



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

LUCIANA CAVALCANTI DE AZEVÊDO

*ESTUDO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS E OS
RESPECTIVOS ÁCIDOS
HIDROXIALQUILSULFÔNICOS EM VINHOS*

Salvador

Outubro de 2007

LUCIANA CAVALCANTI DE AZEVÊDO

ESTUDO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS E
OS RESPECTIVOS ÁCIDOS
HIDROXIALQUILSULFÔNICOS EM VINHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade
Co-Orientadora: Prof^a. Dra Luciana Almeida da Silva

Salvador

2007

Azevedo, Luciana Cavalcanti
Estudo de Compostos carbonílicos e os respectivos ácidos
hidroxialquilsulfônicos em vinhos./ Luciana Cavalcanti de Azevedo –
Salvador: L. C. Azevedo, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade
Co-Orientadora: Profa. Dra Luciana Almeida da Silva
Tese de Doutorado – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química,
2007.

A

Deus, por ter me dado a oportunidade de ser filha de pessoas tão especiais.

Audomar, esposo querido, por ter sido meu braço forte e apoio fundamental na infra-estrutura familiar...

Adriano, meu filho, por ser o principal motivo da minha busca em ser uma pessoa melhor.

Ao destino, por ter me reservado a pesquisa e o ensino como grande paixão.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade pela orientação, paciência e apoio em todas as etapas do trabalho;

À prof^a. Dra. Luciana Almeida da Silva pela co-orientação e principalmente pela disponibilidade em ouvir, aconselhar, ajudar, corrigir e participar muito próximo dos experimentos;

À prof^a. Dra. Gisele Olímpio da Rocha pela acolhida, amizade e também pela valiosa sugestão para melhoria deste trabalho, a quem serei eternamente grata;

À minha querida amiga Marina Mendonça Reis pelo companheirismo e força em todos os momentos e durante as muitas “horas extras” de trabalho. Sua companhia tornou mais leve os momentos difíceis. Que Deus abençoe todos os seus caminhos;

A todos os colegas e professores do LPQ aos quais agradeço o carinho e ajuda: Joyce, Lílian, Lídia, Mariângela, Eliane, Regina, Ney, André, Tatiana, Fred, Márcia, Vilma, Wilson, Luiz, Pedro, Cláudia, Talitha e Fábio.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFBA por ter acreditado na proposta deste projeto selecionando-o para ser desenvolvido com apoio de seus profissionais.

Ao CEFET Petrolina, na pessoa do Diretor Sr. Sebastião Rildo Fernandes Diniz, que possibilitou a minha ausência das atividades para desenvolver os experimentos na UFBA. Em especial, aos colegas Marta Eugênia, Edigênia, Cícero Antônio, Luciano Manfroi, Carlos Anailton e Luiz Frederico Motta, pelo estímulo e apoio.

A todas as vinícolas do Vale do São Francisco pela confiança no meu trabalho e por terem atendido tão prontamente a minha solicitação de amostras de vinhos e uvas para pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho, em especial a professora Dra. Elina Bastos Caramão (UFRGS), prof. Dr. Jorge Maurício David (UFBA) e o Dr. Giuliano Elias Pereira (EMBRAPA/CPATSA).

“A estrada se deita debaixo dos pés para servir.
A gota de orvalho se desfaz na terra para servir.
O grão de areia que ninguém vê enterrado no alicerce
sustenta nos ombros o arranha-céu para servir.
No entanto, a pedra mais alta, soberba, no cimo da torre é
aquela que menos serve, que menos peso carrega”.

*Os gestos mais simples de
doação carregam significados
nobres e muitas vezes
inesquecíveis, transformando
companheiros de rotina em
grandes amigos.*

Adaptado de Padre Tarcísio Marchiori (1963)

RESUMO

A análise dos compostos carbonílicos (CCs) é um dos procedimentos de rotina em muitos laboratórios de controle de qualidade de bebidas, no entanto, atualmente são quantificados apenas os CCs totais expressos em teores de acetaldeído, sem que sejam associados outros CCs com a sua qualidade. Esses compostos possuem impacto olfativo no aroma dos vinhos e uma forte afinidade pelo bissulfito, adicionado na vinificação, podendo formar adutos estáveis que interferirão também no aroma. Os maiores desafios, no entanto, consistem em prever quais CCs têm maior afinidade pelo S(IV), que circunstâncias favorecem esta interação e como analisá-los em conjunto. Por esse motivo, no presente estudo foi avaliado o perfil de 22 CCs em “solução modelo” e em dez amostras reais de vinhos, empregando uma metodologia desenvolvida e validada para analisá-los de forma simultânea, que utiliza CLAE com sistema de gradiente binário de eluição.

Baseado na Análise de Componentes Principais (ACP) e nas constantes de dissociação (K_d), os resultados revelaram que os aldeídos alifáticos formam adutos com S(IV), enquanto as cetonas, os aldeídos cíclicos e os trans-alcenais interagiram fracamente e são encontrados predominantemente em sua forma livre. Estes resultados revelaram também que a faixa de pH entre 10 e 11 foi definida como a mais apropriada para a dissociação do aduto CC-S(IV), favorecendo a quantificação segura dos CCs na forma total. Nos vinhos e uvas estudados foram identificados o formaldeído, acetaldeído, butanal, hexanal, furfural, benzaldeído, *E*-penten-2-al, ciclo hexanona e 2-etil hexanal, sendo este último identificado pela primeira vez neste tipo de matriz. Os quatro primeiros aldeídos citados podem ser considerados aromas primários por estarem presentes tanto nos vinhos quanto nas uvas que lhes deram origem.

ABSTRACT

Carbonyl compounds analysis is one of the routine procedures in several laboratories of control and quality of beverages. However, only total CCs, expressed by the acetaldehyde concentration, are quantified which results in a lack of knowledge about the beverage's quality and other CC concentrations. Although present in minute quantity, other CCs have a strong olfactory impact in many fermented beverages. In addition, the CCs found in wines have a strong affinity for bisulfite, added in winemaking process, and can form stable adducts, which will also interfere in the characteristics of aroma. The greatest challenge, however, is to predict which CCs have the strongest affinity for S(IV), what conditions favor this interaction and how to analyze them jointly. In order to better understand the reaction of CC-bisulfite adduct formation, this study has evaluated the role of 22 CCs in a "model solution" containing bisulfite and in ten real samples of different wines, using a methodology developed and validated to analyze them simultaneously. This methodology is based on HPLC with binary gradient system of elution.

