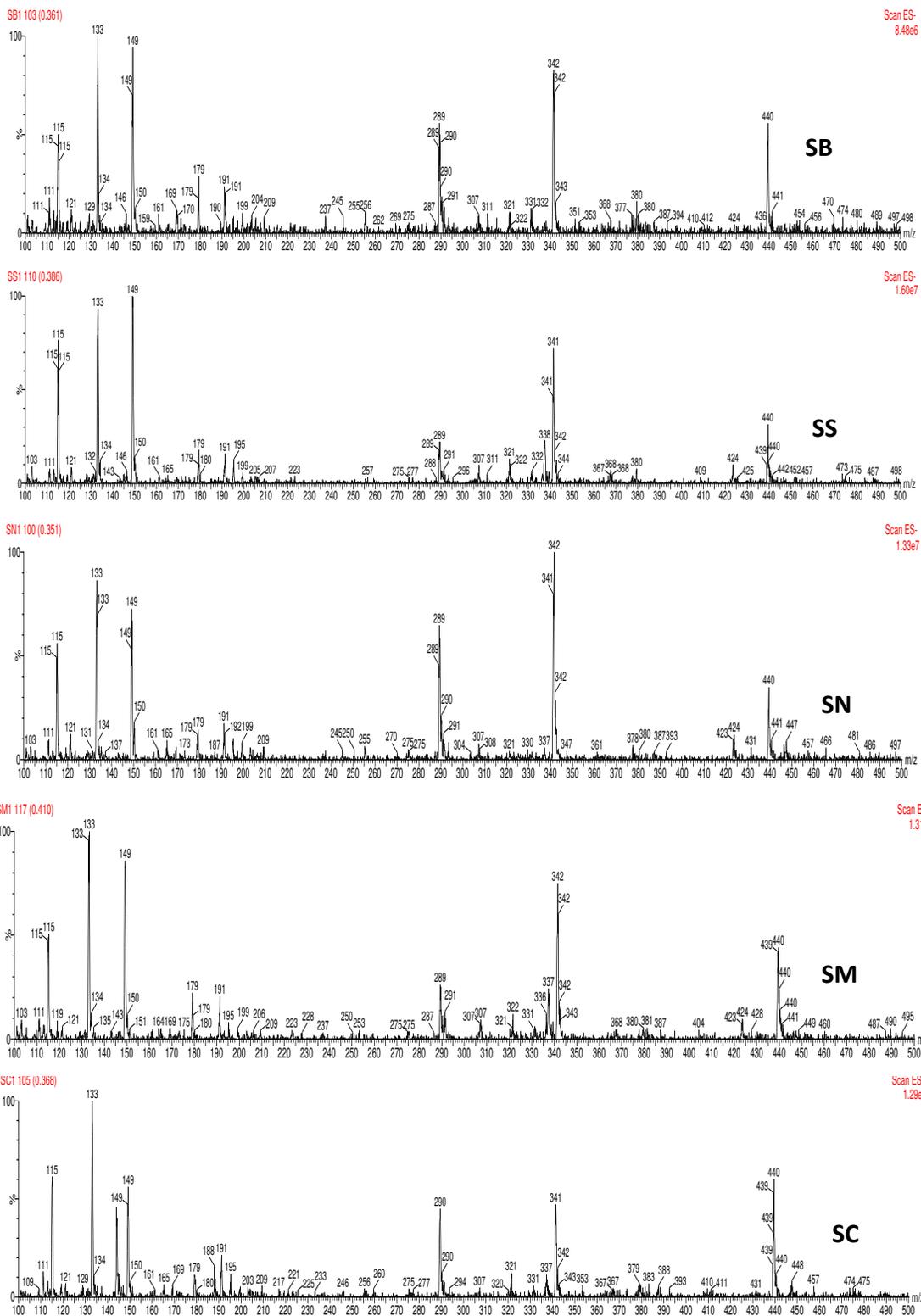


Figura 6.6 Fingerprints obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de sementes de uvas (SB, semente Bordô; SS, semente Syrah; SN, semente Niagara; SM, semente Máximo; SC, semente Carmem).

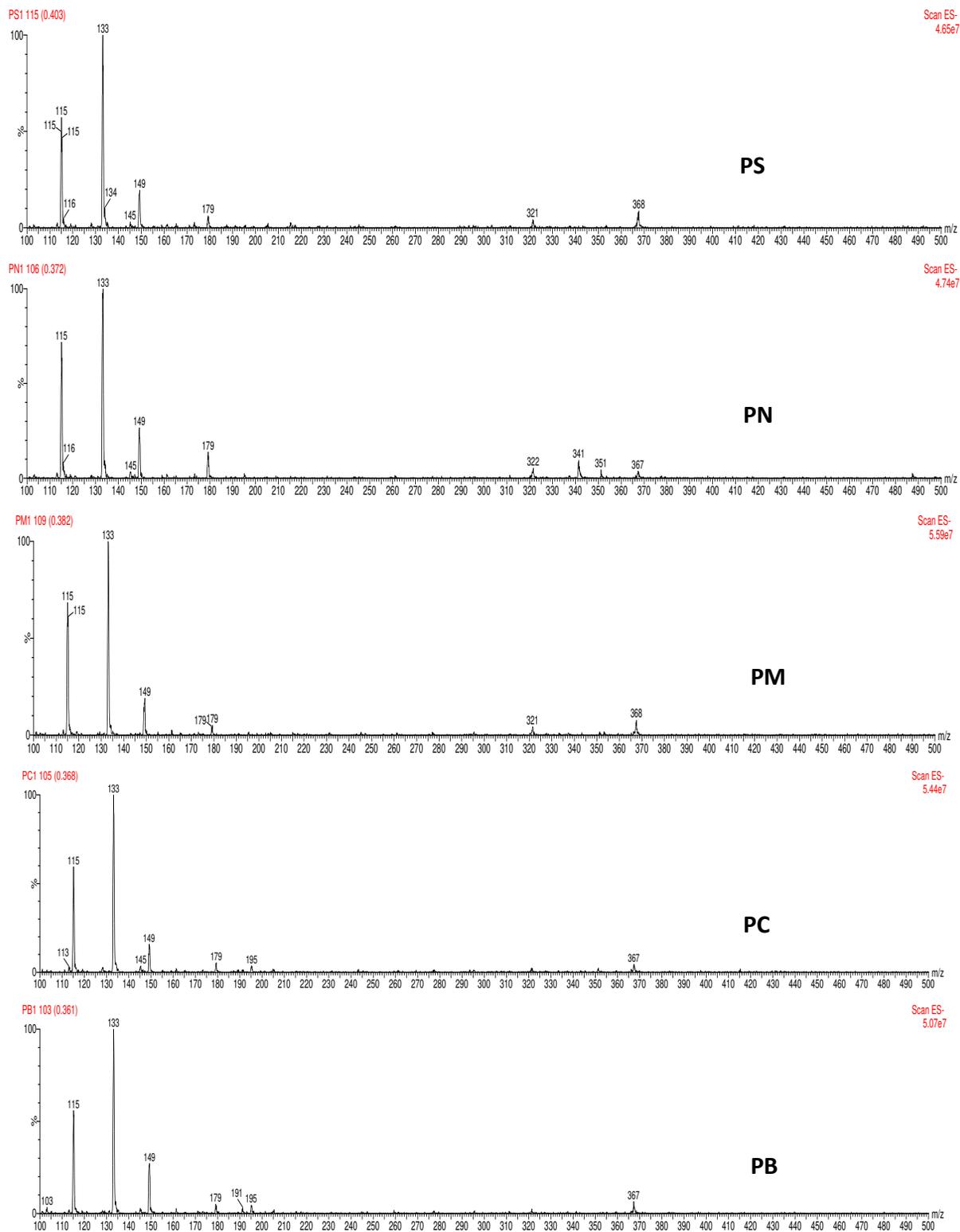


Figura 6.7. Fingerprints obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de polpas de uvas (PS, polpa Syrah; PN, polpa Niagara; PM, polpa Máximo; PC, polpa Carmem; PB, polpa Bordô).

