



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ANDRÉA APARECIDA RIBEIRO ALVES



**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL, NÃO-VOLÁTIL E ANÁLISE DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCOS DE UVA INTEGRAIS BRASILEIROS**

Rio de Janeiro
Dezembro/2014

Andréa Aparecida Ribeiro Alves

Determinação da composição volátil, não-volátil e análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de uva integrais brasileiros

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Química).

Orientadora: Claudia Moraes de Rezende
Colaboradora: Elisabete Barbosa de Paula Barros

Rio de Janeiro
2014

A474

Alves, Andréa Aparecida Ribeiro.

Determinação da composição volátil, não-volátil e análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de uva integrais brasileiros / Andréa Aparecida Ribeiro Alves – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2014.

128 f.

Orientadora: Claudia Moraes de Rezende.

Colaboradora: Elisabete Barbosa de Paula Barros.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Suco de uva integral. 2. Compostos voláteis. 3. Compostos não voláteis. 4. Resíduos de agrotóxicos. I. Rezende, Claudia Moraes de (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD: 547

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andréa Aparecida Ribeiro Alves

Determinação da composição volátil, não-volátil e análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de uva integrais brasileiros

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Química).

Aprovada por:

Presidente, Prof.^a Dr^a Claudia Moraes de Rezende (Orientador, IQ/UFRJ)

Prof.^a Dr^a Michelle Jakeline Cunha Rezende (IQ/UFRJ)

Prof. Dr Anízio Márcio de Faria (IQ/UFU)

Dr. Humberto Ribeiro Bizzo (EMBRAPA/RJ)

Prof.^a Dr^a Selma Gomes Ferreira Leite (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro
2014

À Deus.

Ao meu saudoso pai, José Alves, a minha mãe Neide,

Aos meus irmãos, Ricardo, Ronaldo e Robson.

Aos meus sobrinhos queridos, e finalmente...

Ao meu filho, razão de minha vida, Vinícius.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu o dom da vida.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, estabelecimento de referência acadêmica, que me impulsionou a buscar sempre mais conhecimento, tanto para benefício particular quanto para a melhoria do País. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

À Professora Dr^a Claudia Moraes de Rezende pela orientação segura e pelo incentivo. À professora Dr^a Elisabete Barbosa de Paula Barros, colaboradora desse trabalho, amiga e pessoa decisiva para o sucesso deste trabalho. Aos membros da banca, Prof^a Dr^a Michelle Jakeline Cunha Rezende, Prof. Dr. Anízio Márcio de Faria, Dr. Humberto Ribeiro Bizzo e Prof^a. Dr^a Selma Gomes Ferreira Leite por aceitarem meu convite, pela disponibilidade e pelo acréscimo na qualidade do meu trabalho. Agradecimento especial ao Prof. Dr. Henrique Marcelo Gualberto Pereira pela utilização do equipamento QExactive.

Aos colegas dos Laboratórios de Aromas (626A) por todos os momentos de incentivo e descontração. Aos amigos e amigas, que a todo o momento, me auxiliaram e me deram o ombro amigo: Elisabete B. Paula Barros, Alexandre Lobo, Maristella Martinelli, Thaís Uekane, Natália Tinoco, Rafael Ferreira, Ana Paula e André Castro, Flávia Alves e Cléber Gonçalves. Ao Francisco Padilha; padrasto querido; ao Wendell, e à minha família, em especial, a minha mãe, irmãos e cunhadas, que sempre me instigaram a buscar novos caminhos. A todos que, de uma forma ou de outra, tiveram influência positiva para que este trabalho fosse possível, seja através de incentivo quanto ou por colaboração.

*“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar
para mudar o mundo.”
(Nelson Mandela)*

RESUMO

Alves, Andréa Aparecida Ribeiro. **Determinação da Composição Volátil, Não-volátil e Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Sucos de Uva Integrais Brasileiros**. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Ciências (Química)). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A produção e o consumo de suco de uva integral, no Brasil e no mundo, vêm aumentando numa escala de 30 % a cada ano. Os compostos voláteis são, em geral, aqueles que dão o aroma particular da fruta, e os não-voláteis são aqueles que conferem características organolépticas ao produto, logo a identificação destes compostos visa buscar melhorar a qualidade ao suco produzido no País e conseqüentemente agregar valor comercial. Atualmente, a população mundial tem cobrado qualidade e segurança dos produtos que consome principalmente no que diz respeito a resíduos de agrotóxicos, porque atender à legislação internacional (*Codex Alimentarius* Internacional) implica manter uma relação comercial favorável, garantir empregos e progresso para o País. Esta tese teve por objetivos: desenvolver um método e validá-lo para a quantificação de compostos voláteis em sucos de uva integrais brasileiros; analisar o perfil dos compostos não-voláteis nos sucos utilizando-se do equipamento QExactive e da análise dos componentes principais (ACP); e desenvolver um método e validá-lo para a quantificação de resíduos de agrotóxicos nestes sucos. A identificação dos compostos voláteis no suco ocorreu utilizando a MEFS e CG-EM-MSI. Na validação, obteve-se LD e LQ variando de 0,04 – 1,46 e 0,11 – 1,82 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O coeficiente de determinação R^2 variou de 0,990 a 0,999, o DPR foi abaixo de 6,0 % (tanto *intraday* quanto *interday*) e a recuperação variou de 76,0 a 91,0 %. Os constituintes voláteis mais representativos foram os ésteres, seguidos de álcoois, terpenos, ácidos carboxílicos e derivados nor-isoprenóides. Utilizou-se ACP para agrupar os sucos de acordo com os compostos quantificados. Na análise dos compostos não-voláteis pelo QExactive, conseguiu-se identificar ácidos orgânicos, fenólicos e alguns aminoácidos, e utilizando-se da ACP foi possível agrupar os sucos e verificou-se que os compostos identificados podem vir a servir como marcadores, uma vez que são mais pronunciados em alguns sucos do que em outros, sendo

assim decisivo para separá-los dos demais. Para a análise dos resíduos de agrotóxicos nos sucos foi utilizado a CG-EM-MSI e utilizando ELL/EFS para o *cleanup* e pré-concentração dos agrotóxicos nos sucos de uva. O LQ variou de 3,75 a 9,47 mg L⁻¹, a média de recuperação dos agrotóxicos no método validado foi de 84,0 a 99,7 %, com valores de DPR abaixo de 4,9 %. Dos 99 sucos de uva analisados, 32 apresentaram resíduos de agrotóxicos. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam, aliados às análises físico-química e sensorial, no futuro, contribuir para a obtenção do selo de certificação dos sucos de uva integrais nacionais.

Palavras-chave: suco de uva integral, compostos voláteis, compostos não-voláteis, resíduos de agrotóxicos.

ABSTRACT

Alves, Andréa Aparecida Ribeiro. **Determination of the Volatile, Non-Volatile Composition and the Residue Analysis of Pesticides in Brazilian Integral Grape Juices.** Rio de Janeiro, 2014. Thesis (Doctor degree in Science (Chemistry)). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The integral grape juice production and consumption in Brazil and around the world are increasing by 30% per year. Usually, the volatile compounds are responsible for the fruit unique aroma, and the non-volatile compounds give a organoleptic characteristic to the product. The compounds are identified to increase the quality of the juice produced in Brazil and, as a result, to aggregate commercial value to the product. At these days, the world population is demanding for products with quality and safety, notably worried about pesticides residues. Therefore, it is important to attend the international law (International *Codex Alimentarius*) to keep a positive commercial relationship, strengthening the job market and bringing progress for the country. The aim of this thesis was to develop and validate a method for quantifying volatile compounds in Brazilian integral grape juices; to analyze the juice non-volatile compounds profile using an QExactive equipment and the Principal Components Analysis (PCA); and to quantify the pesticides residues in these juices. In order to identify the volatile compounds it SPME and GC-MS-SIM were used. During the validation phase, the Detection (DL) and Quantifying (QL) limits ranged between 0.04 - 1.46 and 0.11 - 1.82 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The determination coefficient R^2 ranged from 0.990 to 0.999, the RSD was lower than 6.0% (*intraday* and *interday*) and the recovery rate ranged between 76.0 and 91.0%. Esters were the most representative volatile compounds, followed by alcohols, terpenes, carboxylic acids and norisoprenoids derivatives. The PCA was used to aggregate the juices according to the quantified compounds. During the non-volatile compounds analysis using QExactive, it was observed a large number of phenolic acids and some amino acids. The PCA made possible to aggregate the juices and showed that the identified compounds can be used as markers, because their presence differs from juice to juice. The GC-MS-SIM was used to analyse the pesticides residues in the juices and the LLE/SPE was applied to pre-concentrate and cleanup the pesticides in the grape juice. The

QL ranged from 3.75 to 9.47 mg L⁻¹, the pesticides recovery average rate of the validated method ranged between 84.0 and 99.7%, with RSD lower than 4.9%. From the 99 grape juices analysed, 32 presented pesticides residues. It is expected that, in the future, the results reached with this work, together with physical-chemical and sensorial analyses, can contribute for the constitution of a quality certificate for the Brazilian integral grape juices.

Keywords: integral grape juice, volatile compounds, non-volatile compounds, pesticides residues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sucos de uva: tinto, rosado e branco, respectivamente	22
Figura 2. Exemplos de cultivares de uvas utilizadas na elaboração dos sucos de uva brasileiros.....	22
Figura 3. Regiões produtoras de suco de uva no Brasil.....	24
Figura 4. Distribuição de Indicação Geográfica (IG) por Estados brasileiros (RS: Rio Grande do Sul, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, SC: Santa Catarina, ES: Espírito Santo, SP: São Paulo, PI: Piauí, TO: Tocantins, NE: estados do Nordeste, AL: Alagoas, CE: Ceará) e os tipos de IG, concedidas pelo INPI até 2014 (DO: Denominação de Origem, IP: Indicação de Procedência).....	25
Figura 5. Imagens da extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida com sistema de vácuo (EFS) e microextração em fase sólida (MEFS).....	34
Figura 6. Compostos voláteis presentes nos sucos de uva integrais AL e CB (em torno de 80 % dos picos totais): (A): Número de compostos voláteis detectados e identificados usando as colunas DBWax e DB5 para os sucos de uvas AL e CB, (B): Número de compostos separados por grupos químicos para os sucos de uvas AL e CB. Em (A) e (B) está mostrado a barra de erro de 5 % (para mais ou para menos, de acordo com a área da barra correspondente).....	43
Figura 7. Classe de constituintes voláteis extraídos dos sucos de uva (AL, AU, CB, CM, DC e SI) utilizando a ELL, EFS (cartuchos Lichrolut e tC18) e MEFS (fibras cinza – DVB/CAR/PDMS, e azul – PDMS/DVB). Nos gráficos está mostrado a barra de erro de 5 % (para mais ou para menos, de acordo com a área da barra correspondente).	44
Figura 8. Gráfico de Pareto para a variável de resposta (área total).....	49
Figura 9. Gráfico de correlação entre os valores observados experimentalmente e os valores previstos pelo modelo.....	50
Figura 10. CG-EM-MSI total (ao centro) e com as regiões expandidas (nas extremidades): suco de uva DC fortificado com os padrões de aroma: (1). acetato de etila, (2). (<i>E</i>)-crotonato de etila, (3). 1,4-cineol, (4). 3-metil-1-butanol, (5). 1,8-cineol, (6). (<i>E</i>)-2-hexenoato de etila, (7). β -fencheno, (8). 1-hexanol, (9). (<i>Z</i>)-hexen-3-ol, (10). (<i>E</i>)-2-hexen-1-ol, (11). (<i>Z</i>)-linalol óxido, (12). (<i>E</i>)-linalol óxido, (13).furfural, (14). (<i>S</i>)-3-hidroxi-butirato de etila, (15). linalol, (16). 1-octanol, (17). vitispirano, (18). α -ionona, (19). terpinen-4-ol, (20). acetofenona, (21). benzoato de etila, (22). (-)- α -terpineol, (23). 2-etil-hexanol, (24). acetato de 2-feniletila, (25). salicilato de etila, (26). (<i>E</i>)- β -damascenona, (27). 2-fenil-etanol, (28). benzenoacetonitrila, (29). ácido octanóico, (30).	

antranilato de metila e (PI). padrão interno 2-octanol.....	52
Figura 11. Gráfico dos valores próprios x número de componentes (<i>Scree plot</i>).....	66
Figura 12. Visão global dos sucos de uva em duas dimensões com as componentes principais ACP1 e ACP2 com a variável de classificação cor.....	67
Figura 13. (A) Gráfico de <i>scores</i> dos sucos de uva tintos e brancos, (B) Gráfico de <i>loadings</i> com os compostos de aroma validados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).....	67
Figura 14. (A) Gráfico de <i>scores</i> dos sucos de uva tintos, (B) Gráfico de <i>loadings</i> com os compostos de aroma validados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).....	69
Figura 15. (A) Gráfico de <i>scores</i> dos sucos de uva brancos, (B) Gráfico de <i>loadings</i> com os compostos de aroma validados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).....	70
Figura 16. Visualização do interior do Orbitrap, onde os íons são aprisionados e realizam um movimento orbital em torno do eixo.....	81
Figura 17. Esquematização do Orbitrap e foto do equipamento do LBCD - LADETEC/IQ – UFRJ.....	82
Figura 18. (A) Gráfico de <i>scores</i> dos sucos de uva tintos, (B) Gráfico de <i>loadings</i> com os compostos não-voláteis identificados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).....	92
Figura 19. (A) Gráfico de <i>scores</i> dos sucos de uva brancos, (B) Gráfico de <i>loadings</i> com os compostos não-voláteis identificados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).....	94
Figura 20. Estrutura química de alguns agrotóxicos utilizados na cultura de uva: dicofol (OC), paratons metílico (OF), λ -cialotrina (piretróide) e tebuconazol (triazol).....	100
Figura 21. Exemplificação de um cartucho de EFS.....	102
Figura 22. Etapas da extração em fase sólida.....	103
Figura 23. Agrotóxicos utilizados nesta análise de resíduos, sendo OC – organoclorados, OF – organofosforados e Fg – fungicidas.....	105
Figura 24. Comparação dos cromatogramas dos testes utilizando associação das extrações ELL/EFS do suco AU fortificado com alguns agrotóxicos.....	111
Figura 25. Cromatograma do suco de uva AU fortificado com os agrotóxicos	

após a extração ELL/EFS utilizando CG-EM-MSI: 1. Carbaril, 2. Dimetoato, 3. Quintozeno, 4. Paration metílico, 5. Clorpirifós metílico, 6. Dicofol, 7. Aldrin, 8. Tiabendazol, 9. Metidationa, 10. Clordano, 11. Dieldrin, 12. Tebuconazol, 13. Ditianona, 14. λ - cialotrina, 15. Procloraz e o PI: padrão interno *n*-pentacosano..... 111

Figura 26. Cromatograma do suco de uva integral SP_G1 com resíduo do agrotóxico dieldrin ($60,17 \text{ mg L}^{-1}$) e o PI *n*-pentacosano na concentração de 25 mg L^{-1} 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do suco de uva.....	26
Tabela 2. Relação dos sucos de uva integrais com suas especificações: procedência do suco, tipo, natureza, cultivar e espécie da uva.....	37
Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental.....	42
Tabela 4. Condições experimentais e valores de resposta do planejamento composto central (PCC) usado para otimizar as condições da MEFS fibra DVB/CAR/PDMS no suco de uva DC.....	48
Tabela 5. Compostos da Figura 10 com seus respectivos tempos de retenção (t_R), CAS <i>number</i> , estrutura química, aroma, IRL literatura (IRL _{lit.}) e experimental (IRL _{exp.}) para coluna DBWax e referências.....	53
Tabela 6. Compostos de aroma com seus íons característicos e parâmetros de validação dos compostos de aroma por CG-EM-MSI: equação da curva de calibração, coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão <i>intraday</i> (DPR _{intra} %) e <i>interday</i> (DPR _{inter} %), e exatidão por recuperação (R %).....	57
Tabela 7. Compostos de aroma com os valores calculados das concentrações nos sucos de uvas integrais brasileiros.....	59
Tabela 8. Relação dos compostos que foram utilizados na análise de ACP dos sucos de uva brasileiros.....	64
Tabela 9. Valores próprios, a variância aplicada em cada componente (VarX%) e à variância cumulativa (Cum.VarX%) para 30 componentes.....	65
Tabela 10. Novos valores próprios, a variância aplicada em cada componente (VarX%) e à variância cumulativa (Cum.VarX%) para 11 componentes.....	66
Tabela 11. Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos: ácidos hidroxibenzóicos - ácido gálico e ácido sinápico, estilbeno – resveratrol e ácido hidroxicinâmico – ácido cafeico.....	79
Tabela 12. Perfil dos compostos não-voláteis dos sucos, fórmula molecular <i>m/z</i> experimental e teórico, erro - E (ppm) obtidos na análise por QExactive.....	86
Tabela 13. Valores da abundância (média da triplicata, n = 3) de cada substância identificada nos sucos de uva.....	87

Tabela 14. Substâncias com seus respectivos códigos para análise dos componentes principais (ACP).....	91
Tabela 15. Sucos de uva brasileiros: códigos e especificações (tipo, natureza, tipo de uva).....	106
Tabela 16. Tempos de retenção (t_R) e íons característicos dos agrotóxicos em CG-EM.....	112
Tabela 17. Coeficientes de determinação (R^2), equação da curva de calibração, limites de detecção e de quantificação, LD e LQ, respectivamente, e LMR (limite máximo de resíduos).....	113
Tabela 18. Repetitividade (DPR%) e recuperação (R%) dos agrotóxicos trabalhados.....	114
Tabela 19. Sucos de uva contaminados com resíduos de agrotóxicos.....	115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°Brix	Grau Brix (quantidade de sólidos solúveis)
°G.L.	Grau Gay Lussac (gradação alcoólica)
ACG	Ácido clorogênico
ACP	Análise de Componentes Principais
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Fase estacionária octadecilsilano quimicamente ligado à sílica
C_A	Coeficiente da amostra
CAS-number	<i>Chemical Abstract Service Number</i> ou Número Químico da Substância
CB	Carboxen
C_F	Coeficiente da fibra
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-EM-MSI	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com monitoramento seletivo de íons
CG-O	Cromatografia gasosa acoplada à olfatometria
C_H	Coeficiente do <i>headspace</i>
CLAE-DAD/ESI-MS	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
CL/ESI-MS	cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador quadrupolo
CV	Coeficiente de Variação
cv.	Cultivar
CW	Polietilenoglicol
DB5	Fase estacionária 5%fenil95%dimetilsiloxano
DBWax	Fase estacionária Polietilenoglicol
DO	Denominação de Origem
DPR	Desvio padrão relativo
DVB	Divinilbenzeno
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
ESI	<i>Electrospray</i> ou feixe de elétrons
EUA	Estados Unidos da América

eV	elétrons-Volts
Fg.	Fungicida
FT-ICR/MS	Espectrometria de Massas com Transformada de Fourier de íons de ressonância ciclotrônica
HS	<i>Headspace</i>
IG	Indicação Geográfica
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IP	Indicação de Procedência
IRL	Índice de retenção linear
LD	Limite de detecção
LMR	Limite máximo de resíduos
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEFS	Microextração em Fase Sólida
MSI	Monitoramento seletivo de íons
m/z	Razão massa/carga
OC	Organoclorados
OF	Organofosforados
OMC	Organização Mundial do Comércio
PA	Poliacrilato
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PI	Padrão interno
QExactive	<i>QExactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer ou Espectrometria de massas híbrido QExactive com Analisador Quadrupolo-Orbitrap</i>
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> ou Extração Sortiva com Agitação
SCAN	Varredura com verificação completa ou varredura total de íons
SDE	<i>Simultaneous Distillation Extraction</i> ou Destilação com Extração Simultânea
t_{ex.}	Tempo de extração
T_{ex.}	Temperatura de extração
t_{inc.}	Tempo de incubação
t_R	Tempo de retenção
V.	<i>Vitis</i> (relativo à espécie da uva)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 INTRODUÇÃO	21
1.1.1 Suco de uva	21
1.1.2 Benefícios à saúde	23
1.1.3 Produção e comercialização	23
1.1.4 Certificado de procedência e origem	25
1.1.5 Composição do suco de uva	26
1.1.6 Produção do suco de uva	27
1.2 OBJETIVOS	28
1.2.1 Objetivos Específicos	28
1.3 REFERÊNCIAS	29
2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DOS SUCOS DE UVA INTEGRAIS BRASILEIROS	31
2.1 INTRODUÇÃO	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.2.1 Material	36
2.2.1.1 Padrões e Reagentes	36
2.2.1.2 Amostras	37
2.2.2 Métodos	38
2.2.2.1 Cromatografia Gasosa	38
2.2.2.2 Extrações e preparo de soluções	38
2.2.2.2.1 Preparo solução estoque do PI 2-octanol	39
2.2.2.2.2 Procedimento para a Extração Líquido-Líquido (agitação por ultrassom)	39
2.2.2.2.3 Procedimento para a Extração em Fase Sólida (EFS)	39
2.2.2.2.4 Procedimento para a Microextração em Fase Sólida (MEFS)	40
2.2.2.2.5 Preparo das soluções estoque de cada padrão de constituinte volátil	40

2.2.2.2.6	Procedimento para a obtenção das curvas de calibração	41
2.2.2.3	Planejamento experimental utilizando composto central	42
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
2.3.1	Comparação entre colunas cromatográficas quanto à natureza de constituintes voláteis nos sucos de uva	42
2.3.2	Comparação entre técnicas de extração quanto à natureza dos constituintes voláteis nos sucos de uva	44
2.3.3	Planejamento experimental	46
2.3.4	Validação do método para trinta constituintes voláteis nos sucos de uva	51
2.3.5	Aplicação do método validado	58
2.3.6	Análise de componentes principais (ACP) dos sucos de uva	64
2.4	CONCLUSÃO	71
2.5	REFERÊNCIAS	73

3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO NÃO-VOLÁTIL DOS SUCOS DE UVA INTEGRAIS BRASILEIROS ATRAVÉS DO QExactive (Q *Exactive*TM Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer)

3.1	INTRODUÇÃO	78
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	82
3.2.1	Material	82
3.2.1.1	Padrões e Reagentes	82
3.2.1.2	Amostras	83
3.2.2	Métodos	83
3.2.2.1	Condições de Análise	83
3.2.2.2	Preparo dos extratos dos sucos para injeção no QExactive	83
3.2.2.3	Tratamento dos dados	84
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.4.	CONCLUSÃO	95
3.5.	REFERÊNCIAS	96

4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCOS DE UVA INTEGRAIS BRASILEIROS	99	
4.1	INTRODUÇÃO	99
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	105
4.2.1	Material	105
4.2.1.1	Padrões e Reagentes	105
4.2.1.2	Amostras	106
4.2.2	Métodos	108
4.2.2.1	Condições de Análise	108
4.2.2.2	Preparo das soluções- estoque do padrão interno <i>n</i> -pentacosano e dos agrotóxicos	108
4.2.2.3	Preparo da solução-mix dos agrotóxicos	108
4.2.2.4	Fortificação do suco de uva e procedimento de extração ELL/EFS	109
4.2.2.5	Obtenção da curva de calibração	109
4.2.2.6	Aplicação do método validado em amostras reais	110
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4.3.1	Análise Qualitativa	110
4.3.2	Análise Quantitativa	111
4.4	CONCLUSÃO	117
4.5	REFERÊNCIAS	118
CONSIDERAÇÕES FINAIS	121	
APÊNDICES	122	
Apêndice A	123	
Apêndice B	125	
Apêndice C	128	
Publicações	128	

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

A uva é o fruto da videira (*Vitis sp.*), uma planta da família Vitaceae, e é utilizada na produção de sucos, doces, vinhos, passas e *in natura*.

A produção de suco de uva é datada por volta de 1869 nos Estados Unidos da América (EUA), onde Thomas Welch e seu filho recolheram cachos de uva da variedade Concord (*V. labrusca*) e as amassaram, filtraram e colocaram em garrafas esterilizadas para evitar a fermentação e assim criaram um novo produto (PEDERSON, 1980; MARZAROTTO, 2005).

A viticultura brasileira se iniciou com a chegada dos portugueses, com o cultivo de uvas europeias. No entanto, a produção de suco de uva só se iniciou por volta de 1920 sendo que, até década de 1960, o cultivo e a produção estavam limitados às regiões Sul e Sudeste do país (MARZAROTTO, 2005).

1.1.1 Suco de Uva

De acordo com a Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988, o suco de uva é uma bebida não fermentada, obtida do esmagamento ou prensagem (mosto simples) da uva sã, fresca e madura, com a presença ou não de suas partes sólidas, sendo tolerada a graduação até 0,5 °G.L. (Grau Gay Lussac). Para a obtenção do suco de uva brasileiro é permitido somente o uso de uva e mosto produzidos no País (BRASIL 1988).

Quanto à classificação, a mesma Lei supracitada estabelece que o suco de uva possa ser: integral (sem remoção da água e nem acréscimo de açúcar), concentrado (parcialmente desidratado, com concentração mínima equivalente a 65 °Brix), desidratado (remoção de 97 % da água), reconstituído (suco obtido pela diluição do suco concentrado), adoçado (acrécimo de sacarose na quantidade máxima de 1/10 em peso de açúcar) e néctar (é um suco de uva adoçado e reconstituído). No que concerne à cor, ele pode ser tinto, rosado e branco (Figura 1). Em relação ao aroma e ao sabor, estes devem ser próprios da uva que lhe deu origem (BRASIL, 1988).

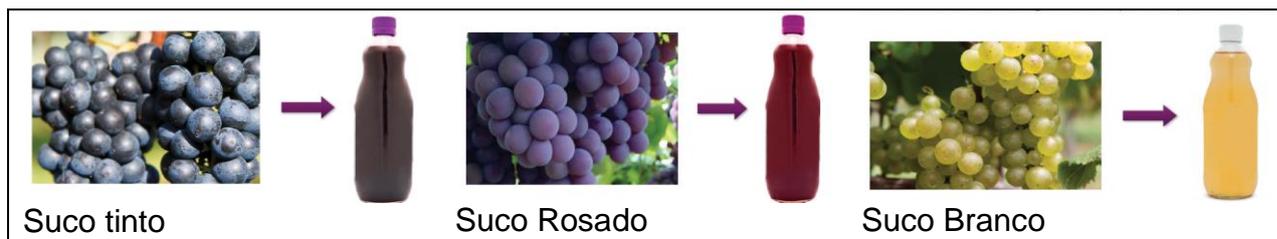


Figura 1. Sucos de uva: tinto, rosado e branco, respectivamente.

Para a elaboração do suco de uva tinto são utilizadas principalmente as uvas Concord, Isabel e Bordô, da espécie americana *V. labrusca*. Para a produção do suco branco são utilizadas a uva cv. (cultivar) Niágara (*V. labrusca*) e as uvas da espécie europeia *V. vinifera* das cultivares Itália, Moscato e Chardonnay (RIZZON & MENEGUZZO, 2007) (Figura 2), e do suco rosado usa-se combinação das cv. Niágara e Bordô. A cv. Concord dá origem ao suco mais procurado pelo consumidor, mantendo as características da uva fresca ao longo das etapas de processamento e propiciando melhor preço de comercialização. A cv. Isabel é mais consumida *in natura*, mas é empregada na elaboração de vinho, geleias e suco. A cv. Bordô apresenta alta resistência a doenças fúngicas, boa produtividade e elevado teor de matéria corante. A cv. Niágara é utilizada em grande parte dos sucos de uva brancos, pois combina aroma e sabor de grande aceitação pelo consumidor, seja na forma de bebida ou *in natura* (SUCO DE UVAS DO BRASIL, 2014).

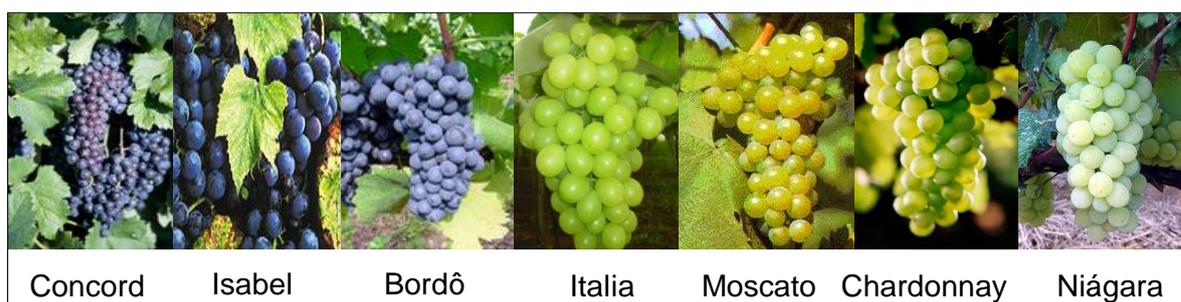


Figura 2. Exemplos de cultivares de uvas utilizadas na elaboração dos sucos de uva brasileiros.

Ainda no que diz respeito à legislação brasileira, a Lei nº 7.678 de 08 de novembro 1988 (decreto nº 6344 de 04 de janeiro 2008) determina os parâmetros físico-químicos, bem como seus limites, para o suco de uva produzido no País: valor mínimo de 1,057 para a densidade relativa do suco (20 °C); mínimo de 14,0 para sólidos solúveis em °Brix (20 °C); 0,41 e 0,90 g.100 g⁻¹, respectivamente valores

mínimo e máximo de acidez total expressa em ácido tartárico; a relação de sólidos solúveis em °Brix/ ácido tartárico nos valores de 15,0 (mínimo) e 45,5 (máximo); máximos de açúcares totais, álcool etílico e sólidos insolúveis, respectivamente, nos valores de 20,0 g 100g⁻¹, 0,5 %vol e 5,0 %v/v (BRASIL, 2008)

1.1.2 Benefícios à saúde

O suco de uva integral é uma bebida feita sem acréscimo de açúcar e água, é considerado um alimento funcional que auxilia na recuperação do cansaço muscular, na prevenção do envelhecimento e de doenças neuro-degenerativas, além de contribuir para a aceleração do metabolismo (DANI et al, 2009). Os polifenóis estão presentes na composição da uva e atuam como antioxidante, ou seja, na proteção contra os danos causados pelos radicais livres. Esse alto poder antioxidante ajuda a reduzir riscos de trombose coronariana e infarto. O suco ajuda no combate ao câncer, previne às doenças cardiovasculares, retarda o aparecimento de doenças neurológicas (como o Alzheimer), auxilia na redução da pressão arterial e colabora para o bom funcionamento do organismo (DANI et al, 2009, DANI et al, 2007).

O suco de uva, por se tratar de uma bebida não alcoólica, pode ser consumido por crianças, jovens, adultos e idosos, inclusive gestantes e portadores de doenças cardíacas e hepáticas, havendo pequena restrição para diabéticos, devido ao alto índice de carga glicêmica (MALACRIDA & MOTTA, 2005; OHNO et al, 2008).

Estudo relata que consumir dois copos de suco por dia (400 mL), para uma pessoa de 70 kg, supre totalmente a necessidade diária dos minerais ferro, manganês, cobre e zinco, que previnem a anemia (DEBON & OTOBELLI, 2014), além das várias doenças supracitadas.

1.1.3 Produção e Comercialização

Em 2011, a produção de uva no território nacional para utilização em sucos foi em torno de 83.700 hectares, sendo os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais os maiores produtores (Figura 3), foram colhidos entre 1.300.000 e 1.400.000 toneladas de uva (CAMARGO et al, 2011).



Figura 3. Regiões produtoras de suco de uva no Brasil. (Fonte: IBRAVIN, 2014)

O Brasil é um dos maiores produtores de suco de uva no âmbito mundial, com crescimento significativo de 30 % ao ano (RIZZON & MIELLE, 2012; IBRAVIN, 2014). Em 2012, a produção de suco de uva brasileiro foi de 220,0 milhões de litros, muito superior a 2008, que foi de 126,9 milhões de litros (MELLO, 2013).

As exportações de sucos de uva aumentaram em 2013, cerca de 1,78 milhão de litros de suco de uva, um aumento de 110,4 % frente ao ano anterior. O Japão é o principal importador de suco brasileiro com representação de 87,4 % do volume total comercializado (DEBON & OTOBELLI, 2014).

A comercialização de suco de uva aumentou 18,68 % no primeiro semestre de 2014 em relação ao mesmo período de 2013 (SUCO DE UVAS DO BRASIL, 2014). O consumo de suco de uva integral no Brasil é em torno de 4 litros per capita, considerado baixo, se comparado com os EUA, que chega a 55,5 litros. No entanto, em 2012, o suco integral foi o mais consumido no País, apresentando nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná os maiores valores, com respectivamente, 25 %, 16 % e 13 % do consumo interno.

O mercado de sucos tem se expandido graças aos investimentos na melhoria das cultivares e do manejo na elaboração destes sucos (IBRAF, 2014). No entanto, o setor ainda carece de parâmetros de qualidade e segurança para se estabelecer no mercado externo e apresentar-se mais atrativo frente aos sucos de uva estrangeiros.

1.1.4 Certificado de procedência e origem

Atualmente, o mercado mundial valoriza a oferta de produtos diferenciados, principalmente os alimentícios, e a utilização de referenciais de qualidade é capaz de dar destaque aos produtos. Um desses diferenciais é a certificação pela Indicação Geográfica (IG), que pode ser classificada como Indicação de Procedência (IP) e como Denominação de Origem (DO).

No Brasil, a Indicação Geográfica (IG) é regulamentada pela Lei nº. 9.279/96 e concedida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Esta indicação é um instrumento jurídico que reconhece e identifica um produto, o qual tem origem em um determinado país ou região, onde são atribuídas ao produto suas raízes geográficas (DRUZIAN & NUNES, 2012).

A Indicação de Procedência (IP) valoriza e reconhece o produto conforme a tradição em que é produzido em uma região específica com qualidade diferenciada. A área do referido produto passa a ser reconhecida pela produção, extração ou beneficiamento. Esse reconhecimento visa proteger a relação histórica entre o produto e sua produção, relacionados à origem geográfica específica. Já a Denominação de Origem (DO) refere-se às características que aquela área agrega ao produto, como fatores naturais e humanos (qualidade, estilo e sabor vinculados a terra, as pessoas e a especificidade da região). Neste são valorizadas as peculiaridades da referida região, beneficiando o produto final, identificando-o como diferentes dos demais (DRUZIAN & NUNES, 2012). Na Figura 4 estão representadas graficamente as IG por Estados brasileiros e os tipos de IG, concedidas pelo INPI até 2014 (INPI, 2014).

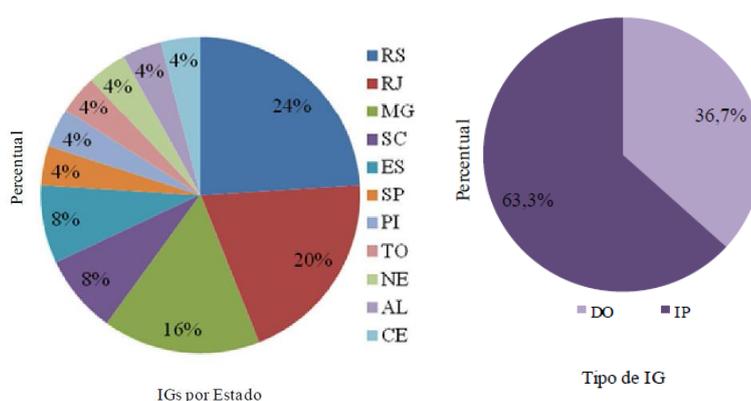


Figura 4. Distribuição de Indicação Geográfica (IG) por Estados brasileiros (RS: Rio Grande do Sul, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, SC: Santa Catarina, ES: Espírito Santo, SP: São Paulo, PI: Piauí, TO: Tocantins, NE: demais estados do

Nordeste, AL: Alagoas, CE: Ceará) e os tipos de IG, concedidas pelo INPI até 2014 (DO: Denominação de Origem, IP: Indicação de Procedência) (Fonte INPI, 2014)

A concessão de uma IG tem a função de agregar valor ao produto final, proteger a região produtora, além de promover reconhecimento por parte dos consumidores, gerar interesse por parte de grupos de produtores, promover maior propaganda do produto e da região na mídia. Ainda há vínculo com a preservação da biodiversidade, além da proteção do conhecimento e dos recursos naturais. A valorização da região contribui para o aumento da economia e da imagem do produto, estimulando a produção e comercialização do produto. Entretanto, o sucesso dessa estratégia depende de pesquisas para a comprovação da identidade e associação da qualidade desses produtos no comércio (DULLIUS, 2009).

No setor vitivinícola, já há para vinhos e espumantes algumas IG concedidas: em 2002, para o Vale dos Vinhedos – RS; em 2010, para a região de Pinto Bandeira – RS; em 2012, para Altos Montes – RS e Goethe – SC; em 2013, para Monte Belo do Sul – RS; em 2014, em Farroupilha – RS; e a região do Vale do Submédio do São Francisco já possui para uvas de mesa uma concessão obtida em 2009, sendo que todos os tipos de concessão foram de Indicação de Procedência (INPI, 2014).

Como se percebe, não há IG para sucos de uva brasileiros, o que de fato dificulta a valorização do produto e da região produtora, além do estabelecimento no mercado nacional e internacional como um produto de excelência.

1.1.5 Composição do suco de uva

O suco de uva é uma bebida complexa. Na Tabela 1 pode-se verificar sua composição.

Tabela 1. Composição do suco de uva.

-
- 81 a 86 % de água
 - baixos teores de lipídios, proteínas (cujos aminoácidos predominantes são a *L*-arginina, *L*-prolina e *L*-glutamina) e de fibra alimentar
 - açúcares (predominância da glicose e frutose)
 - ácidos orgânicos (predominância dos ácidos tartárico e málico, além do cítrico e succínico em menores valores)
 - alguns minerais (potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco, manganês e lítio)
-

Fontes: (MAZAROTTO, 2005; RIZZON & MENEGUZZO, 2007; RIZZON et al, 1997; RIZZON & LINK, 2006)

Os açúcares são os principais componentes dos sólidos solúveis, já a acidez dos sucos deve-se ao conjunto de ácidos orgânicos que conferem pH baixo ao produto, entre 2,90 a 3,43 (VINÍCOLA GARIBALDI, 2014).

No suco de uva há compostos fenólicos que são responsáveis pela cor, amargor e adstringência da bebida, além de serem antioxidantes (GOLLÜCKE et al, 2008). Os principais compostos são os ácidos fenólicos (ácidos protocatecuico, gálico, cumárico, cafeico, ferúlico) e estilbenos (resveratrol). Entre os flavonóides, encontram-se os flavanóis (catequinas, epicatequina e epigallocatequina), flavonóis (kempferol, quercetina), taninos e antocianinas (DANI et al, 2007).

Os ácidos fenólicos encontram-se na polpa (CHEYNIER, 2005); nas cascas estão os flavonóis (MAKRIS, 2006) e as antocianinas. Esta última classe confere cor tinta/violácea ao suco de uva, e pode ser afetada durante as etapas da elaboração do suco (MALACRIDA & MOTTA, 2005), o que influencia diretamente na qualidade e aceitação do produto no mercado consumidor. Os flavanóis e os taninos estão presentes nas sementes (GUERRA & BARNABÉ, 2005).