On the basis of Principal Component Analysis (PCA) and dissociation constants (K_d), the results revealed that aliphatic aldehydes form adducts with S(IV), whereas ketones, cyclic aldehydes and trans-alkenes interact weakly and are found predominantly in their free form. These results revealed also that pH 10 and 11 were defined as the most appropriate for CC-S(IV) adduct dissociation and the total CCs were quantified reliably. In the wines and grapes studied were identified formaldehyde, acetaldehyde, butanal, hexanal, furfural, benzaldehyde, cyclo hexanone, *E*-pent-2-en-1-al, and 2-ethyl hexanal, being the last one firstly identified in wines. Formaldehyde, acetaldehyde, butanal, and hexanal can be considered primary aroma since they are present in wines as well in their respective grapes.

KEYWORDS: wine, carbonyl compounds, hidroxialquilsulfonic acids

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A INDÚSTRIA DO VINHO NO BRASIL	4
2.1.1. Os vinhos do semi-árido brasileiro	8
2.1.2. Elaboração de vinhos: desafios atuais	10
2.2. PRINCIPAIS COMPONENTES VOLÁTEIS NOS VINHOS	11
2.2.1. Formação do aroma nos vinhos	11
2.3. COMPOSTOS CARBONÍLICOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS	14
2.3.1. Compostos carbonílicos identificados em vinhos	15
2.3.2. Influência dos CCs na qualidade dos vinhos	34
2.3.3. Interação dos CCs com o SO ₂ e formação de AHAS	37
2.3.3.1. Importância do SO ₂ na elaboração de vinhos	37
2.3.3.2. Moléculas que se combinam com o S(IV)	39
2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS	42
2.4.1. Reação de derivatização do analito	43
2.4.2. Condições de separação e detecção	45
2.4.3. Quantificação de CCs e seus ácidos hidroxialquilsulfônicos	48
3. OBJETIVOS	49
3.1. OBJETIVO GERAL	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	50
5. PARTE EXPERIMENTAL	51
5.1. REAGENTES, SOLVENTES E SOLUÇÕES	51
5.1.1. Reagentes	51
5.1.2. Solventes	52
5.1.3. Preparo e purificação da solução de hidrazina (2,4-DNPH)	52
5.1.4. Síntese de hidrazonas dos compostos carbonílicos (2,4-DNPHo-CC)	53
5.1.5. Preparo das soluções-estoque das hidrazonas (2,4-DNPHo-CC)	53
5.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	54
5.3. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS	55

5.4. ANÁLISE DO pH DO VINHO	57
5.5. ANÁLISE DO BRUX DA UVA	57
5.6. ANÁLISE DE COMPOSTOS CARBONILICOS POR CLAE	57
5.6.1. Preparo de amostras	57
5.6.1.1. Amostras de uvas	57
5.6.1.2. Amostras de vinhos	58
5.6.2. Reação de Derivatização	60
5.6.2.1. Teste para definição do volume de amostra	61
5.6.2.2. Teste de proporção amostra: 2,4-DNPH (v/v)	61
5.6.3. Condições cromatográficas	62
5.6.3.1. Teste de programações de separação	63
5.6.3.2. Teste de fases móveis	64
5.6.4. Figuras de mérito	64
5.6.4.1. Seletividade	64
5.6.4.2. Linearidade e faixa linear de trabalho	65
5.6.4.3. Precisão	66
5.6.4.4. Limite de detecção (LD)	67
5.6.4.5. Limite de quantificação (LQ)	67
5.6.4.6. Validação (teste de recuperação)	68
5.6.5. Testes com solução modelo	68
5.6.5.1. Preparo da solução modelo	68
5.6.5.2. Condições de análise	71
5.6.5.3. Análise estatística	71
5.6.5.4. Determinação de espécies S(IV) por titulometria	73
5.6.6. Testes com vinho comercial	74
5.6.7. Avaliação da estabilidade do vinho após abertura da garrafa	75
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
6.1. OBTENÇÃO DE HIDRAZONAS	75
6.2. DETERMINAÇÃO DO pH DO VINHO	78
6.3. DETERMINAÇÃO DO BRUX DAS UVAS	79
6.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	80
6.4.1. Sistema isocrático (etapa I)	80
6.4.2. Sistema gradiente (etapas II e III)	82
6.4.2.1. Teste de programação	86

6.4.2.2. Teste de fase móvel	88
6.4.2.3. Teste de volume de amostra	90
6.4.2.4. Definição da proporção de amostra:2,4-DNPH	91
6.5. FIGURAS DE MÉRITO	93
6.5.1. Seletividade	93
6.5.2. Linearidade e faixa linear de trabalho	97
6.5.3. Precisão	101
6.5.4. Limites de detecção e quantificação	102
6.5.5. Validação do método	104
6.6. ANÁLISE DE CCs EM SOLUÇÃO MODELO	108
6.7. ANÁLISE DE ESPÉCIES DE S(IV) LIVRES EM SOLUÇÃO MODELO	123
6.8. ANÁLISE DE CCs EM VINHOS COMERCIAIS	125
6.8.1. Quantificação de CCs em vinhos brancos	125
6.8.2. Quantificação de CCs em vinhos tintos	130
6.9. ANÁLISE DE CCs EM UVAS VINÍFERAS	135
6.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CC NO VINHO	140
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	143
8. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	146
9. REPERCUSSÃO DO TRABALHO	147
9.1. ARTIGOS ACEITOS E SUBMETIDOS	147
9.2. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	147
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa das regiões vitivinícolas brasileiras associado às suas condições climáticas.	5
Figura 2.	Área de uva plantada no Brasil (ha) - ano 2005.	6
Figura 3.	Produção de uva no Brasil (t) - ano 2005.	7
Figura 4.	Exportações e importações brasileiras de uvas e derivados no período de 2000 a 2003.	7
Figura 5.	Representação geográfica do Vale do São Francisco.	9
Figura 6.	Principais compostos terpênicos presentes nas uvas e nos vinhos aromáticos.	12
Figura 7.	Concentrações de furfural e 5-hidroximetil-furfural (HMF) determinadas em brandies comerciais, com caramelo adicionado. a) envelhecimento em sistema dinâmico; b) envelhecimento em sistema estático.	20
Figura 8.	Concentrações de aldeídos furfural e 5-hidroximetil-furfural (HMF) determinadas em <i>brandie</i> envelhecido em barril de madeira, sem adição de caramelo.	20
Figura 9.	Fórmulas estruturais dos aldeídos identificados em vinhos.	32
Figura 10.	Fórmulas estruturais das cetonas identificadas em vinhos.	33
Figura 11.	Reação de derivatização dos compostos carbonílicos com 2,4-DNPH.	44
Figura 12.	Extração e purificação da solução de 2,4-DNPH.	52
Figura 13.	Uvas viníferas analisadas.	56
Figura 14.	Esquema de preparo de amostra para análise de CCs em uvas por CLAE: a) uvas inteiras desengaçadas; b) esmagamento para retirada do suco; c) suco; d) remoção do extrato com seringa; e) filtragem; f) derivatização sob sonicação; g) pré concentração em cartucho C18 e h) eluição com acetonitrila.	58
Figura 15.	Esquema de preparo de amostra para análise de CCs em vinhos por CLAE: a) derivatização com 2,4-DNPH sob sonicação; b) filtragem da amostra derivatizada e concentração em cartucho C18; c) eluição com acetonitrila; d) amostra pronta para ser injetada em CLAE.	60
Figura 16.	Esquemas de preparo de amostra para análise de CCs livres em	61