6.5 Conclusão

O método ESI-MS com inserção direta descrito foi aplicado com sucesso na determinação de ácidos orgânicos em uvas. Essa técnica simples, rápida e de baixo custo, uma vez que não faz uso de cromatografia, foi aplicada com êxito na quantificação de ácidos orgânicos em amostras também de vinhos. Os bons resultados de validação (LD, LQ, linearidade, precisão e recuperação) indicam que o método é adequado para o fim proposto. Dentre as vantagens deste método está o pré-tratamento simples de amostra, rapidez de análise (5 min) que permitiram determinar de forma confiável a variação de teores dos ácidos orgânicos entre diferentes variedades de uvas. Todas as variedades nacionais e híbridas estudadas possuem perfis químicos similares, porém diferem quanto à intensidade dos sinais referentes aos ácidos málico e tartárico. Com isso, foi possível avaliar qualitativamente e quantitativamente a presença desses analitos em amostras distintas de casca, polpa e semente simultaneamente através do *fingerprint* obtido por ESI-MS com inserção direta. Uma aplicação viável para este método seria monitorar os diferentes estágios de maturação para estabelecer o período ideal de colheita da uva.

6.6 Conclusão geral

A espectrometria de massas (MS) foi aplicada com sucesso na caracterização química de vinhos e uvas tintos. A aplicação da espectrometria de massas permitiu o conhecimento dos compostos químicos majoritários responsáveis pelo aroma característico de vários tipos de vinhos de diferentes regiões do mundo produzidos a partir da uva *Vitis vinífera* e híbrido. Além da avaliação qualitativa do perfil volátil e fenólico do vinho, foi possível avaliar quantitativamente os compostos importantes para a formação do aroma, sabor e adstringência dos mesmos. Tais resultados foram obtidos empregando diferentes técnicas de análise de massas de acordo o tipo e natureza das moléculas em estudo. No caso do aroma, empregou-se a técnica mais usual para compostos voláteis a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Através dela foi possível diferenciar vinhos produzidos a partir de uvas tintas cultivados em diversas regiões do mundo. Dentre as variedades de vinhos analisados, tem-se o vinho paulista produzido a partir de uma uva híbrido (Máximo). O estudo desse vinho é de suma importância para a viticultura paulista, uma vez que tem-se investido na pesquisa e cultivo de uvas de mesa híbridas para consumo e produção de vinhos genuinamente paulistas. Como resultado, observou-se a similaridade entre este e os demais vinhos tintos Syrah o que comprova a qualidade do vinho paulista Máximo frente aos melhores vinhos do mundo. Quanto ao perfil fenólico, empregou-se a técnica de espectrometria de massas com ressonância ciclôtrônica de íons e transformada de Fourier por eletrospray e inserção direta (FT ICR-MS). Esta ferramenta nos permitiu avaliar um grande número de compostos químicos importantes do aroma e sabor do vinho. Dentre eles, estão ácidos fenólicos, flavonóis e antocianinas. Os resultados corroboram para o sucesso na caracterização de amostras complexas empregando a técnica de espectrometria de massas. Através dos dados obtidos, constatou-se a similaridade entre o perfil químico fenólico do vinho paulista e os demais vinhos tintos. Compostos químicos tais como ácidos orgânicos simples são de fácil ionização e análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e inserção direta (ESI-MS), no entanto a sua quantificação nem sempre é tão simples. Para tanto foi preciso realizar um estudo de adequação de um método para determinação de ácidos orgânicos simples (málico, tartárico e cítrico). Com esse intuito, foi

possível a aplicação de tal método validado na determinação de ácidos simples em vinhos, casca, polpa e semente de vinhas.

7.0 Referências bibliográficas

Adams, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 2nd ed., Allured Publishing Corporation: Illinois, 1995.

Adams, D.O. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, 57:3, 249-256.

Armanino, C.; Casolino, M. C.; Casale, M.; Forina, M. Modelling aroma of three italian red wines by headspace-mass spectrometry and potencial functions. *Analytica Chimica Acta***2008**, 614, 134-142.

Amorin, A.C.L.; Hovell, A.M.C.; Pinto, A.C.; Eberlin, M.N.; Arruda, N.P.; Pereira, E.J.; Bizzo, H.R.; Catharino, R.R.; Morais Filho, Z.B.; Rezende, C.M. Green and roasted Arabica coffees differentiated by ripeness, process and cup quality via electrospray ionization mass spectrometry *fingerprinting*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, 20,313-321.

Andrade Lima, L.L.; Schuler, A.; Guerra, N.B.; Pereira, G.E.; Andrade Lima, T.L.; Rocha, H. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, **2010**, 33, N^o 5, 1186-1189.

Andrade, P.B.; Mendes, G.; Falco, V.; Valentão, P.; Seabra, R.M. Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties. *Food Chemistry*, **2001**, 73, 397-399.

Berente, B.; García, D.D.C.; Reichenbacher, M.; Danzer, K. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 871, 95-103.

Biasoto, A.C.T.; Catharino, R.R.; Sanvido, G.B.; Eberlin, M.N.; Silva, M.A.A.P. Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. *Food Quality and Preference*, 2010, 21, 755-762.

Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C. Aroma compounds of an Italian (*Ruché*) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chemistry*,**2003**, 80, 125-133.

Boutou, S.; Chatonnet, P. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1141, 1-9.

Buialelli, F.; Cocciole, F.; Merolle, M.; Jacionowska, R.; Terracciano, A. Identification of the hidrocinnamic acid-tartaric acid esters in wine by HPLC – tandem mass spectrometry *Food Chemistry*, **2010**, 123, 827-833.

Burns, J.; Mullen, W.; Landrault, N.; Teissedre, P.L.; Lean, M.E.J.; Crozier, A. Variations in the profile and contend of anthocyanins in wines made from cabernet sauvignon and hybrid grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 4096-4102.

Cabaroglu, T.; Selli, S.; Kafkas, E.; Kurkcuoglu, M.; Canbas, A.; Baser, K.H.C. Determination of volatile compounds in sultaniye wine by solid-phase microextraction techniques. *Chemistry of Natural Compounds*, **2005**, 41, 382-384.

Cabredo-Pinillos, S.; Cedrón-Fernández, T.; Sáenz-Barrio, C. Differentiation of "Claret", Rosé, Red and Blend wines based on the content of volatile compounds by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Eur. Food. Res. Technol.* **2008**, 226, 1317-1323.

Câmara, J.S.; Alves, M.A.; Marques, J.C. Classification of Boal, Malvazia, Sercial and Verdelho wines based on terpenoid patterns. *Food Chemistry*, 2007, 101, 475-484.

Câmara, J. S.; Alves, A. M.; Marques, J.C. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta* **2006**, 68, 1512-1521.

Camargo, U.A.; Tonieto, J.; Hoffmann, A. Progresso na viticultura brasileira. *Rev. Bras. Frutic.* **2011**, Volume Especial, E. 144-149, Outubro.

Canuti, V.; Conversano, M.; Calzi, M.L.; Heymann, H.; Mathews, M.A.; Ebeler, S.E. Headspace solid-phase microextraction - gas chromatography - mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216, 3012-3022.

Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-Resvetarol in red wines, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5226-5231.

Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 6868-6874.

Calleja, A.; Falqué, E. Volatile composition of Mencía wines. *Food Chem.* 2004, 90, 357-363.

Castro, R.; Natera, R.; Durán, E.; Barroso, C.G. Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *Eur Food Res Technol*, **2008**, 228, 1-18.

Catharino, R. R.; Cunha, I. B. S. ; Fogaça, A. O.; Facco, E. M. P. ; Godoy, H. T. ; Daudt, C. E. ; Eberlin, M. N.; Sawaya A. C. H. F. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2006**, 41, 185-190.

Catharino, R.R.; Haddad, R.; Cabrini, L.G.; Cunha, I.B.S.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry *fingerprinting*: classification, quality, adulteration, and aging. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 7429-7433.

Catharino, R.R.; Milagre, H.M.S.; Saraiva, S.A.; Garcia, C.M.; Schuchardt, U.; Eberlin, M.N. Biodiesel typification and quality control by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry *fingerprinting*. *Energy & Fuels*, **2007**, 21, 3698-3701.

Cliff, M.A.; King, M.C.; Schlosser, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, **2007**, 40, 92-100.

Comisarow, M.B; Marshall A.G. "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy" *.Chemical Physics Letters***1974a**, 25, 282-283.

Cooper, H.J.; Marshall, A.G. Electrospray ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of wine. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5710-5718.