Os compostos voláteis são substâncias de classes químicas variadas, presentes em quantidades diminutas nos alimentos, e contribuem para o aroma e sabor do produto final. Em sucos de uva brasileiros experimentais, da espécie *V. labrusca* (cultivares Isabel, BRS Rúbea, BRS Violeta e Concord) foram observadas cerca de 20 substâncias dentre álcoois (1-heptanol, 3-metil- 1-butanol, 2-etil-hexanol, β - feniletanol), terpenos (*o*-cimeno, limoneno, 4-terpineol, α -terpineol), nor-isoprenóides (β -damascenona, vitispirano), ésteres (antranilato de metila, acetato de feniletila, acetato de etila, benzoato de etila), entre outros (SANTANA, 2009). A literatura científica acerca destes voláteis será discutida no Capítulo 2 desta tese.

1.1.6 Produção do suco de uva

A produção do suco de uva passa por várias etapas, a saber: recepção e seleção das uvas; desengace e esmagamento, com separação da ráquis; aquecimento do mosto; tratamento enzimático; extração do suco, com separação do bagaço; clarificação (estabilização tartárica/filtração); pasteurização; engarrafamento e armazenamento (RIZZON & MENEGUZZO, 2007). A separação da ráquis é importante, pois esta pode conferir gosto amargo ao produto (SANTANA, 2009) e a utilização de enzimas aumenta a intensidade da cor, além de diminuir a viscosidade

do suco (RICE, 1974). Na extração, há a retirada das sementes e do bagaço, e a clarificação, este último ocorre para evitar precipitados (em geral de pectinas, elevado teor de cobre e ferro, gomas, entre outros) e turvações no suco (utiliza-se a filtração e estabilização com solução tartárica) (WOLKE, 2003; SANTANA, 2009). A pasteurização inativa os microorganismos, que podem modificar o suco pronto, ocorre entre 90 a 95 °C por 2 segundos (RIZZON & MENEGUZZO, 2007) ou 75 a 80 °C por 15 minutos (RIZZON et al, 1997). O sistema de envase e engarrafamento acontecem nas temperaturas entre 60 e 68 °C, e a garrafa é preenchida com o suco e vedada, formando vácuo no interior quando resfria, garantindo integridade aos compostos do suco (MARKAKIS, 1982). O armazenamento deve ser em local ventilado e ao abrigo da luz solar (temperatura entre 12 e 15 °C) (PEDERSON, 1980).

1.2 OBJETIVOS

Determinar a composição volátil, não-volátil e os resíduos de agrotóxicos presentes em sucos de uva integrais brasileiros.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Validar uma metodologia de análise para 30 compostos voláteis de aroma e aplicar o método validado em amostras de sucos de uva integrais brasileiros, e fazer a análise de componentes principais (ACP) para tentar agrupá-los;
- Avaliar os compostos não-voláteis pela técnica de QExactive e construir modelos de análise de componentes principais (ACP) para obter diferenças/semelhanças entre os sucos;
- Validar uma metodologia de análise para 15 tipos de agrotóxicos e aplicar o método validado para investigar resíduos em amostras de sucos integrais brasileiros da safra 2012.

1.3 REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1988.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6344 de 04 de janeiro de 2008**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2008.

CAMARGO, U. A., TONIETTO, J., HOFFMAN, A. **Revista Brasileira Fruticultura**. volume especial, p. 144, 2011.

CHEYNIER, V. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.81 (suppl), p. 223S – 229S, 2005.

DANI, C., OLIBONI, L.S., VANDERLINDE, R., PRA, D., DIAS, J.F., YONEAMA, M. L., BONATTO, D., SALVADOR, M., HENRIQUES, J. A. P. **Journal of Medicinal Food**. v. 12, n. 1, p. 188, 2009.

DANI, C., OLIBONI, L.S., VANDERLINDE, R., BONATTO, D., SALVADOR, M., Henriques, J. A. P. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 2574, 2007.

DEBON, A., OTOBELLI, D. **O queridinho dos brasileiros**. Disponível em: <<http://www.bonvivant.com.br/sem-categoria/o-queridinho-dos-brasileiros/html>>. Acesso em 07 nov. 2014.

DRUZIAN, J. I., NUNES, I.L. **Revista GEINTEC**. v.2, n. 4, p. 413, 2012.

DULLIUS, P. R. **Indicações geográficas e desenvolvimento territorial: as experiências do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) – Universidade Federal de Santa Maria – RS, 149p., 2009.

GOLLÜCKE, A. P. B., SOUZA, J.C., TAVARES, D.Q. **Journal of Sensory Studies**. v.23, p. 340, 2008.

GUERRA, C., BARNABÉ, D. **Vinho**. In: VENTURINI, W. G. F. (Org). Ed. Edgard Blücher. p. 423, 2005.

IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas. **Exportação de suco de uva**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/news/news_item.asp?NewsID=6454>. Acesso nov. 2014.

IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. **Comercialização de sucos de uva: Comparativo 2004 – 2011**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/cadastroviticola.php?secao=3&m2=true>> Acesso em nov. 2014.

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial. **Indicações geográficas**. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/indicacao>>. Acesso nov. 2014.

MAKRIS, D.P., KALLITHRAKAB, S., KEFALAS, P. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, p. 396, 2006.

MALACRIDA, C.R., MOTTA, S. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, n.4, p. 659, 2005.

MARKAKIS, P. **Stability of anthocyanins in foods**. In: MARKAKIS, P. (Ed.) *Anthocyanins as Food Colors*. NY Academic Press. p. 163, 1982.

MARZAROTTO, V. **Suco de uva**. In: VENTURINI, W. G. F. (Org). Ed. Edgard Blücher. p. 311, 2005.

MELLO, L. M. R. **Embrapa Comunicado Técnico**. v. 137, 4p., 2013.

OHNO, M., KA, T., INOKUCHI, Y., YAMAMOTO, A., TAKAHASHI, S., TSUTSUMI, Z., TSUZITA, J., YAMAMOTO, T., NISHIGUCHI, S. **Clinica Chimica Acta**. v.388, p. 167, 2008.

PEDERSON, C. S. **Fruit and vegetable juice processing technology**. 3ª Ed. p. 269, 1980.

RICE, A. C. In: WEBB, D. **Chemistry of Winemaking**. 3 Ed. Dallas: American Chemical Society. p. 89, 1974.

RIZZON, L.A., MIELE, A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 32, n.1, p. 93, 2012.

RIZZON, L.A., MENEGUZZO, J. **Suco de Uva**. Brasília, 50 p. 2007.

RIZZON, L. A., LINK, M. **Ciência Rural**. v.36, n.2, p. 689, 2006.

RIZZON, L.A., MANFROI, V., MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. v. 21, p. 7, 1998.

SANTANA, I. **Avaliação do efeito da temperatura do processo de concentração por osmose inversa na qualidade do suco de uva (*Vitis labrusca* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – UFRJ – RJ, 117p., 2009.

SUCO DE UVAS DO BRASIL. **Variedades de uva. Venda de suco de uva**. Disponível em <<http://www.sucodeuvadobrasil.com.br>>. Acesso em 07 nov. 2014.

VINÍCOLA GARIBALDI. Disponível: <<http://www.vinicolagaribaldi.com.br/suco-saude>>. Acesso nov. 2014.

WOLKE, R.L. **O que Einstein disse a seu cozinheiro: a ciência na cozinha**. RJ: Jorge Zahar. 300p., 2003.

2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DOS SUCOS DE UVA INTEGRAIS BRASILEIROS

2.1 INTRODUÇÃO

A qualidade e a aceitação de um produto alimentício estão diretamente relacionadas ao seu aroma, representado por compostos voláteis de classes químicas variadas (ésteres, álcoois, terpenos, nor-isoprenóides, entre outros) e que estão, em geral, em quantidades bem pequenas nos alimentos, sendo muitos com valores de mg L^{-1} e até $\mu\text{g L}^{-1}$ (ALVAREZ et al, 2011). Estas substâncias conferem notas frutais, florais e adocicadas às frutas e seus produtos.

A composição volátil da uva é uma fonte contínua de pesquisas. A produção de vinho, que é um processo que sofre fermentação e maturação, introduz inúmeras alterações na matriz original da fruta. No caso do suco, especialmente o integral, a composição matriz versus produto final se mantém mais próxima da fruta do que o vinho (RAPP, 1998).

Em mostos e cascas de uvas do tipo Marmajuelo e Malvásia (variedades de uva branca, espécie *V. vinifera*) cultivadas nas Ilhas Canárias (Espanha), foram observados que as uvas cv. Malvásia apresentavam valores mais elevados de terpenos que as uvas cv. Marmajuelo. Além disso, as uvas Malvásia apresentaram maior teor de *cis*-3-hexen-1-ol, acetato de etila e *n*-nonalactona. Os compostos α -terpineol, os óxidos de linalol (*Z* e *E*), vanilina e álcool benzílico apresentaram valores comparáveis aos já observados em vinhos comerciais. (RODRÍGUEZ-BENCOMO et al, 2011)

Em uvas das cultivares diversas Muscat Hamburg, Beizi, Concord, entre outras, das espécies *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. amurensis*, espécies híbridas (mistura de duas espécies) foram identificados compostos comuns entre as amostras, tais como: (*Z*)-3-hexen-1-ol, 1-hexanol, (*E*)-2-hexen-1-ol, 1-octanol, 2-fenil-etanol, acetato de etila, 3-hidroxibutirato de etila, (*E*)-2-hexenoato de etila, 1,8-cineol (eucaliptol), *Z/E* óxidos de linalol, linalol e α -terpineol. Os terpenóides foram abundantes na cultivar *V. vinifera*, já o grupo *V. labrusca* e híbridos das cultivares *V. vinifera* e *V. amurensis* tiveram abundância nos ésteres. (YANG et al, 2009)

Em sucos de uva provenientes da uva Niágara (*V. vinifera*) foram identificados como compostos majoritários: hexanoato de etila, os óxidos de linalol,

acetofenona, 1-octanol, linalol, e 2-fenil-etanol (ROSS et al, 2010); já na variedade Albariño (*V. vinifera*) foram observados α e β -ionona, linalol, β -damascenona, α -terpineol, 1-hexanol, hexanoato de etila e os ácidos hexanóico e octanóico. (VILANOVA et al, 2012).

BAEK e colaboradores (1997) descreveram voláteis de aroma do suco de uva Muscadine (*V. rotundifolia* Michx), obtidos por extração líquido-líquido e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e CG-olfatometria (CG-O), e ressaltaram a presença de 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona (furaneol), 1,3-butadieno, butanoato de etila, 2-metil-butanoato de etila, álcool fenilético, e *o*-aminoacetofenona, o primeiro componente foi caracterizado como o mais representativo pela técnica de olfatometria (CG-O) conhecida como AEDA (*aroma extract dilution analysis*) (ULLRICH et al, 1987). Posteriormente, CAVEN-QUANTRILL e colaboradores (2006) investigaram a composição de compostos voláteis em sucos de uva branca da cultivar Huxelrebe (*V. vinifera*), comparando as técnicas de SDE (*simultaneous distillation-extraction*) e SBSE (*stir bar sorptive extraction*) em sucos de uva comerciais e experimentais, em que o método de SBSE foi mais sensível, possibilitando a identificação de 126 compostos de aroma contra 98 usando SDE.

SÁNCHEZ-PALOMO e colaboradores (2009) analisaram compostos voláteis em sucos de uva da cultivar espanhola Muscat d'Alexandrie (*V. vinifera*) por extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS) e SDE, onde observaram principalmente monoterpenos oxigenados, ácidos carboxílicos, além de álcoois aromáticos e alifáticos. Sucos de uva da cultivar Carlos Muscadine (*V. rotundifolia* Michx) foram analisados por técnicas de CG-O e de CG-EM, revelando sete compostos como odorantes potentes, como 2-metilbutanoato de etila, 3-metilbutanoato de etila, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, 2-fenil-etanol, hexanoato de etila, (*E*)-2-butenato de etila e *o*-aminoacetofenona, além de (*E*)- β -damascenona e do 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona, associados aos aromas almiscado, caramelo, frutais e florais geralmente observadas em uvas (LIU & CADWALLADER, 2010).

O antranilato de metila é referência quando se trata de aroma de uva comercial (WANG & DE LUCA, 2005) e é encontrado geralmente na cultivar Concord (*V. labrusca*) em baixo teor (2,6 mg kg⁻¹), porém em quantidades superiores às cultivares Niágara (*V. labrusca*), 1,9 mg kg⁻¹, e Elvira (híbrida *V. labrusca* e *V.*

riparia), 0,03 mg kg⁻¹ (SCHREIER & PAROSCHY, 1981). O 3-hidroxi-butirato de etila também apresenta aroma de uva, sendo observado em uvas de cultivares Muscat Hamburg (*V. vinífera*), Beizi (híbrida *V. thunbergii* e *V. vinífera*), Concord (*V. labrusca*) (YANG et al, 2009) e em vinhos de uva branca das cultivares Malásia e Marmajuelo (*V. vinífera*) (RODRÍGUEZ-BENCOMO et al, 2011).

A ELL é empregada para extração de compostos de alta, baixa e média volatilidade, graças ao seu alto coeficiente de partição, porém envolve a evaporação de solvente, o que pode provocar perda de compostos voláteis (ORTEGA-HERAS et al, 2002). Nesta técnica o sistema amostra-solvente é agitado e o analito passa da fase aquosa para a fase orgânica, enquanto os interferentes se mantêm (em sua maioria) na fase aquosa. O procedimento é trabalhoso e requer grande volume de solvente, além de ocorrer, com frequência, baixa repetitividade em decorrência das várias etapas (LANÇAS, 2004).

A EFS é uma técnica de preparo de amostras líquidas que surgiu no final da década de 1970. A EFS utiliza-se de um cartucho recheado com sorvente (fase sólida) responsável pela retenção dos compostos de interesse presentes na matriz (AQUINO NETO & NUNES, 2003; LANÇAS, 2004). Existem disponíveis comercialmente diversos sorventes de EFS e a escolha depende da natureza química dos compostos que se deseja extrair. A EFS requer menor quantidade de solvente que a ELL e apresenta alta capacidade de concentrar os compostos nos extratos, no entanto com matrizes muito complexas ocorre a retenção irreversível ou permite co-extrativos da matriz que podem interferir na quantificação dos compostos de interesse (LANÇAS, 2004). No caso do suco de uva, que apresenta coloração intensa, pode resultar em extratos coloridos, que prejudicam a análise e quantificação dos compostos voláteis posteriormente.

Muitos compostos voláteis são termolábeis e frequentemente aparecem em quantidades diminutas, sendo extremamente importante que o método empregado para extraí-los seja tal que não os destrua, nem interfira na análise dos mesmos (ZAPATA et al, 2010). Uma técnica de extração que tem se mostrado eficiente neste aspecto é a microextração em fase sólida (MEFS).

A MEFS utiliza-se de uma fibra de sílica revestida por um polímero que extrai os compostos voláteis, que são adsorvidos, de acordo com a polaridade da fibra e da amostra. Os compostos são adsorvidos através do *headspace* (HS), esta técnica é especialmente empregada para a captura de voláteis, podem ser termicamente

dessorvidos no injetor de um cromatógrafo para análise (GUEDES DE PINHO, 2009).

Esta técnica necessita de um menor número de etapas, além de não utilizar solventes, apresenta alta sensibilidade, sendo capaz de contornar os problemas relacionados à baixa concentração e perdas por volatilidade, associada às outras técnicas de extração (LORD & PAWLISZYN, 2000).

Na Figura 5 é possível visualizar as três extrações supracitadas.

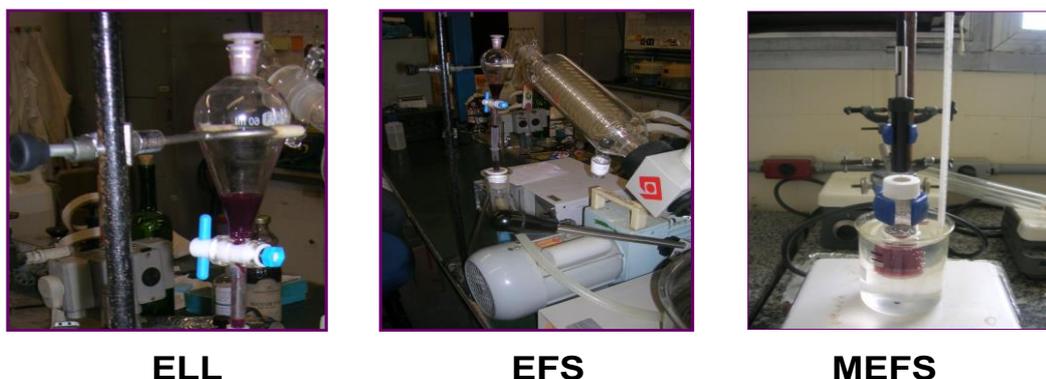


Figura 5. Imagens da extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida com sistema de vácuo (EFS) e microextração em fase sólida (MEFS).

Fibras monofásicas como polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA) são muito utilizadas para análise de terpenos em frutas e sucos, porém possuem pouca sensibilidade para compostos polares. Logo, as fibras mistas bifásicas ou trifásicas, contendo divinilbenzeno (DVB), PDMS, carboxen (CB) ou polietilenoglicol (CW), aumentam a eficiência da fibra em reter os compostos voláteis de polaridades variadas, e vem sendo empregadas visando uma maior sensibilidade que as monofásicas (SANCHEZ-PALOMO et al, 2005).

PAWLISZYN (1997) demonstrou que a fibra de MEFS trifásica, carboxen/divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (CAR/DVB/PDMS) é mais eficiente em relação às mono (PDMS) e as bifásicas (PDMS/DVB e CW/DVB) na extração de voláteis de aroma, devido a sua habilidade em extrair maior número de compostos odoríferos com ampla faixa de massa molecular (40 - 275 Da), além de extrair tanto compostos polares como não polares. O uso de MEFS com fibra trifásica apresentou ótimos resultados na análise de diferentes sucos como de romã (ARAÚJO et al, 2011), de uva cultivar Niágara (ROSS et al, 2010), de mandarina (ALVAREZ et al,

2011), de maçã (RITA et al, 2011), em vinhos brancos (BARROS et al, 2012) e néctares (RIU-AUMATELL et al, 2004).

SANCHEZ-PALOMO e colaboradores (2005) analisaram os compostos voláteis de uvas cv. Muscat (*V. vinifera*) usando diferentes fibras de MEFS (CAR/DVB/PDMS; PDMS/DVB e CW/DVB) e CG-EM, e detectaram e quantificaram 16 compostos, dentre terpenos, derivados benzênicos, nor-isoprenóides e álcoois alifáticos. As fibras DVB/CAR/PDMS e PMDS/DVB apresentaram eficiência próxima, e o grupo considerou a melhor fibra a PMDS/DVB, pois foi capaz de capturar mais compostos que a trifásica. PELLATI e colaboradores (2005) compararam a eficiência de 4 fibras (PDMS, DVB/CAR/PDMS, DVB/PDMS e CW/DVB) na extração dos compostos de aroma de *Evodia rutaecarpa* e *E. officinalis*, frutas da família Rutaceae. A fibra mais eficiente foi a trifásica, conseguindo adsorver compostos importantes como limoneno, β -elemeno, linalol, mirceno, valenceno, β -cariofileno, α -terpineol, entre outros. A fibra CAR/DVB/PDMS é ideal para análise de compostos odoríferos C3 – C20, com pesos moleculares 40 a 275 u, presentes em matrizes alimentares, por adsorver tanto compostos polares quanto não-polares (CANUTO et al, 2011), favorecendo a análise.

Aliada a análise cromatográfica está a Análise de Componentes Principais - ACP ou *Principal Component Analysis (PCA)*. Trata-se de uma formulação matemática utilizada na redução de dados, de forma a expressá-los de uma maneira tal que, suas semelhanças e diferenças sejam destacadas, sem perda significativa de informação. Na abordagem da ACP, a informação contida em um conjunto de dados é armazenada em uma estrutura computacional de dimensão reduzida a partir da projeção integral do conjunto de dados em um subespaço gerado por um sistema de eixos ortogonais. Tal redução é vantajosa em várias instâncias: para compressão de imagens, representação dos dados, redução do cálculo em processamentos subsequentes, entre outras (ABDI & WILLIAMS, 2010; ESPIRITO SANTO, 2012). Os resultados de ACP são geralmente discutidos em termos das pontuações dos componentes: fatores (*scores*) e carregamentos (*loadings*) (SHAW, 2003). A ACP já foi utilizada em análise de sucos (SANTANA, 2009; SOUZA et al, 2009; MORGANO et al, 1999), e forneceu informações importantes quanto aos compostos que são significativos para o agrupamento das amostras.

A análise dos constituintes voláteis de aroma dos sucos de uva é muito importante, pois aliada a informações físico-químicas e sensoriais, pode contribuir na

busca pela indicação geográfica (IG) de procedência (IP) e/ou denominação de origem (DO), indicações já concedidas a algumas regiões produtoras de vinhos brasileiros, que visam valorizar estes produtos e estabelecê-los junto à Organização Mundial do Comércio (OMC), agregando valor comercial e reconhecimento pelo consumidor.

O número de trabalhos relacionados à composição volátil e de aroma do suco de uva está muito aquém dos estudos com vinhos. Assim sendo, este trabalho visou desenvolver e validar um método analítico para quantificar compostos voláteis em sucos de uva integrais brasileiros e aplicá-lo a sucos comerciais e experimentais, a fim de caracterizar melhor o perfil de sucos de uva produzidos no País. A quantificação dos compostos voláteis se deu utilizando a microextração em fase sólida e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

2.2.1.1 Padrões e Reagentes

A solução-padrão dos voláteis de aroma foi constituída de: acetato de etila, (*E*)-crotonato de etila, 1,4-cineol, 3-metil-1-butanol, 1,8-cineol, (*E*)-2-hexenoato de etila, β -fencheno, 1-hexanol, (*Z*)-hexen-3-ol, (*E*)-2-hexen-1-ol, (*Z*)-óxido de linalol, (*E*)-óxido de linalol, furfural, 3-hidroxibutirato de etila, linalol, 1-octanol, vitispirano, α -ionona, terpinen-4-ol, acetofenona, benzoato de etila, α -terpineol, 2-etil-hexanol, acetato de 2-feniletila, salicilato de etila, (*E*)- β -damascenona, 2-fenil-etanol, benzenoacetonitrila, ácido octanóico e antranilato de metila, e preparada em hexano. Todos os padrões foram adquiridos da Fluka (Sigma-Aldrich, Madrid) com grau de pureza ≥ 98 %. 2-octanol (Fluka, Sigma-Aldrich, Madrid) foi utilizado como padrão interno (PI) e uma mistura de hidrocarbonetos *n*C8 a *n*C25 (Fluka, Sigma-Aldrich, Madrid) foi utilizada para a obtenção do índice de retenção linear (IRL). O cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de sódio (Na₂SO₄) foram adquiridos da Merck, e os solventes diclorometano, hexano, acetona, metanol e etanol foram comprados na Tedia Brasil, todos grau CG. As soluções-padrão de aromas, de PI e de hidrocarbonetos foi armazenada e mantida a uma temperatura de 4 °C.

2.2.1.2 Amostras

Adquiriu-se 33 sucos de uva integrais brasileiros, entre comerciais e experimentais (sucos em fase de teste, ainda não comercializados), entre tintos e brancos, conforme a Tabela 2, obtidos em supermercados da cidade de Niterói – RJ – BRASIL ou via empresas parceiras, todos da safra 2012 e em garrafas de vidro. As garrafas foram abertas no dia de extração/análise e após o uso foram acondicionadas em freezer (- 8 °C).

Tabela 2. Relação dos sucos de uva integrais com suas especificações: procedência do suco, tipo, natureza, cultivar e espécie da uva.

Código do suco	Procedência do suco ^(a)	Tipo	Natureza	Cultivar da uva	Espécie da uva
AM	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
AL	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
AU	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
CB	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
CL	PR	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
CM	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
DC*	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
DG	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
GA	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
GB	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
GD*	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
MT	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
MV	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
PE	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
PG	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
PZ	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
SB*	SP	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
SI	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
SN	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
SP*	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
US	RS	tinto	comercial	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
EP*	MG	tinto	experimental	Isabel/bordô	<i>V. labrusca</i>
SA_isaM	PE	tinto	experimental	Isabel	<i>V. labrusca</i>
SA_isaB	PE	tinto	experimental	Isabel	<i>V. labrusca</i>
SA_coraB	PE	tinto	experimental	BRS cora	<i>V. labrusca</i>
SA_coraM	PE	tinto	experimental	BRS cora	<i>V. labrusca</i>
SA_coraFM	PE	tinto	experimental	BRS cora	<i>V. labrusca</i>
CM_B	RS	branco	comercial	Italia	<i>V. vinifera</i>
GD_B*	RS	branco	comercial	Italia	<i>V. vinifera</i>
PE_B	RS	branco	comercial	Italia	<i>V. vinifera</i>
SA_chard_B	PE	branco	experimental	Chardonnay	<i>V. vinifera</i>
SA_mosc_B	PE	branco	experimental	Moscato	<i>V. vinifera</i>
SA_ita_B	PE	branco	experimental	Itália	<i>V. vinifera</i>

* Sucos de uva integrais orgânicos.

(a) Procedência dos sucos por Estados brasileiros - RS: Rio Grande do Sul, PR: Paraná, MG: Minas Gerais, PE: Pernambuco, SP: São Paulo.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Cromatografia gasosa

Para avaliar a melhor coluna cromatográfica (análise teste) foram utilizados os sucos AL e CM, safra 2010, e as colunas DBWax (fase estacionária polietilenoglicol 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.) e 0,25 µm de espessura de filme (e.f.), *Agilent Technologies*) e DB5 (fase estacionária 5%fenil-95%metilsiloxano 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme, *Agilent Technologies*). Para o trabalho em si: planejamento, validação e análise de amostras reais, foi utilizada uma coluna cromatográfica DBWax de 60 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm e.f. (*Agilent Technologies*), sendo que nas etapas de planejamento e validação foi utilizado o suco DC, safra 2012.

Utilizou-se um cromatógrafo a gás (CG6850) acoplado a um espectrômetro de massas (5975C MSD), CG-EM, da *Agilent Technologies* (Colorado, USA), com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. O gás carreador foi o hélio, com 99,999% de pureza (Air Products[®]), com fluxo inicial de 1,0 mL min⁻¹, operando sob pressão constante de 7 psi. A programação de temperatura foi de 40 °C (isoterma por 5 min), com rampa de 4 °C min⁻¹ até 220 °C, permanecendo em isoterma por 25 min, perfazendo um total de 75 min de corrida cromatográfica. O modo de injeção foi *splitless*, com *delay* para os testes de ELL e EFS de 4,5 min e sem *delay* (não identificação pela fonte) para a MEFS. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram de 200 °C e 230 °C, respectivamente. A análise qualitativa foi feita por varredura total de íons (SCAN) e os espectros de massas foram obtidos na faixa de *m/z* 50 - 400. A identificação dos compostos ocorreu por comparação dos espectros de massas com os da biblioteca Wiley 275 (6th Edition, 1984 – 1994) e pela análise do índice de retenção linear (IRL) com base em ADAMS (2007). A análise quantitativa foi realizada para 30 compostos voláteis, utilizando o modo seletivo de íons (MSI) no qual foram utilizados três íons característicos de cada substância de interesse (ICH, 1995).

2.2.2.2 Extrações e preparo de soluções

Para avaliar o melhor tipo de extração foram utilizados seis sucos de uva integrais comerciais (AL, AU, CB, CM, DC e SI), safra 2010. Para a microextração em fase sólida (MEFS) foram utilizadas fibras da SUPELCO[®], sendo uma

Divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (50/30 μm DVB/CAR/PDMS, lote 57328-U, fibra cinza) e outra Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (50/30 μm PDMS/DVB, lote 279545, fibra azul). Para a extração em fase sólida (EFS) foram utilizados cartuchos de fase tC18 ($\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}$, Sep-Pak[®] Vac 12 cc de 2 g, marca Waters, lote 006630056B) e de fase Lichrolut[®] EM (poli(estireno-divinilbenzeno), 200 mg, marca Merck, lote 119870). Para a extração líquido-líquido (ELL) foi utilizado banho de ultrassom (Branson1510 da Biocristal Produtos para Laboratório Ltda), secagem em fluxo de N_2 (Air Products[®], 99 % pureza) e utilização de uma bomba de alto vácuo (Agilent G1099-80023, serial 017.144.053).

2.2.2.2.1 Preparo da solução estoque do padrão interno 2-octanol

Em um balão volumétrico de 200 mL colocaram-se 200 mg do padrão 2-octanol (pesado em balança analítica com 3 casas decimais), completou-se o volume com CH_2Cl_2 , resultando em uma solução estoque de concentração de 1000 mg L^{-1} .

2.2.2.2.2 Procedimento para a Extração Líquido-Líquido (agitação por Ultrassom)

Colocaram-se 15 mL de suco de uva integral em um béquer de 50 mL, acrescentaram-se 2 g de NaCl, 10 mL de CH_2Cl_2 e 30 μL da solução-estoque de 2-octanol (PI, concentração 1000 mg L^{-1}). Colocou-se o béquer sob agitação por ultrassom por 15 min à temperatura de 25 °C. Após a agitação transferiu-se a amostra para um funil de separação de 50 mL, no qual foi recolhida a fase orgânica (F.O.). Utilizou-se Na_2SO_4 para a retirada de resíduo de água e após, a amostra foi reduzida sob fluxo de N_2 até o volume de 1,0 mL. As extrações foram realizadas em triplicata. Foram injetados 3 μL de cada amostra no CG-EM em varredura total de íons (SCAM). Este procedimento foi realizado para os sucos integrais comerciais AL, AU, CB, CM, DC e SI.

2.2.2.2.3 Procedimento para a Extração em Fase Sólida (EFS)

Para a EFS foram utilizados cartuchos de fases tC18 e Lichrolut EN. Cada cartucho foi condicionado com 4,0 mL de CH_2Cl_2 , em seguida 4,0 mL de metanol e por fim 4,0 mL de solução de H_2O /Etanol (1:1 v/v), adaptado de ZAPATA e

colaboradores (2010). Para a extração, colocou-se 30 μL de PI (concentração 1000 mg L^{-1}) e 15,0 mL de suco de uva integral num balão volumétrico de 50 mL, que foi acoplado ao cartucho de EFS, e este a um kitasato em um sistema de vácuo (400 mmHg), com fluxo de gotejamento de aproximadamente 1 mL min^{-1} . Após a eluição de toda a amostra pelo cartucho, o eluato foi seco por 15 min com o uso de fluxo de N_2 . Em seguida, colocaram-se 1,5 mL e 3,0 mL de CH_2Cl_2 nos cartuchos Lichrolut EN e tC18, respectivamente, para extrair os compostos retidos na extração. As extrações foram realizadas em triplicata. Foram injetados 3 μL de cada amostra no CG-EM. Este procedimento foi realizado para os sucos integrais comerciais AL, AU, CB, CM, DC e SI.

2.2.2.2.4 Procedimento para a Microextração em Fase Sólida (MEFS)

Em um *vial* de 40 mL com tampa e septo de silicone, foram adicionados 15 mL de suco de uva integral (vale salientar que nos procedimentos quantitativos utilizou-se 5 mL de suco), 2 g de NaCl, 30 μL do PI (concentração 1000 mg L^{-1}) e uma barra magnética de agitação. Colocou-se um béquer com água sobre uma placa aquecedora e agitadora, onde o sistema *vial*-amostra foi mergulhado em banho-maria cuja temperatura foi de 45 °C e sob agitação contínua de 250 rpm. Toda a amostra contida no *vial* ficou abaixo da altura da água do banho-maria. Após 5 minutos de equilíbrio, a fibra extratora foi exposta no interior do *vial* manualmente. O período de extração foi de 30,5 min, adaptado de BARROS (2011). Após este tempo de extração, a fibra foi recolhida dentro da seringa e imediatamente colocada no injetor do CG-EM. No injetor, a fibra foi exposta por 5 min para a dessorção dos compostos voláteis. As extrações foram realizadas em triplicata. Este procedimento foi realizado para os sucos integrais comerciais AL, AU, CB, CM, DC e SI.

2.2.2.2.5 Preparo das soluções estoque de cada padrão de constituinte volátil

Preparam-se soluções estoque concentrada e diluída, dos padrões de voláteis de aroma, respectivamente nas concentrações de 50 mg L^{-1} e de 5,0 mg L^{-1} . Para a solução concentrada, pesou-se, em um balão volumétrico de 1,0 mL; 0,05 mg do padrão de interesse e completou-se o volume com hexano; para a solução diluída, retirou-se 100 μL da solução concentrada e colocou-se em balão volumétrico de 1,0 mL, completando o volume com hexano. O mesmo procedimento foi realizado para todos os 30 padrões de voláteis de aroma trabalhados nesta tese.

2.2.2.2.6. Procedimento para obtenção das curvas de calibração

Para obter as curvas de calibração utilizou-se o suco DC - por tratar-se de um suco com muitos compostos voláteis – que foi fortificado com as substâncias de interesse, em 10 concentrações diferentes, a saber: 5; 10; 50; 100; 200; 300; 400; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; 1,00 e 1,34 mg L^{-1} .

Para obter os dois primeiros pontos da curva utilizou-se a solução estoque diluída (concentração de 5 mg L^{-1}). Num *vial* de 40 mL, colocou-se 5 μL da solução estoque diluída de cada um dos 30 padrões de voláteis de aroma e 4,85 mL do suco de uva DC, resultando em concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada padrão de aroma na solução resultante. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 10 μL da solução estoque diluída e 4,70 mL de suco, resultando em concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada padrão na solução final.

Para os demais pontos, utilizou-se a solução estoque (50 mg L^{-1}). Num *vial* de 40 mL colocou-se 5 μL de cada solução estoque de cada um dos 30 padrões de aroma e 4,85 mL do suco de uva, resultando em concentrações de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada padrão de voláteis de aroma na solução. Para obter as concentrações 100; 200; 300; 400; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; 1,00 e 1,34 mg L^{-1} utilizou-se respectivamente, 10, 20, 30, 40, 50, 100 e 135 μL de cada solução estoque de padrão de voláteis de aroma (de concentração 50 mg L^{-1}) e, nesta ordem, os seguintes volumes do suco de uva DC: 4,70; 4,40; 4,10; 3,80; 3,50; 2,00; 1,00 mL. Após o preparo de cada solução de suco de uva DC fortificada com os padrões das substâncias de interesse, realizou-se a MEFS descrita em **2.2.2.2.4**.

Para a análise da precisão *intraday* foram realizadas extrações dos compostos de voláteis de aroma e injeções no CG-EM, no mesmo dia, em 3 concentrações diferentes, a saber: 50; 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,00 mg L^{-1} em triplicata cada. Para a precisão *interday* foram realizadas extrações dos compostos voláteis de aroma e injeções no CG-EM das mesmas 3 concentrações da *intraday*, porém em três dias diferentes. A precisão foi calculada usando a média e o desvio padrão relativo, através da repetitividade, já a exatidão foi calculada através da recuperação, realizada com a equação da reta obtida na curva de calibração de cada substância de interesse.

O método validado foi aplicado em 33 sucos de uva integrais, ao qual se seguiu o procedimento descrito em **2.2.2.2.4**, excluindo-se a utilização dos padrões de aroma no processo.

2.2.2.3 Planejamento experimental utilizando composto central

As condições da MEFS foram otimizadas usando um planejamento composto central, baseado em um planejamento fatorial 2^4 com mais oito pontos axiais e triplicata do ponto central. As variáveis estudadas foram adição de sal (NaCl, g), tempo de incubação (t_{inc} , min), tempo de extração (t_{ex} , min) e temperatura de extração (T_{ex} , °C), conforme Tabela 3 o planejamento gerou 27 experimentos distribuídos aleatoriamente.

Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental.

Variável independente	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
NaCl (g)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
tempo de incubação (t_{inc} , min)	0	5	10	15	20
tempo de extração (t_{ex} , min)	0,5	10,5	20,5	30,5	40,5
temperatura de extração (T_{ex} , °C)	35	40	45	50	55

Antes de iniciar os 27 experimentos do planejamento experimental, foi realizado um teste utilizando 5 e 15 mL de suco de uva DC para definição do volume a ser usado na MEFS. Na teoria da MEFS este parâmetro não é significativo para a extração, porém era preciso confirmação para execução do planejamento (PAWLISZYN, 1997). Para os procedimentos de MEFS no planejamento experimental seguiu-se o procedimento descrito em 2.2.2.2.4., porém usando o volume de 5 mL de suco de uva.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Comparação entre colunas cromatográficas quanto à natureza dos constituintes voláteis nos sucos de uva

Para a verificação da coluna cromatográfica utilizou-se, a nível teste, uma coluna DBWax e uma DB5. As amostras utilizadas em ambas as colunas foram aquelas extraídas da ELL dos sucos de uva AL e CB, e estas foram injetadas em CG-EM.

Na Figura 6A pode-se observar que para os sucos AL e CB a coluna DBWax foi a que levou à identificação do maior número de compostos – média de 70, em relação a DB5, aproximadamente 50. Na figura 6B observa-se informação quanto ao número de compostos e seus grupos químicos, onde se percebe que, nas duas colunas, os terpenos foram os compostos majoritários e em quantidades bem próximas (cerca de 20 compostos, na DBWax e 18, na DB5). Foram identificados em torno de 14 ésteres nos sucos analisados, através da coluna DBWax, e tal informação é importante uma vez que este grupo confere aroma frutal à bebida. Outros grupos, tais como aldeídos e ácidos carboxílicos foram mais pronunciados na coluna polar, sendo que na coluna apolar observou-se um maior número de cetonas do que na primeira, e furanos e álcoois foram extraídos igualmente pelas colunas.