vinhos: a) etapa I; b) etapa II; c) etapa III.

- Figura 17. Diagrama de preparo de amostra para avaliação da estabilidade do aduto AHAS em “solução modelo”. 70
- Figura 18. Cromatograma de uma solução contendo padrões de 16 CCs submetidos à separação por CLAE em sistema isocrático. Picos: 1 – formaldeído; 2 – acetaldeído; 3 – furfural; 4 – propanal; 5 – propanona; 6 – butanal; 7 – iso-butanal; 8 – ciclo pentanona; 9 – benzaldeído; 10 – *E*-pent-2-en-1-al; 11 – ciclo hexanona; 12 – *E*-hex-en-1-al; 13 – hexanal; 14 – heptanal; 15 – octanal; 16 – 2-etil-hexanal. 82
- Figura 19. Cromatogramas comparativos de uma solução contendo padrões de 16 CCs submetidos à separação por CLAE em sistemas isocrático e gradiente. Picos: 1 – formaldeído; 2 – acetaldeído; 3 – furfural; 4 – propanal; 5 – propanona; 6 – butanal; 7 – iso-butanal; 8 – ciclo pentanona; 9 – benzaldeído; 10 – *E*-pent-2-en-1-al; 11 – ciclo hexanona; 12 – *E*-hex-en-1-al; 13 – hexanal; 14 – heptanal; 15 – octanal; 16 – 2-etil-hexanal. 84
- Figura 20. Cromatogramas de uma amostra de vinho branco submetida à análise por CLAE em sistemas isocrático e gradiente. As letras indicam os diversos CCs separados na amostra. 84
- Figura 21. Cromatogramas de uma solução padrão contendo 16 CCs, obtidos em três programações diferentes. Picos: 1 – formaldeído; 2 – acetaldeído; 3 – furfural; 4 – propanal; 5 – propanona; 6 – butanal; 7 – iso-butanal; 8 – ciclo pentanona; 9 – benzaldeído; 10 – *E*-pent-2-en-1-al; 11 – ciclo hexanona; 12 – *E*-hex-en-1-al; 13 – hexanal; 14 – heptanal; 15 – octanal; 16 – 2-etil-hexanal. 87
- Figura 22. Cromatogramas de uma amostra de vinho branco separada por CLAE, por diferentes fases móveis. Os picos representam os diversos CCs presentes na amostra, posteriormente identificados. 89
- Figura 23. Concentrações de formaldeído, acetaldeído, 2-etil-hexanal e ciclo hexanona em vinhos brancos (a) e tintos (b), obtidos no teste de proporção amostra:2,4-DNPH 0,4%. 92
- Figura 24. Curvas analíticas das amostras com adição de padrões (—) e dos padrões puros (----) utilizadas na verificação do teste de seletividade 95

do método: a) formaldeído, b) acetaldeído, c) furfural, d) E-pent-2-en-1-al, e)propanona, f) butanal, g) hexanal, h) 2-etil-hexanal.