Corilo, Yuri E.; Vaz, Boniek G.; Simas, Rosineide C.; Lopes Nascimento, Heliara D.; Klistzke, Clécio F. Pereira, Rosana, C.L.; Bastos, Wagner L.; Santos Neto, Eugênio V.; Rodgers, Ryan P.; Eberlin, Marcos N. Petroleomics by EASI FT ICR MS. *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, 3990-3996.

Culleré, L.; Escudero, A.; Campo, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, 4040-4045.

Crotti, A.E.M.; Vessecchi, R.; Lopes, J.L.C.; Lopes, N.P. Espectrometria de massas com ionização por "Electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicos de baixo peso molecular.

Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39, 1-15.

Dall'Asta, C.; Cirilini, M.; Morini, E.; Galaverna, G. Brand-dependent volatile *fingerprinting* of italian wines from Valpolicella. *Journal of Chromatogr A***2011**, 1218, 7557-7565.

Delgado, M.A.R.; Hernandez, G.G.; González, J.E.C.; Trujillo, J.P.P. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, **2002**, 78, 523-532.

Denis, E.G.; Keyzers, R. A.; Kalua, C.M.; Maffei, S.M.; Nicholson, E.L. Grape contribution to wine aroma: production of hexyl acetate, octyl acetate, and benzyl acetate during yeast fermentation is dependent upon precursors in the must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 2638-2646.

Ducasse, M.A.; Williams, P.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Doco, T. Isolation of carignan and merlot red wine oligosaccharids and their characterization by ESI-MS. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79, 747-754.

Ehling, S.; Cole, S. Analysis of organic acids in fruit juices by liquid chromatography – mass spectrometry: an enhanced tool for authenticity testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 2229-2234.

Eyégghé-Bickong, H.; Alexandersson, E.O.; Gouws, L.M.; Young, P.R.; Vivier, M.A. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars acids organic acids in grapevine berries. *Journal of Chromatography B*, **2012**, 885-886, 43-49.

Fang, F.; Li, J.M.; Pan, Q.H.; Huang, W.D. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 2007, 101, 428-433.

Frayne, R.F. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1986**, 37, 4.

Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, 246, 64-71.

Figueiredo-González, M.; Martínez-Carballo, E.; Cancho-Grande, B.; Santiago, J.L.; Martínez M.C.; Simal-Gándara, J. Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry* **2012**, 130, 9–19.

Flamini, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews*, **2003**, 22, 218-250.

Flamini, R. J. Some advances in the knowledge of grape, wine, and distillates chemistry as achieved by mass spectrom. *Journal Mass Spectrometry* **2005**, 40, 705–713.

Flamini, R.; Traldi, P. *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry*, 1th ed.; Wiley: New Jersey, **2010**.

Flores, P.; Hellín, P.; Fenoll, J. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem – mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2012**, 132, 1049-1054.

Frayne, R.F. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1986**, 37, 281-287.

Fulcrand, H.; Mané, C.; Preys, S.; Mazerolles, G.; Bouchut, C.; Mazauric, J.P.; Souquet, J.M.; Meudec, E.; Li, Y.; Cole, R.B.; Cheynier, V. Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 2008, 69, 3131-3138.

Hayasaka, Y.; Asenstorfer, R.E. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nano-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 756-761.

Heier, A.; Blaass, W.; Drob, A.; Wittkowski, R. Anthocyanin analysis by HPLC/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2002**, 53, 78-86.

- Hernanz, D.; Gallo, V.; Recamales, A. F.; Meléndez-Martínez, A. J.; Heredia, F. J. Comparison of the effectiveness of solid-phase and ultrasound –mediated liquid-liquid extractions to determine the volatile compounds of wine. *Talanta*, **2008**, 76, 929-935.
- Hoffmann, E.; Strooband, V. *Mass Spectrometry: Principles and applications*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd, England, 2007.
- Hughey, C.A.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. Resolution of 11,00 compositionally distinct components in a single electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrum mass of crude oil. *Anal. Chem.* 2002, 74, 4145.
- Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial (INMETRO); orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008; 2010.
- Ivanova, V.; Dörnyei, Á.; Márk, L.; Vojnoski, B.; Stafilov, T.; Stefova, M.; Kilár, F. Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry* **2011**, 124, 316–325.
- Ivanova, V.; Stefova, M.; Vojnoski, B.; Dörnyei, Á.; Márk, L.; Dimovska, V.; Stafilov, T.; Kilár, F. Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R.Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International* **2011**, 44, 2851–2860.
- Jaitz, L.; Siegl, K.; Eder, R.; Rak, G.; Abranko, L.; Koellensperger, G.; Hann, S. LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry*, **2010**, 122, 366-372.
- Keevil, S.; Adams, G.; Austin, C.; Baudains, R.; Besonen, J.; Buckley, K.; Brook, S.; Fallowfield, G.; Gilby MW, C.; Jones, R.; Keevil, S.; Lawther MW, J.; Lloyd, A.; Macdonogh, G.; Mayson, R.; Palij MW, M.; Port, J.; Radford, J.; Voss, R.; Werner, G.; White, Paul. *Guia Ilustrado Zahar Vinhos do mundo todo*, 3^aed, Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 2008.
- Li, H.; Tao, Y.S.; Wang, H.; Zhang, L. Impact odorants of chardonnay dry white wine from changli country (China). *Eur Food Technol* **2008**, 227:287-292.
- Loscos, N.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varietals during accelerated wine ageing. *Food Chemistry*, **2010**, 120, 205-216.
- Lee, S.J.; Lee, J.E.; Kim, H.W. Kim, S.S.; Koh, K.H. Development of Korean red wines using *Vitis labrusca* varieties: instrumental and sensory characterization. *Food Chemistry* 2006, 94, 385-393.
- Marques, L.A.; Catharino, R.R.; Bruns, R.E.; Eberlin, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry *fingerprinting* of perfumes: rapid classification and counterfeit detections. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, 20, 3654-3658.
- Marshall, A.G. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 316-322.

Marshall, A.G.; Hendrickson, C.L.; Jackson, G.S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*, **1998**, 17, 1, 1-35.

Mateus, N.; Teresa, S.P.; Gonzalo, J.C.R.; Buelga, C.S.; Freitas, V. Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chemistry*, **2002**, 76, 335-342.

Mato, I.; Suárez-Luque, S.; Huidobro, J.F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, **2005**, 1175-1188.

Mato, I.; Suárez-Luque, S.; Huidobro, J.F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*, 2007, 102, 104-112.

Mazucca, P.; Ferranti, P.; Picariello, G.; Chianese, L.; Addeo, F. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2005**, 40, 83-90.

Meyen, C.G.; Urso, D.B.; Ikuno, L.L. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Produção de Vinhos. Disponível em: http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/vinho/pagina_final.htm. Acessado em: 09 de fev. 2013.

Messias, C.L. IAC E UNICAMP BUSCAM UVA E VINHO REPRESENTATIVO DE SÃO PAULO. *Jornal da UNICAMP*, Campinas, 380, p. 12-25, novembro/2007.

Minuti, L.; Pellegrino, R.M.; Tesei, I. Simple extraction method and gas chromatography – mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1114, 263-268.

Minuti, L.; Pellegrino, R.M. Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1185, 23-30.

Meurer, E. C.; Tomazela, D. M.; Silva, R. C.; Augusto, F.; Eberlin, M. N. Fiber introduction mass spectrometry: full direct coupling of solid-phase microextraction with mass spectrometry. *Anal.Chem.***2002**, 74, 5688-5692.

Møller, J.K.S.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity. *Analyst*, **2005**, 130, 890.

Møller, J.K.S.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: spices from the labiatae family. *Food Chem.* **2007**, 100, 1283.

Monagas, M.; Bartolomé, B.; Cordovés, C.G. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005, 118, 45; 85-118.

Moutounet, M.; Rabier, Ph.; Puech, J.L.; Verette E.; Barillére J.M. Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood, application to a Chardonnay wine. *Sci. Aliments***1989**, 9 (1), 35.