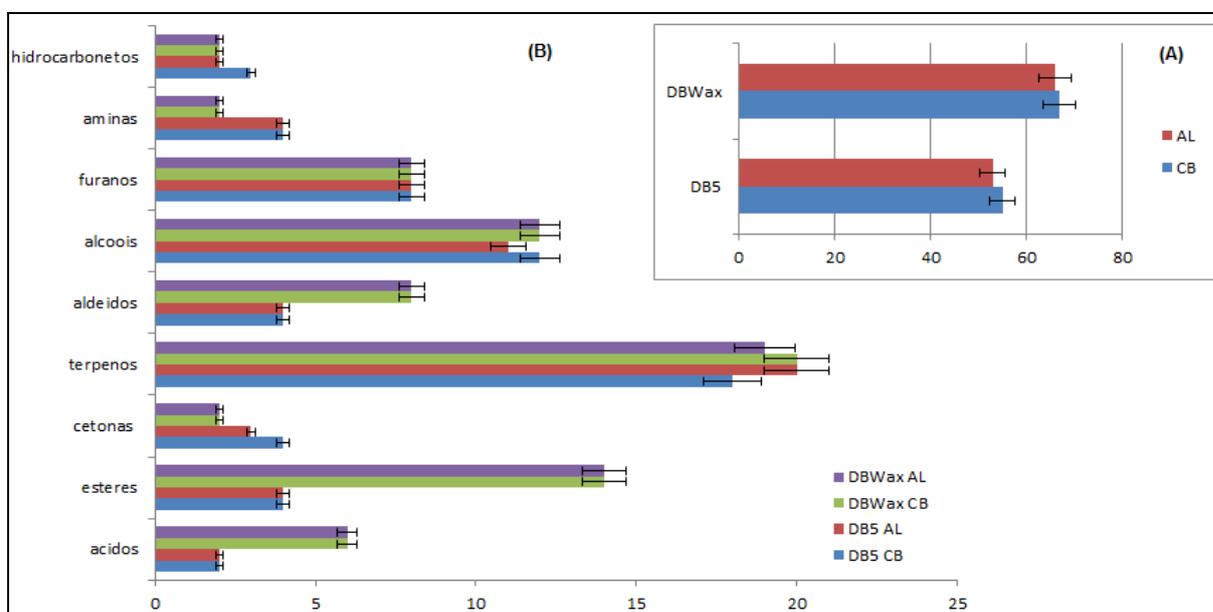


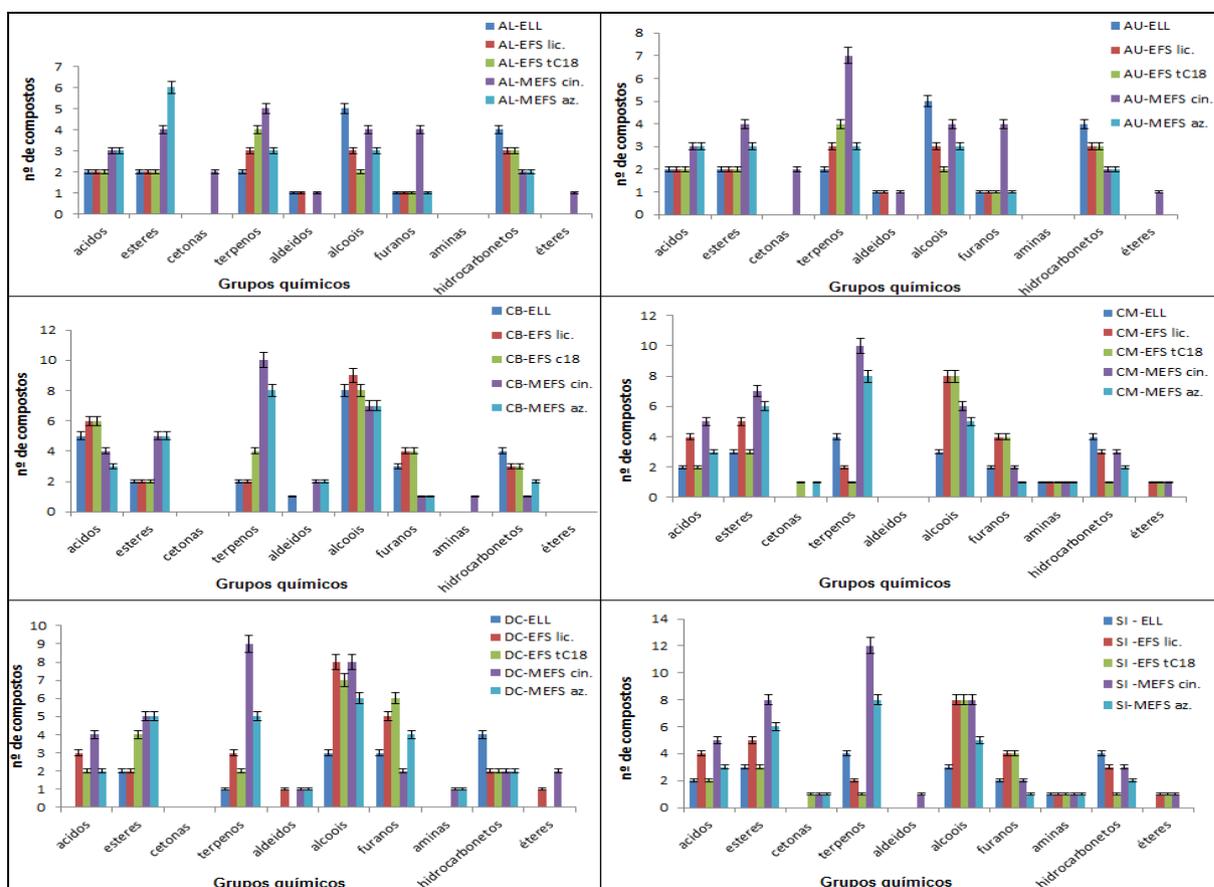
Figura 6. Compostos voláteis presentes nos sucos de uva integrais AL e CB (em torno de 80 % dos picos totais): (A): Número de compostos voláteis detectados e identificados usando as colunas DBWax e DB5 para os sucos de uvas AL e CB, (B): Número de compostos separados por grupos químicos para os sucos de uvas AL e CB. Em (A) e (B) está mostrado a barra de erro de 5 % (para mais ou para menos, de acordo com a área da barra correspondente).

Estes dados estão de acordo com BAEK & CADWALLADER (1999) que utilizaram a coluna DBWax e CG-EM e identificaram 72 compostos voláteis em sucos de uva da cv. Muscadine (*V. rotundifolia* Michx), cujas contribuições majoritárias foram 16 ésteres, 29 álcoois e 10 terpenos. O mesmo grupo de pesquisa, em 1997, comparou compostos de aroma da uva supracitada, utilizando colunas de CG de fases estacionárias DBWax e DB5, e identificaram cerca de 35

compostos usando a coluna polar e 24 a apolar (BAEK et al, 1997). Com base nos resultados obtidos e observados na literatura, a coluna DBWax foi a escolhida para a análise dos voláteis nos sucos. Estes dados foram publicados no livro Flavour Science (ALVES et al, 2014).

2.3.2 Comparação entre técnicas de extração quanto à natureza dos constituintes voláteis nos sucos de uva

Com a definição da melhor coluna cromatográfica, realizaram-se testes com as técnicas de extração ELL, EFS com cartuchos tC18 e Lichrolut, MEFS com fibras cinza (DVB/CAR/PDMS) e azul (PDMS/DVB). As técnicas de extração para os compostos voláteis de sucos de uva foram comparadas quanto ao número de compostos voláteis extraídos. Na Figura 7 encontram-se os gráficos correlacionando o tipo de extração e os grupos químicos identificados.



Legenda: AL-ELL (extração líquido-líquido para o suco AL), AL-EFS lic. (extração em fase sólida com cartucho Lichrolut EN para o suco AL), AL-EFS tC18 (extração em fase sólida com cartucho tC18 para o suco AL), AL-MEFS cin. (microextração em fase sólida com fibra cinza – DVB/CAR/PDMS para o suco AL), AL-MEFS az. (microextração em fase sólida com fibra azul – PDMS/DVB para o suco AL). De forma análoga, para os sucos AU, CB, CM, DC e SI.

Figura 7. Classe de constituintes voláteis extraídos dos sucos de uva (AL, AU, CB, CM, DC e SI) utilizando a ELL, EFS (cartuchos Lichrolut e tC18) e MEFS (fibras

cinza – DVB/CAR/PDMS, e azul – PDMS/DVB). Nos gráficos está mostrada a barra de erro de 5 % (para mais ou para menos, de acordo com a área da barra correspondente).

Antranilato de metila, decanoato de etila e 3-hidroxi-butirato de etila, que apresentam aroma de uva (WANG & DE LUCA, 2005; FLAVORNET, 2014; YANG et al, 2009) foram identificados, sendo que o primeiro composto foi identificado em todos os sucos extraídos com MEFS fibra cinza. O segundo composto foi observado apenas no suco CM extraído com a MEFS fibra cinza, e o terceiro composto foi identificado nos sucos AL, AU e SI extraídos com ambos os cartuchos de EFS e nos sucos CB e CM extraídos com a ELL. Já os compostos sorbato de etila (*trans,trans*-2,4-haxadienoato de etila) (OLIVEIRA et al, 2003) e 5-hidroxi-metil-furfural (LRI & ODOUR DATABASE, 2014) com aromas adocicados e de vinho, respectivamente, foram identificados, sendo o primeiro nos sucos AU e SI extraídos por MEFS em ambas as fibras, e o segundo em todos os sucos extraídos utilizando a ELL e nos sucos CB, CM e DC extraídos pelos dois tipos de cartuchos de EFS.

Identificaram-se compostos *off-flavour* (aroma desagradável para a matriz de suco), como tolueno (aroma de tinta) (FLAVORNET, 2014); o etilbenzeno (aroma de gasolina) (CETESB, 2014); o *p*-xileno (aroma de plástico) (FLAVORNET, 2014); e os ácidos hexanóico (aroma de suor) (FLAVORNET, 2014); decanóico (aroma de ranço) (FLAVORNET, 2014) e dodecanóico (aroma de metal) (FLAVORNET, 2014) e nonil-fenol (cheiro de solvente) (CETESB, 2014), sendo mais observados na ELL e EFS do que na MEFS, isso se deve ao fato dessas técnicas serem mais exaustivas, favorecendo a extração. No suco AU, foi observado o *off flavour* ácido dodecanóico em todas as extrações, menos pronunciado na MEFS fibra cinza, uma vez que a ELL e a EFS são técnicas exaustivas. Ainda neste suco é importante mencionar a presença do ácido *trans-trans*-2,4-hexadienóico, também conhecido como ácido sórbico, identificado em abundância em todas as extrações. O ácido sórbico é utilizado na indústria alimentícia como conservante de bebidas, devido a sua estabilidade a temperatura elevada e ao bom desempenho abaixo de pH 6. O nível máximo permitido desse ácido em bebidas é de 30 mg/ 100 mL de produto (LIMA & AFONSO, 2009); valores acima do estabelecido tornam o produto fortemente ácido e inviável ao consumo e comercialização. Nos outros sucos CB e SI, o ácido sórbico também foi identificado, mas em sinal cromatográfico bem menor que do suco AU.

SÁNCHEZ-PALOMO e colaboradores (2005) analisaram compostos em uvas Muscat (*V. vinifera*) usando três fibras de MEFS (DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS), dentre as quais duas foram utilizadas neste trabalho. Os autores observaram que elas extraíram aproximadamente o mesmo número de compostos voláteis com aromas típicos das uvas, como os ésteres, terpenos, aldeídos e cetonas. Em vinho branco (espécie *V. vinifera* L., cv. Chenin Blanc, Sauvignon Blanc e Verdejo), onde se testou cinco fibras extratoras (inclusive a DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB), foi observado que a fibra CAR/DVB/PDMS obteve maior eficiência em relação às demais fibras utilizadas, com maior número de compostos identificados e maior área para substâncias como álcoois, ésteres e terpenos (BARROS et al, 2012).

O desempenho das extrações foi avaliado pelo número de compostos identificados e pelas classes químicas que mais contribuíam para o aroma dos sucos (ésteres, terpenos, entre outros), logo a técnica de MEFS foi a extração escolhida, sendo que a fibra trifásica DVB/CAR/PDMS (cinza) foi a que extraiu maior número de compostos voláteis de classes variadas em todos os sucos de uva analisados, sendo a técnica de extração escolhida para a análise dos compostos de aroma dos sucos de uva.

2.3.3 Planejamento experimental

Após a seleção da fibra cinza DVB/CAR/PDMS foi empregado o planejamento composto central considerando como variáveis independentes: a temperatura, o tempo de extração, o tempo de incubação e a força iônica (massa de NaCl) e como variável dependente o fator de resposta (área total). Este fator baseia-se nos parâmetros de otimização de MEFS que é a soma da área dos picos de todos os constituintes voláteis identificados na amostra (CARASEK & PAWLISZYN, 2006). Na teoria da MEFS, todas estas variáveis podem melhorar a eficiência da extração e atuam no equilíbrio *headspace*-amostra (PAWLISZYN, 1997).

As quatro variáveis foram otimizadas através de uma metodologia que proporcionasse uma avaliação da significância e a interação entre as mesmas. Este tipo de planejamento é, em geral, utilizado para ajustar modelos quadráticos e promover melhor eficiência entre os parâmetros otimizados.

A temperatura de extração influencia na solubilidade dos analitos e, conseqüentemente, no coeficiente de distribuição entre a amostra (C_A) e o *headspace* (C_H) e entre o *headspace* e a fibra (C_F). Logo, a quantidade de analito extraído depende do tempo de exposição da fibra no *headspace* (tempo de extração). O aquecimento favorece o *headspace*, pois faz com que as substâncias voláteis passem da amostra para a fase gasosa, e assim sejam adsorvidas pela fibra, conseguindo o máximo de sensibilidade. No entanto, temperaturas elevadas podem levar a formação de produtos de degradação. Tempo de extração elevado pode levar ao aquecimento da fibra e deslocar o equilíbrio para o *headspace*, resultando na dessorção dos analitos e diminuindo a afinidade com o mesmo (LANÇAS, 2004; ULLRICH, 2000). Logo encontrar o tempo de extração ótimo (de equilíbrio), é de suma importância para realização de uma MEFS eficiente.

A adição de NaCl modifica a solubilidade dos analitos, aumentando a força de dissociação e tornando o equilíbrio entre as fases mais rápido. O efeito *salting out* é usado para aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade dos métodos (YANG & PEPPARD, 1994). O sal auxilia no equilíbrio para o amostra-*headspace*, pois aumenta a dessolvatação, deixando os compostos voláteis mais livres para passar para a fase de gás na MEFS, pois os íons do sal são mais ionizáveis em água (PIZARRO et al, 2010). O tempo de incubação é o tempo para saturar a fase gasosa do *headspace* com os analitos que estavam na amostra, prontos para serem adsorvidos pela fibra de MEFS.

Antes de iniciar o planejamento experimental realizaram-se duas injeções utilizando os parâmetros de NaCl, t_{ex} (tempo de extração), t_{inc} (tempo de incubação) e T_{ex} (temperatura de extração), de 2 g, 30,5 e 5,0 minutos e 45 °C, respectivamente, com volumes de amostras de 5,0 e 15,0 mL, adaptado de BARROS (2011). Este teste foi feito para verificar se o somatório das áreas absolutas teria mudança importante com a variação do volume de amostra. Como já era esperado pela teoria da MEFS (CARASEK & PAWLISZYN, 2006), o volume não foi um parâmetro significativo, logo adotou-se para o planejamento experimental o volume de 5,0 mL, pois este está diretamente relacionado com o volume/massa mínimo dos analitos no *headspace* para que haja equilíbrio, e assim seja adsorvido pela fibra. Além de que, volumes menores são mais fáceis de manusear e resultam em menos material de descarte.

O planejamento experimental foi realizado a fim de otimizar os parâmetros de extração da MEFS com o objetivo de encontrar a condição de maior eficiência na extração dos constituintes voláteis dos sucos de uva. Baseado em BARROS (2011), que trabalhou com vinhos, foram adotados os parâmetros dos níveis +1 e -1. Os domínios experimentais estudados, mostrados na Tabela 3 geraram 27 experimentos de forma randômica, como mostrado na Tabela 4.

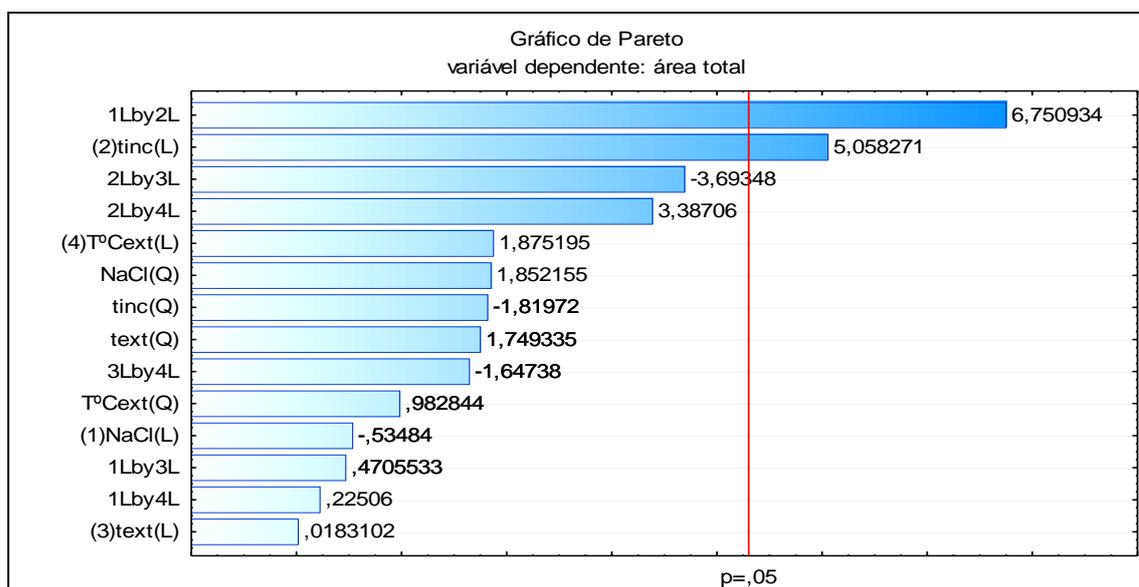
Tabela 4. Condições experimentais e valores de resposta do planejamento composto central (PCC) usado para otimizar as condições da MEFS fibra DVB/CAR/PDMS no suco de uva DC.

Planejamento (nº exp.)	NaCl (g)	t _{inc.} (min)	t _{ex.} (min)	T _{ex} (°C)	Valor de resposta (Área total) ^A
Teste – 5 mL	2,0	5,0	30,5	45,0	182190894
Teste – 15 mL	2,0	5,0	30,5	45,0	183318575
01	0,5	5,0	10,5	40,0	135570389
02	0,5	5,0	10,5	50,0	132386914
03	0,5	15,0	10,5	40,0	178606521
04	0,5	15,0	10,5	50,0	172463034
05	0,5	5,0	30,5	40,0	119778861
06	0,5	5,0	30,5	50,0	116141983
07	0,5	15,0	30,5	40,0	182837972
08	0,5	15,0	30,5	50,0	183228550
09	1,5	5,0	10,5	40,0	162173414
10	1,5	5,0	10,5	50,0	142939277
11	1,5	15,0	10,5	40,0	160719166
12	1,5	15,0	10,5	50,0	100184662
13	1,5	5,0	30,5	40,0	184990910
14	1,5	5,0	30,5	50,0	118367017
15	1,5	15,0	30,5	40,0	161617695
16	1,5	15,0	30,5	50,0	158316028
17	0,0	10,0	20,5	45,0	9580575
18	2,0	10,0	20,5	45,0	176005845
19	1,0	10,0	0,5	45,0	4015338
20	1,0	10,0	40,5	45,0	132681041
21	1,0	0,0	20,5	45,0	118469652
22	1,0	20,0	20,5	45,0	120398505
23	1,0	10,0	20,5	35,0	112937461
24	1,0	10,0	20,5	55,0	103988243
25	1,0	10,0	20,5	45,0	144041638
26	1,0	10,0	20,5	45,0	124121372
27	1,0	10,0	20,5	45,0	111236369

A: área total é expressa em unidades arbitrárias; t_{ex} – tempo de extração;
t_{inc.} – tempo de incubação; T_{ex} – temperatura de extração.

Como se pode observar na Tabela 4, as condições experimentais do planejamento nos experimentos 17 e 19 apresentaram os menores valores de resposta, devido à baixa concentração dos compostos voláteis no *headspace* (HS), salientando que o efeito do sal (corrida 17) e o tempo de extração (corrida 19), interferem na extração dos analitos.

Com a análise de variância (ANOVA) e utilizando o *software Statistica Trial*, foi possível verificar a significância estatística ($p < 0,05$) das variáveis envolvidas e observar as interações no desempenho da otimização da HS-MEFS. O Gráfico de Pareto, Figura 8, mostra os efeitos e suas interações, sendo que aqueles que estiverem à direita da linha vermelha (valor de $p = 0,05$) indicam que tais efeitos ou interações foram relevantes e significativos para a otimização do método.



Legenda: **Efeitos:** (L) termo linear; (Q) termo quadrático; (1) refere-se a NaCl; (2) refere-se a t_{inc} (tempo de incubação); (3) refere-se a t_{ext} (tempo de extração) e (4) refere-se a $T^{\circ}C_{ext}$ (temperatura extração em $^{\circ}C$). **Interações:** 1Lby2L (NaCl x t_{inc}), 1Lby3L (NaCl x t_{ext}), 2Lby4L (t_{inc} x $T^{\circ}C_{ext}$), 2Lby3L (t_{inc} x t_{ext}), 3Lby4L (t_{ext} x $T^{\circ}C_{ext}$) e 1Lby4L (NaCl x $T^{\circ}C_{ext}$).

Figura 8. Gráfico de Pareto para a variável de resposta (área total).

A interação entre o efeito do sal (NaCl) e o tempo de incubação (t_{inc}) foram os parâmetros mais significativos ($p < 0,05$). Os resultados mostram que o efeito *salting out* durante o tempo de incubação provavelmente aumentou a sensibilidade do método analítico. O tempo de incubação é o tempo para que haja equilíbrio entre a concentração do analito na amostra e no HS, para que, quando a fibra seja exposta, haja o equilíbrio HS- fibra extratora (TAT et al, 2005). Com base nisso adotou-se a maior quantidade de sal, 2 g, e relacionando a t_{inc} no planejamento experimental, observamos que no tempo de 5 min, experimento 13, houve maior valor de resposta.

Quando as variáveis não são significativas, usa-se a comparação da variável em dois experimentos, e assim verifica-se a condição mais vantajosa para a MEFS. Isso se dá pela comparação do fator de resposta de ambos e aquele que tiver maior valor de somatório das áreas é adotado. Com base nisso, as outras variáveis não-

significativas ($p > 0,05$) foram o tempo de extração e a temperatura. Logo, dentro do domínio estudado, adotou-se o tempo de extração de 30,5 minutos, uma vez que se comparando os experimentos 13 e 20, observou-se que houve menor área total em 40,5 minutos, podendo ter ocorrido a saturação da fibra. A temperatura de 45 °C foi escolhida, pois analisando os experimentos 24 ($T_{\text{ext}} = 55$ °C) e 25 ($T_{\text{ext}} = 45$ °C) observamos que temperaturas mais altas apresentam menor área, tal fato pode ser devido à degradação de alguns compostos voláteis, o que vai de acordo com CARASEK & PAWLISZYN (2006). Estes autores relatam que a MEFS é um processo exotérmico e a extração dos compostos tende a diminuir a altas temperaturas. Além disso, estes valores adotados tem sido referenciados na literatura em variadas matrizes alimentares, como em sucos cítricos (ALVAREZ et al, 2011) e vinhos (BARROS et al 2012).

O erro experimental foi calculado usando os valores de área total da triplicata do ponto central, apresentando coeficiente de variação de 9,2 %, mostrando boa precisão, uma vez que para MEFS é aceito coeficiente de variação abaixo de 15,0 % (ICH, 1995).

Na Figura 9 encontra-se um gráfico que mostra a correlação satisfatória entre os valores observados e previstos pelo modelo, pois os valores encontram-se próximos a linha do gráfico, que é o ideal, mostrando que os valores foram provenientes de uma população bem distribuída.

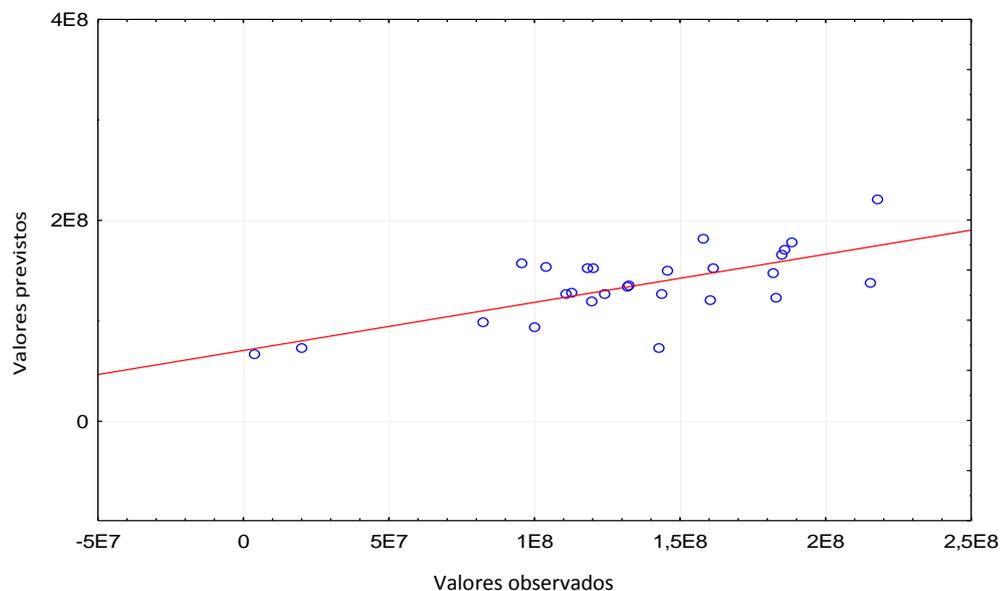


Figura 9. Gráfico de correlação entre os valores observados experimentalmente e os valores previstos pelo modelo.

O modelo apresentou o termo falta de ajuste com o valor $\rho = 0,076$ e os resíduos apresentaram distribuição normal e não se mostraram significativos, segundo os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk (averiguam se uma amostra pode ser considerada como proveniente de uma população com uma determinada distribuição, e sem restrições sobre esta, respectivamente) (GUIMARÃES & SARFIELD CABRAL, 2007) indicando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

2.3.4 Validação do método para trinta constituintes voláteis nos sucos de uva

De posse dos parâmetros de análise estabelecidos, 33 amostras de sucos de uvas integrais foram injetadas no CG-EM em modo de varredura total de íons (SCAN) para a verificação do perfil volátil qualitativo, cuja relação de compostos encontra-se no Apêndice A (seção de Apêndices desta tese). Os compostos detectados foram em sua maioria: ésteres (acetato de etila, acetato de 2-feniletila, octanoato de etila, salicilato de metila, antranilato de metila, entre outros), seguidos de álcoois (1-pentanol, 1-hexanol, *cis*- e *trans*-hexen-1-ol, 1-octanol, entre outros), terpenos (limoneno, α -pineno, α -terpinoleno, α -terpineol, canfeno, entre outros), ácidos (octanóico, sórbico, decanóico, hexanóico, entre outros), nor-isoprenóides (α -ionona, β -damascenona, vitispirano, entre outros), aldeídos (heptanal, benzaldeído, 2-hexenal, hexanal, entre outros), com tióis e cetonas como minoritários.

Observa-se que os 30 primeiros compostos foram aqueles com maior incidência em todas as amostras analisadas e são substâncias que apresentam aromas descritos que valorizam o *bouquet* aromático do suco, tais como frutal, floral e adocicado (ETIÉVANT, 1991; PERFUMER & FLAVORIST, 2014; ROSS et al, 2010), sendo por isso escolhidos para serem validados neste trabalho.

Na Figura 10 encontra-se o perfil cromatográfico obtido por MEFS-CG-EM-MSI do suco DC fortificado com os 30 compostos voláteis escolhidos para monitoramento e quantificação. Na Tabela 5 estão os compostos relativos a cada pico da Figura 10 com seus respectivos tempos de retenção (t_R), CAS number, estrutura química, aroma, índice de retenção linear da literatura ($IRL_{lit.}$) e experimental ($IRL_{exp.}$) – coluna DBWax, e referência.

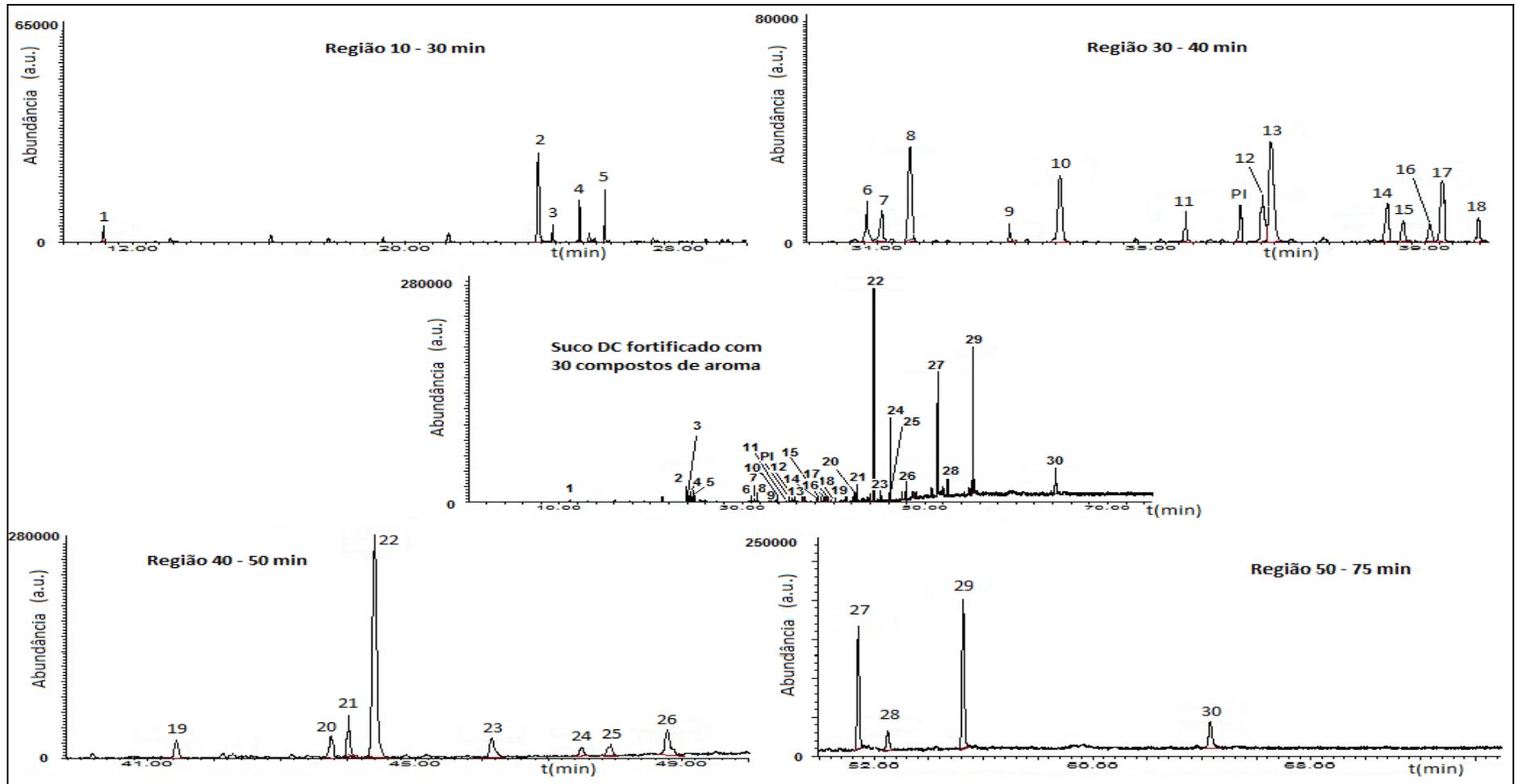
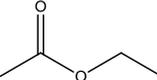
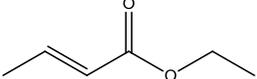
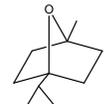
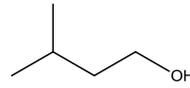
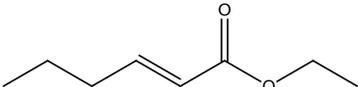
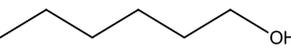
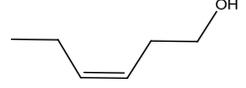
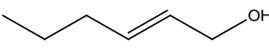
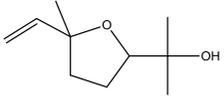
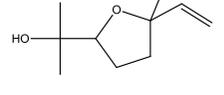
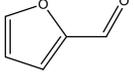
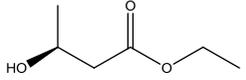
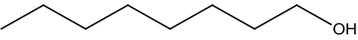
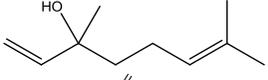
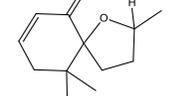
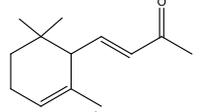
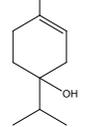
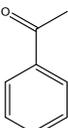


Figura 10. CG-EM-MSI total (ao centro) e com as regiões expandidas (nas extremidades): suco de uva DC fortificado com os padrões de aroma: (1). acetato de etila, (2). (*E*)-crotonato de etila, (3). 1,4-cineol, (4). 3-metil-1-butanol, (5). 1,8-cineol, (6). (*E*)-2-hexenoato de etila, (7). β -fenchono, (8). 1-hexanol, (9). (*Z*)-hexen-3-ol, (10). (*E*)-2-hexen-1-ol, (11). (*Z*)-linalol óxido, (12). (*E*)-linalol óxido, (13).furfural, (14). 3-hidroxibutirato de etila, (15). linalol, (16). 1-octanol, (17). vitispirano, (18). α -ionona, (19). terpinen-4-ol, (20). acetofenona, (21). benzoato de etila, (22). α -terpineol, (23). 2-etil-hexanol, (24). acetato de 2-feniletila, (25). salicilato de etila, (26). (*E*)- β -damascenona, (27). 2-fenil-etanol, (28). benzenoacetonitrila, (29). ácido octanóico, (30). antranilato de metila e (PI). padrão interno 2-octanol.

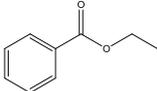
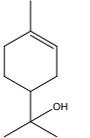
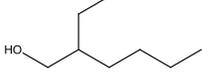
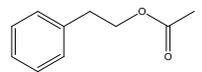
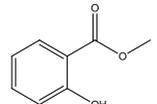
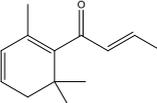
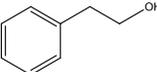
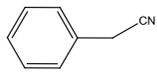
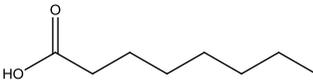
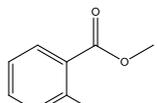
Tabela 5. Compostos da Figura 10 com seus respectivos tempos de retenção (t_R), CAS number, estrutura química, aroma, IRL literatur (IRL_{lit.}) e experimental (IRL_{exp.}) para coluna DBWax e referências.

Picos	t_R	Substancia	CAS	Estrutura	Aroma ¹	IRL _{lit.} ²	IRL _{exp.} ³	Identificação ⁴ /referencias
1	11,25	acetato de etila	141-78-6		Abacaxi	911	907	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, RIBÉREAU- GAYON et al, 2006
2	24,03	(E)- crotonato de etila	623-70-1		Frutal	1203	1207	EM, co-injeção de padrão/ RIBÉREAU-GAYON et al, 2006, FLAVORNET, 2014
3	24,54	1,4-cineol	470-67-7		doce, floral	1182	1186	EM, co-injeção de padrão/ VILANOVA et al, 2012, FLAVORNET, 2014
4	25,46	3-metil-1-butanol	123-51-3		banana, pera	1266	1268	EM, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, FANG & QIAN, 2006
5	26,62	1,8-cineol	470-82-6		Hortelã, doce	1215	1213	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, RIBÉREAU- GAYON et al, 2006
6	30,92	(E)-2-hexenoato de etila	27829-72-7		Frutal, doce	1308	1306	EM, IRL, co-injeção de padrão/ YANG et al, 2009, FLAVORNET, 2014
7	31,09	β -fencheno	33404-67-0		Frutal	1187	1190	EM, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014,
8	31,50	1-hexanol	111-27-3		Floral, verde	1360	1353	EM, IRL, co-injeção de padrão/ NOGUERAL-PATO et al, 2012; FLAVORNET, 2014
9	32,96	(Z)-3-hexen-1-ol	928-96-1		Erva, verde	1391	1384	EM, IRL, co-injeção de padrão/ YANG et al, 2009, FLAVORNET, 2014
10	33,69	(E)-2-hexen-1-ol	928-95-0		Folha verde	1377	1370	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, FLAVORNET, 2014

Continuação Tabela 5.

11	35,50	(Z)-óxido de linalol	5989-33-3		Floral	1423	1420	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LIU & CADWALLADER, 2010 FLAVORNET, 2014
12	36,58	(E)-óxido de linalol	34995-77-2		Floral	1443	1449	EM, IRL, co-injeção de padrão/ CAVELL-QUANTRILL, 2006
13	36,76	furfural	98-01-1		Caramelo	1445	1447	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, NOGUERAL-PATO et al, 2012
14	38,44	3-hidroxibutirato de etila	56816-01-4		Frutal, uva	1467	1465	EM, IRL, co-injeção de padrão/ YANG et al, 2009
15	38,68	1-octanol	111-87-5		Floral, lavanda	1539	1545	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, NOGUERAL-PATO et al, 2012
16	39,08	linalol	78-70-6		Floral, verde	1384	1388	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, RIBÉREAU- GAYON et al, 2006
17	39,24	vitispirano	65416-59-3		Eucalipto	1505	1501	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, CAVELL- QUANTRILL et al, 2006
18	39,94	α - Ionona	127-41-3		Violeta, madeira	1802	1797	EM, IRL, co-injeção de padrão/ LIU & CADWALLADER, 2010, FLAVORNET, 2014
19	41,45	terpinen-4-ol	562-74-3		Nóz, pinha	1591	1590	EM, IRL, co-injeção de padrão/ RIBÉREAU-GAYON et al, 2006, FLAVORNET, 2014
20	43,75	acetofenona	98-86-2		Amêndoa, acido	1645	1648	EM, IRL, co-injeção de padrão/ CAVELL-QUANTRILL et al, 2006, FLAVORNET, 2014

Continuação Tabela 5.

21		93-89-0						EM, IRL, co-injeção de padrão/ NOGUERAL-PATO et al, 2012, FLAVORNET, 2014
	43,99	benzoato de etila		98-55-5	Floral, frutal	1648	1649	
22								EM, IRL, co-injeção de padrão/ NOGUERAL-PATO et al, 2012, FLAVORNET, 2014
	44,41	α -terpineol		104-76-7	Anis, hortelã	1688	1687	
23								EM, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, YANG et al, 2009
	46,67	2-etil-hexanol		103-45-7	Rosa, verde	1484	1487	
24								EM, IRL, co-injeção de padrão/ NOGUERAL-PATO et al, 2012, FLAVORNET, 2014
	47,50	acetato de 2-feniletila		119-36-8	Frutal, doce	1600	1604	
25								EM, IRL, co-injeção de padrão/ LIU & CADWALLADER, 2010, FLAVORNET, 2014
	47,92	salicilato de metila		23726-93-4	especiarias	1745	1746	
26								EM, IRL, co-injeção de padrão/ LRI & Odour, 2014, LIU & CADWALLADER, 2010
	48,79	(<i>E</i>)- β -damascenona		60-12-8	Rosa, mel	1813	1817	
27								EM, IRL, co-injeção de padrão/ FANG & QIAN, 2006, FLAVORNET, 2014
	51,43	2-fenil-etanol		140-29-4	Rosa, tempero	1859	1863	
28								EM, co-injeção de padrão/ GÜRBUZ et al., 2006
	52,53	benzenoacetonitrila		124-07-2	Laranja	1882	1887	
29								EM, IRL, co-injeção de padrão/ ETIÉVANT, 1991, GÜRBUZ et al., 2006
	55,26	ácido octanóico			Acido, queijo	2083	2088	
30								EM, IRL, co-injeção de padrão/ WANG & DE LUCA, 2005
	65,29	antranilato de metila		134-09-8	Uva, mel	2260	2253	

(1) Aromas obtidos nos links www.odour.org.uk e www.flavornet.org, (2) valores de IRL obtidos na literatura e comparação com espectros de massas de Adams (2007) e/ou Davies (1990), (3) valores obtidos através do uso de uma mistura de hidrocarbonetos nas mesmas condições de análise e calculado pela fórmula de índice de retenção linear (IRL), (4) Identificação por comparação de espectros de massa (EM) e/ou índice de retenção linear (IRL).