- Figura 25. Intervalos de faixa linear de trabalho para os CCs identificados no vinho: a) formaldeído, b) acetaldeído, c) furfural, d) E-pent-2-en-1-al, e)propanona, f) butanal, g) hexanal, h) 2-etil-hexanal. 99
- Figura 26. Diagrama de *Scores* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) revelando o agrupamento das amostras em três subgrupos: aldeídos, cetonas e trans-alcenais. 109
- Figura 27. Diagrama de *Loadings* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) revelando as variáveis responsáveis pelo agrupamento das amostras em subgrupos (CCL-livre; CCLig-ligado e CCT-total) 110
- Figura 28. Variação da concentração de CCs em função do pH em solução modelo, usando as equações quadráticas obtidas na regressão. 112
- Figura 29. Percentual de CC livre e CC ligado em amostras de solução modelo (pH 11), analisado individualmente. 119
- Figura 30. Percentual de CC livre e CC ligado em amostras de solução modelo (pH 11), analisado em mistura. 120
- Figura 31. Cromatogramas dos CCs encontrados nos vinhos brancos. 1 - formaldeído, 2 - acetaldeído, 3 - furfural, 4 - butanal, 5 - benzaldeído, 6 - hexanal e 7 - 2-etil-hexanal. 127
- Figura 32. Cromatogramas dos CCs encontrados nos vinhos tintos. 1 - formaldeído, 2 - acetaldeído, 3 - furfural, 4 - butanal, 5 - benzaldeído, 6 - hexanal e 7 - 2-etil-hexanal. 132
- Figura 33. Cromatogramas das amostras de uvas: a) *Syrah*, b) *Moscato canelli* e c) *Cabernet Sauvignon*, e dos seus respectivos vinhos. 139
- Figura 34. Curvas de acompanhamento da concentração de CCs no vinho branco (a) e tinto (b), em garrafas abertas. 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades sensoriais e limites de percepção de alguns transalcenais.	22
Tabela 2.	Compostos carbonílicos identificados em amostras de vinho.	31
Tabela 3.	Abundância relativa das duas espécies de S(IV) em função do pH, a 20°C, em solução aquosa.	39
Tabela 4.	Sistemas de separação e detecção de compostos carbonílicos em amostras ambientais, alimentos e bebidas por CLAE (coluna C18).	46
Tabela 5.	Concentração (mg L ⁻¹) de formaldeído, acetaldeído e seus respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos.	48
Tabela 6.	Padrões de compostos carbonílicos utilizados e suas características.	51
Tabela 7.	Concentrações das soluções-estoque de hidrazonas, fator individual de correção de cada CC e concentrações corrigidas dos CCs.	54
Tabela 8.	Condições cromatográficas para separação de CCs em sistemas isocrático e gradiente.	62
Tabela 9.	Observações importantes relacionadas à síntese e recristalização das hidrazonas.	76
Tabela 10.	Valores de pH dos vinhos brancos e tintos analisados.	79
Tabela 11.	Valores de brix das uvas analisadas.	80
Tabela 12.	Concentração de CCs (mg L ⁻¹) no vinho branco, safra 2003: etapa I.	81
Tabela 13.	Concentração de CCs (mg L ⁻¹) no vinho branco, safra 2003: etapa II.	85
Tabela 14.	Numero de picos obtidos em teste de variação de volume de amostra.	90
Tabela 15.	Curvas analíticas ($y = ax + b$) para determinação de 2,4-dinitrofenilhidrazonas de CCs, por CLAE.	97
Tabela 16.	Resultados da análise de variância das curvas analíticas ($gl_1=1$; $gl_2=8$).	98
Tabela 17.	Faixa linear de trabalho (valores em mg L ⁻¹) para os CCs encontrados na uva e nos vinhos.	101
Tabela 18.	Média, desvio-padrão e coeficiente de variação da concentração de CCs em amostras de solução modelo.	102
Tabela 19.	Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) do método para os	103

CCs encontrados no vinho, obtidos através dos dados fornecidos pelas curvas (sistema gradiente).

Tabela 20.	Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) do método para os CCs encontrados no vinho, obtidos por concentração decrescente, nos sistemas isocrático e gradiente.	103
Tabela 21.	Recuperações dos CCs adicionados em determinada amostra de vinho e em diferentes concentrações (concentração em mg L ⁻¹ , n=7).	105
Tabela 22.	Equações de regressão relacionando a concentração de CCs em função do pH e respectivos coeficientes de determinação.	113
Tabela 23.	Contribuição dos autovalores das variáveis para PC1 e PC2.	114
Tabela 24.	Percentual de variância acumulativo para PC1 e PC2.	115
Tabela 25.	Concentração (mg L ⁻¹) de CCs livres, ligados e totais em solução modelo, estudados individualmente.	118
Tabela 26.	Concentração (mg L ⁻¹) de CCs livres, ligados e totais em solução modelo, estudados em mistura.	118
Tabela 27.	Constantes de dissociação (K _d) de adutos CC-S(IV) em pH 3,5.	124
Tabela 28.	Caracterização das amostras de vinho branco analisadas.	125
Tabela 29.	Concentração (mg L ⁻¹) de CCs identificados em vinhos brancos nas formas livre (CCL), ligada (CCLig) e total (CCT), (n=3).	129
Tabela 30.	Caracterização das amostras de vinho tinto analisadas.	131
Tabela 31.	Concentração (mg L ⁻¹) de CCs identificados em vinhos tintos nas formas livre (CCL), ligada (CCLig) e total (CCT), (n=3).	134
Tabela 32.	Concentração (µg de CC/ g de uva) de CCs identificados em uvas de algumas cultivares de videiras (<i>Vitis vinífera</i>).	136
Tabela 33.	Equações de regressão relacionando a concentração de CCs em função dos dias de estocagem do vinho aberto sob refrigeração e respectivos coeficientes de correlação.	142

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Via metabólica da fermentação alcoólica.	16
Esquema 2.	Formação de aldeídos e álcoois contendo seis átomos de carbono na cadeia, a partir de ácidos graxos polinsaturados da uva.	21
Esquema 3.	Formação de diacetil por levedura, em anaerobiose (TPP: pirofosfato de tiamina; TPP-C ₂ : acetaldeído ativo).	24
Esquema 4.	Vias metabólicas de degradação do ácido cítrico por bactérias lácticas.	25
Esquema 5.	Via metabólica de obtenção da acroleína.	26
Esquema 6.	Formação de acroleína a partir de aminoácidos sulfurados.	27
Esquema 7.	Via metabólica da obtenção da β -damascenona.	29
Esquema 8.	Distribuição das diferentes formas de S(IV) em solução aquosa.	38
Esquema 9.	Reação de formação dos ácidos hidroxialquilsulfônicos.	40
Esquema 10.	Estruturas de ressonância e híbrido de ressonância de aldeídos α e β -insaturados para reação de adição simples.	121
Esquema 11.	Adição conjugada, através da via de adição de "Michael", entre um ânion e compostos carbonílicos α , β -insaturados.	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCs	Compostos Carbonílicos
CCL	Compostos Carbonílicos Livres
CCLig	Compostos Carbonílicos Ligados
CCT	Compostos Carbonílicos Totais
LPO	Limite de Pecepção Olfativa
2,4-DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
2,4-DNPHo-CC	2,4-dinitrofenilhidrazona do CC
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
OIV	Organization International de la Vigne et du Vin
DIENDIOL 1	3,7-dimetil-1,5 octadieno-3,7-diol
DIENDIOL 2	3,7-dimetil-1,7 octadieno-3,6-diol
ENDIOL	3,7-dimetil-1 octen-3,7-diol
TRIOL	3,7-dimetil-1 octen-3,6,7-triol
5-HMF	5-Hidroxi-metil-2-furaldeído
F	2-furaldeído (furfural)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
AHAS	Ácido hidroxialquilsulfônico
AHMS	Ácido hidroximetanosulfônico
AHES	Ácido hidroxietanosulfônico
UV/VIS	Ultravioleta/visível
d ₃ D-NPH	2,4-dinitro-3,5,6-trideuterofenilhidrazina
ACP	Análise de Componentes Principais (ou PCA – inglês)
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
ACN	Acetonitrila
FR	Fator de Resposta

1. INTRODUÇÃO

O vinho é um produto natural resultante de inúmeras reações bioquímicas que se iniciam durante a maturação das uvas e continuam durante a colheita, através da fermentação e após o engarrafamento¹. O conjunto das substâncias resultantes de todas essas reações está representado por várias classes de compostos e é responsável pelo *flavour* final do vinho. Fazem parte desse conjunto: hidrocarbonetos, álcoois, terpenos, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis voláteis, lactonas e compostos sulfurados e nitrogenados¹⁻⁵.