- Nasi, A.; Ferranti, P.; Amato, S.; Chianese, L. Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometry techniques. *Food Chemistry*, **2008**, 110, 762-768.
- Ng, L.K. Analysis by gas chromatography/mass spectrometry of fatty acids and esters in alcoholic beverages and tobaccos. *Analytica Chimica Acta*. 2002, 465, 309-318.
- Nixdorf, S.L.; Gutiérrez, I.H. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytical Chimica Acta*, 2010, 659, 208-215.
- Noguerol-Pato, R.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. Quantitative determination and characterisation of the main odourants of Mencía monovarietal red wines. *Food Chemistry*, **2009**, 117, 473-484.
- Nuengchamng, N.; Ingkaninan, K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *Food Science and Technology*, **2009**, 42, 297-302.
- Ojima, M.; Rigitano, C.; Scaranari, H. J.; Martins, F. P.; Dallorto, F. C.; Nagai, V. Estudo de porta-enxertos para o pessegueiro. *Bragantia* **1978**, 37, 45-52.
- Ortega-Heras, M.; González-SanJosé, M. L.; Beltrán, S. Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 458, 85-93.
- Palma, M.; Barroso, C.G. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by – products. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 458, 119-130.
- Pawliszyn, J. Sample preoartion: quo vadis?. *Analytical Chemistry*. **2003**, 75, 2543-2558.
- Peña, R. M.; Barciela, J.; Herrero, C.; García-Martín, S. Optimization of solid-phase microextraction methods for GC-MS determination of terpenes in wines. *Journal of the science of food and agriculture* **2005**, 85, 1227-1234.
- Peres, R.G.; Moraes, E.P.; Micke, G.A.; Tonin, F.G.; Tavares, M.F.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control*, **2009**, 548-552.
- Pietra, P.G. Flavonids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 2000, 63, 1035-1042.
- Pilar Martí, M.; Busto, O.; Guasch, J. Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiaton and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *Journal Chromatography A*. 2004, 1057, 211-217.
- Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction; Wiley-VCH: New York, 1997.
- Pereira, A.C.; Reis, M.S.; Saraiva, P.M.; Marques, J.C. Aroma ageing trends in GC/MS profiles of liqueur wines. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 659, 93-101.

- Poppi, R.J.; Março, P.H.; Scarminio, I.P. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Quím. Nova*, **2008**, 31(5), 1218-1223.
- Revilla, I.; Margarino, S.P.; SanJosé, G.; Beltrán, S. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1999, 847, 83-90.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quím. Nova*, **2004**, 27, 771-780.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Mau jean, A.; Dubourdieu, D. Handbook of Enology the Chemistry of Wine, 2th Ed.; Wiley: England, 2006.
- Rizzon, L.A.; Zanuz, M.C.; Miele, A. Efeito da fermentação maloláctica na composição do vinho tinto. *Ciência Rural*, Santa Maria, **1997**, 27(3), 497-500.
- Rizzon, L.A.; Miele, A. Concentração de ácido tartárico dos vinhos da Serra Gaúcha. *Ciência Rural*, Santa Maria, **2001**, 31(5), 893-895.
- Rizzon, L.A.; Miele, A. Características analíticas de vinhos Merlot da Serra Gaúcha. *Ciência Rural*, Santa Maria, **2009**, 39(6), 1913-1916.
- Rizzon, L.A.; Sganzerla, V.M.A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves –RS. *Ciência Rural*, Santa Maria, **2007**, 37(3), 911-914.
- Robinson, A.L.; Boss, P.K.; Heymann, H.; Solomon, P.S.; Trengove, R.D. Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 504-517.
- Roesler, R.; Catharino, R.R.; Malta, L.G.; Eberlin, M.N.; Pastore, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2008**, 110, 711-117.
- Saccani, G.; Gherardi, S.; Trifirò, A.; Soresi Bordini, C.; Calza, M.; Freddi, C. Use of ion chromatography for the measurement of organic acids in fruit juices. *Journal of Chromatography A* **1995**, 706, 395-403.
- Sánchez, B.J; Ballesteros, E.; Gallego, M. Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after acontinuous solid-phase extraction. *Talanta*, **2011**, 84, 924-930.
- Santos Neto, J. R. A. Boletim técnico do instituto agrônômico do estado de São Paulo *Bragantia* **1955**, 14, 23.
- Sawaya, A.C.H.F. Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. Tese de doutorado. Instituto de Química-UNICAMP. 2006.
- Sawaya, A.C.H.F.; Tomazela, D.M; Cunha, I.B.S.; Bankova, V.S.; Marcucci, M.C.; Eberlin, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry *fingerpint* of propolis. *Analyst*, **2004**, 129, 739.

- Sawaya, A.C.H.F.; Catharino, R.R.; Facco, E.M.P.; Fogaça, A.; Godoy, H.T.; Daudt, C.E.; Eberlin, M. N. Monitoring of wine aging process by electrospray ionization mass spectrometry. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2011, 31(3), 730-734.
- Schaub, T. M.; Hendrickson, C.L.; Horning, S.; Marshall, A.G. High-Performance Mass Spectrometry: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance at 14,5 Tesla. *Analytical Chemistry* **2008**, 11, 3985-3990.
- Setkova, L.; Risticovic, S.; Pawliszyn, J. Rapid headspace solid-phase microextraction –gas chromatographic –time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction I. method development and optimization. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1147, 213–223.
- Silva, F.L.N.; Jara, J.L.P.; Queiroga, C.L.; Bechara, I.J.; Messias, C.L.; Eberlin, M.N. Qualitative headspace aroma profiling of wines from Syrah and hybrid grape using solid phase microextraction –gas chromatography – mass spectrometry. *Br J Anal Chem*, **2011**, 06, 271–275.
- Stafford, H.A.; Lester, H.H. Flavan-3-ol biosynthesis. *Plant Physiol* **1984**, 76, 184-186.
- Stecher, G.; Huck, C.W.; Popp, M.; Bonn, G. Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. *Journal of Analytical Chemistry*, **2001**, 371, 73-80.
- Tao, Y.; Li, H.; Wang, H.; Zhang L.; *Journal of Food Composition and Analysis*. **2008**, 21, 689-694.
- Terra, M. M.; Pires, E. J. P.; Coelho, S. M. B. M.; Passos, I. R. S.; Santos, R. R.; Pommer, C. V.; Silva, A. C. P.; Ribeiro, I. J. A. Porta-exertos para o cultivar Máximo IAC 138-22 de uvas de vinho em monte alegre do sul, SP. *Bragantia* **1990**, 49, 363-369.
- Van Bramer, S.E. *An Introduction to Mass Spectrometry*, Chester, 1997, vol 1.
- Vaclavik, L.; Lacina, O.; Hajslova, J.; Zweigenbaum, J. The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 685, 45–51.
- Vas, G.; Köteleky, K.; Farkas, M.; Dobó, A.; Vékey, K.. Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, 49, 100-104.
- Vas Freire, L. M. T.; Costa Freitas, A. M.; Relva, A. M. Optimization of solid phase microextraction analysis of aroma compounds in Portuguese muscatel wine must. *Journal Microcolumn Separations* **2001**, 13, 236-242.
- Villagra, E.; Santos, L.S.; Vaz, B.G.; Eberlin, M.N.; Laurie, V.F. Varietal discrimination of Chilean wines by direct injection mass spectrometry analysis combined with multivariate statistics. *Food Chemistry*, **2012**, 131, 692-697.

- Villiers, A.; Cabooterb, D.; Lynenc, F.; Desmetb, G.; Sandra, P. High-efficiency high performance liquid chromatographic analysis of red wine anthocyanins. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 4660– 4670.
- Villiers, A.; Alberts, P.; Tredoux, A.G.J.; Nieuwoudt, H.H. Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 730, 2-23.
- Wang, H.; Race, E.J.; Shrikrande, A.J. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 1839-1844.
- Wang, J.; Sporns, P. Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 2009-2015.
- Weldegergis, B.T.; Tredoux, A.G.J.; Crouch, A.M. Application of a headspace sorptive extraction method for the analysis of volatile components in south African wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 8696-8702.
- Xie, D.Y.; Sharma, S.B.; Paiva, N.L.; Ferreira, D.; Dixon, R.A. *Science* **2003** 299:396-399.
- Zhao, Q.; Duan, C.Q.; Wang, J. Anthocyanins profile of grape berries of *Vitis amurensis*, its hybrids and their wines. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11, 2212-2228; doi: 10.3390/ijms11052212.
- Zheng, Y.J.; Duan, Y.T.; Zhang, Y.F.; Pan, Q.H.; Li, J.M.; Huang, W.D. Determination of organic acids in red wine and must on only one RP-LC-column directly after sample dilution and filtration. *Chromatographia*, **2009**, DOI: 10.1365/s10337-009-1085-0.
- Zotou, A.; Loukou, Z.; Karava, O. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **2004**, 60, 39-44.