As curvas de calibração dos constituintes voláteis do suco de uva foram obtidas a partir de amostras do suco de uva DC fortificado. Dez pontos em triplicata, nas concentrações 5; 10; 50; 100; 200; 300; 400; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; 1,0 e 1,34 mg L^{-1} , foram escolhidos para cada padrão de volátil de aroma. As condições de MEFS otimizada em 2.3.3., utilizando 2 g de sal NaCl, 5 minutos de incubação e 30,5 minutos de extração a temperatura de 45 °C foram aplicadas e a fibra foi exposta no injetor do CG-EM para dessorção dos analitos num período de 5 minutos, utilizando o MSI. Em todas as análises a concentração de PI foi de 2 mg L^{-1} .

Na Tabela 6 encontram-se os íons característicos e os parâmetros de validação dos compostos de aroma validados.

Para a validação dos compostos de aroma em alimentos, que são matrizes complexas, o coeficiente de determinação (R^2) deve ser superior a 0,990 (MILLER & MILLER, 1988; BOX et al, 1987), relacionando as concentrações com os valores de R^2 deste trabalho podemos considerar que foram satisfatórios, variando de 0,990 a 0,999.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica, que foram expressos respectivamente em $\text{LD} = 3,3 (s/S)$ e $\text{LQ} = 10,0 (s/S)$, onde s e S são as estimativas do desvio padrão de resposta do coeficiente linear e do coeficiente angular da equação da curva de calibração do padrão de aroma (MILLER & MILLER, 1988; BOX et al, 1987) e foram expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 6. Compostos de aroma com seus íons característicos e parâmetros de validação dos compostos de aroma por CG-EM-MSI: equação da curva de calibração, coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão *intraday* ($DPR_{intra}\%$) e *interday* ($DPR_{inter}\%$), e exatidão por recuperação (R %).

Picos	Compostos de aroma	íons característicos (<i>m/z</i>)	CG-EM-MSI						
			Equação ^(a)	$R^{2(b)}$	LD ^(c)	LQ ^(c)	$DPR_{intra}\%$ ^(d)	$DPR_{inter}\%$ ^(d)	R (%) ^(e)
1	acetato de etila	43, 59, 74	$y = 0,102x - 0,115$	0,993	0,23	0,57	0,1	0,2	91
2	(<i>E</i>)- crotonato de etila	69, 99, 114	$y = 0,072x - 0,021$	0,994	0,06	0,15	0,5	0,9	83
3	1,4-cineol	111, 125, 154	$y = 0,088x - 0,163$	0,990	0,37	0,92	0,4	0,8	83
4	3-metil-1-butanol	42, 55, 88	$y = 0,008x - 0,017$	0,990	0,39	0,98	0,7	0,9	81
5	1,8 cineol	43, 108, 154	$y = 0,128x - 0,342$	0,990	0,53	1,33	0,1	0,1	76
6	(<i>E</i>)-2-hexenoato de etila	55, 97, 99	$y = 0,036x - 0,160$	0,991	0,75	1,51	1,8	1,5	84
7	β -fencheno	93, 121, 136	$y = 0,142x + 0,031$	0,999	0,04	0,11	1,9	1,5	84
8	1-hexanol	56, 69, 102	$y = 0,024x - 0,124$	0,990	1,04	1,73	5,5	5,5	85
9	(<i>Z</i>)-3-hexen-1-ol	67, 82, 100	$y = 0,033x - 0,026$	0,992	0,16	0,39	5,6	4,1	83
10	(<i>E</i>)-2-hexen-1-ol	57, 67, 100	$y = 0,039x - 0,035$	0,994	0,18	0,45	5,5	5,1	85
11	(<i>Z</i>)- óxido de linalol	59, 94, 170	$y = 0,013x - 0,048$	0,991	0,73	1,82	3,1	2,1	85
12	(<i>E</i>)- óxido de linalol	59, 94, 179	$y = 0,043x - 0,179$	0,990	0,83	1,39	0,7	0,9	84
13	furfural	39, 67, 96	$y = 0,027x - 0,079$	0,993	0,59	1,48	5,5	5,7	85
14	3-hidroxiturato de etila	88, 117, 132	$y = 0,056x - 0,270$	0,991	0,97	1,62	4,4	5,3	85
15	1-octanol	84, 112, 130	$y = 0,024x + 0,011$	0,990	0,09	0,22	5,6	5,9	85
16	linalol	71, 121, 154	$y = 0,022x - 0,015$	0,990	0,13	0,33	1,6	1,9	83
17	vitispirano	93, 177, 192	$y = 0,025x - 0,021$	0,990	0,17	0,41	5,1	4,1	87
18	α -ionona	121, 136, 192	$y = 0,109x - 0,036$	0,998	0,07	0,17	5,8	5,5	81
19	terpinen-4-ol	93, 136, 154	$y = 0,007x - 0,011$	0,995	0,31	0,78	0,3	0,3	84
20	acetofenona	77, 105, 120	$y = 0,034x - 0,272$	0,993	1,34	1,60	4,6	4,2	84
21	benzoato de etila	105, 121, 150	$y = 0,054x - 0,380$	0,991	1,18	1,77	3,7	3,3	86
22	α -terpineol	93, 121, 136	$y = 0,006x - 0,017$	0,992	0,53	1,33	2,3	2,2	84
23	2-eti- hexanol	57, 112, 130	$y = 0,008x - 0,066$	0,991	1,37	1,65	5,8	5,4	86
24	acetato de 2-feniletila	43, 104, 164	$y = 0,008x - 0,026$	0,996	0,65	1,63	5,6	5,9	83
25	salicilato de metila	92, 120, 152	$y = 0,009x - 0,059$	0,993	1,02	1,37	4,9	5,6	82
26	(<i>E</i>)- β -damascenona	69, 121, 190	$y = 0,032x - 0,141$	0,991	0,87	1,09	4,2	4,6	87
27	2-fenil-etanol	65, 91, 122	$y = 0,035x - 0,308$	0,990	1,46	1,75	2,4	3,1	85
28	benzenoacetoneitrila	63, 90, 117	$y = 0,134x - 0,353$	0,990	0,53	1,32	1,3	1,9	80
29	ácido octanóico	60, 73, 144	$y = 0,173x - 0,131$	0,993	0,15	0,38	3,2	2,7	88
30	antranilato de metila	92, 119, 151	$y = 0,133x - 0,131$	0,992	0,20	0,49	0,1	0,2	83
PI	2-octanol (padrão interno)	45, 112, 130							

(a) Equação da curva de calibração de cada constituinte de aroma, (b) R^2 coeficiente de determinação, (c) LD e LQ em $\mu\text{g L}^{-1}$. (d) média para repetitividade para $n = 9$, precisão *intraday* ($DPR_{intra}\%$) e *interday* ($DPR_{inter}\%$) (e) média para recuperações (R%) dos valores de dez concentrações utilizadas na curva de calibração.

Os valores de LD e LQ obtidos neste trabalho variaram, respectivamente, de 0,04 – 1,46 e 0,11 – 1,82 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão do método foi avaliada pela repetitividade de réplicas autênticas nos aspectos *intraday* (3 injeções no mesmo dia) e *interday* (1 injeção em 3 dias diferentes) sendo obtida através de três concentrações diferentes daquelas utilizadas nas curvas de validação, mas dentro da faixa de trabalho de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 1,34 mg L^{-1} , a saber: 50; 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,00 mg L^{-1} (n = 9 para cada aspecto) de cada composto de aroma na matriz do suco de uva DC, apresentando nos dois aspectos DPR abaixo de 6,0 %. A exatidão do método foi avaliada pela recuperação, utilizando as áreas dos compostos voláteis de aroma obtidas por CG-EM-MSI, utilizando-se das equações da curva de calibração de cada composto, e a concentração de PI (2 mg L^{-1}), apresentando valores de 76 a 91 %.

ARISSETO e colaboradores (2013) desenvolveram um método para amostras de sucos de frutas (laranja, guava, acerola, manga, uva, entre outros), utilizando MEFS e CG-EM-SIM, e obtiveram R^2 acima de 0,999, recuperações entre 97,5 – 103,1 % e DPR de 1,5 a 15,7 %.

CAVELL-QUANTRILL e colaboradores (2006) validaram um método para 46 compostos de aroma em suco de uva da cv. Muscat (*V. vinifera*) utilizando CG-EM-MSI e obtiveram valores de R^2 entre 0,994 – 1,000 com valores de DPR de 0,0 – 38,6 % e recuperação de 50 % para antranilato de metila, 96% para acetato de etila, 97% para 3-hexen-1-ol, 120 % para furfural, 115% para linalol, 96% para acetofenona, 87 % para β -damascenona e 95% para α -ionona.

2.3.5 Aplicação do método validado

O método validado foi aplicado em 33 amostras de sucos de uvas integrais brasileiros, comerciais e experimentais (Tabela 2).

As concentrações dos compostos de aroma (constituintes voláteis), obtidos através da validação do método, em $\mu\text{g L}^{-1}$, podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7. Compostos de aroma com os valores calculados das concentrações nos sucos de uvas integrais brasileiros.

Picos	Compostos de aroma	Sucos de Uva Integrais Brasileiros ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a																	
		AM	AL	AU	CB	CL	CM	CM_B	DC	DG	GA	GB	GD	GD_B	MT	MV	PE	PE_B	PG
1	acetato de etila	–	6,86	–	5,88	8,89	1,80	1,43	6,97	1,06	8,67	2,04	1,41	5,54	5,25	6,29	0,87	1,14	0,65
2	(E)- crotonato de etila	2,38	4,50	9,05	9,46	3,96	2,27	–	6,75	5,42	8,33	7,66	4,23	–	4,74	6,01	2,08	–	4,56
3	1,4-cineol	–	–	–	–	1,52	1,41	–	4,02	3,22	–	7,64	3,62	–	1,32	–	0,95	–	0,98
4	3-metil-1-butanol	2,24	1,31	1,65	8,98	1,69	7,19	1,24	1,12	7,88	1,35	4,11	2,09	2,44	2,28	5,75	–	9,87	2,13
5	1,8 cineol	–	1,56	–	–	1,13	1,96	3,75	7,57	5,30	9,28	5,69	4,62	1,65	1,24	3,22	2,60	7,92	2,42
6	(E)-2-hexenoato de etila	1,63	2,91	1,37	8,46	–	–	2,47	4,38	4,68	–	2,49	3,43	9,92	–	–	1,90	–	3,03
7	β -fencheno	5,67	–	–	–	1,04	1,93	–	1,19	3,65	1,14	1,39	4,73	–	–	1,00	2,66	–	–
8	1-hexanol	10,74	13,17	8,67	16,08	10,92	7,52	4,89	11,03	10,77	14,03	2,83	11,24	2,00	10,45	6,37	2,98	19,65	7,35
9	(Z)-3-hexen-1-ol	5,94	6,68	2,46	1,16	–	4,99	5,96	6,72	–	–	1,25	–	8,28	9,64	–	–	1,88	0,49
10	(E)-2-hexen-1-ol	5,45	5,41	2,93	11,19	5,10	13,94	2,94	6,81	3,60	6,64	11,02	–	–	2,14	3,10	1,02	–	5,97
11	(Z)- óxido de linalol	2,91	11,10	–	4,70	3,26	4,24	2,19	14,20	10,59	4,94	1,96	2,10	–	3,77	8,64	4,83	8,11	5,15
12	(E)- óxido de linalol	–	5,53	–	3,10	1,60	1,59	2,10	6,81	11,78	7,63	1,67	2,83	–	3,79	4,11	1,66	11,84	1,57
13	furfural	7,10	11,96	7,02	8,14	18,40	9,78	12,29	10,05	9,36	19,66	4,50	10,23	5,99	5,47	12,64	9,08	6,67	8,52
14	3-hidroxitubirato de etila	1,42	7,39	9,49	1,21	2,05	2,79	–	1,90	1,83	2,03	19,13	1,20	–	–	1,71	5,90	–	4,31
15	1-octanol	2,40	2,89	–	1,16	2,21	5,43	2,72	8,13	2,37	11,67	–	2,62	7,59	–	–	1,44	7,17	5,90
16	linalol	2,22	2,83	2,76	1,13	5,08	3,63	–	3,49	1,20	4,93	3,15	3,45	–	–	2,93	0,72	–	–
17	vitispirano	6,72	3,93	9,00	4,30	7,45	9,69	1,97	6,31	1,75	6,00	5,37	–	–	5,81	8,56	2,45	–	3,87
18	α -ionona	1,43	8,90	1,90	–	–	1,57	3,83	4,32	7,88	–	2,91	2,63	–	5,60	1,64	–	–	1,88
19	terpinen-4-ol	2,90	1,82	1,10	1,12	2,98	1,91	2,48	2,12	2,53	5,55	–	1,59	–	–	1,61	0,84	2,57	0,97
20	acetofenona	2,30	2,39	–	–	2,53	2,52	–	2,12	1,95	3,10	–	1,59	–	3,74	–	1,68	–	1,75
21	benzoato de etila	1,90	2,25	–	–	2,27	2,28	–	1,96	2,59	1,84	–	1,65	–	–	1,01	3,89	–	3,40
22	α -terpineol	26,71	28,77	9,65	18,94	28,07	19,91	9,39	16,94	14,80	24,29	1,18	18,93	7,75	5,13	8,90	9,75	7,44	8,45
23	2-eti-hexanol	–	1,25	–	–	1,92	1,43	–	3,25	7,33	2,03	–	1,06	–	1,36	3,96	1,95	–	1,74
24	acetato de 2-feniletila	1,41	3,71	1,81	9,89	4,53	–	–	1,58	4,65	6,14	–	9,96	26,67	–	2,35	2,41	–	4,79
25	salicilato de metila	1,75	1,67	–	5,62	5,04	3,35	–	6,05	5,10	7,26	–	2,07	5,59	6,65	2,49	3,40	–	4,73
26	(E)- β -damascenona	4,05	5,64	4,69	2,47	2,22	5,16	1,83	1,29	1,35	1,34	–	5,17	1,49	6,01	1,57	1,53	5,50	2,62
27	2-fenil-etanol	10,87	16,97	7,08	13,12	9,03	15,56	4,79	4,38	15,69	18,39	14,38	16,60	4,65	16,36	2,78	5,20	8,80	6,76
28	benzenoacetoneitrila	2,77	3,02	–	1,62	3,88	2,53	–	3,44	4,11	5,35	2,48	2,08	–	–	2,69	5,10	–	6,03
29	ácido octanóico	13,32	9,70	–	3,69	–	2,06	2,69	1,42	1,88	1,15	–	2,42	1,95	–	29,26	1,60	9,54	–
30	antranilato de metila	1,43	1,46	1,92	–	–	–	8,68	4,66	2,83	3,05	–	1,64	14,55	–	–	2,87	–	–

(a) valores calculados de concentração dos compostos validados nos sucos de uva em $\mu\text{g L}^{-1}$.

AU, AL, entre outros são os códigos atribuídos aos sucos da Tabela 2.

Continuação da Tabela 7.

Picos	Substâncias de aroma	Sucos de Uva Integrais Brasileiros ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a														
		PZ	SB	SI	SN	SP	US	EP	SA_isaM	SA_isaB	SA_coraB	SA_coraM	SA_coraFM	SA_chard_B	SA_mosc_B	SA_ita_B
1	acetato de etila	1,81	3,66	1,91	9,39	3,02	4,09	6,94	19,11	10,11	1,51	23,13	11,06	6,47	3,17	2,27
2	(E)- crotonato de etila	–	4,34	8,59	5,48	1,74	3,51	1,09	7,38	8,35	23,22	12,22	23,06	–	–	–
3	1,4-cineol	–	2,17	1,28	1,40	2,13	3,61	1,28	–	–	–	–	–	–	–	–
4	3-metil-1-butanol	–	1,68	6,90	4,84	3,42	2,23	2,44	–	3,86	–	–	4,69	3,24	1,93	–
5	1,8 cineol	–	2,38	1,87	1,66	1,70	5,53	1,19	2,19	3,49	1,23	3,54	3,92	2,27	–	–
6	(E)-2-hexenoato de etila	–	2,60	–	–	2,38	1,97	3,53	–	–	–	2,25	–	–	–	–
7	β -fencheno	–	9,43	9,11	5,64	2,78	–	–	–	8,01	–	–	–	–	–	–
8	1-hexanol	–	17,46	3,52	1,98	2,74	12,08	4,89	3,46	1,39	2,68	–	3,09	–	7,17	–
9	(Z)-3-hexen-1-ol	–	–	1,10	–	5,82	–	–	5,82	4,01	7,85	2,96	1,81	–	3,43	–
10	(E)-2-hexen-1-ol	–	1,56	10,59	–	5,28	6,48	1,75	2,70	2,03	9,49	4,58	2,12	–	3,06	–
11	(Z)- óxido de linalol	–	1,61	4,26	1,64	4,45	18,15	1,44	–	–	–	–	–	14,44	8,83	–
12	(E)- óxido de linalol	1,06	1,89	4,92	1,83	4,32	2,73	2,06	1,67	2,16	–	2,58	–	–	5,14	3,03
13	furfural	8,15	6,48	19,38	15,87	1,91	4,19	9,18	–	3,29	3,88	2,72	4,24	–	4,75	–
14	3-hidroxi-butirato de etila	3,28	8,83	2,28	1,67	3,56	3,79	2,33	2,06	6,51	7,45	8,03	6,07	–	–	–
15	1-octanol	2,62	–	–	1,71	8,36	1,94	9,12	7,36	1,23	1,67	3,62	–	–	18,62	18,91
16	linalol	1,25	3,14	4,06	4,62	5,61	2,95	9,49	4,04	2,53	3,71	4,03	2,47	–	–	–
17	vitispirano	6,69	7,83	5,36	2,13	1,50	8,51	9,49	4,61	5,42	4,22	5,29	3,06	–	–	–
18	α -ionona	9,29	8,66	4,65	2,66	8,79	–	1,32	–	9,67	2,43	–	1,99	–	8,14	6,03
19	terpinen-4-ol	3,31	1,89	2,32	1,97	4,63	5,57	2,28	3,30	2,29	–	1,01	1,31	12,47	–	3,33
20	acetofenona	–	1,54	–	9,99	2,18	2,55	–	–	2,03	2,18	–	8,97	7,67	–	–
21	benzoato de etila	1,83	1,58	2,49	1,75	1,51	9,89	–	–	–	–	–	–	–	–	–
22	α -terpineol	15,88	2,71	19,51	2,82	6,72	15,42	3,31	25,38	15,42	3,68	2,67	–	–	12,60	13,71
23	2-eti- hexanol	–	–	2,50	1,86	–	–	–	–	2,75	–	3,81	–	–	–	–
24	acetato de 2-feniletila	2,65	2,64	5,32	13,58	1,92	2,55	–	1,56	–	–	–	–	–	2,78	–
25	salicilato de metila	9,31	1,58	1,85	2,34	3,21	3,74	–	–	6,28	–	–	–	4,25	–	–
26	(E)- β -damascenona	4,08	4,66	3,39	1,11	8,53	1,15	3,71	6,89	5,22	4,28	4,71	4,96	1,11	1,41	2,31
27	2-fenil-etanol	3,23	7,57	6,18	4,48	6,03	7,16	2,79	8,35	6,68	4,39	–	–	4,17	5,66	–
28	benzenoacetoneitrila	–	2,68	1,88	2,21	2,55	2,55	2,87	2,49	8,81	–	–	–	–	–	–
29	ácido octanóico	5,07	5,28	1,74	9,84	9,47	–	–	–	–	–	5,89	–	2,97	1,23	–
30	antranilato de metila	–	–	–	3,07	–	–	2,98	3,56	–	–	–	–	–	–	–

(a) valores calculados das concentrações dos compostos validados nos sucos de uva em $\mu\text{g L}^{-1}$.

AU, AL, entre outros são os códigos atribuídos aos sucos da Tabela 2.

Os ésteres alifáticos e aromáticos contribuem positivamente para o aroma do suco de uva, conferindo odores frutados ao produto. O acetato de etila foi identificado em 31 sucos, apresentando menor e maior concentração nos sucos PE e SA_isaM, com respectivamente, $0,87 \mu\text{g L}^{-1}$ e $19,11 \mu\text{g L}^{-1}$. O (*E*)-crotonato de etila foi identificado em 26 sucos, apresentando menor e maior concentração nos sucos EP e SA_coraB, com respectivamente, $1,09 \mu\text{g L}^{-1}$ e $23,22 \mu\text{g L}^{-1}$. O (*E*)-2-hexenoato de etila foi identificado em 17 sucos, apresentando menor e maior concentração nos sucos PE e CB, com respectivamente, $1,90 \mu\text{g L}^{-1}$ e $8,46 \mu\text{g L}^{-1}$. O benzoato de etila foi identificado em 17 sucos, apresentando menor e maior concentração nos sucos MV e US, com respectivamente, $1,01 \mu\text{g L}^{-1}$ e $9,89 \mu\text{g L}^{-1}$. O acetato de 2-feniletila foi identificado em 21 sucos, assim como o salicilato de metila, seus maiores valores foram nos sucos GD_B ($26,67 \mu\text{g L}^{-1}$) e no PZ ($9,31 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Em sucos de uva cv. Muscat (*V. vinifera*), já foi relatada concentração de acetato de etila variando de $0,15$ a $300 \mu\text{g L}^{-1}$ e de acetato de feniletila variando de $0,05$ a $18,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (ETIÉVANT, 1991). SCHREIER & PAROSCHY (1981), relataram em seu trabalho, $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para acetato de 2-feniletila, (*E*)-2-hexenoato de etila e salicilato de metila, em uvas cv. Concord (*V. labrusca*).

Compostos com aromas da fruta são importantes para a qualidade dos sucos, o 3-hidroxibutirato de etila foi observado em 26 dos 33 sucos, enquanto o antranilato de metila foi observado em 13 sucos, apresentando maiores valores nos sucos brancos GD_B e CM_B, com $14,55$ e $8,68 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, ambos compostos com aroma de uva (PERFUMER & FLAVORIST, 2011). RICE (1974) relata teores de antranilato de metila de $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ em mosto de uva Concord (*V. labrusca*), e $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ em uva Niágara (*V. labrusca*). SCHREIER & PAROSCHY (1981) relataram $1,0$ e $2,6 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente de 3-hidroxibutirato de etila e antranilato de metila, em uvas cv. Concord (*V. labrusca*).

O antranilato de metila, apesar de ser referência no aroma de uva, não foi encontrado em todos os sucos de uva, NELSON & ACREE (1978) relatam uma observação feita por Shaulis e Robinson, em 1953, que perceberam grande variação da concentração de antranilato de metila de uvas cv. Concord (*V. labrusca*) e Fredonia (*V. labrusca*), decorrentes da variação sazonal. MOYER e colaboradores (1977) observaram que nas uvas cv. Niágara, Fredonia e Concord quando descascadas para a produção de vinho ou suco, havia grande redução da

quantidade de antranilato de metila. Além disso, NELSON e colaboradores (1977) concluíram que em alguns tipos de uvas não se observa antranilato de metila. No entanto estas apresentam um intenso aroma “foxado” (oriundo de uvas de mesa, de uvas americanas Isabel e Bordô) (COLETTI, 2014), sendo fornecido por compostos gerados a partir da clivagem do anel do antranilato. Baixa concentração de antranilato de metila pode ser dependente de fatores como maturação das uvas e da maceração pelicular (NELSON & ACREE, 1978).

Os álcoois apresentam odores herbáceos, que conferem suavidade ao suco, dentre eles o 2-fenil-etanol e o 1-hexanol foram aqueles com maior incidência nos sucos, sendo ambos descritos com aromas florais (NOGUERAL-PATO et al, 2012), e apresentaram valores máximos de 18,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ no suco tinto GA e de 19,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ no suco branco PE_B, respectivamente. Em sucos de uva cv. Muscat (*V. vinifera*), já foi relatada concentração de 2-fenil-etanol variando de 4 a 197 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 1-hexanol entre 0,3 a 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ETIÉVANT, 1991). (Z)-3-hexen-1-ol, (E)-2-hexen-1-ol, 2-etil-hexanol, 1-octanol e 3-metil-1-butanol também foram quantificados na maioria dos sucos, porém abaixo de 13,94 $\mu\text{g L}^{-1}$. Resultados similares foram observados em sucos de uva Muscadine (*V. rotundifolia* Michx) para 1-hexanol e (E)- 2-hexen-1-ol (BAEK & CADWALLADER, 1999). O 2-fenil-etanol foi considerado um aroma bem importante para vinhos Pinot Noir com seu aroma de rosa e mel (FANG & QIAN, 2006) e concentração de 0,69 mg kg^{-1} em uvas Concord (*V. labrusca*) (SCHREIER & PAROSCHY, 1981).

Os terpenos contribuem para caracterizar o aroma varietal da uva, contribuindo com odores florais. Neste trabalho foram validados o 1,4-cineol, 1,8-cineol, β -fencheno, linalol, terpinen-4-ol e α -terpineol, encontrados na maioria dos sucos de uva analisados. Vale ressaltar os altos valores de α -terpineol, com seu aroma de menta/anis (NOGUERAL-PATO et al, 2012), nos suco tintos CL e AL respectivamente de 28,07 e 28,77 $\mu\text{g L}^{-1}$. (E) e (Z)-óxido de linalol, ambos com aromas florais, também foram observados em vários dos sucos analisados, com maior concentração no suco branco experimental SA_chard_B e no suco branco comercial PE_B, respectivamente 14,44 e 11,84 $\mu\text{g L}^{-1}$. Linalol, óxido de linalol ((Z) - forma furanóide) e óxido de linalol ((E) – forma piranóide) foram encontrados em baixa concentração no suco de uva cv. Muscat (*V. vinifera*) e no mosto Huxelrebe (*V. vinifera*) (CAVELL-QUANTRILL et al, 2006), já o α -terpineol foi encontrado em baixa concentração na uva cv. Tempranillo e Grenache (ambas *V. vinifera*) (LÓPEZ

et al, 2004). Álcoois monoterpênicos (linalol, α -terpineol, nerol) geralmente são encontrados em concentrações que variam de 0,01 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (RIBERÉAU-GAYON et al, 2006).

Nor-isoprenóides resultam da degradação de carotenoides e são constituídos por 9, 10, 11 e 13 átomos de carbono, apresentando estes últimos propriedades olfativas que aumentam a intensidade do aroma (FERREIRA & GUEDES DE PINHO, 2003). Dentre os nor-isoprenóides (C_{13}) estão a (*E*)- β -damascenona, vitispirano, α -ionona, descritos com aromas de rosa/mel, eucalipto, violeta/madeira, respectivamente (LRI & ODOUR DATABASE, 2014) e que foram identificados por LÓPEZ e colaboradores (2004) em uvas da variedade Tempranillo e Grenache (ambas *V. vinifera*), com aroma intenso de mel. CAVELL-QUANTRILL e colaboradores (2006) observaram a β -damascenona e o vitispirano em sucos de uva das cv. Muscat e Huxelrebe (ambos *V. vinifera*), sendo que a (*E*)- β -damascenona foi verificada em 32 sucos analisados pelo grupo com maior concentração de 8,53 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto neste trabalho o maior teor observado foi de 6,89 $\mu\text{g L}^{-1}$ no suco SA_isaM. Já o vitispirano e a α -ionona encontram-se em quase todos os sucos trabalhados, com maiores concentrações, 9,69 e 9,29 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente nos sucos tintos e comerciais CM e PZ. CAVELL-QUANTRILL e colaboradores (2006) observaram concentração de vitispirano de 13 – 23 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de ionona de 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ em suco de uva Huxelrebe (*V. vinifera*).

Furfural, acetofenona, benzenoacetonitrila e ácido octanóico são respectivamente descritos como aromas de caramelo, amêndoa/ácido, laranja e queijo/ácido (LRI & ODOUR DATABASE, 2012; GÜRBUZ et al, 2006). Dentre estes, o furfural é um composto com grande relevância sensorial e teve maior concentração, 19,66 $\mu\text{g L}^{-1}$, no suco tinto GA. A acetofenona foi observada com maior concentração, 9,99 $\mu\text{g L}^{-1}$, no suco SN. O suco SA_isaB teve concentração de 8,81 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzenoacetonitrila e o suco MV, 29,26 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido octanóico. A benzenoacetonitrila é proveniente do mosto, do metabolismo da videira (GUERRA & BARNABÉ, 2005). Em sucos de uva cv. Muscat (*V. vinifera*), já foi relatada concentração de ácido octanóico variando de 0,5 a 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ETIÉVANT, 1991).

Observou-se que, dos 33 sucos trabalhados, os sucos DC, DG, AL e SP, CM, GA e SN apresentaram respectivamente 30, 29, 28 e 27 compostos dos 30 validados neste trabalho. Os sucos com menos compostos foram o SA_ita_B; SA_chard_B; SA_mosc_B e SA_coraFM e GD_B; SA_coraB e PZ, com 7; 10; 15; e

16 compostos, respectivamente, e curiosamente destes 5 eram experimentais, o que leva a concluir que ainda precisam de maior atenção na sua composição e elaboração do processamento.

2.3.6 Análise de componentes principais (ACP) dos sucos de uva

Para ACP foram utilizados os sucos de uva integrais (Tabela 2) e os compostos validados (Tabela 5), com suas respectivas concentrações, utilizando o programa estatístico *SPSS_17 Statistics*, com o objetivo de tentar agrupar/separar estes sucos de uva, bem como observar quais seriam os compostos mais representativos na composição do suco.

Na Tabela 8 encontra-se a relação dos compostos de aroma utilizados nesta análise de ACP, que aqui serão chamados de componentes.

Tabela 8. Relação dos compostos que foram utilizados na análise de ACP dos sucos de uva brasileiros.

C1: acetato de etila	C2: (<i>E</i>)-crotonato de etila	C3: 1,4- cineol
C4: 3-metil-1-butanol	C5: 1,8- cineol	C6: (<i>E</i>)-2-hexenoato de etila
C7: β -Fencheno	C8: 1-hexanol	C9: (<i>Z</i>)-3-hexen-1-ol
C10: (<i>E</i>)-2-hexen-1-ol	C11: (<i>Z</i>)-óxido de linalol	C12: (<i>E</i>)-óxido de linalol
C13: furfural	C14: 3-hidroxibutirato de etila	C15: 1-octanol
C16: linalol	C17: vitispirano	C18: α -ionona
C19: terpinen-4-ol	C20: acetofenona	C21: benzoato de etila
C22: α -terpineol	C23: 2- etil-hexanol	C24: acetato de 2-feniletila
C25: salicilato de metila	C26: (<i>E</i>)- β -damascenona	C27: 2-fenil-etanol
C28: benzenoacetonitrila	C29: ácido octanóico	C30: antranilato de metila

Na Tabela 9 observa-se que as primeiras 11 componentes principais recuperam quase 80 % do acumulado da variância dos dados, desta forma o número de componentes principais significativos é 11, ou seja 11 eixos. Logo, se considerarmos as duas primeiras componentes ($p=2$), descreve-se 26,7 % da informação original, se as três primeiras componentes ($p=3$) descreve 35,3 %, ou seja, valores muito baixos, quando o ideal seria duas componentes pelo menos 60 % de informação original.

Tabela 9. Valores próprios, a variância aplicada em cada componente (VarX%) e à variância cumulativa (Cum.VarX%) para 30 componentes.

Componente	Valor próprio	Var X%	Cum.VarX %
1	4,558	15,194	15,194
2	3,439	11,464	26,658
3	2,582	8,607	35,265
4	2,276	7,587	42,852
5	2,049	6,829	49,681
6	1,875	6,251	55,932
7	1,802	6,006	61,937
8	1,623	5,408	67,346
9	1,455	4,85	72,196
10	1,134	3,779	75,975
11	1,049	3,496	79,471
12	0,838	2,793	82,264
13	0,822	2,741	85,005
14	0,695	2,317	87,322
15	0,641	2,135	89,458
16	0,566	1,886	91,343
17	0,473	1,575	92,919
18	0,436	1,452	94,371
19	0,396	1,319	95,69
20	0,337	1,122	96,813
21	0,254	0,845	97,658
22	0,19	0,634	98,291
23	0,179	0,596	98,888
24	0,125	0,416	99,303
25	0,084	0,28	99,583
26	0,059	0,195	99,778
27	0,037	0,125	99,903
28	0,015	0,051	99,954
29	0,011	0,037	99,991
30	0,003	0,009	100

Para melhorar os valores de Var X%, retirou-se na tabela *Communtides* do programa *SPSS_17* os componentes cujos valores não ajudavam a separar as amostras (inferiores a 0,5), e para obter o eixo de variação de 2 ou 3 componentes principais superior a 60 %. Logo, na nova tabela (Tabela 10) de valores próprios, com as variâncias para cada componente e cumulativa, pode-se observar que os 3 primeiros componentes principais recuperam 64 % do acumulado da variância dos dados, sendo que as duas primeiras componentes descrevem 45,8 % e as três primeiras componentes 63,9 % da distribuição original.

Tabela 10. Novos valores próprios, a variância aplicada em cada componente (VarX%) e à variância cumulativa (Cum.VarX%) para 11 componentes.

Componente	Valor próprio	Var X%	Cum.VarX %
(E)-2-hexenoato de etila (C6)	2,603	23,665	23,665
1-hexanol (C8)	2,435	22,136	45,801
(E)-2-Hexen-1-ol (C10)	1,988	18,075	63,876
(Z)- óxido de linalol (C11)	0,982	8,925	72,8
(E)- óxido de linalol (C12)	0,724	6,585	79,385
3-hidroxibutirato de etila (C14)	0,639	5,806	85,191
vitispirano (C17)	0,548	4,986	90,177
terpinen-4-ol (C19)	0,398	3,616	93,792
acetato de 2-feniletila (C24)	0,28	2,544	96,337
2-fenil-etanol (C27)	0,238	2,162	98,499
antranilato de metila (C30)	0,165	1,501	100

Na Figura 11, encontra-se o gráfico Var X% versus número de componentes considerados (gráfico do *Scree plot*). Para os 11 componentes pode-se observar que as 3 primeiras componentes são mais relevantes, logo podemos considerar a descrição dos dados em 2 ou 3 eixos, ACP1, ACP2 (e ACP3), pois estes serão capazes de separar os sucos de uva.

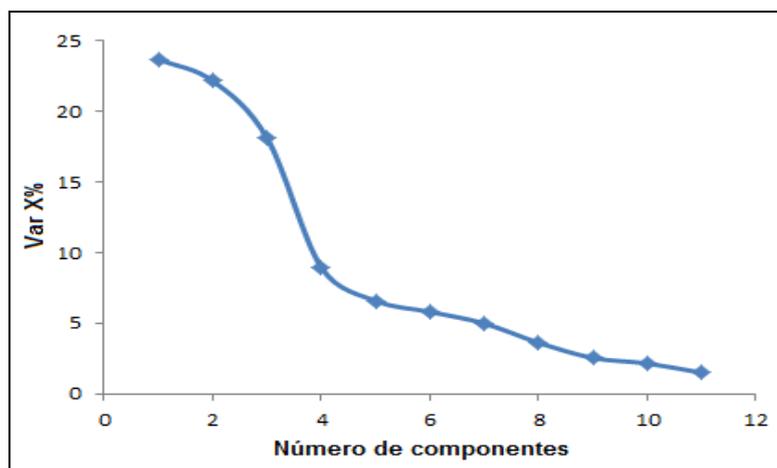


Figura 11. Gráfico de Var X% versus número de componentes (*Scree plot*).

Na Figura 12 está o gráfico dos *scores*, que é a representação dos sucos num sistema de eixos. Neste, cada marca representa um suco de uva em um plano definido por dois eixos correspondentes aos componentes principais (ACP), que são, numa visão global em duas dimensões, os componentes principais ACP1 e ACP2, onde inclui a variável de classificação cor, utilizada para facilitar a identificação e separação dos sucos tintos (em losango azul) e os brancos (em círculo vermelho) após o ACP.

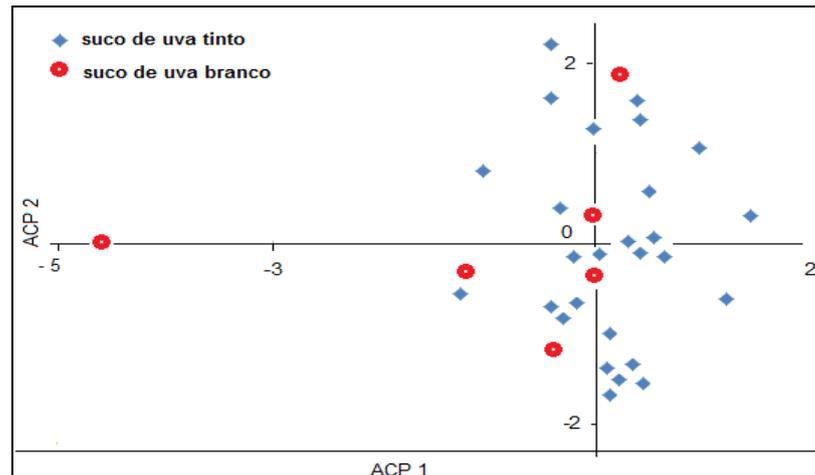


Figura 12. Visão global dos sucos de uva em duas dimensões com as componentes principais ACP1 e ACP2 com a variável de classificação cor.

Pode-se observar que os sucos brancos se encontram no meio dos sucos tintos mostrando que a separação não ocorre nem ao longo da primeira componente (ACP1) nem da segunda (ACP2), logo a classificação por cor não é suficiente para separá-los.

Utilizando-se dos componentes (Tabela 8), fez-se ACP com os 33 sucos de uva tintos e brancos (gráfico de *scores*, Figura 13A) e correlacionou-os com os componentes obtendo o gráfico de *loadings* (Figura 13B), que mostra a relevância de cada componente com o suco ou grupo de sucos relacionados.

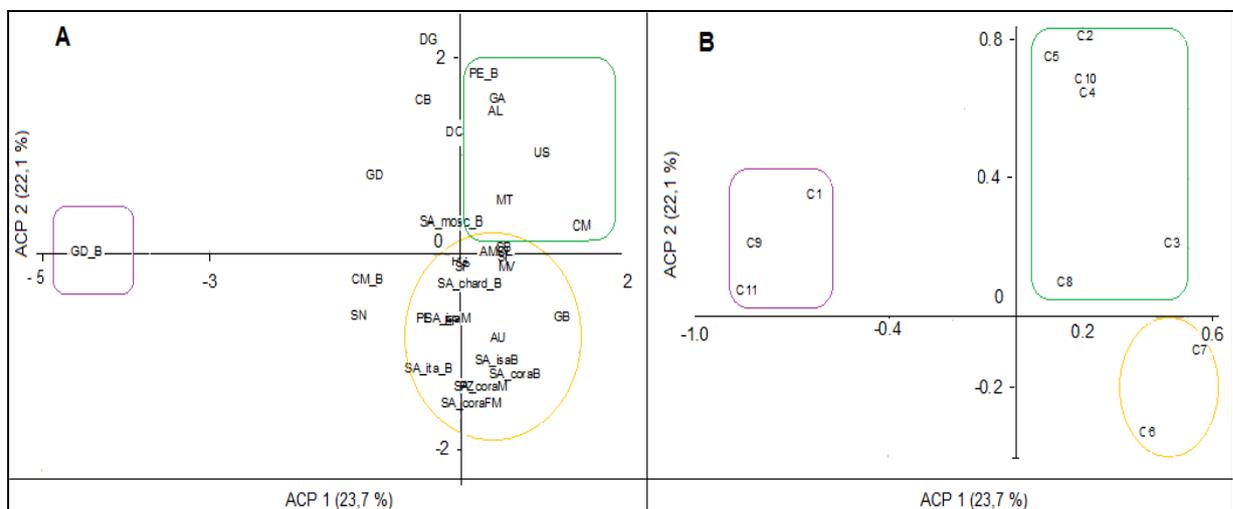


Figura 13. (A) Gráfico de *scores* dos sucos de uva tintos e brancos, (B) Gráfico de *loadings* com os compostos de aroma validados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).