A complexidade do aroma nos vinhos está refletida não só pela variedade de compostos presentes, mas pela faixa de concentração na qual se apresentam, podendo ser encontrados mais de mil componentes aromáticos em níveis de concentrações que variam de mg L⁻¹ (alguns álcoois) a ng L⁻¹ (cetonas). Além disso, nem todos contribuem com a mesma intensidade ao aroma, pois essa contribuição depende diretamente do limite de percepção⁶.

Todos esses compostos podem apresentar um papel importante na caracterização do aroma de cada tipo de vinho, inclusive diferenciando um vinho de outro. Em alguns casos, um pequeno número deles parece colaborar de forma mais intensa na tipicidade dessa bebida, mas todos ajudam a formar a sua “personalidade”. Portanto, conhecer melhor os componentes aromáticos desta bebida significa estabelecer novos critérios para controlar a sua qualidade, podendo haver, desta forma, um impacto na vitivinicultura e no processo de produção.

Condições climáticas e de cultivo, tipo de uva, amadurecimento, microbiota natural, fatores biológicos, processos fermentativos, tipo de produção e envelhecimento são alguns dos fatores que podem influenciar quantitativa e qualitativamente na produção dos compostos aromáticos dos vinhos^{2,4,7}. O clima quente e seco do Submédio Vale do São Francisco, localizado no sertão nordestino, é um exemplo desta influência. O calor intenso e a falta de chuva são características típicas da região e favorecem o amadurecimento das uvas e a concentração de açúcar, prejudicando, por outro lado, o índice de acidez⁸.

Algumas vezes, a presença de certos constituintes químicos pode ser indesejável, principalmente quando conferem sabores e odores estranhos ao

paladar, podendo reduzir drasticamente a qualidade e o valor comercial do vinho. A maioria dos defeitos percebidos nesta bebida está associada à presença de ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas obtidos de fermentações paralelas (contaminações), oxidações enzimáticas de ácidos graxos provenientes da casca e sementes da uva e/ou pela oxidação de álcoois⁹. Os álcoois são os precursores mais importantes na síntese de compostos carbonílicos (CCs) sendo a desidrogenação alcoólica o principal mecanismo de formação de aldeídos, especialmente do acetaldeído¹⁰. O acetaldeído aparece com frequência em cervejas e vinhos submetidos ao contato com o ar. No caso dos vinhos, as pesquisas realizadas com o intuito de avaliar a sua qualidade indicam o acetaldeído como principal marcador químico de deterioração oxidativa. De fato, este é o principal componente resultante da oxidação do etanol, no entanto, outros aldeídos foram identificados por Escudero e colaboradores¹¹, quando estudavam os vinhos brancos submetidos à oxidação induzida.

Todos os CCs são importantes para as propriedades sensoriais dos vinhos, mas ainda não está claro o seu papel efetivo na formação da característica “oxidada” deste produto. A identificação de outros CCs em vinhos pode ser um recurso importante na busca pela padronização sensorial desta bebida. Em linhas gerais, pode-se dizer que aldeídos de baixa massa molar marcam negativamente os vinhos, produzindo os gostos herbáceos e de ranço, depreciadores do produto e que os aldeídos de cadeia longa são muito mais agradáveis ao aroma e ao paladar, constituindo os sabores vitais de um bom vinho. No entanto, do ponto de vista analítico, os CCs de alta massa molar apresentam certa dificuldade de separação e quantificação, fato este que tem limitado o seu estudo em qualquer tipo de amostra¹².

Um procedimento analítico utilizando o método CLAE foi desenvolvido por de Oliveira e de Andrade (1994)¹³, visando a análise simultânea do formaldeído e do acetaldeído em vinhos. Este procedimento baseia-se no fato de que os CCs podem ser caracterizados por meio de reações de adição da carbonila com reagentes nucleofílicos. Por este motivo, utiliza-se a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) para derivatizar os aldeídos presentes na amostra, identificando-os através das suas respectivas hidrazonas. Os autores levaram em conta também a existência de conservantes à base de enxofre no

vinho. Esses aditivos reagem com uma parte dos aldeídos presentes na amostra formando ácidos hidroxialquilsulfônicos e, portanto, esses ácidos também devem ser avaliados na matriz^{14, 15}.

A identificação destes e de outros componentes químicos nos vinhos é importante para auxiliar no controle de qualidade, na condução de misturas adequadas, na certificação das bebidas e também para atender a requisitos legais¹⁶.

Neste trabalho serão apresentadas as considerações feitas por diversos autores quanto à presença de CCs em vinhos, sua influência no aroma e as técnicas freqüentemente aplicadas para sua identificação. A principal proposta deste trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica capaz de identificar todos os CCs presentes no vinho na forma livre ou combinada, assim como entender o equilíbrio envolvido nas reações de formação do aduto com o bissulfito.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A INDÚSTRIA DO VINHO NO BRASIL

O vinho é uma bebida milenar, sua fabricação começou provavelmente no período neolítico, 8.500 a.C. Alguns achados arqueológicos levam a crer que o consumo desta bebida era um hábito comum entre todas as civilizações antigas. Nas montanhas Zagros, no norte do Irã, foi encontrado um jarro de 7.000 anos com capacidade para 9 litros de vinho e algumas pinturas encontradas numa tumba egípcia mostram que aquele povo também dominava as técnicas de colheita da uva e fabricação do vinho¹⁷.