ANEXOS

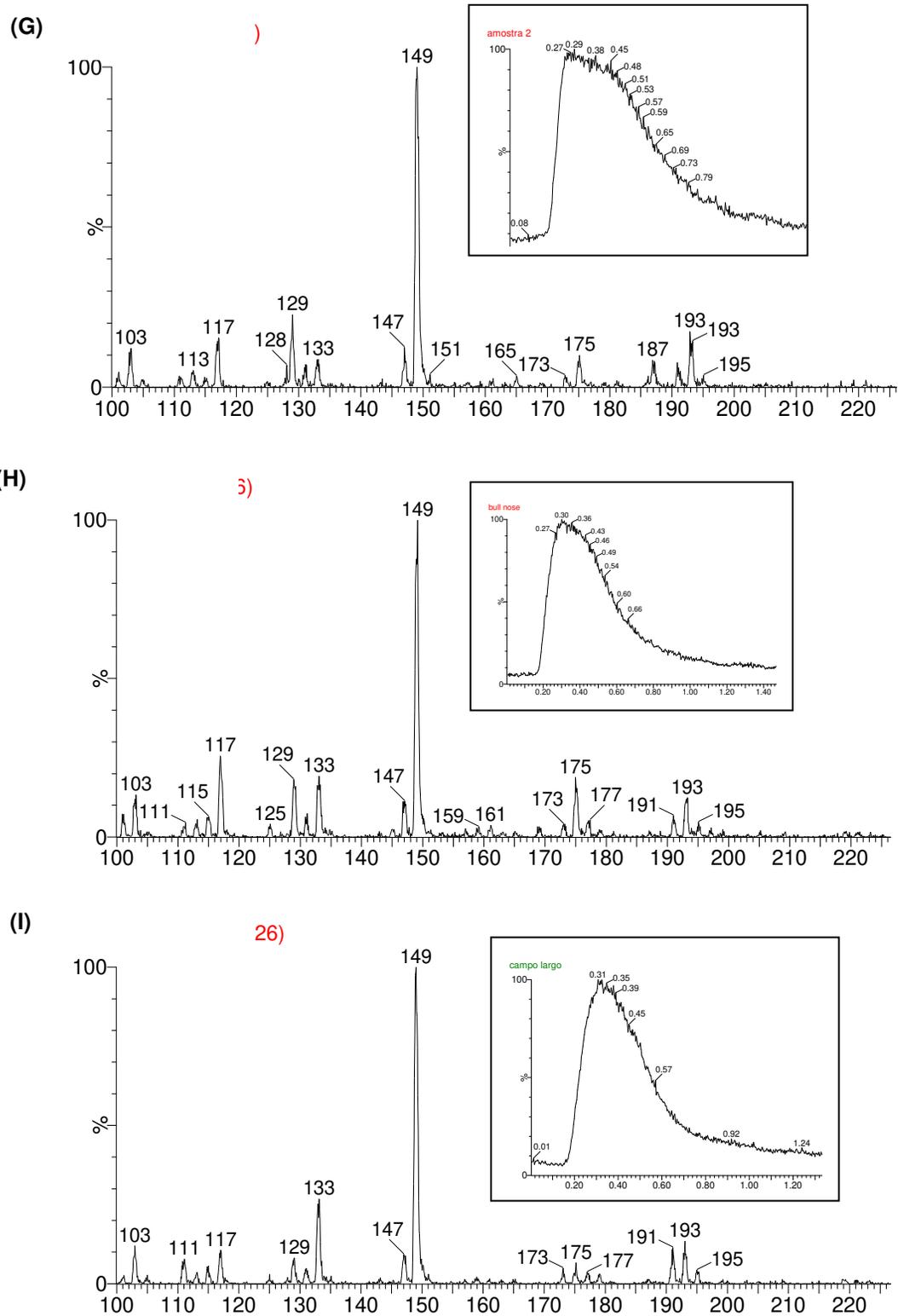


Figura A1. Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (G) vinho Bordô + Merlot, Serra Gaúcha; (H) vinho Syrah, Nova Zelândia; (I) vinho Isabel, Serra Gaúcha; ác. málico (m/z 133); ác. tartárico (m/z 149) e ác. cítrico (m/z 191).

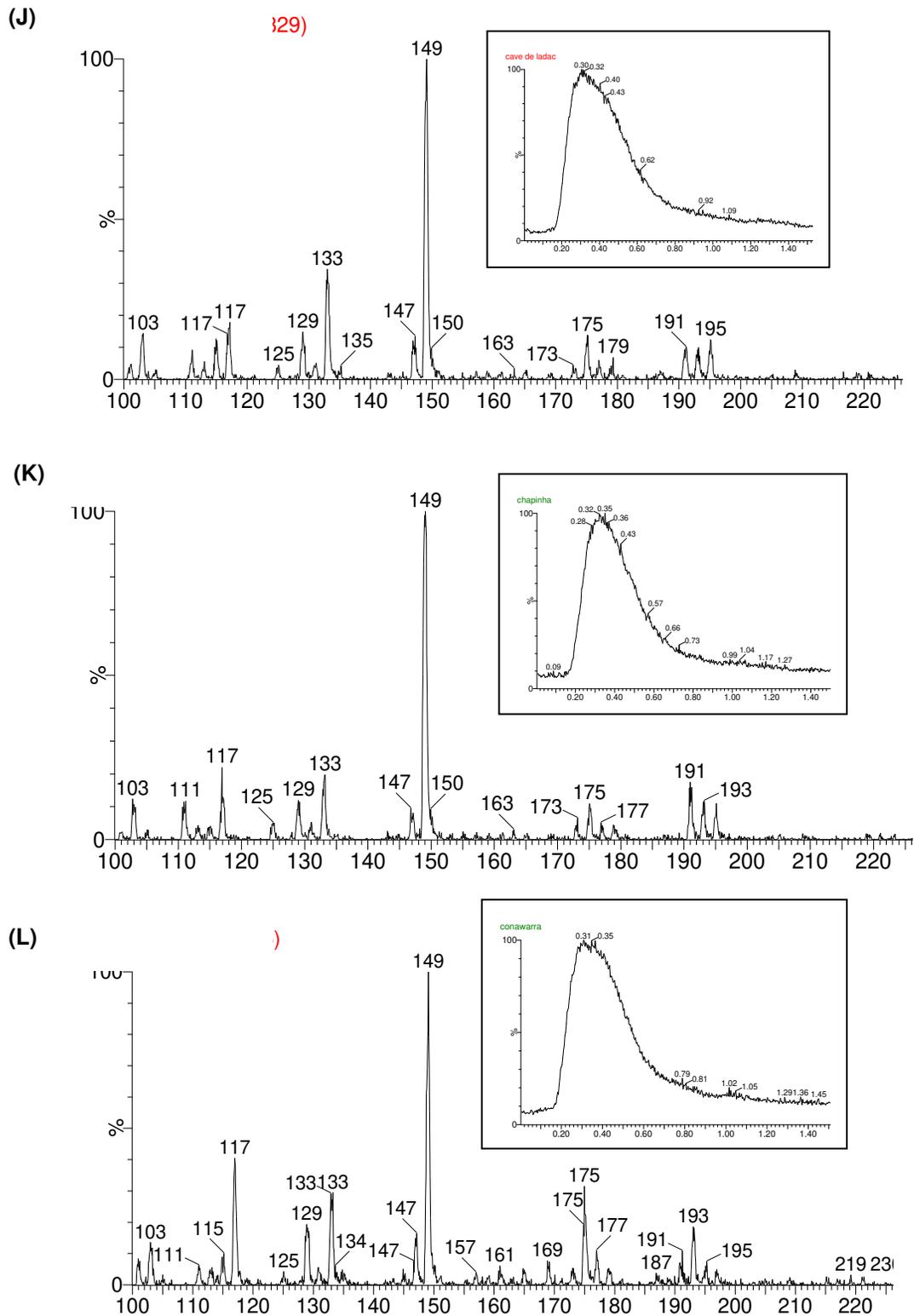


Figura A2. Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (J) vinho Syrah, França; (K) vinho Carmem, Serra Gaúcha; (L) vinho Syrah, Austrália; ác. málico (m/z 133); ác. tartárico (m/z 149) e ác. cítrico (m/z 191).