No gráfico de *scores* (Figura 13A) que apresenta a disposição dos sucos, pode-se observar um grande acúmulo de sucos no lado direito (circulados em

amarelo) cujos compostos, no gráfico de *loadings* (Figura 13B) correspondem às substâncias que os agrupam, que são (*E*)-2-hexenoato de etila (C6) e o β -fencheno (C7), ambos com aromas florais. De forma análoga, os sucos circundados em verde possuem os compostos (*E*)-crotonato de etila, 1,4-cineol, 3-metil-1-butanol, 1,8-cineol, 1-hexanol e (*E*)-3-hexen-1-ol, respectivamente C2, C3, C4, C5, C8 e C10, os agrupam. Pode-se observar que os compostos que formam este grupo é formado por 3 álcoois, 2 terpenóides e 1 éster, os quais atribuem notas herbal e frutal a estes sucos.

O suco GD_B encontra-se separado dos demais, mostrando que os compostos: acetato de etila, (*Z*)-3-hexen-1-ol e (*Z*)-óxido de linalol (C1, C9 e C11, respectivamente), foram determinantes para este isolamento, podendo assim prever que os demais sucos possuam pouca concentração dos referidos compostos.

Os sucos sem marcação são aqueles que possuem influência de todos os compostos, não havendo um que seja determinante para separá-los ou agrupá-los.

Pode-se observar que alguns componentes estão ausentes (Figura 13B), por não ajudarem a separar ou agrupar essas amostras, sendo assim descartados na análise de ACP sem perdas para a distribuição original.

A soma das duas componentes principais foi baixa (45,8 %), devido ao número de variáveis e complexidade/diferenciação dos sucos analisados, e gerou um grande agrupamento de sucos na ACP como observado no gráfico de *scores*. Para tentar obter mais informações decidiu-se fazer ACPs individuais para os sucos tintos e brancos, visando conseguir melhor separação.

No programa SPSS_17 retirou-se os dados relativos aos sucos de uva brancos. Fez-se ACP com os componentes da Tabela 8 e para os sucos de uva tintos (vide Tabela 2), resultando no gráfico de *scores* (Figura 14A) e *loadings* (Figura 14B).

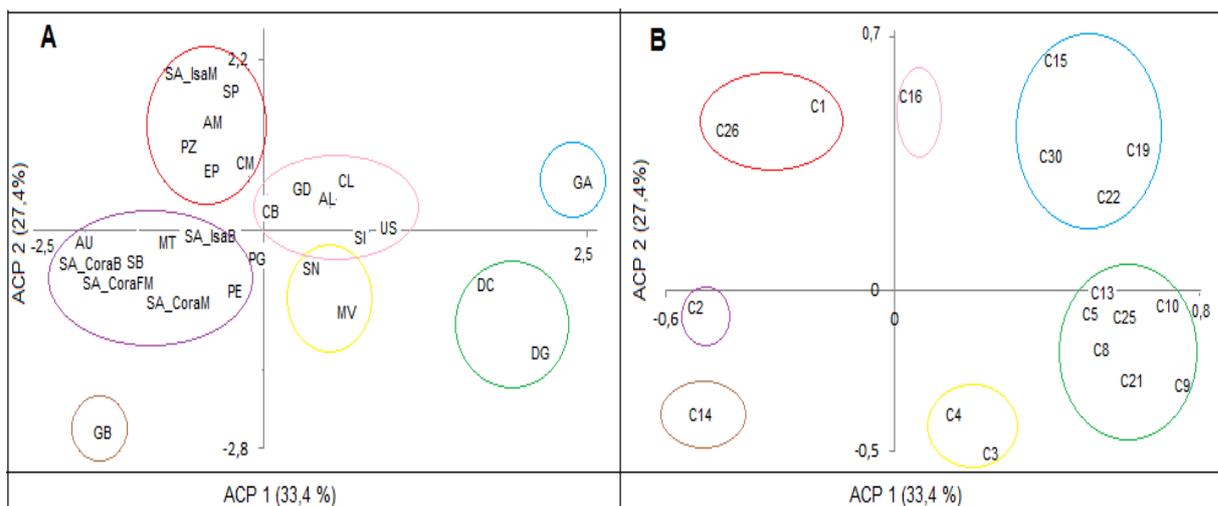


Figura 14. (A) Gráfico de *scores* dos sucos de uva tintos, (B) Gráfico de *loadings* com os compostos de aroma validados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).

Pode-se observar melhor separação entre os sucos e formação de pequenos agrupamentos tanto no gráfico de *scores*, para os sucos, quanto no gráfico de *loadings*, para os compostos, melhorando consideravelmente a análise do ACP. As duas componentes principais descrevem agora 60,8 %, promovendo melhor a separação e/ou agrupamento das amostras.

Pode-se observar que os sucos DC e DG, que são de procedência do Rio Grande do Sul (RS), estão relacionados com sete compostos: 1,8-cineol (C5), 1-hexanol (C8), (*Z*)-3-hexen-1-ol (C9), (*E*)-2-hexen-1-ol (C10), furfural (C13), benzoato de etila (C21) e salicilato de metila (C25), deixando-os bem separados dos demais sucos. Estes compostos, grande parte álcoois e ésteres conferem a estes sucos aromas herbal, floral e frutal.

O composto C2, (*E*)-crotonato de etila, de nota frutal, está agrupando sozinho nove sucos, sendo quatro deles experimentais, os sucos SA_coraB, SA_coraM, SA_coraFM e SA_isaB, que são de Pernambuco, quatro comerciais do Estado do Rio Grande do Sul (AU, MT, PG e PE) e um suco comercial de São Paulo, SB. O mesmo ocorre para o linalol (C16, aroma de floral), que agrupa seis sucos, todos comerciais e de procedência do sul do País. O C14, 3-hidroxibutirato de etila, possui aroma de uva, e isolou o suco GB dos demais, mostrando que esse composto é bem marcante neste suco e menos pronunciado nos outros.

Suco GA foi isolado pelos compostos 1-octanol (C15), terpinen-4-ol (C19), α -terpineol (C22) e antranilato de metila (C30), com notas florais oriundas dos 3

primeiros e de uva do último. Os compostos 1,4-cineol (C3) e 3-metil-1-butanol (C4), de aromas adocicados e frutal, foram determinantes para o agrupamento dos sucos comerciais sul-grandenses MV e SN. Por fim, os compostos acetato de etila (C1, aroma frutal) e (*E*)- β -damascenona (C26, aroma de mel) agruparam os sucos comerciais AM, CM, SP e PZ (procedência RS) e os experimentais EP (procedência MG) e SA_isaM (procedência PE).

Fez-se a ACP para os sucos brancos (seis amostras), e pode-se observar na Figura 15 que as duas componentes principais descrevem 63,8 % da distribuição original, o que facilitou a separação e/ou agrupamento das amostras. Os sucos de uva brancos ainda são recentes para o consumidor brasileiro, tendo começado a produção em 2009 e só em 2011 começou a comercializar estes sucos no País (IBRAVIN, 2014).

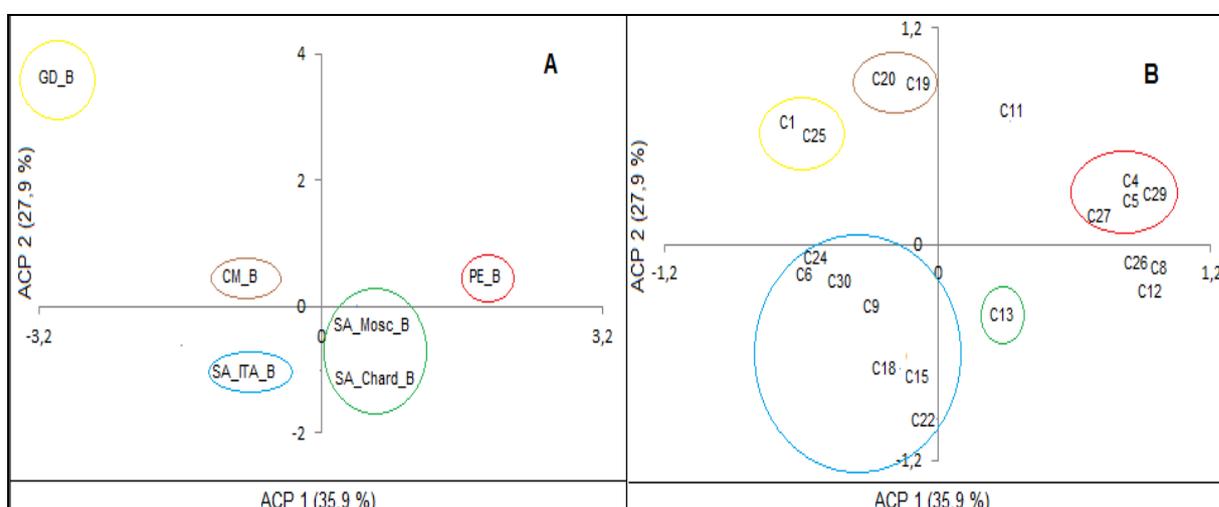


Figura 15. (A) Gráfico de *scores* dos sucos de uva brancos, (B) Gráfico de *loadings* com os compostos de aroma validados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).

Na Figura 13 o suco GD_B estava isolado dos sucos tintos e brancos pela associação dos compostos acetato de etila (C1), (*Z*)-3-hexen-1-ol (C9) e (*Z*)-óxido de linalol (C11). Neste ACP, já separado sucos brancos de tintos, o GD_B foi isolado pelos ésteres acetato de etila (C1) e salicilato de metila (C25). Os sucos experimentais SA_mosc_B e SA_chard_B, sucos experimentais de Pernambuco, foram agrupados pelo furfural (C13), que possui aroma de caramelo. O suco experimental SA_ita_B, foi separado dos demais pela associação dos ésteres (*E*)-2-hexenoato de etila (C6), acetato de 2-feniletila (C24) e antranilato de metila (C30), conferindo suavidade ao suco com suas notas adocicadas, dos álcoois (*E*)-3-hexen-

1-ol (C9) e 1-octanol (C15), e com frescor do α -terpineol (C22) e o aroma amadeirado da α -ionona (C18).

Os compostos 1-hexanol (C8), (E)-óxido de linalol (C12) e (E)- β -damascenona (C26), estão em maiores concentrações no suco PE_B do que nos outros cinco, devido à proximidade com os compostos que isola este suco dos outros que são 3-metil-1-butanol (C4), 1,8-cineol (C5), 2-fenil-etanol (C27) e ácido octanóico (C29).

No suco comercial CM_B correlaciona-se os compostos C19 e C20, respectivamente, terpinen-4-ol e acetofenona, com aromas frutais, e o composto (Z)-óxido de linalol, devido a proximidade no ACP com os compostos que o isola dos outros sucos.

Pode-se observar que a análise dos sucos tintos e brancos em separado foi mais satisfatória, uma vez que na ACP da Figura 13 utilizou-se apenas 11 componentes da Tabela 8. Já na ACP para sucos tintos (Figura 14) utilizou-se 18 componentes e nesta última ACP para os sucos brancos, 20. Quanto mais componentes, mais informações sobre a relação substância química versus suco, o que pode contribuir, associado a outras técnicas, para definir marcadores de aroma, parâmetro importante para a busca da Indicação Geográfica (IG).

2.4 CONCLUSÃO

No que se refere às colunas cromatográficas, a DBWax (fase estacionária de caráter polar polietilenoglicol) foi aquela que permitiu a separação e posterior identificação do maior número de compostos voláteis de grupos químicos variados (terpenos, ésteres, álcoois e ácidos), sendo considerada mais eficiente para a análise dos compostos dos sucos de uva. No que se refere às técnicas de extração, a MEFS em fibra cinza (DVB/CAR/PDMS) foi aquela que extraiu o maior número de compostos voláteis responsáveis pelos aromas florais, frutais e adocicados, característicos de frutas, apresentando maior valor de área absoluta total no CG, sendo adotada no estudo do perfil dos sucos. Foi realizado um planejamento experimental, cujos parâmetros estudados não foram significativos, apresentando apenas uma correlação forte entre o tempo de incubação e o uso de NaCl, sendo adotadas as seguintes condições de trabalho: tempos de incubação e extração de 5 e 30,5 minutos, temperatura de extração de 45 °C e 2,0 g de NaCl.

O método desenvolvido foi eficiente para validar e quantificar trinta compostos voláteis em sucos de uva integrais brasileiros. Na validação obteve-se LD e LQ 0,04 – 1,46 e 0,11 – 1,82 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O valor de DPR ficou abaixo de 6%, a recuperação variou entre 76 a 91%, e o R^2 foi de 0,990 a 0,999.

O método validado foi aplicado, com êxito, em 33 sucos de uva comerciais e experimentais, sendo possível quantificar e caracterizar o suco de uva nacional no âmbito dos compostos voláteis, responsáveis diretos pelo aroma dos mesmos, como os frutais: acetato de etila (suco SA_isaM, 19,11 $\mu\text{g L}^{-1}$), acetato de 2-fenietila e 3-hidroxi-butirato de etila, no suco GD_B com concentrações de 26,67 e 14,55 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, os florais: (*Z*)-óxido de linalol (suco SA_chard_B, 14,44 $\mu\text{g L}^{-1}$), herbal: 1-hexanol (suco PE_B, 19,65 $\mu\text{g L}^{-1}$), entre outros.

A análise dos componentes principais (ACP) conseguiu agrupar e separar os sucos de uva através do uso dos compostos validados. ACP com todos os sucos tintos e brancos não foi eficiente, sendo necessário fazer um ACP para cada tipo de suco. Houve agrupamentos importantes, tanto nos sucos tintos quanto nos brancos, onde componentes químicos contribuíram efetivamente para separar os sucos. Nos sucos tintos, o (*E*)-crotonato de etila agrupou sozinho nove sucos, sendo quatro deles experimentais (sucos SA_coraB, SA_coraM, SA_coraFM e SA_isaB), nos brancos, o suco PE_B foi isolado dos outros pela associação dos compostos 3-metil-1-butanol, 1,8-cineol, 2-fenil-etanol e ácido octanóico. As informações de ACP complementam aquelas já obtidas em outras análises e contribuem para o perfil dos sucos estudados, no entanto com estes dados ainda não é possível fazer distinção de origem geográfica dos sucos.

Os dados desta pesquisa visam contribuir para a comunidade científica brasileira e para a sociedade em geral com suas informações e considerações sobre o suco de uva integral brasileiro. Almeja-se ainda, que estes resultados possam de alguma forma, contribuir para a busca do selo de procedência geográfica dos sucos de uva brasileiros.

2.5 REFERÊNCIAS

- ABDI. H., WILLIAMS, L.J. **Principal component analysis**. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, v.2, p. 433, 2010.
- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th Edition, Ed. Allured Pub Corp, 804 p., 2007.
- ALVAREZ, R.Q., PASSARO, C.C., LARA, O.G., LONDONO, J.L. **Procedia Food Science**. v.1, p. 1396, 2011.
- ALVES, A.A.R., BARROS, E. B. P., REZENDE, C.M. **Flavour Science**. Chapter 78: Method Development and Optimization of Liquid Liquid Extraction for the Quantitative Analysis of Volatile Compounds from Brazilian Grape Juices. In: Vicente Ferreira e Ricardo Lopez. (Org.). Elsevier, v. 1, p. 417, 2014.
- ARAÚJO, L.V., KOPPEL, K., CHAMBERS IV, E., ADHIKARI, K., BARRACHINA, A.A.C. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 26, p. 129, 2011.
- ARISSETO, A.P., VICENTE, E., FURLANI, R.P.Z., PEREIRA, A. L. D., TOLEDO, M. C. F. **Food Analytical Methods**. v. 6, p. 1379, 2013.
- AQUINO-NETO, F.R., NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 187p., 2003.
- BAEK, H.H., CADWALLADER, K.R., MARROQUIM, E., SILVA, J.L. **Journal of Food Science**. v. 62, p. 249, 1997.
- BAEK, H.H.; CADWALLADER, K.R. **Journal of Food Science**. v. 64, n. 3, p. 441, 1999.
- BARROS, E. B. P. **Estudo analítico de vinhos brancos e sua importância enológica**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 130 p., 2011.
- BARROS, E.B.P., MOREIRA, N., PEREIRA, G.E., LEITE, S.G.F., REZENDE, C.M., Pinho, P.G. **Talanta**. v. 101, p. 177, 2012.
- BOX, G. E. P., HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S.; **Statistics for Experimenters**. Wiley: New York, 215 p.1987.
- CANUTO, K.M., GARRUTI, D.S., MAGALHÃES, H.C.R. EMBRAPA - **Comunicado técnico**. nº 166, Fortaleza – CE, 2011.
- CARASEK, E., PAWLISZYN, J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 8688, 2006.
- CAVELL-QUANTRILL, D.J., BUGLASS, A.J. **Journal of Chromatography A**. v. 1117, p. 121, 2006.

CETESB. **Etilbenzeno**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/etilbenzeno.pdf>>. Acesso nov. 2014.

CETESB. **Nonil-fenol**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/nonilfenol.pdf>>. Acesso nov. 2014.

COLETTI, C.H. Disponível em: <<http://www.vinhoedelicias.com.br/2014/02/vinho-foxado.html>>. Acesso nov. 2014.

DAVIES, N.W. **Journal of Chromatography A**. v. 503, p. 1, 1990.

DÓREA, H.S., GAUJAC, A., NAVICKIENE, S. **Scientia Plena**. v. 4, n. 7, p.1, 2008.

ETIÉVANT, P.X. **Grape juice**. In: Volatile Compounds of Food and Beverages. H. Maerse (Ed.), Marcel Dekker Inc.: New York, 254p., 1991.

ESPIRITO SANTO, R. **Einstein**. v.10, n. 2, p. 135, 2012.

FANG, Y., QIAN, M.C. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 54, p. 8567, 2006.

FLAVORNET. Disponível em: < www.flavornet.org>. Acesso nov. 2014.

FERREIRA, A.C.S., GUEDES DE PINHO, P. **Journal of Food Science**. v.68, n.9, p. 2817, 2003.

GUEDES DE PINHO, P., GONÇALVES, R.F., VALENTÃO, P., PEREIRA, D.M.R., SEABRA, M., ANDRADE, P.B., SOTTOMAYOR, M. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.23, p. 674, 2009.

GUERRA, C., BARNABÉ, D. **Vinho**. In: VENTURINI, W. G. F. (Org). Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. Ed. Edgard Blücher. p. 423, 2005.

GUIMARÃES, R.C., SARFIELD CABRAL, J.A. **Estatística**. 2ª Ed. McGraw-Hill, 2007.

GÜRBUZ, O., ROUSEFF, J.M., ROUSEFF, R.L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 3990, 2006.

ICH (International Conference Harmonization). **Validation of analytical procedures: methodology**. CPMP/ICH/280/95.1995

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima Editora, 2004.

LIMA, A. C. S., AFONSO, J. C. **Química Nova na Escola**. v. 31, n. 3, p. 210, 2009.

LIU, G-Y., CADWALLADER, K. R. **Flavor and Health Benefits of Small Fruits.** p.63, 2010.

LÓPEZ, R., EZPELETA, E., SÁNCHEZ, I., CACHO, J., FERREIRA, V. **Food Chemistry.** v. 88, p. 95, 2004.

LORD, H., PAWLISZYN, J. **Journal of Chromatography A.** v. 885, p. 153, 2000.

LRI & ODOUR DATABASE. Disponível em: < www.odour.org.uk>. Acesso nov. 2014.

MAYER, J.C., MILLER, R.C., MATTICK, L.R. **American Journal of Enology and Viticulture.** v.28, p. 4, 1977.

MILLER, J. C., MILLER, J. N.; **Statistics for Analytical Chemistry.** 2ª ed., Ellis Horwood: Chichester, 196 p., 1988.

MORGANO, M.A., QUEIROZ, S.C.N., FERREIRA, M.M.C. **Ciência & Tecnologia de Alimentos.** v.19, n.3, (<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000300009>), 1999.

NELSON, R.R., ACREE, T.E, LEE, C.Y., BUTTS, R.M. **Journal of Food Science.** v. 42, p. 57, 1977.

NELSON, R.R., ACREE, T.E. **American Journal of Enology and Viticulture.** v. 29, p. 83, 1978.

NOGUEROL-PATO, R., GONZÁLEZ-BARREIRO, C., CANCHO-GRANDE, B., SANTIAGO, J.L., MARTÍNEZ, M.C., SIMAL-GÁNDARA. **Journal of Food Chemistry.** v. 132, p. 112, 2012.

OLIVEIRA, P.A., ALVES, G.L., FRANCO, M.R.B. **Identificação dos compostos da graviola e de sua importancia ao aroma da fruta.** XI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, T441, 2003.

ORTEGA-HERAS, M., SAN JOSÉ, M.L.G., BELTRÁN, S. **Analítica Chimica Acta.** v. 458, p. 85, 2002.

PAWLISZYN, J. **Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice.** Willey-VHC: New York, 1997.

PELLATI, F., BENVENUTI, S., YOSHIZAKI, F., BERTELLI, D., ROSSI, M.C. **Journal Chromatography A.** v. 1087, p. 265, 2005.

PERFUMER & FLAVORIST - 2011. Disponível em: <www.perfumerflavorist.com/flavor/rawmaterials/naturals/123658534.html> Acesso nov. 2014.

PIZARRO, C., PÉREZ-DEL-NOTARIO, N., GONZÁLEZ-SÁIZ, J.M. **Journal of Chromatography A.** v. 1217, p. 6013, 2010.

PIZZUTTI, I.R. **Tese**. (Doutorado em Química), UFSM, Santa Maria, RS, 2006.
RAPP, A. **Nahrung**. v. 42, p. 351, 1998.

RIBÉREAU-GAYON, J., GLORIES, Y., MANJEAN, A., DUBORDIEU, D. **Handbook of Enology**. v.2, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 450p., 2006.

RICE, A. C. In: WEBB, D. **Chemistry of Winemaking**. 3 Ed. Dallas: American Chemical Society. p. 89, 1974.

RITA, R.D., ZANDA, K., DAINAA, K., DALIJA, S. **Procedia Food Science**. v. 1, p. 1709, 2011.

RIU-AUMATELL, M., CASTELLARI, M., LÓPEZ-TAMAMES, E., GALASSI, S., BUXADERAS, S. **Food Chemistry**. v. 87, p. 627, 2004.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J., CABRERA-VALIDO, H.M., PÉREZ-TRUJILLO, J.P., CACHO, J. **European Food Research and Technology**. v. 233, p. 413, 2011.

ROSS, C. F., ROSALES, M.U., FERNANDEZ-PLOTKA, V. C. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 45, p. 789, 2010.

SÁNCHEZ-PALOMO, E.S., DÍAZ-MAROTO, M.C., COELHO, M.S.P. **Talanta**. v. 66, p. 1152, 2005.

SÁNCHEZ-PALOMO, E., ALAÑÓN, M.E., MAROTO, M.C.D., VIÑAS, M.A.G., COELHO, M.S.P. **Talanta**. v. 79, p. 871, 2009.

SCHREIER, P., PAROSCHY, J.H. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. v. 14, n. 2, p. 112, 1981.

SHAW, P.J.A. **Multivariate statistics for the Environmental Sciences**. Hodder-Arnold. ISBN 0-3408-0763-6, 2003.

SOUZA, A. P. F., MARTINS, C.M., BARARÓ, A.C.L. **Nutrir Gerais** - Revista Digital de Nutrição. Ipatinga, v.3, n.4, p.299, fev./jul., 2009.

TAT, I., COMUZZOM, P., STOLFO, I., BATTISTUTTA, F. **Food Chemistry**. v.93, p. 361, 2005.

ULLRICH, S. **Journal of Chromatography A**. v. 902, p. 167, 2000.

ULLRICH, F., GROSCH, W., LEBENSM, Z. **Forsch**. V. 184, p. 277, 1897.

VILANOVA, M., SIEBERT, T. E., VARELA, C., PRETORIUS, I.S., HENSCHKE, P.A. **Food Chemistry**. v. 133, p. 124, 2012.

WANG, J., DE LUCA, V. **The Plant Journal**. v. 44, p. 606, 2005.

YANG, X., PEPPARD, T. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, p. 1925, 1994.

YANG, C., WANG, Y., LIANG, Z., FAN, P., WU, B., YANG, L., WANG, Y., LI, S. **Food Chemistry**. v. 114, p. 1106, 2009.

ZAPATA, J., VIVARACHO, L.M., CACHO, J., FERREIRA, V. **Analitica Chimica Acta**. v. 660, p. 197, 2010.

3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO NÃO-VOLÁTIL DOS SUCOS DE UVA INTEGRAIS BRASILEIROS ATRAVÉS DO QExactive (Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer)

3.1 Introdução

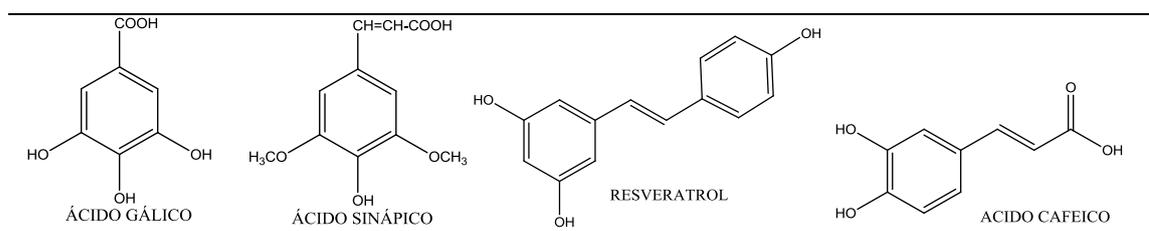
Os constituintes majoritários do suco de uva são compostos não-voláteis polares e responsáveis, na maioria das vezes, pelo seu sabor e coloração. Isto se deve à presença dos compostos fenólicos, açúcares, ácidos orgânicos, vitaminas, pectina, entre outros (CATHARINO et al, 2006).

Na casca da uva estão presentes metabólitos secundários como antocianinas (cianidina, peonidina, entre outros), flavonóis, estilbenos (resveratrol) e os ácidos orgânicos (ácidos tartárico, málico, cítrico). Nas sementes estão principalmente os flavonóis (taninos, catequina, epicatequina, entre outros) (FULEKI et al, 2003; KOYAMA et al, 2007) e nelas também há grande quantidade de fibra e óleo. Na polpa da uva, os principais compostos são constituintes fenólicos (CHEYNIER, 2005).

Quando sucos tintos são produzidos, a polpa é aquecida juntamente com a casca e a semente, o que resulta em maior incorporação de compostos fenólicos ao mesmo (FULEKI et al, 2003) se comparados aos sucos brancos, e ainda num maior valor calórico devido aos carboidratos (DANI et al, 2007).

Os compostos fenólicos são muito importantes para a enologia, pois estão relacionados à qualidade de sucos e vinhos, especialmente à sua cor e adstringência, e também possuem importância nutricional e farmacológica (RIBERÉAU-GAYON et al, 2003). Os principais compostos fenólicos no suco de uva são os ácidos hidroxibenzoicos (ácidos gálico, sinápico), os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos coumárico, cafeico, ferúlico), os estilbenos (resveratrol), os flavanóis (catequinas), os flavonóis (kaempferol, quercetina) (MANACH et al, 2004) e as antocianinas (cianidina, petunidina, malvidina, delphinidina, peonidina). Estas últimas são associadas às colorações rosa, vermelha, azul e violeta de diversas flores, folhas e frutas (WANG et al, 2003). MORRIS e colaboradores (1986) indicam que a cor tinta/violácea e a qualidade do suco de uva estão relacionadas com a composição das antocininas obtidas durante todo o processo de elaboração da bebida. Na Tabela 11 estão as estruturas químicas de alguns compostos fenólicos.

Tabela 11. Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos: ácidos hidroxibenzoicos - ácido gálico e ácido sinápico, estilbeno – resveratrol e ácido hidroxicinâmico – ácido cafeico.



O resveratrol é um produto do metabolismo das plantas e possui várias ações biológicas: antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, e é sintetizado pela videira para prevenir os ataques de fungos (SAUTTER et al, 2005).

Diversas técnicas já foram aplicadas para analisar compostos não-voláteis em uvas, vinhos e sucos de uvas. CATHARINO e colaboradores (2006) analisaram amostras de mosto provenientes de seis variedades de uvas cultivadas no Brasil (*V. vinifera*: cv. Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, e *V. Labrusca*: cv. Isabel, Bordô), de procedência do Rio Grande do Sul, durante a fermentação para obtenção do vinho. Foram analisados fenóis, flavonóides, e açúcares por espectrometria de massas por ionização com *electrospray* e analisador tempo de voo (ESI-TOF/MS). Com a associação à análise quimiométrica, foi possível agrupar os vinhos (*m/z* diagnósticos: 439, 559) e os mostos (*m/z* diagnósticos: 277, 313, 329, 359, 457, 539, 704, 794), sendo diferenciados principalmente pelo °Brix (°Bx).

NASI e colaboradores (2008) analisaram sucos de uva cv. italiana Falanghina (*V. vinifera*), usando cromatografia líquida e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e analisador quadrupolo (CL/ESI-MS, em modo negativo) para detectar marcadores de tipicidade e autenticidade, e observaram principalmente terpenos glicosilados, como o linalil-glicosídeo, geranil-glicosídeo, linalil-arabinosil-glicosídeo, entre outros. Utilizaram na CL uma coluna C18 e fase móvel em gradiente de 5 % de acetonitrila (0,2 % ácido fórmico, tampão A) e 95 % água (0,2 % ácido fórmico, tampão B). Foi realizada uma extração em fase sólida usando C18 para reduzir os interferentes, sem comprometer a detecção dos terpenos glicosilados que se apresentam em baixa concentração nas uvas.

WANG e colaboradores (2003) analisaram antocianinas em sucos de uvas de uvas Concord (*V. labrusca*), Rubired (híbrido da espécie *V. labrusca*) e Salvador (híbrido da espécie *V. rupestris*) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

com detecção por arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (CLAE-DAD/ESI-MS). TIAN e colaboradores (2005) utilizaram CLAE-ESI-MS/MS para análise de antocianinas em frutas do tipo “*berries*”, entre elas uvas da cultivar Rubired (*V. vinifera*). O grupo utilizou *cleanup* com EFS C18, e uma coluna analítica de C18, gradiente de fase móvel 100 % A (10 % ácido fórmico) e 20 % B (acetonitrila) por 13 min, seguido de 30 % de B por 7 min e retorno a 100 % de A por 5 min, com fluxo de 1 mL min⁻¹. Foi empregado detector com arranjo de fotodiodo (Photodiode Array Detector - PDA) na faixa de 200 – 600 nm.

O uso de equipamentos com tecnologia avançada promovem um diferencial nas pesquisas e leva a resultados mais precisos e confiáveis. O equipamento QExactive (Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer) da Thermo Electron Corporation (San Jose, CA), por exemplo, possui alto poder de resolução (140.000) e excelente exatidão de massa (até a quinta casa decimal), reduzindo significativamente falsas identificações (PERRY et al, 2008).

O analisador Orbitrap foi desenvolvido por Kingdon no início dos anos 1920 (KINGDON, 1973) e é constituído por um fino fio central e um eletrodo exterior cilíndrico. A tensão aplicada em um potencial possui resultados estáticos na forma logarítmica radial entre os eletrodos. Em 1981, Knight introduziu um eletrodo externo modificado, que incluiu um termo de quadrupolo axial que limita os íons no eixo-armadilha (KNIGHT, 1981), porém não era produzido para espectros de massa. No final da década de 1990, MAKAROV e colaboradores (2006a) começou uma sequência de melhorias tecnológicas que resultou, em 2005, no lançamento comercial do analisador híbrido QExactive pela Thermo Fisher Scientific (MAKAROV et al, 2006b).

No analisador Quadrupolo-Orbitrap, o eletrodo na forma de barril (como exterior) e o eletrodo fusiforme (coaxial no interior) capturam e selecionam os íons, no quadrupolo, e esses, por sua vez, realizam um movimento orbital em torno do eixo, como se pode observar na Figura 16. A imagem dos íons aprisionados é detectada e convertida para o espectro de massas usando a transformada de Fourier do sinal de frequência (RICHARD et al, 2008).

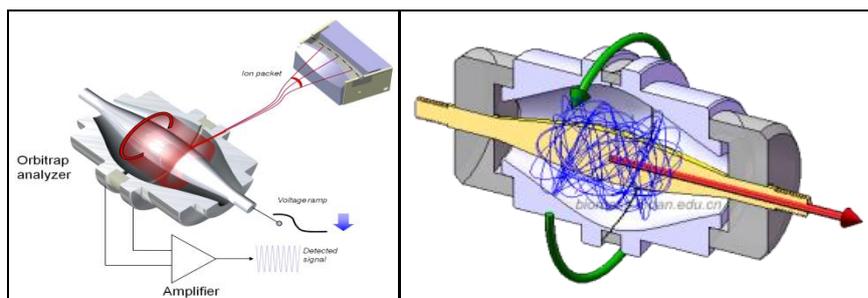


Figura 16. Visualização do interior do Orbitrap, onde os íons são aprisionados e realizam um movimento orbital em torno do eixo (FONTE: MAKAROV, 2006a).

Segundo RICHARD e colaboradores (2008), o funcionamento do Quadrupolo-Orbitrap ocorre da seguinte maneira: os íons ficam presos devido à atração eletrostática do eletrodo interno que é equilibrada por forças centrífugas, desta forma os íons que giram ao redor do eletrodo interno promovem trajetórias elípticas, ou seja, órbitas. Além disso, os íons também se movem para trás e para frente ao longo do eixo do eletrodo central, portanto, suas trajetórias no espaço se assemelham a hélices. O movimento axial é harmônico, ou seja, é totalmente independente do movimento em torno do eletrodo interno, como também de todos os parâmetros iniciais de íons, com exceção da relação massa/carga (m/z). A fim de empacotar os íons, o campo elétrico entre os eletrodos é reduzido a partir de uma fonte externa, então estes pacotes são injetados tangencialmente para o campo elétrico, que é aumentado para elevar a tensão no eletrodo interno. Desta forma, os íons ficam mais juntos no eletrodo interno até atingirem a órbita desejada dentro do barril, quando o campo torna-se estático e a detecção começa. Cada pacote contém um número grande de íons que estão com velocidades diferentes e que estão distribuídos ao longo de um determinado volume. Logo, eles irão se mover com diferentes frequências de rotação, porém com a mesma frequência axial, o que proporciona que íons de uma determinada m/z se espalhem pelos anéis ao longo do eixo interno. O espectrômetro de massas Quadrupolo-Orbitrap utiliza-se de uma curva linear para a injeção desses íons, que faz com que os íons desacelerem rapidamente. As oscilações axiais dos íons nos anéis são detectadas pela corrente induzida no eletrodo exterior, o qual é dividido em dois sensores de captação simétricos ligados a um amplificador diferencial. O processamento dos dados é semelhante ao utilizado na Espectrometria de Massa com transformada de Fourier de íons de ressonância ciclotrônica (FT-ICR/MS), utilizado como um analisador de massa, onde todos os íons são detectados simultaneamente durante um período de

tempo determinado e a resolução pode ser melhorada pelo aumento da força do campo ou do aumento da duração de detecção. O Quadrupolo-Orbitrap difere do FT-ICR/MS por ausência de campo magnético, o que diminui significativamente o poder de resolução com o aumento da m/z (MAKAROV et al, 2006a; MAKAROV et al, 2006b). Na Figura 17 está esquematizado o equipamento QExactive e uma foto do equipamento utilizado neste trabalho com foco nos constituintes não-voláteis, que se encontra no Laboratório LBCD - LADETEC/IQ - UFRJ, sob a supervisão do professor Henrique Marcelo Gualberto Pereira.

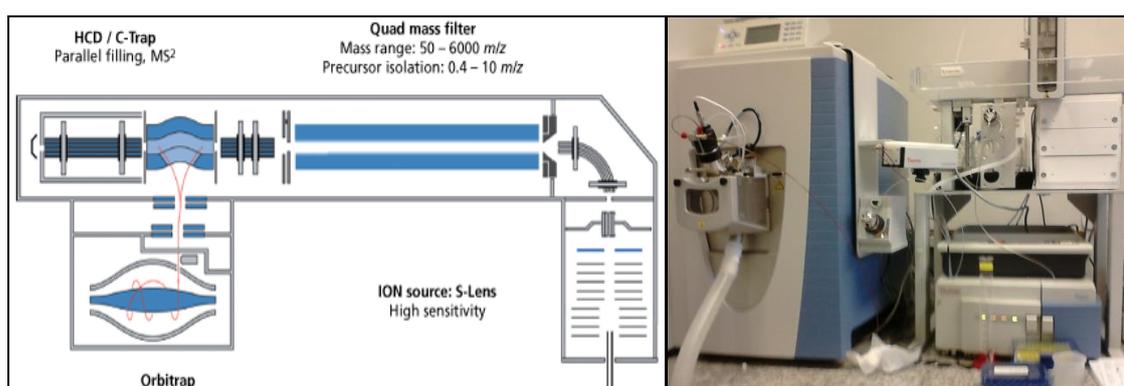


Figura 17. Esquemática do QExactive e foto do equipamento do LBCD - LADETEC/IQ – UFRJ.

O objetivo deste trabalho foi investigar a composição não-volátil dos sucos de uva integrais brasileiros, utilizando o QExactive, e investigar as diferenças e semelhanças entre os mesmos utilizando-se da análise dos componentes principais (ACP), relacionando-os com os compostos não-voláteis identificados.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

3.2.1.1 Padrões e Reagentes

Os solventes utilizados foram: acetona, metanol e solução de NH_4OH (concentração 1 mg L^{-1}), adquiridos da Tedia Brasil. Para *cleanup* dos sucos foi utilizado cartucho EFS Florisil (marca J. T. Baker[®], lote P2044A1, USA), contendo 100 mg de adsorvente/cartucho. Filtros Millipore[®] (Membrana Fluoropore em PTFE, Estéril, $0,2 \mu\text{m}$ de Poro, 25 mm, Corpo em PE, lote JBRFGS25P).

3.2.1.2 Amostras

Trinta e três sucos de uva comerciais e experimentais, todos da safra 2012 foram analisados, sendo que os comerciais foram adquiridos em supermercados de Niterói – RJ (Brasil) e os experimentais foram obtidos de empresas parceiras, cuja relação encontra-se na Tabela 2 (Capítulo 2).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Condições de Análise

Foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução QExactive (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemanha) como ionização por *electrospray* (ESI) com modo de aquisição negativo e positivo concomitantemente (um diferencial deste equipamento). A aquisição foi realizada no modo *Full MS* em resolução de 140.000, AGC *target* de 10^6 , tempo máximo de injeção de 200 ms e intervalo de *m/z* de 50 a 750.