No Brasil, a produção de vinhos começou quando imigrantes do norte da Itália se instalaram no sul do país no início do século XIX, trazendo a tradição europeia de fabricação e consumo. A produção de vinho brasileira ainda está em fase de expansão, mas a viticultura já colocou o país entre os 10 maiores produtores de uva de mesa do mundo, com boas perspectivas de crescimento já que novas variedades de uvas apirênicas (sem sementes) estão sendo cultivadas.

O comportamento da produção e do mercado de vinhos no Brasil é bastante complexo, pois cada região produtora possui realidades bem diferentes como: condições climáticas, variedades, tipos de solo, etc. Atualmente, o maior pólo nacional da vitivinicultura está localizado na Serra Gaúcha (RS), de onde saem 90,0% dos vinhos e dos espumantes produzidos no País, no entanto, fortes investimentos também têm sido feitos em outras áreas, do Sul ao Sudeste e do Centro-Oeste ao Nordeste¹⁸ (Figura 1).

A vitivinicultura nacional consolidou-se no Vale dos Vinhedos (Serra Gaúcha) pela implantação de mais de cem variedades de uvas americanas e híbridas, destas apenas 20 cultivares são apropriadas para produção de sucos e vinhos de mesa comuns. O Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina, também apresenta este perfil e é uma região de significativa expressão econômica, onde os vinhedos ocupam 1.706,91 hectares¹⁸.

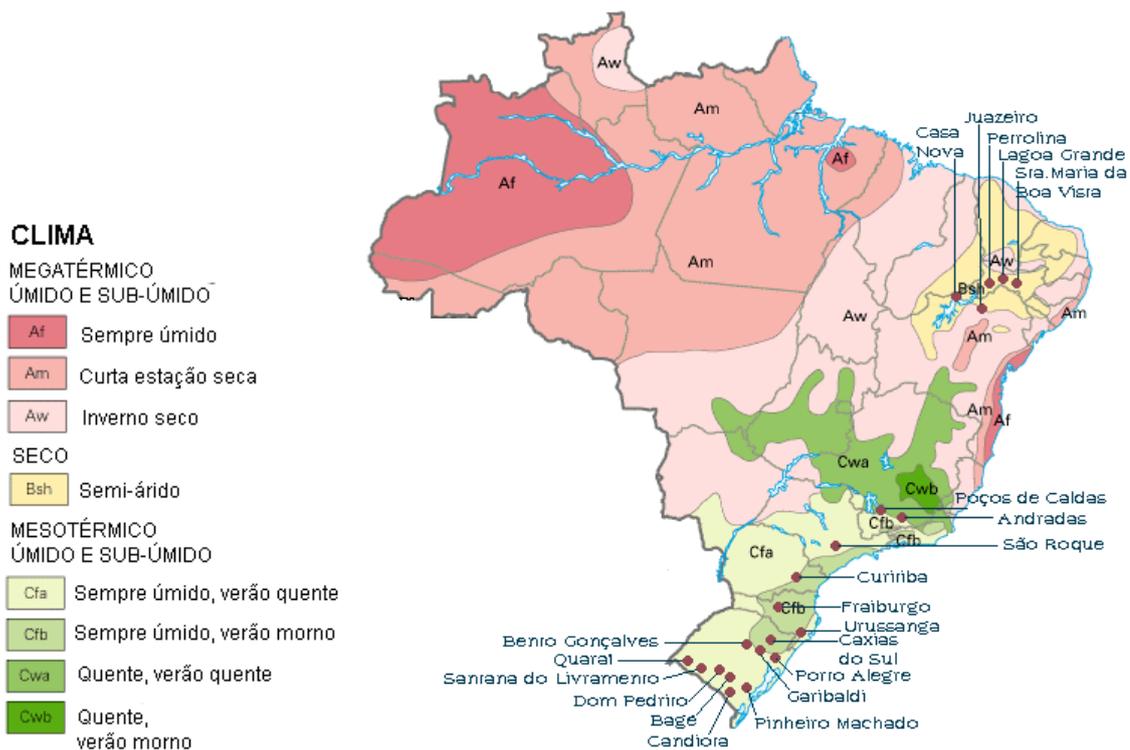


Figura 1: Mapa das regiões vitivinícolas brasileiras associado às suas condições climáticas⁸.

Na década de 70, variedades de uvas européias (*V. viniferas*) foram introduzidas na região semi-árida do país dando início à produção de vinhos finos, surgindo assim, a vitivinicultura tropical brasileira, cujo principal pólo produtor está localizado no Vale do São Francisco, nos estados de Pernambuco e Bahia. Hoje, os novos pólos de produção, conhecidos como: Fronteira, Serra do Sudeste, Campos de Cima da Serra e Planalto Catarinense, todos no sul do país, também investem no segmento de vinhos finos.

Minas Gerais, no Sudeste do Brasil, também figura no cenário de produção de vinhos nacionais com dois importantes pólos: O pólo vitícola do Sul, compreendendo os municípios de Caldas, Andradás e Santa Rita de Caldas, e outro ao Norte, no município de Pirapora.

O mais novo endereço da atividade vitivinícola no Brasil é o município de Santa Helena de Goiás (GO), com vocação para uvas de mesa, vinhos de mesa comuns e suco concentrado. Uvas de mesa e sucos concentrados de uva também podem ser encontrados em Nova Mutum (Norte do Mato Grosso),

nos pólos de Marialva e de Bandeirantes (no Paraná), em Jales (Noroeste de São Paulo) e em Brejo Santo (Ceará).

Nas regiões tradicionais ou nos novos pólos, a modernização tecnológica e genética tem favorecido a participação brasileira no mercado internacional de uvas de mesa, sucos e vinhos. Cada pólo possui suas características culturais, climáticas, tecnológicas e mercadológicas diferenciadas, produzindo vinhos e espumantes bem distintos e gerando uma cadeia produtiva claramente segmentada¹⁸. Em todas essas áreas o enoturismo tem sido usado como veículo para gerar oportunidades de negócio e rendimentos adicionais. Além de diversificar a economia rural e gerar renda, o agroturismo tem o importante papel de preservar a identidade visual e cultural das comunidades e paisagens rurais¹⁹.