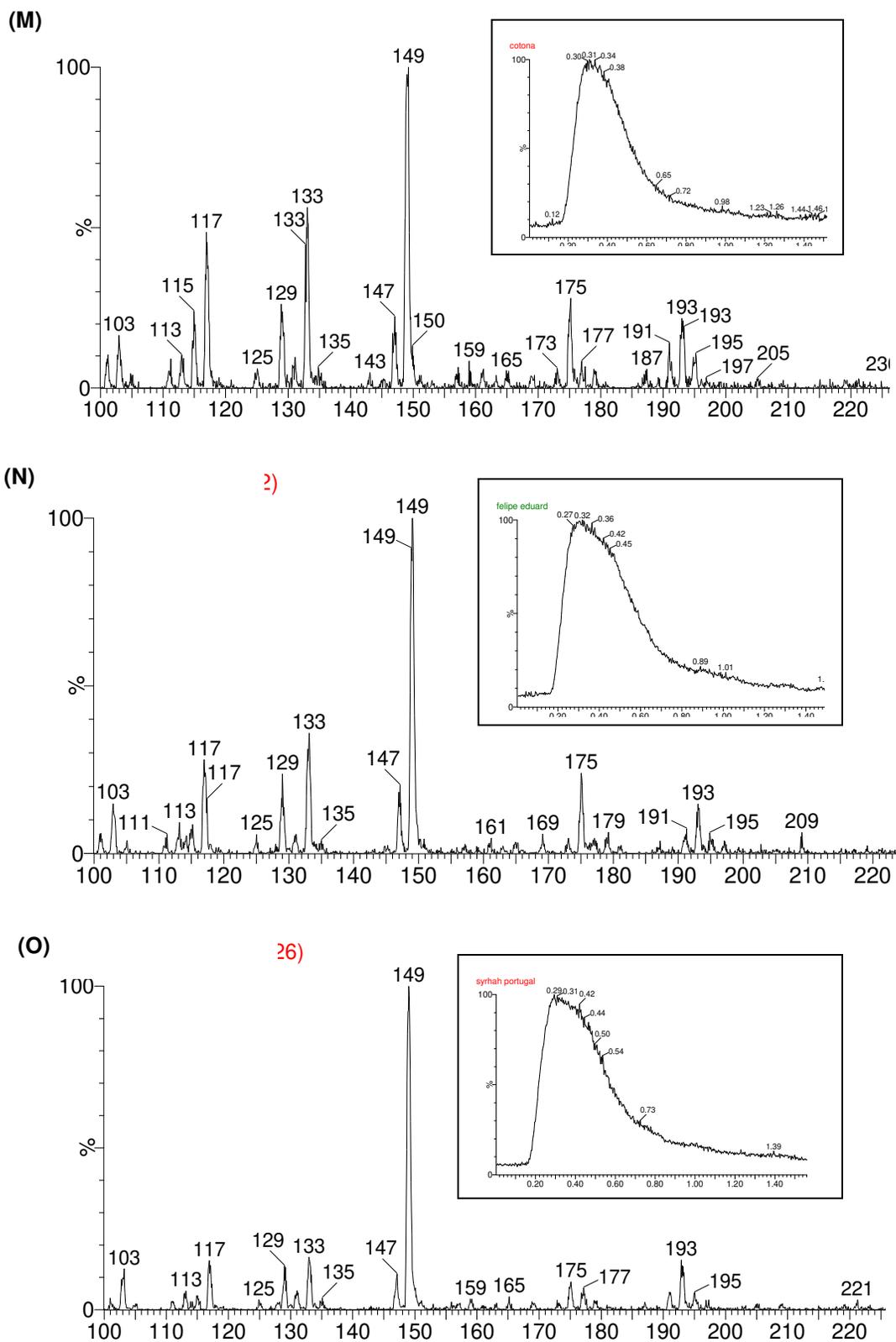
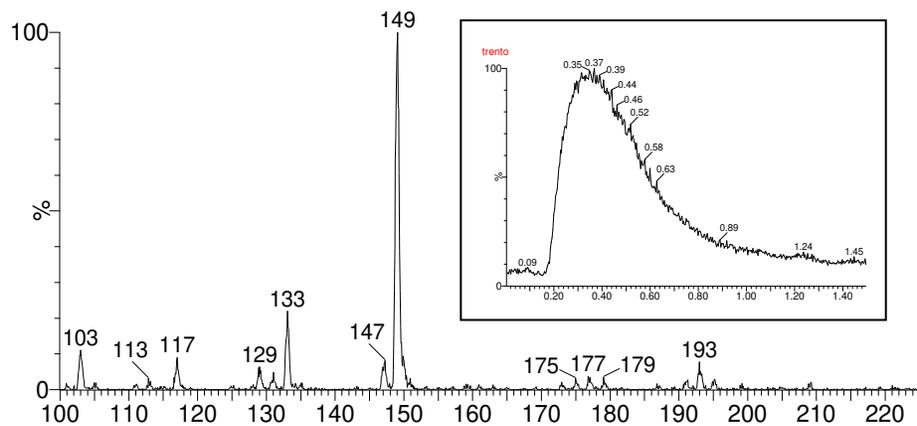
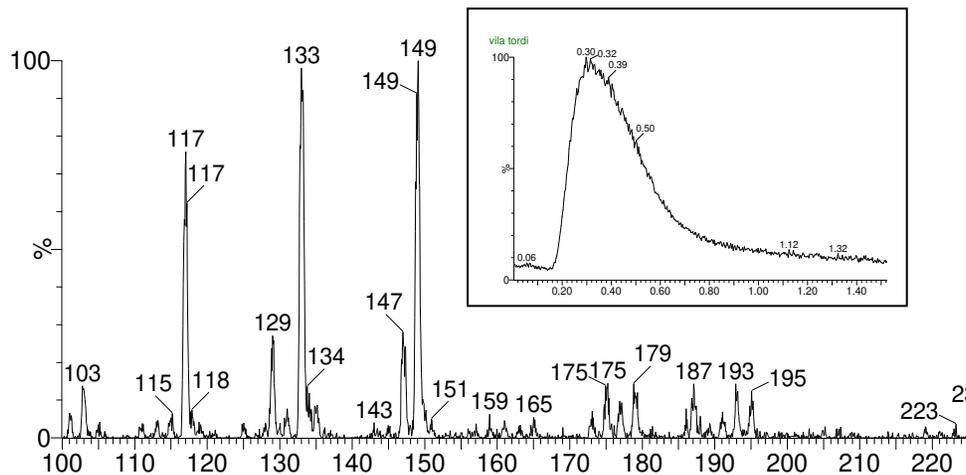


Figura A3. Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (M) vinho Syrah, Itália; (N) vinho Syrah, Chile; (O) vinho Syrah, Portugal; ác. málico (m/z 133); ác. tartárico (m/z 149) e ác. cítrico (m/z 191).

(P)



(Q)



(R)

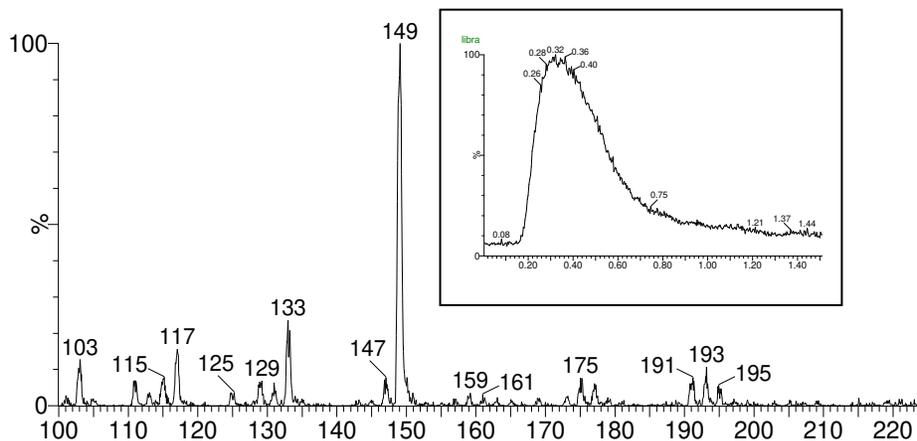


Figura A4. Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (P) vinho Bordô, Valinhos-SP; (Q) vinho Isabel, Valinhos-SP; (R) vinho Syrah, Portugal; ác. málico (m/z 133); ác. tartárico (m/z 149) e ác. cítrico (m/z 191).