A amostra foi injetada em um sistema Accela 1250 Pump acoplado a um injetor automático Accela Open (*Thermo Scientific*, San Jose, EUA). Vinte microlitros de amostra foram injetados em coluna C18 *Thermo Scientific* (2.1x 50mm, 1.9 μ m). A corrida cromatográfica seguiu um fluxo constante de 50 μ L min^{-1} . Foi adotado um sistema isocrático com 100% de acetonitrila. O tempo total de corrida foi de 5 min. A sequência de corridas e configurações foram controladas pelo *software* Xcalibur™, o tratamento dos dados também foi realizado neste *software*.

3.2.2.2 Preparo dos extratos dos sucos para injeção no QExactive

Para o preparo dos extratos dos sucos utilizaram-se 2 mL de suco de uva. O cartucho de EFS Florisil foi acondicionado com 1 mL de acetona, e em seguida foi adicionado o suco de uva, que foi eluído com 2 mL de metanol. O eluato foi levado à secura sob fluxo de N_2 , e então ressuspendido com 2 mL de metanol.

Paralelamente, preparou-se uma solução-estoque de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$, utilizando 3 mL de água destilada, 7 mL de metanol e 3 gotas de NH_4OH (solução 1 %).

Do extrato de suco, retirou-se uma alíquota de 50 μ L, ao qual se adicionou 950 μ L da solução de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$. Este novo extrato passou por filtro de 0,2 μ m Millipore®, e então foi recolhido em um *vial* apropriado para injeção no

QExactive. Foram injetados 20 μL da amostra final, e utilizado fluxo de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ e injeção automática. Procedeu-se todos os procedimentos supracitados para os 33 sucos em triplicata de extração.

3.2.2.3 Tratamento dos dados

Para o tratamento dos dados fez-se primeiramente uma busca na literatura e montou-se uma tabela-referência com informações dos compostos não-voláteis, como m/z , tipo de equipamento e principais fragmentos para uvas e seus derivados. Logo após, realizou-se a análise de cada suco utilizando o *software* XcaliburTM que forneceu o espectros ESI-MS, com valores de m/z experimental ($m/z_{\text{exp.}}$) com cinco casas decimais, obtendo-se a abundância da área relativa desses íons. Em seguida, foram realizadas comparações das informações da tabela-referência com os valores obtidos pelo *software* XcaliburTM. A verificação da razão massa/carga teórica ($m/z_{\text{teor.}}$) foi obtida no próprio *software* através da fórmula molecular da substância identificada, e assim foi realizado o cálculo do erro, em ppm, segundo a fórmula abaixo (IGLESIAS, 2012):

$$\text{Cálculo E(ppm)} = |(m/z_{\text{exp.}} - m/z_{\text{teor.}})/(m/z_{\text{exp.}})| \times 10^6$$

Com os valores de área obtidos no tratamento dos dados das injeções no QExactive foi possível fazer a ACP dos compostos não-voláteis dos sucos de uva e tentar agrupá-los. Para fazer o ACP foi utilizado o programa *SPSS_17 Statistics*.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante ressaltar que até o presente momento não há trabalhos publicados utilizando a técnica de QExactive em sucos de uva, por ser uma técnica de análise ainda muito recente. Análises anteriores levaram ao estudo de antocianinas, como de FRAIGE e colaboradores (2014), em uvas cv. Shiraz, Cabernet Sauvignon, Merlot e Máximo (*V. vinifera*) usando LC-ESI-MS/MS, e pelo grupo de HUANG (2009) em uvas Muscadine (*V. rotundifolia*) em HPLC-ESI-MS. PERESTRELO e colaboradores (2012) analisaram o perfil fenólico da uva cv. Tinta Negra e Sercial (*V. vinifera*) utilizando HPLC-DAD-ESI-MS, assim como o grupo de BARCIA (2014) analisando as cultivares híbridas (*V. vinifera* com *V. labrusca*) brasileiras BRS Violeta (tinta) and BRS Lorena (branca) utilizando a mesma técnica.

Neste trabalho, inicialmente testou-se para *clean-up* da amostra dois tipos de cartuchos EFS, o C18 e o Florisil. O primeiro, devido a alguns trabalhos semelhantes na literatura mencionarem o uso de C18 (NASI et al, 2008; TIAN et al, 2005), e o segundo, por já ter sido utilizado no Laboratório de Aromas em algumas matrizes e ter apresentado bons resultados (ALVES et al, 2012; ALVES et al, 2014; MARTINELLI, 2014) perante o *cleanup* e a pré-concentração eficientes em matrizes alimentares (LANÇAS, 2014)

Após o teste com ambos os cartuchos de extração, constatou-se que o Florisil foi o melhor para a retirada dos interferentes. Observou-se que a extração com cartucho C18 deixou o extrato ainda com corante, com tom rosado, sendo assim, escolhido o cartucho EFS Florisil. FRAIGE e colaboradores (2014) analisando uvas cv. Shiraz, Cabernet Sauvignon, Merlot e Máximo (*V. vinifera*) utilizadas para produção de vinho, com foco nas antocianinas, relatam que a cor intensa das uvas tintas é proveniente da casca e do mosto.

Os extratos de suco de uva integral, extraídos com EFS Florisil, foram filtrados em filtro 0,2 μm Millipore[®], para a retirada de possíveis resíduos insolúveis presentes no extrato, uma vez que estes podem entupir a seringa de injeção e prejudicar o funcionamento do QExactive (MAKAROV et al, 2006a). Vinte microlitros de cada extrato (33 sucos de uva em triplicata de extração) foram injetados no QExactive.

Os dados foram tratados utilizando do *software* Xcalibur[™], obtendo-se um perfil dos compostos não-voláteis dos sucos (Tabela 2) com massas exatas (5 casas decimais obtido pela análise no QExactive). Na Tabela 12 estão os valores de m/z com cinco casas decimais, além do erro E(ppm) relativo à razão massa/carga experimental (m/z exp.) e teórica (m/z teor.), para verificação da confiabilidade da identificação dos mesmos. O erro indica quanto os valores obtidos se destoaram dos "verdadeiros" valores de m/z (VALLE, 2012; EMEA, 1995). Para este tipo de equipamento, que possui alta resolução em massa exata, o erro deve ser inferior a 10 ppm (IGLESIAS, 2012). Como pode ser observado na Tabela 12, os valores de E (ppm) variaram de 0,42 a 8,06 ppm, e assim foram considerados satisfatórios.

Tabela 12. Proposta dos compostos não-voláteis presentes nos sucos de uva, fórmula molecular, m/z_{exp} (experimental) e $m/z_{\text{teor.}}$ (teórico), erro E (ppm) obtidos na análise por QExactive.

Substância	Fórmula	$m/z_{\text{exp.}}$	$m/z_{\text{teor.}}$	E (ppm)
ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	96,95871	96,95915	4,53
ácido tartárico	C ₄ H ₆ O ₆	149,00797	149,00789	0,54
ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	133,01296	133,01251	3,38
ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	191,01890	191,01795	4,97
ácido succínico	C ₄ H ₆ O ₄	117,01805	117,01756	4,18
ácido ascético	C ₂ H ₄ O ₂	59,01251	59,01258	1,18
ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	176,13380	176,13456	4,31
ácido <i>p</i> -coumarico	C ₉ H ₈ O ₃	165,09284	165,09277	0,42
ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,05851	180,05871	1,11
ácido quinico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,01890	191,01834	2,93
ácido <i>trans</i> -ferrárico	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	325,09284	325,09272	0,37
ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,03455	193,03536	4,19
ácido aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	134,01636	134,01696	4,47
ácido malônico	C ₃ H ₄ O ₄	102,97443	102,97391	5,05
ácido siringico	C ₉ H ₁₀ O ₅	199,80428	199,80370	2,90
ácido propionico	C ₃ H ₆ O ₂	72,99172	72,99201	3,97
ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	170,09014	170,09097	4,87
ácido cinâmico	C ₉ H ₈ O ₂	149,04439	149,04508	4,62
ácido carbônico	H ₂ CO ₃	59,91258	59,91296	6,34
ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	225,00701	225,00786	3,78
ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	168,98842	168,98855	0,77
ácido coutarico	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	295,06708	295,06781	2,47
ácido <i>trans</i> -caftárico	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	311,16867	311,16758	3,50
ácido <i>cis</i> -4-coumarico	C ₉ H ₈ O ₃	165,06708	165,06782	4,48
<i>L</i> - asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	133,04936	133,04961	1,88
<i>L</i> - glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	147,02875	147,02833	2,85
<i>L</i> - lisina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147,02875	147,02909	2,31
<i>L</i> - valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118,04082	118,04140	4,91
<i>D</i> - glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	179,05515	179,05484	1,73
<i>L</i> - prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	115,91945	115,91891	4,65
<i>L</i> - metionina	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	150,01137	150,01150	1,13
<i>L</i> - tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182,08775	182,08694	4,45
<i>L</i> - leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,36670	132,36605	4,91
<i>L</i> -triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,03484	205,03498	0,68
<i>L</i> - arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175,06026	175,06101	4,28
4- <i>O</i> -cafeoilquinico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,08800	353,08825	0,71
5- <i>O</i> -cafeoilquinico	C ₂₄ H ₃₂ O ₈	447,03959	447,03920	0,87
resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,99380	228,99310	3,06
pteroestilbeno	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	254,91680	254,91555	5,45
apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,08773	269,08827	2,01
catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,08415	290,08491	2,62
coniferina	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	341,10898	341,10876	0,65
<i>p</i> -coumarato de etila	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	191,01890	191,01736	8,06
galato de metila	C ₈ H ₈ O ₅	182,98779	182,98662	6,39
malonato de dietila	C ₇ H ₁₂ O ₄	160,07445	160,07533	5,49
tirosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	136,99571	136,99503	4,96
manitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	181,07084	181,07147	3,48

Na Tabela 13 encontram-se os valores da abundância (média da triplicata, $n = 3$) das substâncias propostas, presentes nos sucos de uva trabalhados. Os valores dos coeficientes de variação (CV %) encontram-se no Apêndice B, os quais variaram de 0,8 a 6,8 %, apresentando baixa dispersão dos valores, uma vez que até 15 % é considerado aceitável quando se trata de matrizes complexas (EMEA, 1995).

Tabela 13. Valores da abundância (média da triplicata, n = 3) de cada substância identificada nos sucos de uva.

Substâncias	Abundância										
	AL	AM	AU	CB	SA_chard_B	CL	CM	CM_B	SA_coraB	SA_coraFM	SA_coraM
acido fosforico	230813813	430221206	40943917	138344603	167531059	11464848	18067475	419484011	26673168	107387797	82846949
acido tartarico	74812156	358513087	13752693	45103386	21757269	1691592	3291786	15448307	5345973	8838098	24886112
acido acetico	8053655	11369508	2974453	7006471	5937977	120083	217508	22947987	538784	5475400	4509861
acido carbonico	0	0	0	372419	9321	991014	0	0	0	0	0
acido citrico	32252173	35373422	11051592	5715724	8002452	571626	688940	98314206	447482	3855189	3637326
acido succinico	5685627	4105379	3433648	6531138	225957467	47951	55231	26371164	0	4523560	8079073
ácido propiônico	3090387	8207062	1838140	5434553	23530050	38046	47170	17028964	253032	4527367	0
acido ascorbico	0	5401970	4807276	8569936	26191359	311271	336749	32331536	647841	7381285	6645177
acido málico	305883547	369590109	80808147	66425671	322354471	3810513	5395816	1104118571	4316080	472534144	423808939
acido p-coumarico	26965278	14968433	1506449	8118461	3345956	301648	387093	60584192	210990	7958317	8784069
acido cafeico	57260023	32773630	23420764	31022858	11248693	1568970	1757069	9734591	3340108	2544323	36019515
acido quínico	10035752	13491333	1634567	5257515	3627675	114120	141520	11448911	517482	3855187	3637326
acido trans-fertarico	41033746	18841558	18187104	13500739	34874363	1306089	3291786	97261560	231273	7958317	7993997
acido ferúlico	32611524	199617065	1189199	10021397	35054535	1306089	3291786	97261560	259270	5239462	6769441
ácido aspártico	11041352	15516039	3398724	15603690	18321619	583737	811925	47283544	0	20248509	18094089
ácido malônico	2919926	4746021	1497327	4134408	66103	516548	620494	9856977	0	0	0
acido siringico	61815	0	0	0	14591	0	20968	0	0	0	0
acido cinâmico	0	0	666345	34283176	6151864	623810	3291786	15448307	5345974	2842512	24896427
acido sinapico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3775766	0
acido galico	0	0	3204145	158949	0	0	0	10690618	0	2556781	3952286
acido coutárico	29891027	5103748	1481624	7179726	34879869	1691592	3291786	21722682	5192633	8838098	0
ácido trans-caftárico	35131	1456627	21082	7527804	15839	0	28614	152536715	0	0	0
ácido cis-4-coumarico	35620398	9329658	1509930	6194974	12742164	331047	378117	21722682	669940	4908936	4514726
L- asparagina	266874926	369590109	82367300	5790391	148987665	2872764	3531311	9084208	4316080	3359228	3012906
L- glutamina	17548954	0	0	8227130	4876680	179648	471633	42437395	944657	9862785	10449571
L- lisina	3292216	0	0	2987561	4876680	0	0	0	0	0	0
L- valina	6888608	10689065	2591850	1602490	9749920	746626	95665	14967783	858060	4856160	3765114
D- glucose	50577076	64195411	23420765	31022858	19588487	1568970	1757069	152536715	3340108	4053166	34250005
L- prolina	161924	1555375	1853505	2511353	3485933	764326	950483	9084208	0	3359228	3012906
L- metionina	217990300	6774985	23941	177999	4896906	1416833	2594007	12203662	226453	0	0
L- tirosina	75590	137678	93105,33	0	29145	618761	260206	0	0	0	0
L- arginina	0	0	0	0	7124987	0	0	0	0	0	0
L- leucina	0	0	32010,67	180864	0	243887	123615	0	0	0	6084275
L- triptofano	0	0	0	2450051	0	0	0	0	0	3330285	2892451
4- O-cafeoilquinico	0	0	0	0	0	0	0	0	1327427	0	0
5- O-cafeoilquinico	1867594	0	1684792	2594656	10563927	141327	0	11127292	0	0	24886112
resveratrol	0	0	9781,333	0	0	230230	347036	0	269733	0	0
pteroestilbeno	0	0	0	772337	29253	0	131885	0	0	0	0
apigenina	0	0	5282,667	0	0	47951	55232	26371164	432953	4523560	0
catequina	0	0	6275	2450051	0	1568970	1431070	152536715	3340108	40531371	0
coniferina	0	0	0	0	5846869	0	0	0	255312	0	0
malonato de dietila	15716076	18375607	6259354	11908245	38713279	813377	1130448	40465699	1339151	9101858	9316329
p-coumarato de etila	6589016	4154444	1683249	5715724	3494877	114120	141521	9581838	447482	3855233	3637326
galato de metila	75590	1827184	101775,7	0	29145	766634	652375	0	0	0	3848466
tirosol	0	0	0	0	2029118	238748	191790	28578511	669940	7196871	0

Continuação. Tabela 13.

Substâncias	Abundância										
	DC	DG	EP	GA	GB	GD	GD_B	SA_isaB	SA_isaM	SA_ita_B	SA_mosc_B
			15299463								
acido fosforico	2377009	131323179	5	807372	92878325	114270976	76364384	455333	455333	151544928	112767179
acido tartarico	662411	1987336	64257531	10723560	17649921	26465027	1671565	67926	67926	56183579	47190107
acido málico	769705	413738923	3975763	6217445	5087845	396927616	42687773	263769	263769	340287616	174503872
acido carbonico	0	0	405857	192165	0	1992992	0	610473	606356	0	0
ácido propiônico	0	3999014	4063460	291200	5050650	4485868	1499551	0	0	4090787	0
acido citrico	235023	4838529	3258470	302300	5908676	4904763	7525249	1319176	1319176	2764987	1916775
acido succinico	0	6572141	2693475	259896	13085773	5123049	2118760	48891	48891	2024844	1982805
acido acetico	68518	4380021	6831575	472906	7526071	6171544	2514884	0	0	5679775	3869384
acido ascorbico	124952	5859413	8414148	493221	10429829	9288212	3245652	11863	11863	7283019	5224982
acido <i>p</i> -coumarico	106480	5599480	10408506	489542	14609703	6047141	1976003	9378	9378	6322637	1566968
acido cafeico	144647	27208619	2739072	2277777	3161246	2722423	1051898	63336	63336	2421675	1640284
acido quinico	0	4838529	3258470	302300	6198166	4904763	7525249	12771	12771	8062391	1916775
acido <i>trans</i> -ferritico	662411	21750016	2692126	543098	61124549	9940201	9695183	9378	9378	3229249	47190107
ácido ferúlico	0	21750016	2692126	10723560	61124549	24203533	9695183	67926	67926	3229249	47190107
ácido malonico	141283	2278608	0	266756	5210837	0	1006829	92136	92136	0	0
ácido aspártico	244485	17296912	10194731	261360	8950100	17092620	1823244	10971	10971	14669603	7360421
acido galico	0	2919176	2431022	406049	6794092	3743760	1195370	10357	0	1916834	0
ácido cinâmico	376942	4085792	64257531	10723560	17649921	5207389	1671565	32555	203779	3820513	0
ácido coutarico	0	4183995	2712553	10723560	4831524	5431589	790443	67926	67926	2034055	2509734
ácido sinapico	0	0	0	200523	3990226	0	0	250070	27742	0	1388068
ácido vanílico	0	0	0	0	0	0	0	11896	0	0	0
ácido <i>trans</i> -caftárico	0	2314819	0	0	0	0	0	9157	9157	0	0
ácido <i>cis</i> -4-coumarico	0	4790289	2712553	489542	9000172	6648357	3288353	14854	14854	2034055	2845111
<i>L</i> -asparagina	769705	3029160	3975763	419970	5087845	2878338	42687773	263769	263769	2433561	1246847
<i>L</i> -glutamina	217945	1987336	11090287	914980	4024860	12036597	4694900	15681	15681	10507706	7259035
<i>L</i> -lisina	0	1987336	0	3185544	4024860	0	0	0	0	0	0
<i>L</i> -valina	343308	5689325	0	0	3820176	7565829	0	0	0	0	0
<i>D</i> -glucose	608718	27208619	42661813	2277777	48718539	42728064	1600628	63336	63336	37539107	25517859
<i>L</i> -prolina	244485	3029160	0	419970	0	2878338	0	81212	81212	2433561	1246847
<i>L</i> -metionina	769705	2407480	2639389	453839	4024860	0	1408591	263769	263769	2360311	1972543
<i>L</i> -triptofano	0	0	0	0	0	2551931	837470	0	3159971	0	0
5- <i>O</i> -cafeoilquinico	68484	2848294	0	0	6352601	2826798	793790	0	0	0	0
resveratrol	125638	0	0	0	0	0	0	10774	77575	106996	4743540
pteroestilbeno	222480	0	513627	0	0	0	0	0	0	0	2270503
apigenina	0	6572141	0	0	0	0	910535	10905	0	2024844	0
catequina	0	27208619	42661813	0	0	0	0	13935	0	0	1342361
galato de metila	258839	0	0	0	0	0	0	86438	86438	0	0
<i>p</i> -coumarato de etila	0	4838529	3258470	302300	7200135	4904763	7525249	12771	12771	2764987	1916775
malonato de dietila	528738	8207656	11532785	1811111	13559384	13798979	4564038	18298	18298	9937167	7361931
tirosol	80596	5689325	7541499	3219157	9000172	1992992	3288353	22289	74730	7038343	47190107

Continuação. Tabela 13.

Substâncias	Abundância										
	MT	MV	PE	PE_B	PG	PZ	SB	SI	SN	SP	UV
ácido fosforico	3033854	1138737	184025749	177958869	177748256	63297973	67071515	57296629	116386389	10019937	115049611
ácido tartarico	914456	298125	96171787	72375936	37895027	5399938	27625355	18412580	41240088	3096804	64839659
ácido carbonico	932515	944128	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ácido málico	991862	422803	198159253	285889365	277166144	368019627	186771563	184048917	291749376	341605	528537771
ácido cítrico	3805974	4074804	3124237	3763986	3891735	7953394	4681777	3894881	2252231	135117	8546573
ácido propiônico	0	0	3951093	4672309	4285667	4231042	3317781	2960383	3838674	0	1370489
ácido succínico	0	0	1998265	6114095	2973377	9452278	6046972	6812175	4604826	0	2504162
ácido acético	83581	0	6241681	6642979	6458445	4638100	5295985	4647222	5037321	1878154	2888867
ácido ascorbico	162695	79457	7402505	8925659	8501401	6955626	7708847	7690043	6195705	328672	3702139
ácido p-coumarico	129163	88675	7586214	4632301	8831130	7397462	10350829	6318167	8242679	197307	4098121
ácido cafeico	777609	370371	2356799	2672777	2683612	32593789	2497447	2488608	28262064	1663706	16481816
ácido quínico	0	0	3124237	3763986	3891735	7953394	4681777	3894881	2252231	135117	8546573
ácido trans-fertarico	914456	298125	12428217	17069745	13505741	52561109	27625355	8172225	34349021	0	3259906
ácido ferúlico	914456	298125	10676113	17069745	13505741	52561109	29604307	22462179	34349021	368695	3259906
ácido aspártico	295022	191065	8346379	12058475	11947383	15514704	7876605	7873202	12450143	145060	22370472
ácido malônico	139379	168071	0	2341647	0	4571289	2736668	2642827	2833114	0	1643435
ácido sinápico	0	0	0	0	0	25139100	0	0	0	132293	0
ácido gálico	0	0	2630850	8162487	7339621	1282100	3439912	3956927	3694896	0	1533940
ácido cinâmico	914456	894376	96171787	217127808	113685080	72178744	27625355	4795871	41240088	3096804	1839578
ácido siringico	0	0	0	3465944	0	0	0	0	0	0	0
ácido coutarico	914457	298125	2389681	3607901	4946112	8262047	5004696	5332045	4458329	3096804	3640168
ácido cis-4-coumarico	169189	74759	3557768	3607901	2061028	8262047	5004696	2247115	5414800	341605	3640168
ácido trans-caftárico	0	0	0	0	2418178	4806616	0	2602746	0	0	2239860
L-asparagina	295022	422803	2301950	3141138	6929336	5615338	4788938	4722295	2142257	860431	3968917
L-glutamina	284130	137225	9990540	12073644	11437400	9308720	1899780	2155490	3198546	539905	1421170
L-lisina	0	0	0	0	0	0	1899780	2155490	3198546	0	1421170
L-valina	0	0	0	11383625	0	0	0	0	0	0	0
D-glucose	777609	370371	2050079	41352685	42376832	32593789	38809773	38307792	28262064	1663706	16481816
L-prolina	295022	191065	0	3141138	0	0	0	0	2142257	0	3968917
L-metionina	991862	422803	3983560	3046702	0	0	1899780	2155490	3198546	128440	2714894
L-arginina	0	0	0	0	0	17626078	0	0	0	0	0
L-leucina	0	142741	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-triptofano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2548352
5-O-cafeoilquinico	0	62800	0	0	0	6353685	1993212	3907728	2457629	0	1450526
resveratrol	116529	279984	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pteroestilbeno	0	219638	0	0	227972	0	0	0	0	188156	0
apigenina	0	0	1998265	18342284	8920131	28356834	0	12425655	4604826	138856	0
catequina	777609	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
malonato de dietila	635731	362862	10445617	11192249	11133893	9980141	10151768	11189041	8639457	1023376	5722007
p-coumarato de etila	0	0	3124237	3763986	3891735	7953394	4681777	3894881	2252231	135117	8546573
galato de metila	242031	270660	0	0	0	0	0	0	0	229748	0
manitol	0	0	0	0	0	0	2107657	0	0	0	0
tirosol	557983	224279	6422621	22898894	23153564	17300734	7193702	6634847	5414800	0	0

Os termos AL, AU etc. são os códigos referentes aos sucos de uva. Os valores de abundância referem-se às médias das áreas relativas das triplicatas de extração.

Observa-se que em todos os sucos foram identificados o ácido fosfórico, e os ácidos tartárico, málico, cítrico e ascórbico (exceção do suco AL), já mencionados em uvas híbridas (*V. vinifera* com *V. labrusca*) para elaboração de vinhos (BIASOTO et al, 2010).

Os outros compostos, dentre ácidos fenólicos e aminoácidos, foram variáveis entre os sucos. O pterostilbeno, encontrado nos sucos comerciais CB, CM, DC, EP, MV, PG e SP, e nos experimentais SA_chard_B e SA_mosc_B, é um estilbeno, e assim como o resveratrol é produzido pelas uvas para o combate a fungos e vírus; nos animais tem propriedades antiinflamatórias e antioxidante (LANGCAKE & PRYCE, 1997).

O ácido clorogênico (ACG), aqui representado pelo ácido 4-O-cafeoilquinico, o mais comumente observado na natureza, foi identificado apenas no suco experimental SA_coraB e trata-se de um éster polifenólico encontrado em vegetais e frutas, principalmente no café; o ACG 5-O-cafeoilquinico já foi observado em dezoito tipos de sucos, sendo observado principalmente em frutas. OLIVEIRA e colaboradores (2014) observaram ácido cafeoilquinico em sucos de uva cv Concord (*V. labrusca*) produzidos em Farroupilha –RS. O ACG atua em diversos sistemas biológicos, nas atividades anti-mutagênica, antitumoral, no controle da obesidade, analgésica, antipirética, ansiolítica, anti-microbicida, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiinflamatória e anti-angiogênica (FARSKY, 2013).

O ácido sinápico é derivado do ácido cinâmico e possui atividade antioxidante, assim como o ácido vanílico, que é derivado do ácido benzóico (RAMALHO & JORGE, 2006), sendo encontrados respectivamente nos sucos SA_coraFM, GA, GB, SA_isaB, SA_isaM, SA_mosc_B, PZ, SP).

O manitol, por sua vez, é um açúcar obtido da frutose, possui atividade diurética e é utilizado em alimentos dietéticos (CRUZ et al, 2004). Pode ser utilizado como adoçante, e foi identificado apenas no suco SB, um suco orgânico e comercial.

Os estilbenos, pterostilbeno e resveratrol, já foram identificados em uvas brasileiras cv Concord (OLIVEIRA et al, 2014), os ácidos fenólicos ferúlico e cafeico em uvas híbridas (*V. vinifera* com *V. labrusca*) de variadas cultivares (BIASOTO et al, 2010), assim como alguns sucos deste trabalho.

O *L*-triptofano é um aminoácido que auxilia na síntese da serotonina e está associado ao bem-estar, sendo importante no tratamento e prevenção da depressão, ansiedade e até auxiliar no processo de emagrecimento, e pode ser

encontrado em alguns alimentos (ZANIN, 2014). Neste estudo foi observado nos sucos GD, GD_B, SA_isaM, CB, SA_coraFM, SA_coraM e UV. Outro aminoácido, a *L*-arginina, foi identificada nos sucos PZ e SA_chard_B, sendo responsável pela cicatrização de feridas, antitumoral, e combinada com a lisina, reduzem a ansiedade. Outro aminoácido, a *L*-tirosina, ajuda na produção de outros hormônios, que melhoram o estado de alerta e a alegria (CORREIA & QUIRINO, 2014), observada nos sucos AL, AM, AU, SA_chard_B, CL e CM.

Não foram observadas antocianinas, o que parece ter sido decorrente das etapas de *cleanup* com EFS Florisil. No entanto, como já comentado anteriormente, não há metodologias bem estabelecidas utilizando o QExactive e, devido a sua alta sensibilidade e pelo fato do equipamento utilizado ser empregado em análise de doping, optou-se por um clean-up bastante efetivo a fim de evitar futuros problemas de contaminação.

Na Tabela 14 encontram-se os códigos dos compostos na análise dos componentes principais (ACP), cuja área encontra-se descrita na Tabela 13. Alguns compostos estão ausentes pelos valores não significativos na separação pelo ACP.

Tabela 14. Substâncias com seus respectivos códigos para análise dos componentes principais (ACP).

Substância	Código para ACP	Substância	Código para ACP
acido fosfórico	C1	<i>L</i> - lisina	C22
acido tartárico	C2	<i>L</i> - valina	C23
acido málico	C3	<i>D</i> - glucose	C24
acido cítrico	C4	<i>L</i> - prolina	C32
acido succínico	C5	<i>L</i> - metionina	C33
acido acético	C7	<i>L</i> - tirosina	C34
acido ascórbico	C8	<i>L</i> - leucina	C40
ácido <i>p</i> -coumarico	C9	<i>L</i> -triptofano	C48
ácido cafeico	C12	<i>L</i> - arginina	C54
ácido quinico	C13	<i>L</i> - glutamina	C21
ácido <i>trans</i> -fetarico	C16	<i>L</i> - asparagina	C19
ácido ferúlico	C17	resveratrol	C44
ácido aspártico	C20	pteroestilbeno	C50
ácido malônico	C27	apigenina	C42
ácido siríngico	C31	catequina	C47
ácido propionico	C36	coniferina	C53
acido galico	C45	tirosol	C41
ácido cinâmico	C46	manitol	C56
acido carbônico	-	5- <i>O</i> -cafeoilquinico	C37
ácido sinápico	C59	4- <i>O</i> -cafeoilquinico	C58
ácido vanílico	-	galato de metila	C35
ácido coutarico	C39	malonato de dietila	C25
ácido <i>trans</i> -caftárico	C30	<i>p</i> -coumarato de etila	C18
ácido <i>cis</i> -4-coumarico	C28		

Sabendo-se que na ACP, com ênfase nos constituintes voláteis (vide seção 2.3.6. do Capítulo 2), não foi satisfatória quando se fez a análise com os sucos brancos e tintos juntos, resolveu-se então, fazer a ACP para os compostos não-voláteis para cada tipo de suco.

Na Figura 18 encontra-se a análise de componentes principais (ACP) para os sucos de uva tintos, onde se observa o gráfico de *scores* (A) dos sucos de uva e o gráfico de *loadings* (B) com os compostos químicos identificados. As duas componentes principais descrevem 73,7 %, promovendo melhor a separação e/ou agrupamento das amostras.

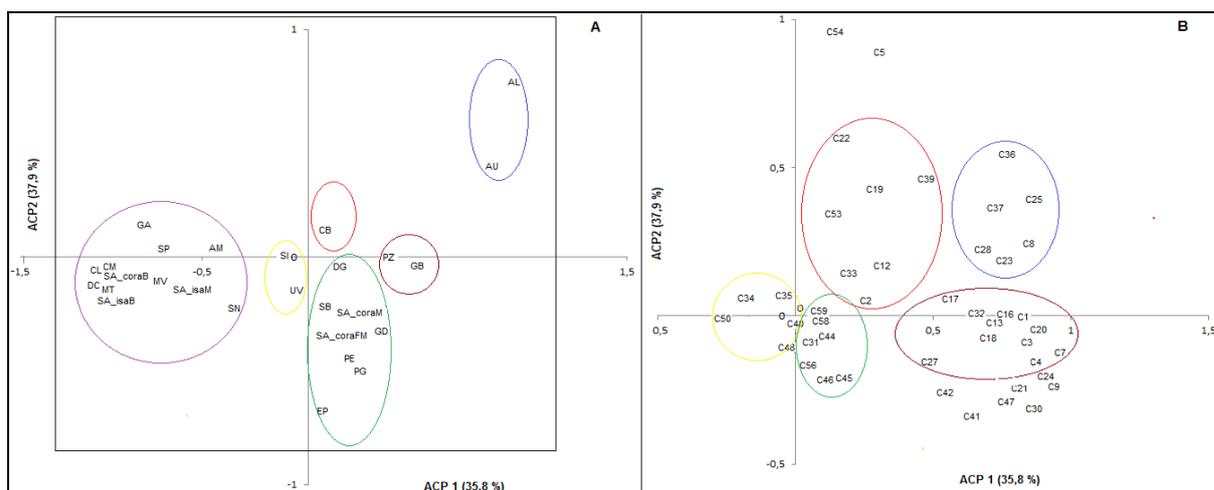


Figura 18. (A) Gráfico de *scores* dos sucos de uva tintos, (B) Gráfico de *loadings* com os compostos não-voláteis identificados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).

Os sucos SI e UV estão relacionados com os compostos C34 (*L*-tirosina), C35 (galato de metila), C40 (*L*-leucina), C48 (*L*-triptofano) e C50 (pterostilbeno), o que mostra que há maior quantidade destes compostos nestes sucos, conseguindo separá-los, mesmo que pouco dos demais sucos. O galato de metila é um composto fenólico encontrado no vinho e no gerânio (*Geranium niveum*) (CALZADA et al., 1999).

Pode-se observar no gráfico de *scores*, Figura 18A, que há um grupo de sucos à esquerda (marcado em roxo), sendo 3 sucos experimentais (SA) e 8 sucos comerciais. Nota-se que, no gráfico de *loadings*, Figura 18B, não há correlação direta com nenhuma substância. Esse fato informa que nenhuma substância da Tabela 14 foi eficaz para isolá-los.

Os sucos AL e AU apresentam correlação com os compostos C8 (ácido ascórbico), C23 (*L*-valina), C25 (malonato de dietila), C28 (*cis*-coumárico), C36 (ácido propiônico) e C37 (5-*O*-cafeoilquinico). Vale ressaltar que o ácido ascórbico (vitamina C) é uma furanolactona muito importante na dieta humana, é um poderoso antioxidante, sendo usado para transformar os radicais livres de oxigênio em formas inertes, e pode ser encontrado em várias frutas e legumes (NELSON & COX, 2005).

Já os sucos PZ e GB possuem 11 compostos propostos que ajudam a separá-los do grupo maior. Os compostos C31 (ácido siríngico), C44 (resveratrol), C56 (manitol), C58 (4-*O*-cafeoilquinico) e C59 (ácido sinápico), correlaciona-se a 8 sucos, deixando-os agrupados entre si e separados dos demais grupos. O ácido siríngico é derivado do ácido gálico e está presente no vinho tinto e nas cascas das uvas vermelhas possui atividade antioxidante (GÁLVEZ et al, 1994).

Os compostos sem marcação são aqueles que podem estar relacionados com os sucos PZ e GB, na região inferior do gráfico de *loadings* e com os sucos AL e AU na parte superior.

BIASOTO e colaboradores (2010) utilizaram-se do ACP para caracterizar os vinhos elaborados com uvas híbridas (*V. vinifera* com *V. labrusca*). Foi observada, de maneira geral, que a ACP estaria relacionada a parâmetros como a acidez de uma amostra por correlação com o ácido succínico, o que pode conferir maior acidez ao mesmo, e em outra amostra, relação com o ácido ascórbico, o que conferiria caráter amargo. Os autores propuseram um potencial uso destas informações para auxiliar as vinícolas no controle de qualidade.

Na Figura 19 encontra-se a ACP para os sucos brancos, onde se observa o gráfico de *scores* (A) dos sucos de uva e o gráfico de *loadings* (B) com os compostos químicos propostos, sendo que as componentes principais, ACP1 e ACP2, descreveram 66,0 %, conferindo separação das amostras.

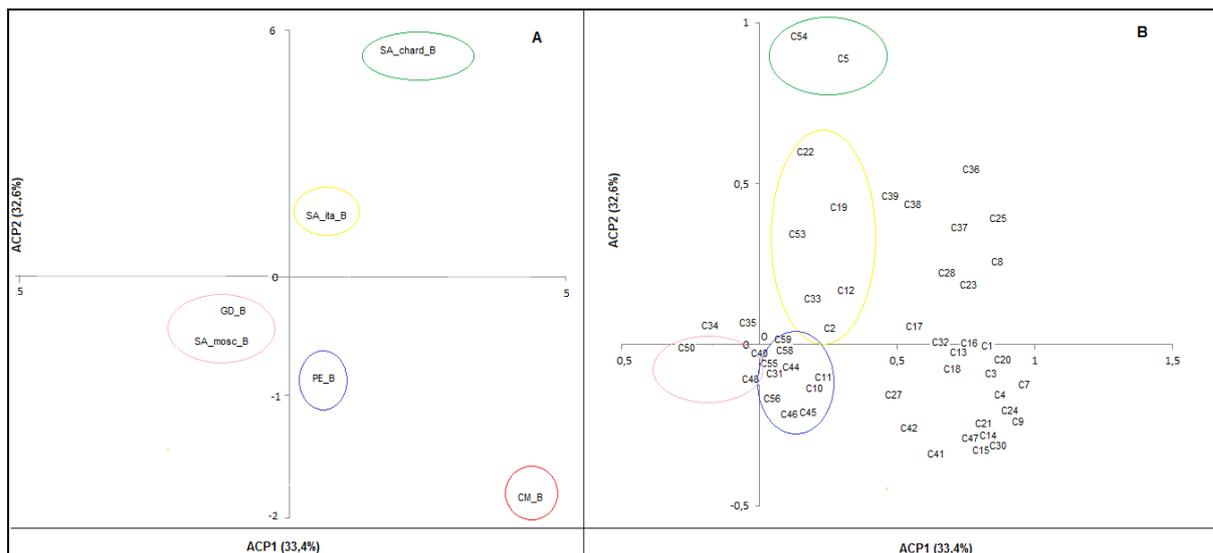


Figura 19. (A) Gráfico de *scores* dos sucos de uva brancos, (B) Gráfico de *loadings* com os compostos não-voláteis identificados, com formação de agrupamentos conforme as cores observadas nos gráficos (A) e (B).

Embora o número de amostras seja restrito, observa-se que os sucos estão bem separados, com exceção dos sucos SA_mosc_B e GD_B, que se agruparam por influência dos compostos C40 (*L*-leucina), C48 (*L*-triptofano) e C50 (pterostilbeno), compostos que foram igualmente observados nos sucos tintos SI e UV. O suco experimental SA_chard_B do gráfico de *scores*, Figura 19A, correlaciona-se no gráfico de *loadings* (Figura 19B) com os compostos C5 (ácido succínico) e C54 (arginina), e o suco CM_B não possui nenhuma substância correlacionada a ele. No entanto, no gráfico de *loadings* observa-se grande número de compostos sem correlação com nenhum suco estudado, o que pode estar relacionado ao baixo número de amostras. O ácido *trans*-caftárico (C30) é um composto fenólico não-flavonoídico encontrado na uva, sendo responsável pelo tom amarelado dos vinhos e sucos brancos (LEE & JAWORSKI, 1987). O tirosol (41) é um antioxidante fenólico natural presente em uma variedade de matérias primas naturais, dentre elas a uva, o chá e óleo de oliva, é um derivado do álcool fenílico (GIOVANNINI et al., 1999). Os sucos SA_ita_B e PE_B possuem, respectivamente 7 e 10 substâncias que os separam dos demais sucos brancos.

A ACP se mostrou uma ferramenta importante na análise da composição do perfil não-volátil dos sucos, pois através dela foi possível obter informações quanto ao agrupamento dos sucos estudados correlacionando-os com os compostos identificados no QExactive.

3.4 CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível agrupar os sucos de uva estudados neste trabalho através do uso da análise dos componentes principais (ACP), utilizando-se dos compostos propostos com o emprego do equipamento QExactive (*Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer*). Nos sucos tintos e brancos, analisados separadamente, foi possível verificar agrupamentos provocados por compostos que melhor se relacionaram a alguns grupos de sucos, sendo assim decisivo para separá-los dos demais.

3.5 REFERÊNCIAS

ABAD, F.C., WINCK, P.R., SILVA, J.M., CARAMÃO, E.B., ZINI, C.A. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21, n. 3, p. 461, 2010.

ALVES, A.A.R, REZENDE, M.J.C., HOVELL, A.M.C., BIZZO, H.R., OLIVEIRA, A.C.L., RODRIGUES, S.V., REZENDE, C.M. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, n. 2, p. 306, 2012.