Segundo dados obtidos pelo IBGE (citado por EMBRAPA UVA E VINHO, 2005²⁰), a região com maior área plantada e, conseqüentemente, maior produção de uva no Brasil é a região Sul, pois os três estados que a compõem representam juntos 71,0% de toda área cultivada com este fruto no país (Figuras 2 e 3). Os estados de São Paulo, Pernambuco e Bahia também possuem uma área de vinhedos bastante expressiva, com respectivamente 16,7%, 6,42% e 4,63% da área total cultivada²⁰.

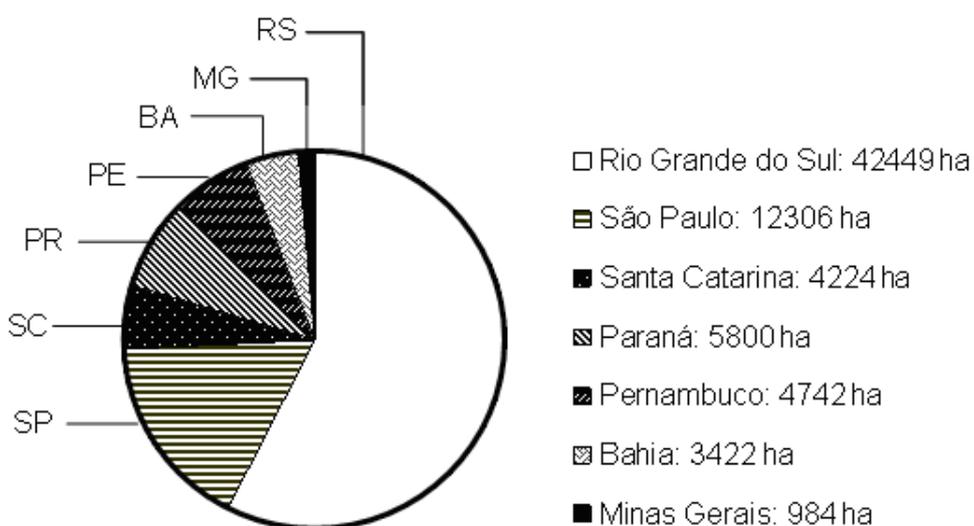


Figura 2: Área de uva plantada no Brasil (ha) – ano 2005²⁰.

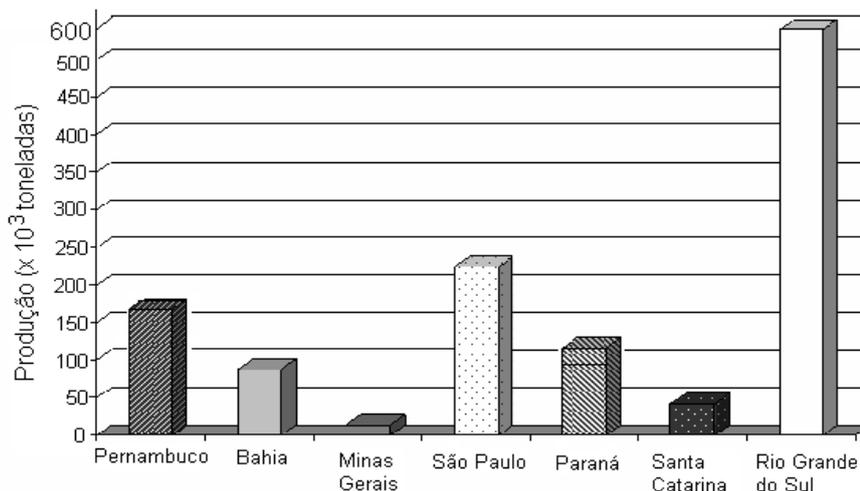


Figura 3: Produção de uva no Brasil (t) - ano 2005²⁰.

O Brasil produziu em 2005 aproximadamente 1,3 milhões de toneladas de uvas, sendo 57% desta produção destinados ao mercado interno para consumo *in natura*, 40% encaminhados às agroindústrias para serem processadas e apenas 3% foram exportados¹⁸. Mesmo representando um pequeno percentual do total produzido, as exportações de uva de mesa apresentaram um aumento gradual nos últimos anos e ainda é o principal produto exportado, seguido pelos sucos concentrados (Figura 4).

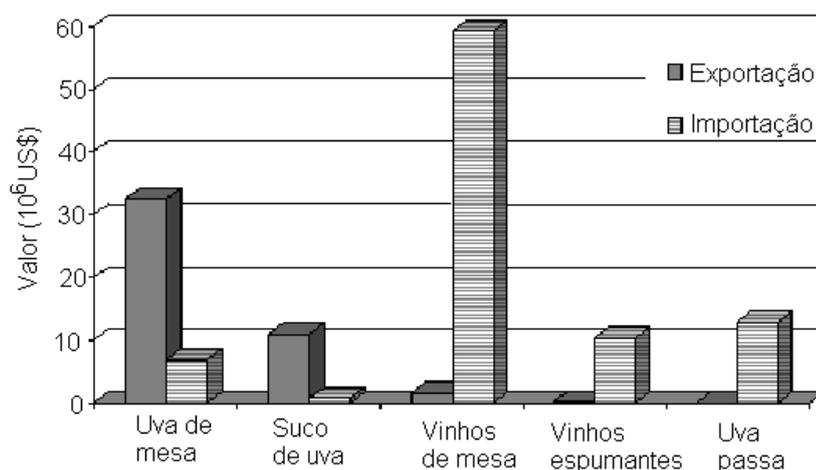


Figura 4: Exportações e importações brasileiras de uvas e derivados no período de 2000 a 2003¹⁸.

A Figura 4 mostra que o consumo de vinho importado no Brasil ainda é muito significativo, indicando que os vinhos nacionais possuem um grande mercado a ser conquistado, inclusive internamente. Para isso, o investimento

em marketing, assim como algumas medidas econômicas do Governo para impulsionar a produção nacional se tornam necessários para consolidar o nome do país no mercado mundial.

2.1.1. Os vinhos do semi-árido brasileiro

O Vale do Submédio São Francisco, localizado no sertão nordestino entre os estados da Bahia e Pernambuco, é reconhecido internacionalmente pela produção de uvas de mesa, que conseguem ser colocadas no mercado na entressafra dos demais países produtores.