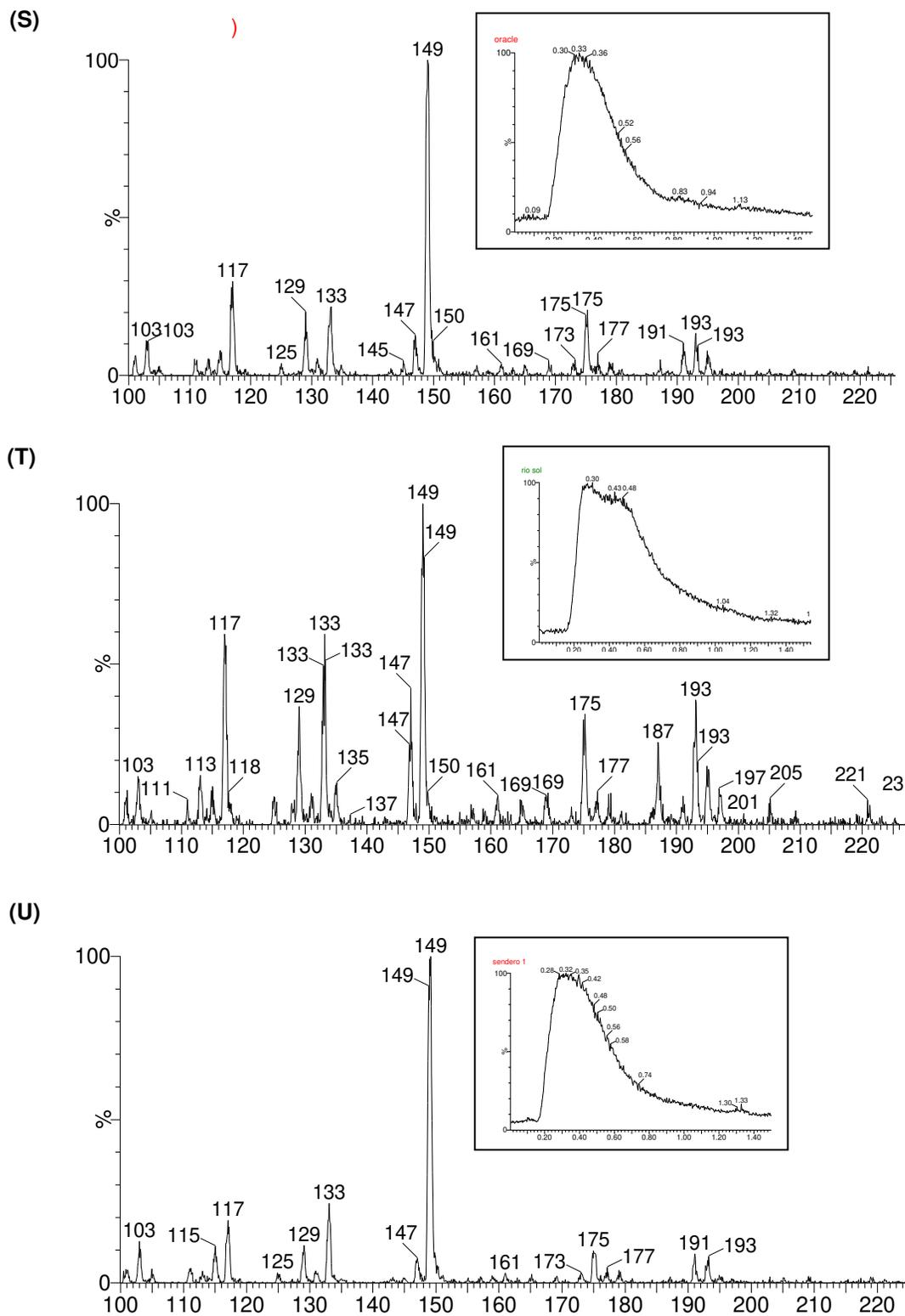


Figura A5. Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (S) vinho Syrah, África do Sul; (T) vinho Syrah, Vale do São Francisco; (U) vinho Syrah, Chile; ácido málico (m/z 133); ácido tartárico (m/z 149) e ácido cítrico (m/z 191).

(V)

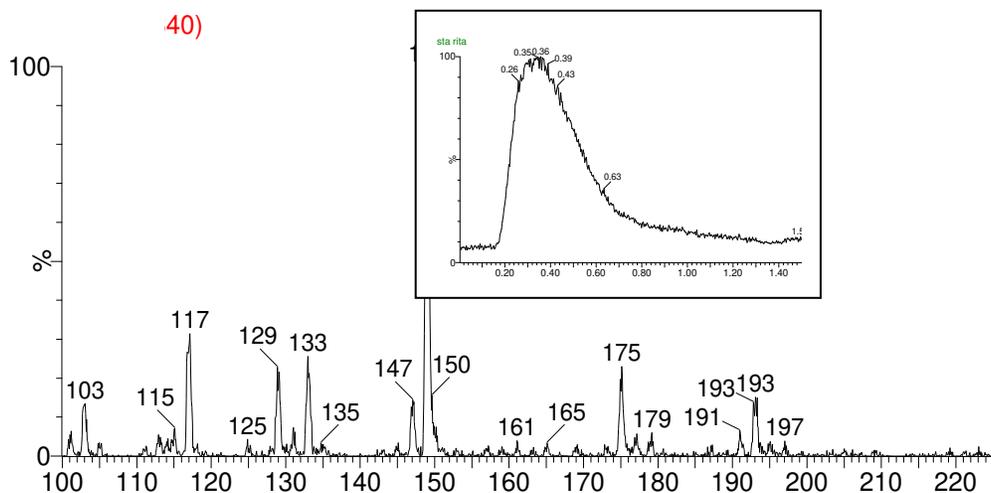


Figura A6. Espectros obtidos por (-) ESI-MS para amostras de vinhos: (V) vinho Syrah, Chile; ác. málico (m/z 133); ác. tartárico (m/z 149) e ác. cítrico (m/z 191).

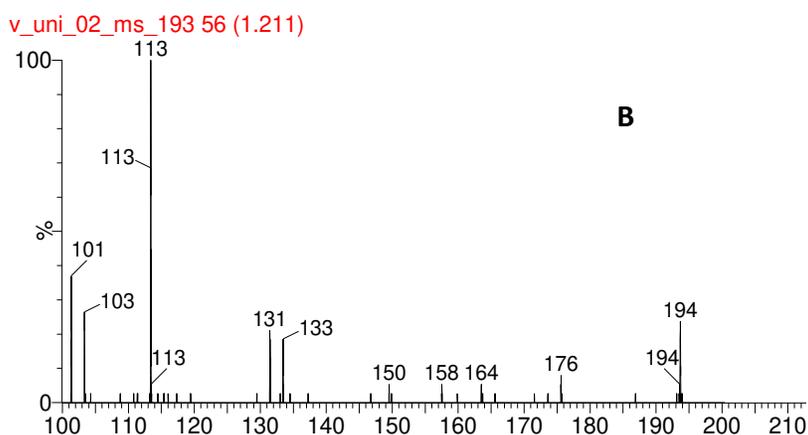
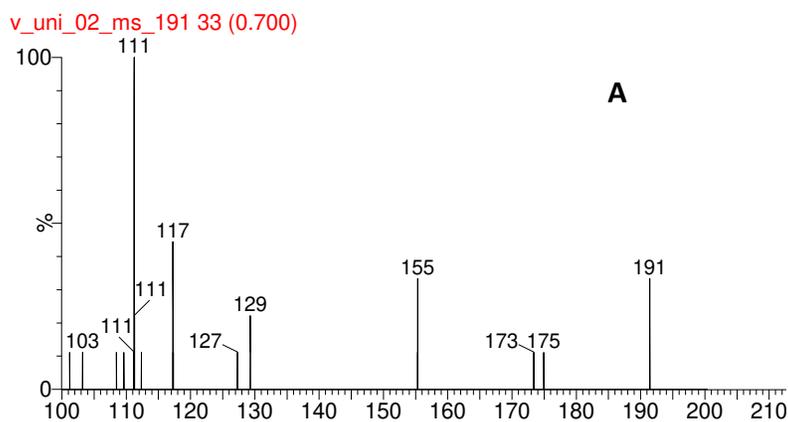


Figura A7. ESI (-) - MS/MS dos compostos encontrados e identificados em vinho tinto de diferentes regiões citados nos capítulos 4, 5 e 6. (A) ácido cítrico; (B) ácido D-glucônico.