ALVES, A.A.R., RODRIGUES, A.S., PAULA BARROS, E.B., UEKANE, T.M., BIZZO, H.R., REZENDE, C.M. **Food Analytical Methods**. v. 7, p.1834, 2014.

BARCIA, M.T., PERTUZATTI, P.B., GÓMEZ-ALONSO, S. GODOY, H.T., HERMASÍN-GUTIÉRREZ. **Food Chemistry**. v.159, p. 95, 2014.

BIASOTO, A.C.T., CATHARINO, R.R., SANVIDO, G.B., EBERLIN, M.N., SILVA, M.A.A.P. **Food Quality and Preference**. v.21, p. 755, 2010.

CALZADA, F., CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M., MECKES, M., CEDILLO-RIVERA, R., BYE, R., MATA, R. **Journal of Natural Products**. v. 62, n. 5, p. 705, 1999.

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. **Journal of Mass Spectrometry**. v.41, p. 185, 2006.

CHEYNIER, V. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.81 (suppl), p. 223S, 2005.

CORREIA, M.I.T.D., QUIRINO, I.E.P. **Arginina Nutrição e vida**. Disponível em: <<http://nutricaoevida.com.br/wp-content/uploads/2012/03/Arginina.pdf>>. Acesso nov. 2014.

CRUZ, J., MINOJA, G., OKUCHI, K., FACCO, E. **Journal of Neurosurgery**. v. 100, n.3, p.376, 2004.

DANI, C., OLIBONI, L.S., VANDERLINDE, R., BONATTO, D., SALVADOR, M., Henriques, J. A. P. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 2574, 2007.

EMEA. **Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. London. CPMP/ICH/381, 1995.

FARSKY, S.H.P. **Efeitos do ácido clorogênico sobre as propriedades de adesão do endotélio**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), USP-SP, 115p., 2013.

FRAIGE, K., PEREIRA-FILHO, E.R., CARRILHO, E. **Food Chemistry**. v.145, p. 395, 2014.

FULEKI, T., RICARDO DA SILVA, J.M. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 640, 2003.

GÁLVEZ, M.C., BARROSO, C.G., PÉREZ-BUSTAMANTE, J.A. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**. v.199, n. 1, p. 29,1994.

GIOVANNINI, C., STRAFACE, E., MODESTI, D., CONI, E., CANTAFORA, A., DE VINCENZI, M., MALORNI, W., MASELLA, R. **Journal of Nutrition**. v. 129, n. 7, p. 1269, 1999.

HUANG, Z., WANG, B., WILLIAMS, P., PACE, R.D. **LWT –Food Science and Technology**. v.42, p. 819, 2009.

IGLESIAS, A.H. **Espectrometria de Massas**. XVII MET – Encontro Nacional sobre Metodologia e Gestão de Laboratórios da Embrapa. USP – SP, 2012.

KINGDON, K.H. **Physical Review**. v. 21, n. 4, p. 408, 1923.

KNIGHT, R.D. **Applied Physics Letters**. v.38, n. 4, p. 221, 1981.

KOYAMA, K., GOTO-YAMAMOTO, N., HASHIZUME, K. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 71, p. 958, 2007.

LANGCAKE, P., PRYCE, R. J. **Experientia**. v. 33, n. 2, p. 151, 1977.

LEE, C. Y., JAWORSKI, A. **American Journal Enology and Viticulture**. v. 38, n. 4, p. 277, 1987.

MAKAROV, A., DENISOV, E., KHOLOMEEV, A., BALSCHUN, W., LANGE, O., STRUPAT, K., HORNING, S. **Analytical Chemistry**. v. 78, n. 7, p. 2113, 2006a.

MAKAROV, A., DENISOV, E., LANGE, O., HORNING, S. **Journal American Society Mass Spectrometry**. v. 17, n. 7, p. 977, 2006b.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.79, n.1, p. 727, 2004.

MARTINELLI, M. **Estudo de uma nova opção de embalagem para transporte e comercialização de caquis (Diospyros kaki, L.) cv, Mikado e Rama-forte**. Tese. (Doutorado em Ciências de Alimentos), 130p., 2014.

MORRIS, J.R., SISTRUNK, W.A., JUNEK, J., SIMS, C.A. **Journal of the Society for Horticultural Science**. v.111, p. 742, 1986.

NASI, A., FERRANTI, P., AMATO, S., CHIANESE, L. **Food Chemistry**. v. 110, p. 762, 2008.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ª edição, W. H. Freeman, 2005.

OLIVEIRA, D.N., SARTOR, S.B., DAMÁRIO, N., GÖLLUCKE, A.P.B., CATHARINO, R.R. **Food Mensure**. v.8, p. 9, 2014.

PERESTRELO, R., LU, Y., SANTOS, S.A.O., SILVESTRE, A.J.D., NETO, C.P., CAMARA, J.S., ROCHA, S.M. **Food Chemistry**. v. 135, p. 94, 2012.

RAMALHO, V.C., JORGE, N. **Química Nova**. v.29, n.4, p. 755, 2006.

RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. **Química Nova**. v.27, n. 5, p. 771, 2004.

RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÉCHE, B., LONVAUD, A. **Tratado de Enología: microbiología del vino- vinificaciones**. v.1, Buenos Aires: Editorial Hemisfério Sur. 636p., 2003.

RICHARD, H., PERRY, R., COOKS, G., NOLL, R.J. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 27, p. 661, 2008.

SAUTTER, C.K., DENARDIN, S., ALVES, A.O., MALLMANN, C.A., PENNA, N.G., HECKTHEUER, L.H. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p.437, 2005.

TIAN, Q., GIUSTI, M.M., STONER, G.D., SCHWARTZ, S.J. **Journal of Chromatography A**. v. 1091, p. 72, 2005.

VALLE, I. **Controlo da Qualidade e Ambiente**. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química – Universidade de Coimbra, Portugal, 2012.

WANG, H., RACE, E.J., SHRIKHANDE, A.J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p. 1839, 2003.

4 DETERMINAÇÃO DA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCOS DE UVA INTEGRAIS BRASILEIROS

4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante país produtor e exportador de produtos agropecuário, e é também um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, com as importações atingindo quase 2,5 bilhões de dólares por ano (SPADOTTO & GOMES, 2011).

Os agrotóxicos são compostos químicos que possuem atividade sobre pragas numa lavoura, sendo esta de inibição ou extermínio. A finalidade de sua aplicação na cultura é favorecer o aumento da produção de alimentos, tendo em vista que faz o controle fitossanitário. O risco de contaminação pode ocorrer tanto pela aplicação em si, quanto pela migração dos compostos de uma cultura para outra, que pode ocorrer por ação dos ventos (SANTOS, 2002) ou migração pela água.

As uvas estão entre as frutas que mais apresentam risco de exposição aos agrotóxicos, devido ao fato da aplicação ser realizada por meio da pulverização aérea, podendo deixar resíduos destes contaminantes em uvas *in natura* e em seus produtos finais (sucos, vinhos e geleias), além de proporcionar risco de contaminação ao meio ambiente (KUGLER, 2014). Os agrotóxicos mais utilizados na cultura da uva são os inseticidas da classe dos organofosforados e alguns fungicidas, principalmente das classes dos piretróides e dos carbamatos (MAPA, 2014; ANVISA, 2014a).

Os organofosforados (OF) são extremamente tóxicos aos seres humanos. No entanto, apresentam boa eficácia no combate a pragas e possuem pouca persistência no meio ambiente (GASPARIN, 2014). Os organoclorados (OC) são compostos que possuem seu uso banido desde 1992 (MILHOME et al, 2011), porém ainda hoje são observadas contaminações por estes compostos, devido à sua alta persistência na natureza e estabilidade química, uma vez que não são solúveis em água e podem ficar ativos por anos, se acumulando na cadeia alimentar e contaminando a região onde fora aplicada. A exceção é o dicofol, que é o único OC permitido o seu uso na cultura de uva, pois é solúvel em água e apresenta toxicidade baixa se comparada com outros agrotóxicos (OVIEDO et al, 2003; FLORES, 2004).

Segundo JULIATTI e colaboradores (2006) os fungicidas são compostos químicos empregados no controle de doenças de plantas causadas por fungos, são classificados como protetores ou erradicantes. Os protetores tem seu efeito quando aplicados na planta antes da mesma possuir o fungo, agem formando uma espécie de barreira tóxica, impedindo a penetração dos fungos. Já os erradicantes são absorvidos e distribuídos por toda a planta, tendo a capacidade de inibir a proliferação do patógeno, que já se encontra na mesma. Os fungicidas (Fg) podem ser de várias classes químicas como: piretróides, carbamatos, triazóis, imidazóis e derivados, entre outros.

Atualmente, cerca de 60 tipos de pragas afetam a videira, principalmente fungos e insetos. Dentre as doenças relacionadas estão aquelas causadas por fungos: o míldio (*Plasmopara viticola*), oídio (*Uncinula necator*), podridão de cachos (*Glomerella cingulata*), antracnose (*Elsinoe ampelina*) e ferrugem (*Phakopsora euvitis*) estão entre aqueles que mais atacam os frutos e as folhas. No caso dos insetos, os mais incidentes são a mosca branca (*Bemisia argentifolli*), a lagarta das folhas (*Eumorphia vitis*), a broca dos ramos (*Paramadarus complexus*), o bicudo da videira (*Heilipodus dorsosulcatus*) e o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) que atacam folhas, galhos e frutos (BOTTON et al, 2014). Anualmente, o prejuízo por pragas na cultura de uvas chega a 2 bilhões de dólares (SPADOTTO & GOMES, 2014) e, para combater estas pragas, os agricultores fazem uso contínuo de agrotóxicos, principalmente fungicidas e inseticidas (BOTTON et al, 2014), os quais fazem parte o organoclorado dicofol, os organofosforados paration e clorpirifós metílico, metidationa e ditianona, o piretróide λ -cialotrina e o triazol tebuconazol, dentre outros. Na Figura 20 encontram-se as estruturas químicas de alguns agrotóxicos utilizados na cultura de uva.

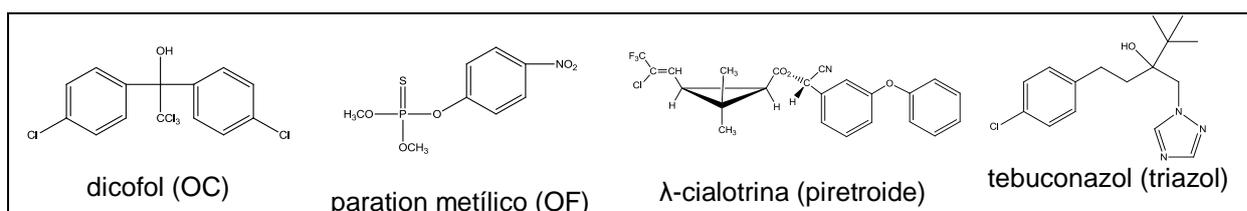


Figura 20. Estrutura química de alguns agrotóxicos utilizados na cultura de uva: dicofol (OC), parations metílico (OF), λ -cialotrina (piretróide) e tebuconazol (triazol).

Amostras de vários produtos alimentícios já foram pesquisadas no que concerne à análise de resíduos, e alguns resultados são preocupantes. RAMOS e

colaboradores (2009) monitoraram organofosforados, triazinas e piretróides em amostra de frutas como maçã, laranja, uva e pêra, e neste caso em questão, não detectaram nenhuma contaminação, estando os resíduos dentro dos valores aceitáveis. A ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) já relatou vários resíduos de agrotóxicos em frutas, principalmente de laranja, como procloráz e profenofós (ANVISA, 2014b). RISSATO e colaboradores (2005) relataram resíduos de procloráz e tebuconazol em maçã e tomate, e valores maiores do que o permitido de clorpirifós metílico, e de aldrin (organoclorado proibido no Brasil) foram detectados.

O uso de agrotóxicos em produtos alimentícios tem gerado preocupação nos órgãos governamentais, pois as exportações destes produtos agrícolas devem obedecer às normas rígidas do órgão internacional *Codex Alimentarius* Internacional. Esse órgão inspeciona visando um comércio de alimentos livres de resíduos de agrotóxicos entre as nações, estabelecendo assim limites máximos de resíduos (LMR) de cada agrotóxico para uma determinada cultura agrônômica. Em caso de desacordo com as normas o País exportador sofre barreiras fitossanitárias e econômicas (CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

O Brasil, assim como os outros países, obedece aos LMR ditados pelo *Codex Alimentarius*, no entanto há também os limites nacionais, que são definidos pela ANVISA e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estes valores são resultados de experimentos no campo, e aqueles princípios ativos que não estão registrados nestes órgãos são considerados não autorizados para uma determinada cultura, pois não apresentam LMR definidos no País (MAPA, 2014; ANVISA, 2014a).

O desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação e o monitoramento de resíduos de agrotóxicos, tanto em frutas quanto em alimentos processados, como o caso do suco de uva, é de grande importância para a adequação às normas internacionais.

Como já comentado na seção 2.1. do Capítulo 2, a extração líquido-líquido (ELL) é uma técnica muito empregada na separação de substâncias, sendo que o analito de interesse fica na fase orgânica, mantendo os interferentes na fase aquosa, que é descartada. Já a extração em fase sólida (EFS) é uma técnica que usa pouco solvente, é simples e rápida, promove o *cleanup* da amostra e pré-concentra os analitos de interesse.

Na EFS, uma amostra é eluída num cartucho recheado com um sorvente (fase estacionária), conforme ilustrado na Figura 21, e a escolha desta fase deve-se a natureza química das substâncias que se pretende isolar e analisar (LANÇAS, 2004).

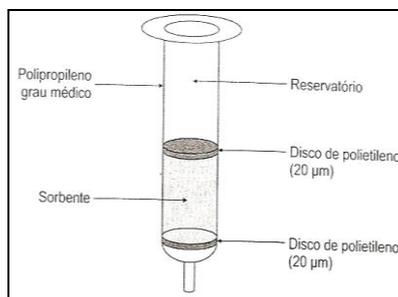


Figura 21. Exemplificação de um cartucho de EFS (Fonte: LANÇAS, 2004).

O fenômeno da adsorção ocorre quando se emprega, por exemplo, um sorvente polar, como a sílica. A fase estacionária sílica é um polímero de $(\text{SiO}_2)_n\text{-OH}$ e seu mecanismo é por adsorção, que é a adesão das moléculas de um fluido (o adsorvido) à uma superfície sólida ou fase estacionária sólida (o adsorvente) e o grau dessa adsorção dependerá da temperatura, da pressão e da área da superfície do sólido. Os cartuchos Amina (NH_2), Alumina (Al_2O_3) e Florisil, $[\text{MgAl}(\text{SiO}_4)_n]$, apresentam este tipo de mecanismo, e este último tem sido utilizado em análises de agrotóxicos. Este tipo de fase estacionária adsorve facilmente água e compostos muito polares, devido à formação de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis em sua superfície e tal fato deve ser levado em conta, uma vez que o analito de interesse pode ficar retido na fase de forma irreversível (LANÇAS, 2004).

A partição ou absorção ocorre quando o sorvente é menos polar que o solvente de eluição na fase estacionária como o C_{18} - que são grupos octadecilsilanos quimicamente ligados à sílica - e seu mecanismo é o processo de interação de um líquido (substância absorvida) por um filme líquido (substância que absorve). No caso, o grupo octadecilsilano fixa os componentes mais apolares da amostra. O solvente extrator deve ser mais apolar para garantir a remoção dos analitos da fase C_{18} , uma vez que a mesma possui uma longa cadeia carbônica. O tamanho do seu radical C_{18} pode reter os analitos mais do que o desejado, chegando ao ponto de prendê-los no cartucho de maneira irreversível (LANÇAS, 2004).

A etapa de limpeza da amostra ou *cleanup* é um procedimento importante que tem como finalidade remover interferentes presentes na amostra, que podem atrapalhar no método e na análise dos compostos de interesse (LANÇAS, 2004). O *cleanup* da amostra tem como principal finalidade a remoção de componentes da matriz da amostra que são potenciais interferentes na quantificação dos agrotóxicos (LANÇAS, 2004).

O *cleanup* com cartucho de EFS ocorre através das etapas ilustradas na Figura 22: condicionamento do cartucho (para ativar o sorvente), adição de amostra (uso de pequenos volumes de amostra com uso da pressão positiva - gravidade) e eluição do analito de interesse (com pequeno volume de eluente apropriado). Ao carregar o cartucho com a amostra, os compostos que não tiverem afinidade com a fase estacionária eluem primeiro, permanecendo retidos apenas os compostos que possuem algum tipo de interação com o sorvente. Em seguida ocorre a etapa de *cleanup* ou lavagem, e por fim passa-se um solvente ou uma mistura de solventes para extrair os analitos retidos (LANÇAS, 2004; AQUINO NETO & NUNES, 2003; COLLINS et al, 2007).

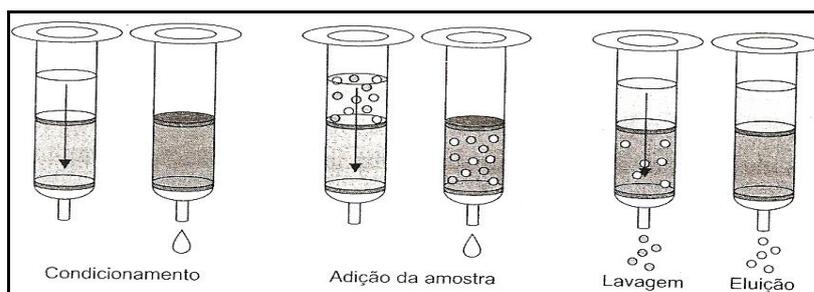


Figura 22. Etapas da extração em fase sólida (Fonte: LANÇAS, 2004).

Em pesquisas para análise de agrotóxicos em matrizes alimentares, a EFS com Florisil já se mostrou como sendo aquela com melhor recuperação desses contaminantes. Isso se deve ao fato de que os interferentes são eluídos com o auxílio de solventes apropriados e os resíduos de agrotóxicos são recuperados quase quantitativamente (CESSNA, 1992). ABAD e colaboradores (2010), em investigação de multirresíduos em cenoura, obtiveram recuperação de 70 a 133 % dos agrotóxicos pelo método no qual utilizaram o cartucho Florisil para pré-concentração destes compostos.

No caso de sucos de frutas frescas, o uso de técnicas de extração associadas como a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) promove

excelente remoção de interferentes como corantes e açúcares, e extrai os analitos de interesse, visto que a matriz alimentar é bem complexa. DONG e colaboradores (2009) e LI & YUAN (2008) utilizaram a união da ELL com a EFS para esta finalidade, em seus trabalhos com sucos concentrados de frutas e suco de cenoura, respectivamente, obtendo bons resultados quando comparado com procedimentos que utilizavam apenas uma das extrações. Pelo fato dos sucos apresentarem muitos açúcares e corantes que, em geral, saturam o sorvente e entopem o cartucho de EFS, impedindo a satisfatória pré-concentração dos compostos de interesse, o uso da ELL previamente faz-se necessária.

A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (com analisador quadrupolo) em modo seletivo de íons (CG-EM-MSI) - já comentada na seção 2.1. do Capítulo 2 – apresenta boa sensibilidade para quantificação de substâncias, e é uma alternativa simples e de fácil acesso na análise de agrotóxicos em matrizes variadas, visto sua enorme aplicação em laboratórios de pesquisa e de controle de qualidade. CHERTA e colaboradores utilizaram a CG-EM-MSI para análise de resíduos de agrotóxicos de diversas classes em frutas e vegetais (2013a) e em sucos de frutas (2013b). ALVES e colaboradores (2012) utilizaram esta técnica para análise de organoclorados e organofosforados em óleos essenciais cítricos. ANDRADE e colaboradores (2011) investigaram resíduos de seis agrotóxicos em amostras de tomate utilizando o CG-EM-MSI. DÖMÖTÖROVÁ e colaboradores (2006) a utilizaram para investigar resíduos de agrotóxicos multiclasses em maçã, e ALBERO e colaboradores (2005) usaram esta técnica na análise de 50 agrotóxicos em diversos tipos de sucos.

A produção de suco de uva vem aumentando no Brasil e, para tanto, a qualidade e a segurança alimentar devem ser avaliados para que se cumpram os requisitos do *Codex Alimentarius* Internacional e da Organização Mundial de Saúde (OMS), no âmbito de consumo interno e da expansão das exportações brasileiras. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para investigar resíduos dos agrotóxicos, dos tipos organoclorados (OC) e organofosforados (OF) e fungicidas (FG), em sucos de uva integrais brasileiros – comerciais e experimentais - utilizando a ELL/EFS e CG-EM-MSI.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

4.2.1.1 Padrões e Reagentes

Os solventes e os reagentes utilizados foram: cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de sódio (Na₂SO₄) foram adquiridos da Merck, hexano (HEX), acetona (ACET), acetato de etila (AcOEt) foram comprados na Tedia Brasil, todos grau GC. Padrão interno: o *n*-pentacosano (Fluka, Sigma Aldrich), os padrões de agrotóxicos, cujas fórmulas moleculares estão na Figura 23, foram da marca Dr. Mark Ehrenstorfer GmbH, com pureza > 98 % e foram utilizados cartuchos EFS Florisil (marca J. T. Baker[®], lote P2044A1, USA), contendo 100 mg de adsorvente/cartucho e para teste os cartuchos amina (marca Waters lote 00N9306531), alumina (marca Waters, lote 006432150K) e tC18 (marca Waters, lote 006630056A). A solução-estoque dos padrões de agrotóxicos e de PI foram armazenadas e mantidas a 4 °C.

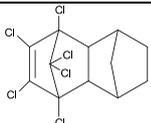
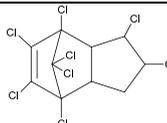
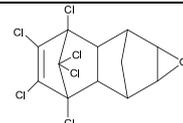
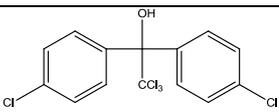
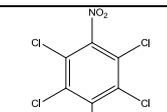
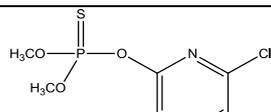
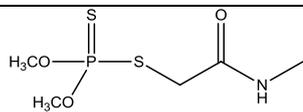
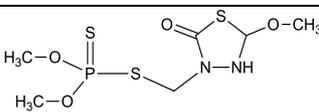
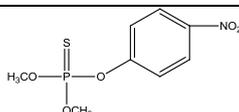
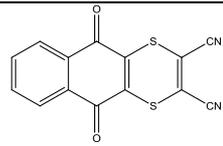
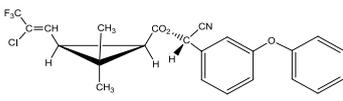
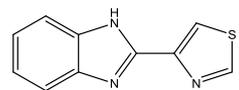
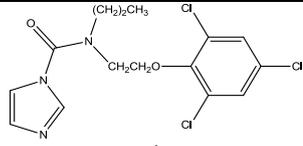
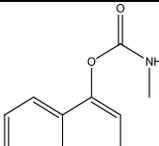
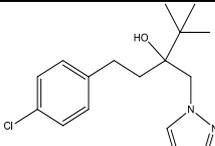
 aldrin (OC)	 clordano (OC)	 dieldrin (OC)
 dicofol (OC)	 quintozeno (OC)	 clorpirifós metílico (OF)
 dimetoato (OF)	 metidationa (OF)	 paration metílico (OF)
 ditianona (OF)	 λ -cialotrina (piretróide) – (Fg)	 tiabendazol (benzimidazol) - (Fg)
 procloraz (imidazolcarboxamida) – (Fg)	 carbaril (carbamato) – (Fg)	 tebuconazol (triazol) – (Fg)

Figura 23. Agrotóxicos utilizados nesta análise de resíduos, sendo OC – organoclorados, OF – organofosforados e Fg – fungicidas.

4.2.1.2 Amostras

Foram adquiridos 99 sucos de uva comerciais e experimentais (sendo 3 garrafas de cada suco, conforme Tabela 15), todos da safra 2012. Os comerciais foram adquiridos em supermercados de Niterói – RJ (Brasil) e os experimentais foram obtidos de empresas parceiras. As garrafas foram abertas no dia de extração/análise e após o uso foram acondicionadas em freezer (- 8° C).

Tabela 15. Sucos de uva brasileiros: códigos e especificações (tipo, natureza, tipo de uva).

Código sucos	tipo	Natureza do suco	Tipo da uva
AM_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AM_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AM_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AL_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AL_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AL_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AU_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AU_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
AU_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CB_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CB_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CB_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CL_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CL_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CL_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CM_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CM_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CM_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
CM_B_G1	Branco	Comercial	Italia
CM_B_G2	Branco	Comercial	Italia
CM_B_G3	Branco	Comercial	Italia
DC_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
DC_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
DC_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
DG_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
DG_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
DG_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GA_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GA_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GA_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GB_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GB_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GB_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GD_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GD_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GD_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
GD_B_G1	Branco	Comercial	Italia
GD_B_G2	Branco	Comercial	Italia
GD_B_G3	Branco	Comercial	Italia
MT_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
MT_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
MT_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
MV_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
MV_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô

Continuação da Tabela 15.

MV_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PE_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PE_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PE_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PE_B_G1	Branco	Comercial	Italia
PE_B_G2	Branco	Comercial	Italia
PE_B_G3	Branco	Comercial	Italia
PG_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PG_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PG_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PZ_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PZ_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
PZ_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SB_G1*	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SB_G2*	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SB_G3*	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SI_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SI_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SI_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SN_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SN_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SN_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SP_G1*	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SP_G2*	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
SP_G3*	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
US_G1	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
US_G2	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
US_G3	Tinto	Comercial	Isabel/ bordô
EP_G1*	Tinto	Experimental	Isabel/ bordô
EP_G2*	Tinto	Experimental	Isabel/ bordô
EP_G3*	Tinto	Experimental	Isabel/bordô
SA_isaM_G1	Tinto	Experimental	Isabel
SA_isaM_G2	Tinto	Experimental	Isabel
SA_isaM_G3	Tinto	Experimental	Isabel
SA_isaB_G1	Tinto	Experimental	Isabel
SA_isaB_G2	Tinto	Experimental	Isabel
SA_isaB_G3	Tinto	Experimental	Isabel
SA_coraB_G1	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraB_G2	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraB_G3	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraM_G1	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraM_G2	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraM_G3	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraFM_G1	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraFM_G2	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_coraFM_G3	Tinto	Experimental	BRS cora
SA_chard_B_G1	Branco	Experimental	Chardonnay
SA_chard_B_G2	Branco	Experimental	Chardonnay
SA_chard_B_G3	Branco	Experimental	Chardonnay
SA_mosc_B_G1	Branco	Experimental	Moscato
SA_mosc_B_G2	Branco	Experimental	Moscato
SA_mosc_B_G3	Branco	Experimental	Moscato
SA_ita_B_G1	Branco	Experimental	Itália
SA_ita_B_G2	Branco	Experimental	Itália
SA_ita_B_G3	Branco	Experimental	Itália

* Suco Orgânico: sem utilização de fertilizantes solúveis, pesticidas sintéticos e transgênicos. G1, G2 e G3 refere-se as garrafas de sucos de uva.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Condições de Análise

Utilizou-se um CG-EM modelo GC6850 acoplado a um MSD modelo 5975C MSD Instrument (*Agilent Technologies*) com modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. O gás carreador utilizado foi hélio da Air Products®, com fluxo inicial de 1.0 mL min⁻¹. A coluna cromatográfica foi a HP5-MS (*Agilent* 19091S 433E) com 0.25 mm i.d., 30 m e 0.25 µm espessura de filme. As temperaturas do injetor e linha de transferência foram, respectivamente, de 250 e 310 °C. A programação da temperatura foi: 50 °C, em isoterma por 2 min, taxa de 10 °C min⁻¹ até 300 °C (15 min) perfazendo 42 min de corrida cromatográfica. O modo de injeção foi splitless, com pressão constante de 7,9 PSI. Utilizou-se o modo SCAN (50 - 400 u) para a obtenção dos tempos de retenção e confirmação da composição e o modo seletivo de íons (MSI) para a validação do método, quantificação e aplicação em amostras reais.

4.2.2.2 Preparo das soluções estoque do padrão interno *n*-pentacosano e dos agrotóxicos

As soluções estoque do padrão interno (PI) *n*-pentacosano e dos agrotóxicos foram preparadas, individualmente, colocando-se 1,0 mg do composto num balão volumétrico de 1,0 mL, onde posteriormente completou-se o volume com hexano, obtendo uma concentração de 1000 mg.L⁻¹. Estas soluções foram mantidas em freezer a - 8 °C e injetadas no CG-EM, a cada 15 dias, para verificação da estabilidade desses padrões.

4.2.2.3 Preparo da solução-mix dos agrotóxicos

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 1,0 mL, 50 µL de cada solução estoque de agrotóxicos e o volume foi completado com hexano, resultando em uma solução-mix (mistura dos agrotóxicos) de concentração 50 mg L⁻¹ de cada agrotóxico. Para a validação foram preparados soluções-mix utilizando-se 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 µL da solução estoque de cada agrotóxico (concentração de 1000 mg L⁻¹), em balões volumétricos de 1,0 mL, completando o volume com hexano, resultando respectivamente em soluções com concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50 mg L⁻¹ de cada agrotóxico. Para a análise da precisão (repetitividade) foram

preparadas soluções-mix, utilizando 15, 30, 45 e 60 μL da solução-estoque de cada agrotóxico, em balões volumétricos de 1,0 mL, cujos volumes foram completados com hexano, resultando respectivamente soluções com concentrações de 15, 30, 45 e 60 mg L^{-1} de cada agrotóxico. As soluções foram mantidas no freezer durante todo o trabalho a temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2.4 Fortificação do suco de uva e procedimento de extração ELL/EFS

Realizou-se inicialmente a técnica de ELL, colocando-se em um erlenmeyer 15 mL do suco de uva integral AU fortificado com 1,0 mL da solução-mix de agrotóxico (concentração de 50 mg L^{-1}), 4 g de NaCl, 15 mL de acetato de etila:hexano (1:1) e 25 μL da solução-estoque do padrão interno *n*-pentacosano (concentração 1000 mg L^{-1}). O erlenmeyer foi agitado via ultrassom por 15 minutos. Em seguida, foi recolhida a fase orgânica (F.O.), seca com adição de sulfato de sódio e a fase aquosa descartada. Em seguida, foi realizada a EFS com cartucho Florisil, condicionado com 5 mL de acetona e, em seguida, foi aplicada a F.O. Após a eluição, o cartucho foi eluído com 5 mL acetato:hexano (1:1). O extrato foi recolhido em um frasco para a obtenção dos analitos de interesse. Esse extrato foi levado à secura em fluxo de N_2 , e em seguida, ressuspendido com 1.0 mL de hexano. Um microlitro deste extrato final foi injetado no CG-EM-MSI, em triplicata.

4.2.2.5 Obtenção da curva de calibração

Para a obtenção da curva de calibração foi utilizado o suco AU - por tratar-se de um suco com poucos compostos e livre de resíduos (já observados nos cap. 2 e 3) – e o uso do suco fortificado com as soluções-mix de agrotóxicos, nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50 mg L^{-1} de cada agrotóxico. Em seguida, foi realizado o procedimento descrito em **4.2.2.4** para cada fortificação com as concentrações supracitadas.

Para a análise da precisão (repetitividade) utilizou-se o suco AU fortificado com as soluções-mix de agrotóxicos nas concentrações de 15, 30, 45 e 60 mg L^{-1} de cada agrotóxico. Em seguida, foi realizado o procedimento descrito em **4.2.2.4**, para cada fortificação com as concentrações mencionadas.

4.2.2.6 Aplicação do método validado em amostras reais

O método validado foi aplicado em 33 sucos de uva integrais (triplicata de garrafa), ao qual seguiu o procedimento descrito em 4.2.2.4, excluindo-se a parte de fortificação com os agrotóxicos no processo.

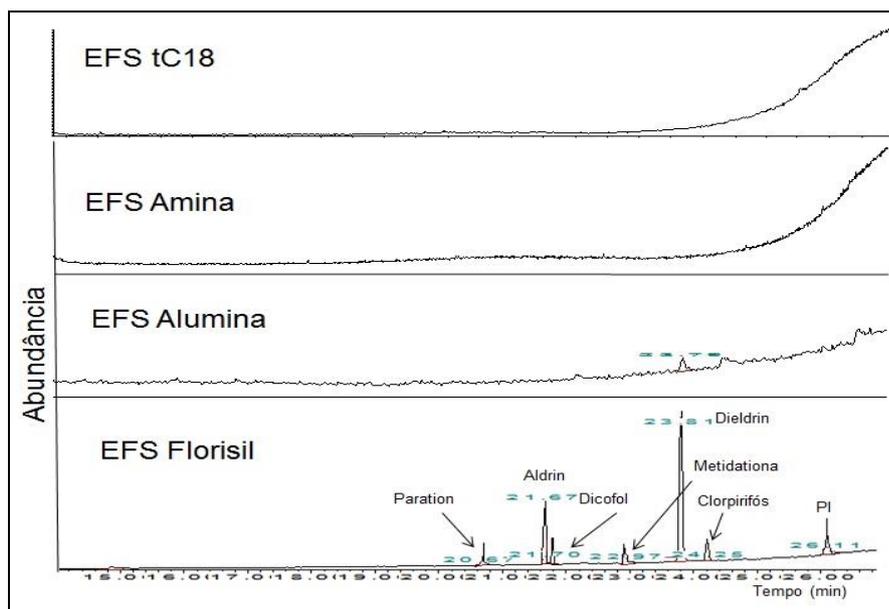
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análise qualitativa

Devido à composição química pobre na análise em SCAN pelo CG-EM, o suco de uva AU foi escolhido para a validação do método, uma vez que possuía apenas 18 compostos identificados, possuindo assim menor interferência na análise dos resíduos e também não se detectou agrotóxicos no mesmo. Nos outros sucos, foram identificados cerca de 45 voláteis, principalmente ésteres etílicos (antranilato, (*E*)-2-hexenoato de metila e benzoato de metila), álcoois primários (1-hexanol, 1-octanol, 2-etil-hexanol, 2-fenil-etanol) e álcoois terpênicos (α -terpineol, linalol), conforme discutido anteriormente no Capítulo 2 e atestado no Apêndice A.

Inicialmente, foram realizados vários testes, com métodos de extração já descritos na literatura para análise de agrotóxicos, como o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), a ELL, e a EFS, utilizando nesta última os cartuchos alumina, amina, tC18 e Florisil, sem êxito, e finalmente a associação ELL/EFS.

Na Figura 24 está representada a comparação dos cromatogramas dos testes utilizando associação das extrações ELL/EFS do suco AU fortificado com alguns agrotóxicos, para verificação de *cleanup* e pré-concentração dos agrotóxicos e posterior escolha do cartucho que melhor extraía os compostos de interesse. Observa-se que apenas a extração utilizando a EFS Florisil foi eficiente para extrair os agrotóxicos no suco AU fortificado com estes analitos.



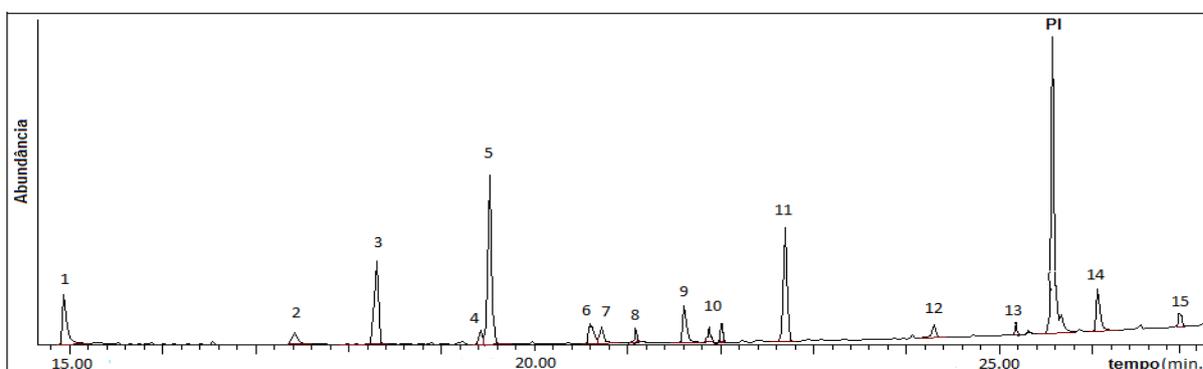
Legenda: ELL/EFS: associação das extrações líquido-líquido e em fase sólida.

Figura 24. Comparação dos cromatogramas dos testes utilizando associação das extrações ELL/EFS do suco AU fortificado com alguns agrotóxicos.

4.3.2 Análise quantitativa

O suco AU foi fortificado com solução-mix de agrotóxicos (concentração de 50 mg.L^{-1}) e injetado em CG-EM em varredura (SCAN) e em modo seletivo de íons (MSI), para verificação dos tempos de retenção dos mesmos.

Na Figura 25, está representado o cromatograma do suco AU fortificado com os padrões dos agrotóxicos após as extrações ELL/EFS Florisil, utilizando o CG-EM-MSI.



Legenda: ELL/EFS: associação das extrações líquido-líquido e em fase sólida, CG-EM-MSI: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em modo seletivo de íons.

Figura 25. Cromatograma do suco de uva AU fortificado com os agrotóxicos após a extração ELL/EFS utilizando CG-EM-MSI: 1. carbaril, 2. dimetoato, 3. quintozeno, 4. paration metílico, 5. clorpirifós metílico, 6. dicofol, 7. aldrin, 8. tiabendazol, 9. metidationa, 10. clordano, 11. dieldrin, 12. tebuconazol, 13. ditianona, 14. λ -cialotrina, 15. procloraz e o PI: padrão interno *n*-pentacosano.

Na Tabela 16 estão apresentados os tempos de retenção dos agrotóxicos e do padrão interno (PI) *n*-pentacosano, bem como os íons característicos, que foram utilizados para determinação qualitativa e quantitativa dos resíduos de agrotóxicos por CG-EM.

Tabela 16. Tempos de retenção (t_R) e íons característicos dos agrotóxicos em CG-EM.

Picos	Agrotóxicos	t_R (min)	Íons característicos (m/z)
Organoclorados (OC)			
7	Aldrin	20,8	263, 265, 293
6	Dicofol	20,6	197, 286, 314
10	Clordano	21,9; 22,3	237, 272, 373
11	Dieldrin	22,7	139, 141, 250
3	Quintozeno	18,3	237, 249, 295
Organofosforados (OF)			
2	Dimetoato	17,4	87, 125, 229
4	Paration Metílico	19,4	109, 125, 153
5	Clorpirifós Metílico	19,6	237, 263, 345
9	Metidationa	21,7	85, 145, 302
13	Ditianona	25,2	264, 268, 296
Fungicidas (Fg)			
14	λ -cialotrina	26,1	181, 197, 225
1	Carbaril	14,9	115, 144, 202
12	Tebuconazol	24,3	131, 175, 201
8	Tiabendazol	21,2	125, 153, 307
15	Procloraz	27,1	180, 266, 308
PI	<i>n</i> -Pentacosano (PI)	25,7	197, 239, 352

*No agrotóxico clordano foram monitorados 2 isômeros (α e γ)

As curvas analíticas foram obtidas de suco AU fortificado, em sete diferentes concentrações (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50 mg L⁻¹) dos agrotóxicos após a *cleanup* com ELL e pré-concentração por EFS Florisil, injetado em triplicata. A concentração de PI foi de 25 mg L⁻¹ para todas as análises. Os resultados foram submetidos aos métodos estatísticos de *Grubbs* e *Cochran*, para verificação de valores aberrantes (MILLER & MILLER, 1988). No teste de *Grubbs* não houve necessidade de se descartar nenhum valor, possuindo assim 95 % de confiança para todos os valores das curvas de calibração. No teste de *Cochran*, as variâncias de cada ponto das curvas de calibração se mostraram homogêneas com o aumento da concentração, e observou-se que o desvio bilateral das variâncias apresentou um nível de significância de 5 %, apresentando um comportamento homocedástico, ou seja, com variâncias estatisticamente equivalentes.

Na Tabela 17 encontram-se os parâmetros de calibração dos padrões de agrotóxicos: coeficientes de determinação (R^2), equações da curva de calibração, limites de detecção e de quantificação, LD e LQ, respectivamente, e LMR (limite

máximo de resíduos - do *Codex Alimentarius* Internacional) dos agrotóxicos estudados.

Tabela 17. Coeficientes de determinação (R^2), equação da curva de calibração, limites de detecção e de quantificação, LD e LQ, respectivamente, e LMR (limite máximo de resíduos obtido no *site* do *Codex Alimentarius* Internacional).

Agrotóxico	CG-EM-MSI				LMR ^(b)
	R ^{2(a)}	Equações	LD	LQ	
Aldrin	0,991	$y = 0,051x + 0,011$	1,42	4,16	(c)
Dicofol	0,996	$y = 0,105x - 0,018$	1,70	6,86	8,50
Clordano	0,992	$y = 0,014x + 0,005$	5,89	7,14	(c)
Dieldrin	0,990	$y = 0,156x + 0,078$	6,60	9,00	(c)
Quintozeno	0,997	$y = 0,147x + 0,004$	5,39	8,16	(c)
Dimetoato	0,991	$y = 0,042x - 0,013$	5,11	9,29	(c)
Paration Metílico	0,990	$y = 0,008x + 0,006$	1,24	3,75	1,40
Clorpirifós Metílico	0,992	$y = 0,182x + 0,075$	1,36	4,12	1,70
Metidationa	0,997	$y = 0,101x - 0,018$	1,47	3,56	1,70
Ditianona	0,994	$y = 0,011x + 0,004$	1,20	3,64	5,10
λ -cialotrina	0,994	$y = 0,042x + 0,003$	5,89	7,14	5,10
Carbaril	0,990	$y = 0,095x - 0,009$	6,25	9,47	(c)
Tebuconazol	0,994	$y = 0,015x + 0,005$	5,50	8,33	10,20
Tiabendazol	0,990	$y = 0,008x + 0,006$	6,19	9,00	(c)
Procloraz	0,991	$y = 0,024x + 0,008$	5,50	8,33	(c)

(a) coeficiente de determinação (R^2), (b) Referência *Codex Alimentarius* Internacional, (c) sem valor referência. LD, LQ e LMR em mg L^{-1} .

Para análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares se aceita (R^2) acima de a 0,990 (MILLER & MILLER, 1988; RIBANI et al, 2004). Considerando todas as concentrações trabalhadas, observa-se que os valores obtidos variam de 0,990 – 0,997, estando dentro dos valores aceitáveis. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica de acordo com a fórmula $LD = 3,3 (s/S)$ e $LQ = 10,0 (s/S)$, onde s e S são as estimativas do desvio padrão de resposta do coeficiente linear e do coeficiente angular da equação da curva analítica, respectivamente, (MILLER & MILLER, 1988; BOX et al, 2004) e estes variaram, respectivamente, de 1,20 – 6,25 e 3,75 – 9,47 mg L^{-1} .

A precisão do método foi avaliada pela repetitividade, sendo obtida através de quatro concentrações injetadas em triplicata (15, 30, 45 e 60 mg L^{-1} , com $n = 12$) de cada agrotóxico na matriz do suco de uva AU, cujo desvio padrão relativo (DPR%) foi abaixo de 4,9 %. A exatidão do método foi avaliada pela recuperação, utilizando as áreas dos agrotóxicos obtidas por CG-EM-MSI na equação da curva de calibração de cada agrotóxico, e a concentração de PI de 25 mg L^{-1} na matriz do

suco de uva AU, variando de 84 a 99,7 %. Os valores de precisão e exatidão estão de acordo com a ANVISA (2014) e o *International Conference on Harmonization – ICH* (1995) que estabelecem DPR (%) abaixo de 20 %, principalmente quando envolve matrizes complexas, como as alimentares. Na análise de resíduos são aceitas recuperações na faixa de 70 a 120 %, quando se tem precisão inferior a 20 % (MILLER & MILLER, 1988; BOX et al, 2004). Para tanto, os resultados obtidos de recuperação para os agrotóxicos avaliados encontram-se dentro desta faixa aceitável e estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Repetitividade (DPR%) e recuperação (R%) dos agrotóxicos trabalhados.

Agrotóxico	CG-EM-MSI	
	DPR (%) ^(a)	R (%) ^(b)
Aldrin	1,9	93,9
Clordano	4,9	94,9
Dicofol	3,5	86,5
Dieldrin	3,1	91,5
Quintozeno	0,4	99,7
Dimetoato	0,5	86,3
Metidationa	0,2	94,8
Clorpirifós Metílico	2,9	99,7
Paration Metílico	0,5	89,3
Ditianona	0,9	93,9
λ -cialotrina	0,6	92,3
Carbaril	4,4	87,8
Tebuconazol	1,8	91,2
Tiabendazol	3,9	84,0
Procloraz	2,4	90,4

(a) médias da repetitividade para n = 12, (b) medias para recuperação para os valores de cinco concentrações utilizando a curva de calibração.

CHERTA e colaboradores (2013b) analisaram resíduos de agrotóxicos (aldrin, dieldrin, clorpirifós metílico) em sucos de frutas e obtiveram, utilizando CG-EM-MSI, valores de recuperação variando de 70 - 120 % com DPR abaixo de 15 %. ALBERO e colaboradores (2005) analisaram resíduos de 52 agrotóxicos (aldrin, metidationa, λ -cialotrina, paration metílico, clorpirifós metílico, entre outros) em sucos de frutas (uva, laranja, abacaxi, pêra, pêssego, cenoura), utilizando CG-EM-MSI, em cujo método obteve recuperações variando de 91,5 a 101,8 % com DPR de 3,8 – 8,1 %. YANG e colaboradores (2011) analisaram 88 agrotóxicos em frutas do tipo “*berry*” (*raspberry*, *strawberry*, *blueberry*) e uvas usando EFS e CG-EM-MSI, obtendo recuperações entre 63 - 137 %, com DPR entre 1 - 19 %.

O método validado foi aplicado em amostras de sucos de uvas integrais comerciais e experimentais de 33 marcas diferentes, produzidos em 2012. Para

cada marca foram analisadas três amostras diferentes, chamadas de G1, G2, G3 (n = 99). Entre eles, 32 estavam contaminadas, sendo que em algumas amostras havia contaminação por mais de um tipo de agrotóxico. Dos 15 agrotóxicos testados apenas dicofol, ditianona e tebuconazol são permitidos na cultura da uva (CODEX ALIMENTARIUS, 2014). No entanto, as quantidades encontradas foram bem acima dos LMRs aceitáveis. Os sucos cujos resíduos de agrotóxicos foram identificados e quantificados por esse método encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Sucos de uva contaminados com resíduos de agrotóxicos.

Resíduos de Agrotóxicos	Suco_Garrafa	Concentração (mg L⁻¹)
Aldrin	CL_G1	13,20
Clordano	SB*_G1	13,29
	SB*_G2	12,11
	EP*_G3	13,36
Dicofol	CL*_G1	34,00
	DC*_G1	17,13
	DC*_G2	21,38
	DC*_G3	34,38
	GA_G3	16,95
	PE_B_G1	18,25
	PE_B_G2	14,57
	PE_B_G3	18,20
	SA_isabelB_G3	15,28
Dieldrin	SP*_G1	60,17
Dimetoato	AM_G1	14,50
	AM_G2	17,00
	AM_G3	16,20
	SA_coraM_G3	15,58
Ditianona	GB_G2	15,23
Quintozeno	AL_G1	15,85
	AL_G2	18,71
	AL_G3	34,52
	CL_G1	21,66
	DC*_G1	11,80
	DC*_G2	12,55
	DC*_G3	15,34
	GA_G1	16,33
	GA_G2	15,90
	GA_G3	16,80
	MT_G1	17,83
	PE_B_G1	12,67
	PZ_G1	16,67
	PZ_G2	15,01
	PZ_G3	18,33
SI_G3	13,34	
Tebuconazol	GA_G1	16,65
	GA_G2	16,63
	GA_G3	16,60
	PE_G1	13,53
	PE_G3	13,25
	PZ_G1	16,65

Continuação Tabela 19.

	PZ_G2	18,62
	PZ_G3	19,11
	SN_G2	13,34
Tiabendazol	GB_G1	13,33

*Sucos de uva orgânicos.

No cromatograma da Figura 26, por exemplo, pode ser observado resíduo de dieldrin no suco SP_G1, na concentração de $60,17 \text{ mg L}^{-1}$. Vale salientar que este agrotóxico está banido das culturas agrícolas brasileiras desde a década de 90 (MILHOME et al, 2011). No Apêndice C (seção de Apêndices) encontram-se mais alguns cromatogramas da análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de uva, já relatados na Tabela 15.

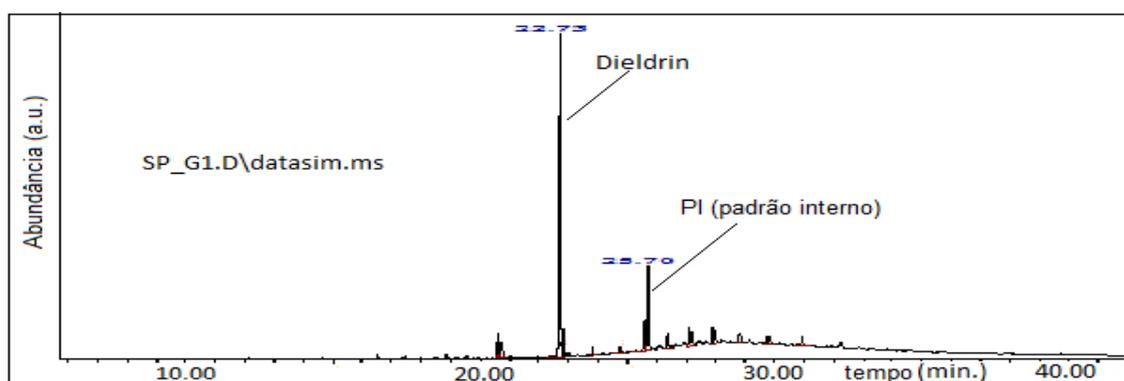


Figura 26. Cromatograma do suco de uva integral SP_G1 com resíduo do agrotóxico dieldrin ($60,17 \text{ mg.L}^{-1}$) e o PI *n*-pentacosano na concentração de 25 mg.L^{-1} .

Observou-se a contaminação do suco AL_G3 pelo agrotóxico quintozeno, na concentração de $34,52 \text{ mg L}^{-1}$ (t_R 18,28), um organoclorado proibido na cultura de uva. Resíduos de dicofol (t_R 20,57) foram observados nas amostras DC_G2 e o DC_G3, que são sucos orgânicos, e cujo valor se encontra acima do LMR do dicofol para a cultura de uva, que é $8,50 \text{ mg L}^{-1}$. O dicofol é permitido em várias culturas agrícolas, uma vez que apresenta baixa toxicidade e é solúvel em água.

No suco de uva integral CL_G1 observou-se resíduo de mais de um agrotóxico, como $13,20 \text{ mg L}^{-1}$ de aldrin; $34,00 \text{ mg L}^{-1}$ de dicofol e $21,66 \text{ mg L}^{-1}$ de quintozeno, todos OC. Os valores são bem altos, até mesmo para o dicofol, único permitido entre eles.

Em alguns casos, há a utilização de mais de um tipo de agrotóxicos nas culturas visando à eliminação de diversas pragas que acometem a videira, no

entanto não é considerado o ideal, tendo em vista a contaminação do ambiente (BOTTON et al, 2014). Na literatura, há relatos de matrizes com mais de um resíduo de agrotóxico. CHERTA e colaboradores (2013b) encontraram resíduos de aldrin e metidationa em amostras de maçã, RISSATO e colaboradores (2005) encontraram resíduos de aldrin, clorpirifós metílico, dimetoato e procloráz em amostras de alface, tomate, batata e maçã.

Os resíduos de agrotóxicos encontrados nesta tese foram, em sua grande maioria, em sucos de uva integrais tintos e comerciais. Quanto aos sucos de uva integrais brancos apenas o PE_B, nas G1 (18,25 mg L⁻¹), G2 (14,57 mg L⁻¹) e G3 (18,20 mg L⁻¹) apresentou resíduos de dicofol e na G1 também quintozeno (12,67 mg L⁻¹).

Os resíduos dos agrotóxicos dicofol e tebuconazol podem ser decorrentes de excesso de aplicação desses agrotóxicos às videiras, enquanto os resíduos de dimetoato e tiabendazol podem ser oriundos de outras culturas (vindos pelos ventos), assim como os organoclorados (aldrin, clordano, dieldrin e quintozeno), pois estão proibidos em culturas brasileiras, podendo ainda ser provenientes de contaminações do solo ou resultantes de aplicação indevida por agricultores.

Os resultados deste Capítulo foram publicados na revista Food Analytical Methods (ALVES et al, 2014).

4.4 CONCLUSÃO

Na validação do método para a análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de uva brasileiros, obteve-se LQ que variou de 3,75 a 9,47 mg L⁻¹, a média de recuperação dos agrotóxicos no método validado foi de 84 a 99,7 %, com valores de DPR abaixo de 4,9 %. O método validado foi aplicado em 99 sucos de uva (safra 2012), sendo que 32 apresentaram resíduos de agrotóxicos. Todos os resíduos encontrados estavam com valores acima do LMR permitido pelo *Codex Alimentarius* ou não eram permitidos na cultura da uva.

Estes resultados mostram a necessidade de um acompanhamento mais rígido, do cultivo ao envase, dos sucos de uva processados no Brasil.

4.5 REFERÊNCIAS

ABAD, F.C., WINCK, P.R., SILVA, J.M., CARAMÃO, E.B., ZINI, C.A. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21, n. 3, p. 461, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Monografias de produtos agrotóxicos**. Disponível em : <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em nov. 2014a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - 2013**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/150409_para.pdf >. Acesso nov. 2014b.

ALBERO, B., SÁNCHEZ-BRUNETE, C., TADEO, J.L. **Talanta**. v. 66, p. 917, 2005.

ALVES, A.A.R, REZENDE, M.J.C., HOVELL, A.M.C., BIZZO, H.R., OLIVEIRA, A.C.L., RODRIGUES, S.V., REZENDE, C.M. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, n. 2, p. 306, 2012.

ALVES, A.A.R., RODRIGUES, A.S., PAULA BARROS, E.B., UEKANE, T.M., BIZZO, H.R., REZENDE, C.M. **Food Analytical Methods**. v. 7, p.1834, 2014.

ANDRADE, G.C.R.M., FREGUGLIA, R.M.O., FURLANI, R.P.Z., TORRESA, N.H., TORNISIELO, V.L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22, n. 9, p. 1701, 2011.

AQUINO NETO, F.R., NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 23, 2003.

BOTTON, M., HAJI, F.N.P., SORIA, S.J., VENTURA, M.U., ROBERTO, S.R. **Pragas da videira**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteParana/pragas.htm>. Acesso nov. 2014.

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters**. Wiley: New York, 1987.

CESSNA, A.J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 40, p. 1154, 1992.

CHERTA, L., BELTRAN, J., LÓPEZ, F. HERNÁNDEZ, F. **Food Analytical Methods**. v.6, p. 1170, 2013a.

CHERTA, L., BELTRAN, J., PITARCH, E., HERNÁNDEZ, F. **Food Analytical Methods**. v.6, p. 1671, 2013b.

CODEX ALIMENTARIUS. **Official website of the Codex Alimentarius Commission - 2013**. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp>. Acesso nov. 2014.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L, BONATO, P.S. **Fundamentos da cromatografia**. Ed. Unicamp, p.33, 2007.

DÖMÖTÖROVÁ, M., HERCEGOVÁ, A., MATISOVÁ, E. **Czech Journal Food Science**. v. 24, p. 84, 2006.

DONG, J., LUO, X.L., XIE, Y., WANG, Q.L. **Modern Food Science and Technology**. v. 25, n. 1, p.108, 2009.

FLORES, A. V. **Revista Ambiente & Sociedade**. v. 7, n. 2, jul.- dez. 2004.

GASPARIN, D.C. **Defensivos agrícolas e seus impactos sobre o meio ambiente**. Curitiba, p.93, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Q2B (CPMP/ ICH/ 281/ 95), 1995.

JULIATTI, F.C., HAMAWAKI, O. T., CUNHA, E. P. C., POLIZEL, A. C., SANTOS, M. A., SHIGIHARA, D. **Bioscience Journal**. v. 22, n.1, p. 83, 2006.

KUGLER, H. **Os perigos da uva: Pesquisadores constataam elevado nível de intoxicação em vinicultores gaúchos**. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/medicina-e-saude/os-perigos-da-uva>> Acesso nov. 2014.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. Ed RiMa, p. 18, 2004.

LI, Y., YUAN, T. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**. v.18, p. 1774, 2008.

MILHOME, M. A. L., SOUZA, P. L. R., KEUKELEIRE, D., NASCIMENTO, R. F. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 2048, 2011.

MILLER, J. C., MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**. 2ª ed., Ellis Horwood: Chichester, 1988.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) - 2013**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso nov. 2014.

OVIEDO, M.T.P., TOLEDO, M.C.F., VICENTE, E. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 13, p. 9 -18, 2003.

RAMOS, J.J., GONZÁLEZ, L. R. **Journal of the Chromatography A**. n. 1216, p. 7307, 2009.

RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. **Química Nova**. v.27, n. 5, p. 771, 2004.

RISSATO, S.R., GALHIANEA, M.S., SOUZA, A.G., APONC, B.M. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 5, p. 1038, 2005.

SANTOS, S.A. **Química Nova**. v. 85, p. 43, 2002.

SPADOTTO, C.A., GOMES, M.A.F. **Agrotóxicos no Brasil 2005 – 2011**. Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html> Acesso nov. 2014.

YANG, X., ZHANG, H., LIU, Y., WANG, J., ZHANG, Y.C., DONG, A.J., ZHAO, H.T., SUN, C.H., CUI, J. **Food Chemistry**. v. 127, p. 855, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considera-se:

- Que na análise dos compostos voláteis foi possível traçar o perfil desses dos sucos de uva, utilizando-se da MEFS, fibra cinza (DVB/CAR/PDMS) e que o método desenvolvido foi eficiente para validar e quantificar trinta compostos voláteis nos sucos de uva integrais brasileiros, utilizando CG-EM-MSI. Esse método validado foi aplicado, com êxito em 33 sucos de uva comerciais e experimentais, sendo possível quantificar e caracterizar o suco de uva nacional no âmbito desses compostos responsáveis diretos pelo aroma dos mesmos, além de agrupar os sucos através da análise de componentes principais (ACP).
- Que na análise dos compostos não-voláteis foi possível agrupar e separar os sucos de uva através do uso da análise dos componentes principais (ACP), utilizando-se dos compostos identificados por QExactive.
- Que na análise de resíduos de 15 tipos de agrotóxicos nos sucos de uva foi possível desenvolver um método, que foi eficiente para validar e quantificar esses contaminantes na bebida, utilizando ELL/EFS e CG-EM-MSI. O método validado foi aplicado em 99 sucos de uva, sendo possível a detecção e quantificação de 32 resíduos de agrotóxicos nos sucos trabalhados.

APÊNDICES

Continuação do Apêndice A.

substâncias/suco	DC	GA	AU	CM	SB	SN	DG	MV	CL	PZ	PG	AL	GD	SP	US	PE	CB	AM	SI	GB	MT	EP	isaM	coraB	isaB	coraM	coraFM	chard_B	PE_B	mosc_B	ita_B	GD_B	CM_B	
<i>n</i> -hexanoato de etila	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	-	-
1-octen-3-ol	x	x	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	x	x	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	
heptanal	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
cimeno	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	-	x	-	-	-	
óxido de nerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	
sorbato de etila	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
decanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	
α -terpinoleno	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
benzaldeído	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	
terpinen-1-ol	x	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x	x	x	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5-metil 2-furfural	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	
ho-trienol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	-	-	x	
ácido benzoico	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
decanoato de etila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	
β -terpineol	-	x	-	-	x	x	x	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ocimeno	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -pineno	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nonanol	-	x	x	-	-	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> - β -ocimeno	x	-	-	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
canfeno	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ácido heptanoico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ácido hexanoico	-	-	-	-	x	x	x	x	-	-	-	-	x	-	-	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-
salicilato de etila	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
timol	-	-	-	-	x	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -cimen-8-ol	x	x	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
álcool benzílico	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -ionol	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ácido sórbico	-	-	x	-	-	-	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ácido decanoico	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notação: ocorrência do composto no suco de uva (x), não ocorrência (-).

AU, DC, US, entre outros tratam-se dos códigos atribuídos aos sucos de uva trabalhados.

Os sucos isaM, isaB, coraB, coraM, coraFM, chard_B, mosc_B e ita_B, refere-se aos sucos experimentais SA_isaM, SA_isaB, SA_coraB, SA_coraM, SA_coraFM, SA_chard_B, SA_mosc_B e SA_ita_B, respectivamente.

Apêndice B. Coeficientes de variação (CV %, n = 3) das substâncias identificadas nos sucos de uva pelo QExactive.

substância	CV (%)											
	AL	AM	AU	CB	SA_chard B	CL	CM	CM B	SA_coraB	SA_coraFM	SA_coraM	
ácido fosfórico	3,3	3,8	6,0	2,7	3,3	3,1	4,5	2,3	2,5	2,1	1,3	
ácido tartárico	3,5	3,4	6,7	4,1	4,9	2,4	3,1	2,3	2,3	2,0	1,1	
ácido carbônico	0,0	0,0	0,0	3,7	6,8	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
ácido cítrico	2,9	3,5	6,2	3,7	3,0	2,5	3,8	3,2	1,3	2,1	2,6	
ácido succínico	4,5	3,4	6,6	4,9	3,4	6,8	6,8	2,3	0,0	2,0	2,1	
ácido acético	3,5	3,5	6,8	3,7	3,4	3,5	4,2	2,3	3,3	4,3	1,3	
ácido ascórbico	5,7	6,8	6,7	3,7	3,7	2,5	4,3	2,3	2,1	1,4	2,7	
ácido <i>p</i> -coumárico	5,7	3,6	6,5	4,0	3,5	2,6	3,7	4,4	1,4	2,1	2,8	
ácido málico	4,8	3,4	6,5	5,4	5,2	3,2	2,9	2,3	2,2	3,3	2,3	
ácido caféico	3,9	4,5	4,7	5,8	4,2	2,4	4,0	2,3	2,4	4,3	1,2	
ácido quínico	4,9	3,4	6,4	4,1	3,2	6,8	4,2	2,4	2,8	1,3	4,1	
ácido <i>trans</i> -ferrárico	4,8	6,1	6,7	3,3	3,4	3,3	3,1	2,3	1,3	2,9	2,3	
ácido ferúlico	4,7	6,6	6,8	4,0	3,3	3,3	3,1	2,3	2,2	1,5	1,3	
ácido aspártico	3,4	3,4	6,4	4,8	3,7	2,5	3,5	2,3	0,0	1,9	2,3	
ácido malônico	6,8	3,5	5,2	4,9	6,8	2,3	2,5	2,3	0,0	0,0	0,0	
ácido coutárico	0,0	3,4	1,7	5,3	6,8	2,4	3,1	2,3	2,1	2,1	2,9	
ácido síringico	6,8	0,0	0,0	0,0	6,8	0,0	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
ácido propiónico	6,6	3,6	6,6	4,1	3,4	6,8	6,8	2,3	2,1	2,8	5,3	
ácido sinápico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	
ácido galico	0,0	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	2,1	
ácido cinâmico	0,0	0,0	5,8	1,8	6,7	3,7	3,1	2,3	2,1	2,3	2,3	
ácido <i>cis</i> -4-coumárico	6,8	4,1	6,5	5,1	5,3	2,4	3,8	2,3	2,3	2,1	2,9	
ácido <i>trans</i> -caftárico	6,7	6,8	6,8	3,1	6,3	0,0	3,8	2,3	0,0	0,0	0,0	
<i>L</i> -asparagina	4,2	3,4	6,2	3,4	6,6	4,8	4,6	2,3	1,3	1,2	2,2	
<i>L</i> -glutamina	3,5	0,0	0,0	6,8	3,1	6,8	6,1	2,3	2,6	2,9	2,2	
<i>L</i> -lisina	3,4	0,0	0,0	6,8	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>L</i> -valina	2,9	4,4	6,6	3,7	3,4	3,0	6,8	2,5	2,2	1,3	3,0	
<i>D</i> -glucose	6,0	3,5	6,7	5,8	3,4	2,4	4,0	2,3	1,4	1,0	2,6	
<i>L</i> -triptofano	0,0	0,0	0,0	6,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	2,0	
<i>L</i> -arginina	0,0	0,0	0,0	0,0	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>L</i> -prolina	6,3	6,5	5,5	5,8	3,5	2,3	2,8	2,3	0,0	2,1	2,3	
<i>L</i> -metionina	6,4	6,8	6,1	6,7	3,4	3,5	4,6	2,3	2,1	0,0	0,0	
<i>L</i> -tirosina	6,7	6,1	6,8	0,0	6,8	2,5	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>L</i> -leucina	0,0	0,0	2,6	6,8	3,4	3,4	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	
resveratrol	0,0	0,0	6,7	2,7	0,0	3,4	6,2	0,0	2,3	0,0	0,0	
pterostilbeno	0,0	0,0	0,0	6,8	1,3	0,0	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
4- <i>O</i> -cafeoilquinico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	
5- <i>O</i> -cafeoilquinico	0,0	0,0	6,8	6,8	3,5	3,4	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	
apigenina	0,0	0,0	6,1	1,8	0,0	6,8	6,8	2,3	2,1	2,3	0,0	
catequina	0,0	0,0	6,8	4,8	0,0	2,4	5,5	2,3	0,0	1,6	0,0	
coniferina	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	
galato de meila	6,1	0,0	5,7	0,0	6,8	2,3	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	
<i>p</i> -coumarato de etila	3,6	3,5	6,1	3,7	3,4	6,8	4,2	2,3	2,3	2,3	2,3	
malonato de dietila	6,7	3,5	6,6	3,4	3,5	3,9	4,6	2,3	2,1	2,2	2,3	
manitol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
tirosol	0,0	0,0	6,8	0,0	6,8	3,6	3,4	2,3	2,3	2,4	2,7	

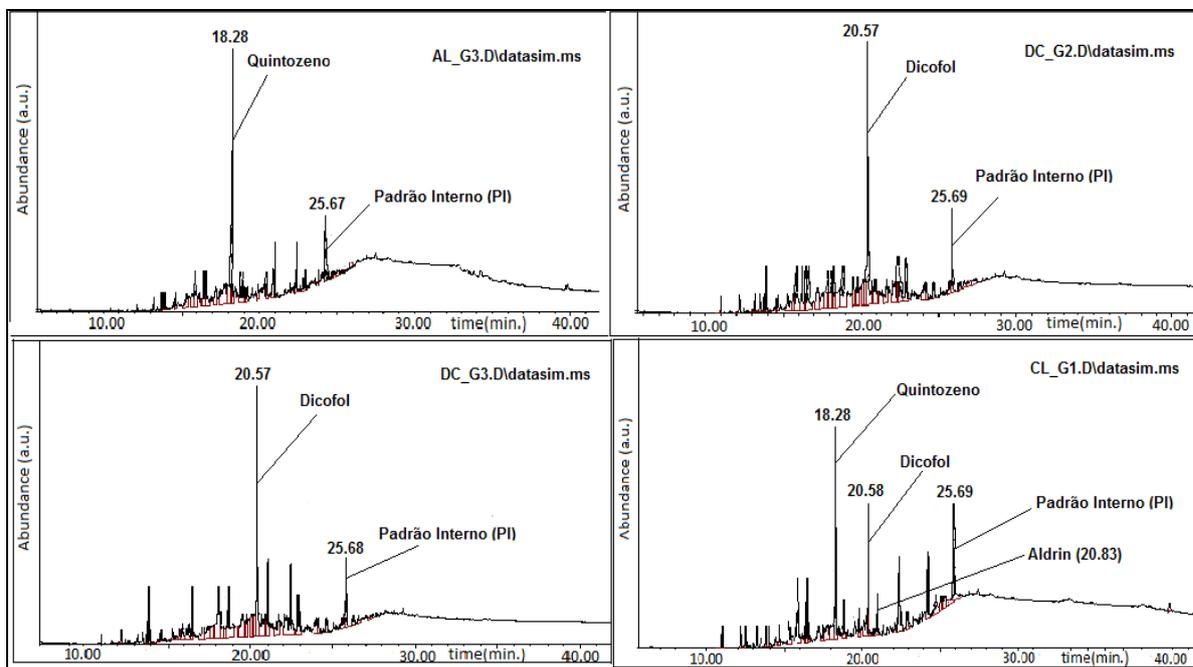
Continuação Apêndice B.

substância	CV (%)										
	DC	DG	EP	GA	GB	GD	GD B	SA_isaB	SA_isaM	SA_ita B	SA_mosc B
ácido fosforico	1,4	0,9	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	2,2	2,4	1,7	2,7
ácido tartarico	2,3	2,1	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2	3,9	6,7	2,2
ácido cítrico	2,5	0,9	1,5	3,7	3,4	3,9	2,4	2,2	2,3	6,8	3,5
ácido propionico	0,0	1,0	2,2	0,0	6,8	3,1	1,8	0,0	0,0	3,0	5,3
ácido carbônico	0,0	0,0	2,3	2,3	0,0	2,2	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0
ácido succinico	0,0	3,4	3,2	5,8	3,4	2,4	3,9	0,0	2,4	3,7	3,4
ácido acético	2,8	1,1	0,8	6,8	2,4	2,4	2,3	0,0	0,0	2,4	2,5
ácido ascorbico	2,3	0,9	1,8	3,7	3,9	2,4	2,4	0,0	2,4	3,9	2,2
ácido <i>p</i> -coumarico	2,5	1,3	0,4	5,8	2,4	3,9	2,4	6,8	3,9	2,4	2,2
ácido cafeico	1,5	2,5	0,9	0,0	2,4	2,4	2,2	3,4	2,4	2,4	4,0
ácido málico	1,5	1,1	2,5	6,8	3,5	2,4	6,0	2,0	2,4	6,8	3,1
ácido quínico	0,0	1,2	3,4	6,8	3,1	2,4	6,8	3,1	2,4	3,9	4,6
ácido <i>trans</i> -ferrítico	1,9	2,1	2,3	5,8	3,4	2,3	5,8	3,4	2,3	6,8	3,5
ácido ferúlico	0,0	3,4	4,0	3,4	3,5	2,2	3,4	3,5	2,4	3,7	3,4
ácido aspártico	2,2	1,9	0,9	3,7	3,7	3,7	3,4	6,5	3,9	4,6	3,9
ácido malônico	3,3	1,1	0,0	5,8	5,8	0,0	3,4	3,7	3,4	0,0	0,0
ácido síringico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ácido gálico	0,0	0,0	0,0	6,7	3,0	5,3	2,4	6,8	0,0	2,2	6,75
ácido cinâmico	2,3	1,1	2,5	0,7	3,3	3,4	3,3	3,7	3,0	5,3	0,0
ácido sinápico	0,0	0,0	0,0	1,8	2,4	0,0	0,0	2,2	1,9	0,0	2,5
ácido vanílico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0
ácido <i>cis</i> -4-coumarico	0,0	0,9	2,5	3,4	3,4	6,5	3,9	5,8	3,4	2,5	6,8
Ácido coumárico	0,0	2,2	2,2	1,3	5,8	3,4	5,8	3,3	3,4	3,3	3,1
ácido <i>trans</i> -caftárico	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	6,7	0,0	0,0
<i>L</i> -asparagina	3,5	1,2	2,0	6,8	6,8	6,8	3,5	6,7	2,4	4,0	2,4
<i>L</i> -glutamina	4,5	1,1	1,2	5,8	5,8	5,8	3,4	0,0	2,4	3,4	2,4
<i>L</i> -lisina	0,0	2,3	0,0	3,4	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L</i> -valina	2,3	2,2	0,0	3,9	3,9	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>D</i> -glucose	1,8	2,3	2,2	0,0	2,2	3,7	6,8	6,0	3,8	5,8	6,8
<i>L</i> -leucina	1,1	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0
<i>L</i> -prolina	2,2	2,5	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	6,8	6,0	6,8	0,8
<i>L</i> -metionina	2,5	2,2	2,9	6,5	5,3	0,0	6,7	1,7	3,1	1,7	3,5
<i>L</i> -tirosina	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L</i> -triptofano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,2	2,2	0,0	3,3	0,0	0,9
resveratrol	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,8	3,0	5,3	0,0
pterostilbeno	2,2	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5- <i>O</i> -cafeoilquinico	0,9	3,8	0,0	2,5	6,8	3,5	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>p</i> -coumarato de etila	0,0	3,0	5,1	6,8	3,1	6,8	3,1	0,0	6,7	5,8	3,4
malonato de dietila	1,7	2,0	2,5	1,8	6,8	5,8	3,7	6,3	3,1	6,8	6,0
galato de meila	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	2,5	0,0	0,0
apigenina	0,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	5,3	0,0	2,2	0,0
catequina	0,0	1,9	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	5,8	0,0	0,0	0,0
tirosol	3,0	3,8	2,5	0,9	3,0	5,3	2,4	5,3	3,0	5,3	2,4

Continuação Apêndice B.

substância	CV (%)										
	MT	MV	PE	PE_B	PG	PZ	SB	SI	SN	SP	UV
ácido fosforico	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2	1,2	2,9	4,9	1,2	2,9
ácido tartarico	2,2	5,3	3,1	2,2	6,5	2,2	2,2	5,3	3,1	2,2	5,3
ácido carbonico	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ácido propionico	0,0	0,0	1,5	5,3	2,4	1,2	2,9	4,9	2,1	0,0	3,5
ácido málico	2,5	3,4	3,5	2,4	6,0	2,5	2,5	3,4	3,5	2,5	3,4
ácido cítrico	1,5	3,7	3,4	3,9	2,4	1,5	1,5	3,7	3,4	1,5	3,7
ácido succinico	0,0	0,0	3,5	3,5	3,5	3,9	1,2	2,9	4,9	0,0	3,5
ácido acético	2,5	0,0	5,3	2,4	3,5	3,9	2,5	6,8	3,5	3,5	6,8
ácido ascorbico	1,2	1,7	5,3	5,3	3,4	2,4	1,5	3,7	3,4	3,4	3,5
ácido <i>p</i> -coumarico	2,2	3,5	3,5	3,5	3,5	3,9	1,2	2,9	4,9	6,8	3,4
ácido cafeico	2,5	2,2	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2	3,5	3,9	3,5
ácido quinico	0,0	0,0	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2	3,4	2,4	3,4
ácido <i>trans</i> -ferrárico	2,5	6,8	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2	3,5	0,0	3,5
ácido ferúlico	1,5	3,7	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2	3,4	3,5	3,4
ácido malônico	3,5	3,9	0,0	5,3	0,0	3,5	3,5	3,9	3,5	0,0	3,5
ácido coutárico	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	1,5	3,7	3,4	3,9	2,2	6,8
ácido aspártico	2,2	6,8	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2	3,5	5,3	6,8
ácido sinápico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
ácido siringico	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ácido gálico	0,0	0,0	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2	2,9	0,0	5,3
ácido cinâmico	2,2	2,5	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2	6,8	2,3	3,4
ácido <i>cis</i> -4-coumarico	3,4	2,4	3,5	3,4	3,5	3,4	3,4	2,4	1,4	2,2	3,4
ácido <i>trans</i> -caftárico	0,0	0,0	0,0	0,0	6,8	6,75	0,0	2,7	0,0	0,0	1,5
<i>L</i> -asparagina	1,2	2,9	1,5	3,7	3,4	3,9	2,4	1,5	5,3	6,8	3,4
<i>L</i> -glutamina	2,5	6,8	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2	3,4	3,5	5,3
<i>L</i> -lisina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	6,7	6,8	0,0	3,5
<i>L</i> -valina	0,0	0,0	0,0	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>D</i> -glucose	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2
<i>L</i> -leucina	0,0	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L</i> -prolina	5,3	2,4	0,0	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	3,5
<i>L</i> -metionina	3,4	3,3	2,2	5,3	0,0	0,0	6,7	3,5	2,2	2,5	3,4
<i>L</i> -tirosina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L</i> -arginina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L</i> -triptofano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9
resveratrol	2,5	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pterostilbeno	0,0	2,2	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0
apigenina	0,0	0,0	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2	6,8	2,2	0,0
catequina	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5- <i>O</i> -cafeoilquinico	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	2,2	6,8	3,1	2,2	0,0	3,4
<i>p</i> -coumarato de etila	0,0	0,0	2,5	6,8	3,5	2,4	6,0	2,5	6,8	3,4	3,5
malonato de dietila	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2	6,8	3,1	2,2	6,5	2,2
Galato de meila	6,75	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
manitol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
tirosol	2,2	3,4	1,2	2,9	4,9	2,1	4,7	1,2	2,9	0,0	0,0

Apêndice C. Cromatogramas dos sucos de uva integral: AL_G3 com resíduo de quintozeno ($34,52 \text{ mg L}^{-1}$); suco DC_G2 e DC_G3, com resíduos do agrotóxico dicofol com respectivamente, $21,38 \text{ mg L}^{-1}$ e $34,38 \text{ mg L}^{-1}$, e o suco de uva CL_G1, com os resíduos de aldrin, dicofol e quintozeno, respectivamente $13,20 \text{ mg L}^{-1}$, $34,00 \text{ mg L}^{-1}$ e $21,66 \text{ mg L}^{-1}$.



Publicações

<p>CHAPTER 78</p> <p>Method Development and Optimization of Liquid–Liquid Extraction for the Quantitative Analysis of Volatile Compounds from Brazilian Grape Juices</p> <p>Andréa A.R. Alves, Elisabete B.P. Barros and Claudia M. Rezende Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brazil</p>	
<p>ALVES, A.A.R., BARROS, E. B. P., REZENDE, C.M. Flavour Science. In: Vicente Ferreira e Ricardo Lopez. (Org.). Elsevier, v. 1, p. 417, 2014.</p>	
<p>Food Anal. Methods (2014) 7:1834–1839 DOI 10.1007/s12161-014-9823-9</p> <hr/> <p>Determination of Pesticides Residues in Brazilian Grape Juices Using GC-MS-SIM</p> <p>Andréa A. R. Alves · Aline S. Rodrigues · Elisabete B. Paula Barros · Thais M. Uekane · Humberto R. Bizzo · Claudia M. Rezende</p>	
<p>ALVES, A.A.R., RODRIGUES, A.S., PAULA BARROS, E.B., UEKANE, T.M., BIZZO, H.R., REZENDE, C.M. Food Analytical Methods. v. 7, p.1834, 2014.</p>	