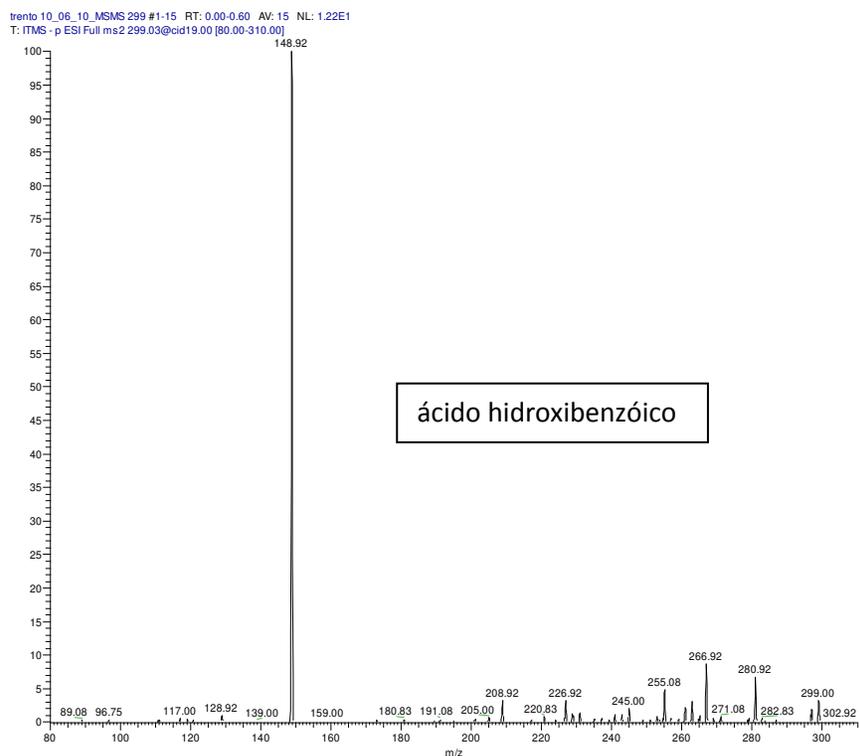


Figura A8. ESI (-) - MS/MS dos compostos encontrados e identificados em vinho tinto citados nos capítulos 4, 5 e 6. ácido hidroxibenzóico.

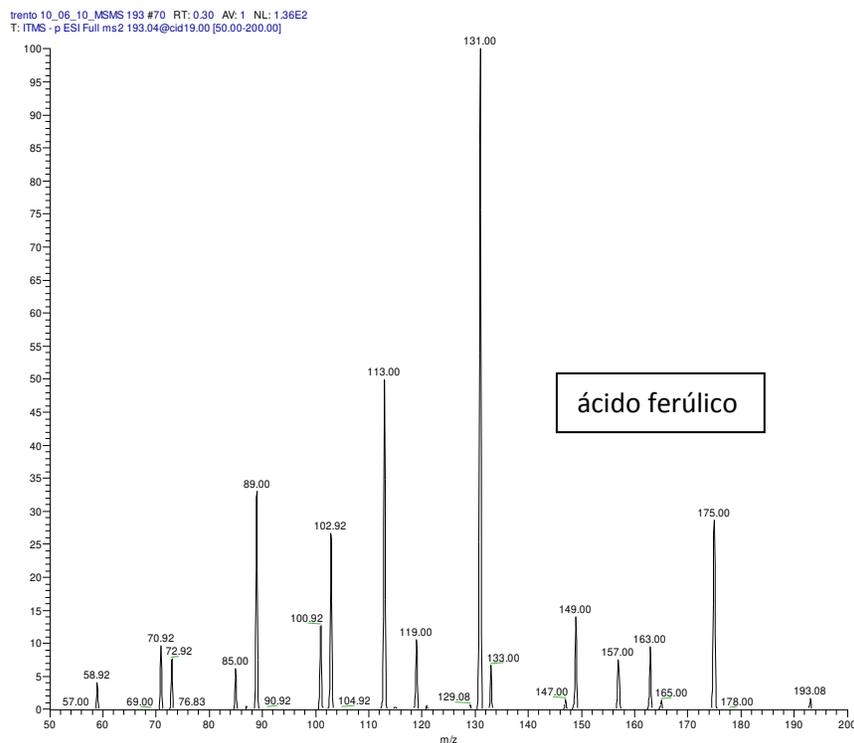


Figura A9. ESI (-) - MS/MS dos compostos encontrados e identificados em vinho tinto citados nos capítulos 4, 5 e 6. ácido ferúlico.

trento 10_06_10_MSMS 149 #246 RT: 1.07 AV: 1 NL: 1.20E1
T: ITMS - p ESI Full ms2 149.00@cid20.00 [50.00-200.00]

F

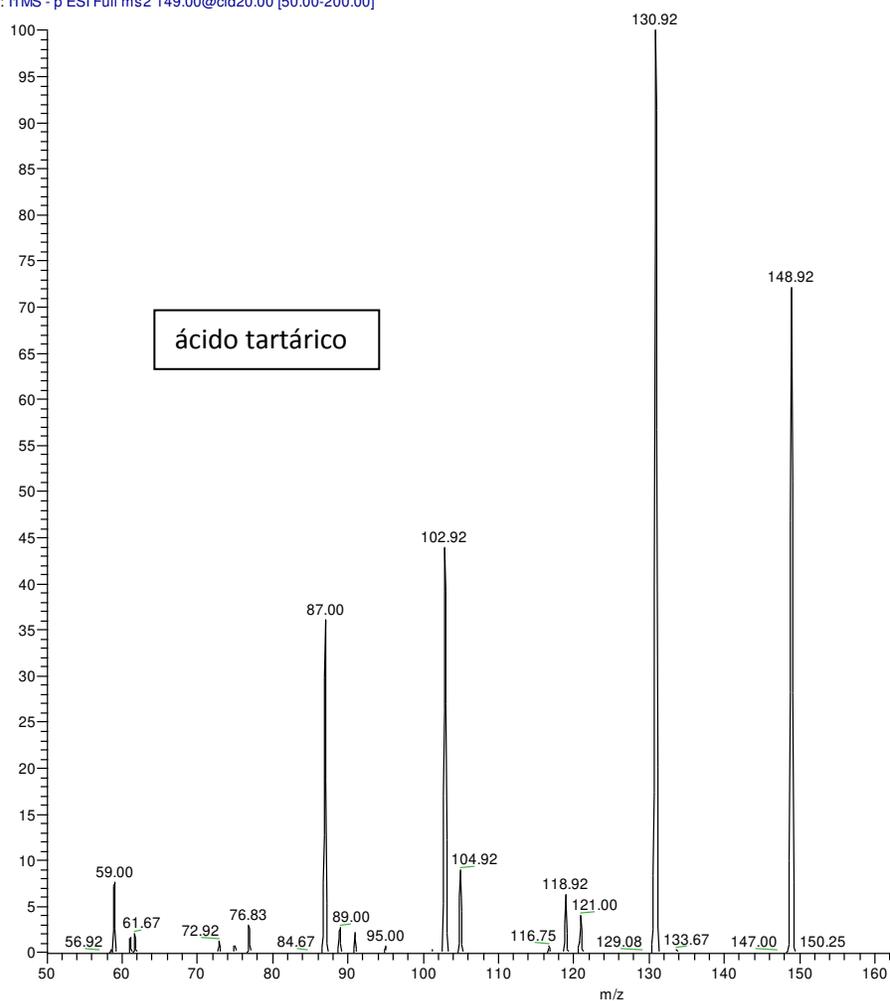


Figura A10. ESI (-) - MS/MS dos compostos encontrados e identificados em vinho tinto citados nos capítulos 4, 5 e 6, ácido tartárico.