A região é responsável por 96% da exportação brasileira de uvas de mesa e vem se firmando também como um importante pólo de produção de vinhos finos²¹. Em apenas 20 anos, 600 hectares de uvas de castas européias (viníferas) já foram implantados e diversas empresas, entre nacionais e européias, engarrafam cerca de dez marcas diferentes de vinho e já processam seis milhões de litros da bebida por ano²².

Assim como as variedades americanas e híbridas se adaptaram ao solo e clima gaúchos, as variedades viníferas foram bem adaptadas às condições climáticas do sertão, que incluem três mil horas anuais de sol, clima seco e solo de fácil drenagem, dando origem a um vinho do tipo jovem, frutado e aromático, com tipicidade e sabor diferenciado²³.

O Submédio é a região mais árida do Vale do São Francisco (Figura 5), com precipitação irregular entre 350 a 600 mm/ano e a temperatura média de 26,5 °C²⁴. No entanto, as características climáticas, a disponibilidade de água de boa qualidade (do rio São Francisco) e os investimentos na irrigação fazem dessa região o único local do mundo onde se pode produzir uvas para vinho durante todos os dias do ano e a única região no país com capacidade para produção anual de duas safras e meia.

O volume de vinho produzido no sertão em 2006 foi de aproximadamente 7 milhões de litros, no entanto, especialistas estimam que em 2 anos esse valor seja duplicado, uma vez que novos parreirais já se encontram em fase de implantação²⁴.



Figura 5: Representação geográfica do Vale do São Francisco.

As uvas utilizadas na elaboração dos vinhos do sertão são: *Moscato Canelli*, *Syrah*, *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Cabernet Franc*, *Chenin Blanc*, *Sauvignon Blanc*, *Tannat*, *Ruby Cabernet* e *Petite Syrah*, e as vinícolas responsáveis por esta produção no Vale são:

- Vinícola do Vale do São Francisco (Marca: Botticelli);
- Vinibrasil (Marca: Adega do Vale e Rio Sol);
- Adega Tedesco e Bianchetti (Marca: Bianchetti);
- Vitivinícola Lagoa Grande (Marca: Garziera e Carranca);
- Adega Cave do Sol (Marca: Passarin);
- Vinícola Ducos (Marca: Ducos);
- Fazenda Ouro Verde (Marca: Terra Nova).

A consolidação e o crescimento dos vinhedos em pleno sertão nordestino foram possíveis devido a uma forte influência tecnológica nos sistemas de cultivo de frutas, baseada principalmente em modernas técnicas de irrigação.

2.1.2. Elaboração de vinhos: desafios atuais

A elaboração de vinhos envolve uma tecnologia milenar que tem sido melhorada ao longo dos anos em termos de equipamentos e higiene das instalações, mas sem alterar a base tecnológica da fermentação. Duas das maiores preocupações dos vitivicultores, citadas com frequência em muitos artigos sobre o assunto, tem relação com a necessidade de criar vinhos que combinem elementos naturais e culturais de cada região e de se obter informações mais precisas sobre o tipo de componentes que constituem estas bebidas, ou que possam ser formados durante o seu envelhecimento nas garrafas^{16,19}.

Historicamente, a caracterização de vinhos tem sido realizada principalmente através de análises sensoriais. O olfato e as papilas gustativas continuam sendo as ferramentas analíticas mais sensíveis, no entanto, as exigências legais e o controle de qualidade estão forçando as vinícolas a realizar mais análises, tanto de componentes majoritários quanto os minoritários. Isto tem impulsionado os pesquisadores e as empresas a buscar métodos instrumentais mais sofisticados que possibilitem:

- Otimizar e simplificar as técnicas analíticas para auxiliar no controle de qualidade;
- Identificar compostos que possam estar implicados em odores defeituosos ou no caráter varietal do vinho;
- Determinar com precisão o término das fermentações;
- Comprovar a autenticidade dos vinhos e das variedades de uvas;
- Conhecer a influência das leveduras sobre a transformação de alguns componentes do mosto durante a fermentação;
- Detectar, com segurança e simplicidade, a presença dos compostos sulfurados que se desenvolvem em alguns vinhos, meses depois de serem engarrafados, pois os métodos atuais são muito complexos para serem aplicados em análises de rotina.

No setor mercadológico nacional, o maior desafio tem sido criar mecanismos para aumentar o consumo *per capita* de uvas de mesas, sucos e vinhos finos¹⁸. Nesse sentido, é preciso agregar qualidade ao produto a tal ponto que se torne referência para os consumidores.

2.2. PRINCIPAIS COMPONENTES VOLÁTEIS NOS VINHOS

2.2.1. Formação do aroma nos vinhos

As substâncias aromáticas do vinho são provenientes da própria uva ou do seu processo de elaboração e envelhecimento. Desta forma, esses componentes do vinho podem ser classificados em três grupos: os de aroma primário, de aroma secundário e os de aroma terciário.

As substâncias formadoras do aroma primário compreendem os compostos aromáticos da uva que influenciam a tipicidade e a estrutura do vinho, não apenas pelos seus aromas vegetativos, mas pela presença de açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e outros compostos. Todos eles juntos podem representar a identificação de cada tipo de uva enquanto que a caracterização do conjunto desses compostos pode ser usada como base para diferenciação do caráter varietal. Entre as quase oito mil variedades de uvas existentes atualmente, apenas 100 delas podem produzir vinhos comercializáveis e, seguramente, poucas dezenas delas dariam um vinho considerado de excelente qualidade, pelo seu equilíbrio e complexidade²⁵.

Em uvas consideradas aromáticas, são encontrados teores significativos de compostos terpênicos, que por sua vez, aparecem em quantidades muito pequenas em uvas não aromáticas. Portanto, através da determinação destes compostos, é possível distinguir uvas que darão origem a vinhos de boa intensidade aromática⁹.

Os compostos terpênicos mais comuns na maior parte das uvas aromáticas, tintas ou brancas, são: linalol (quantitativamente é o mais representativo, com limite de percepção de 50 µg/L), α -terpineol, nerol, geraniol, citronelol, hotrienol, diendiol-1, diendiol-2, endiol, triol e terpenos combinados. Estes compostos, apesar de não apresentarem influência direta no aroma, constituem uma importante reserva de voláteis, liberando lentamente o álcool terpênico que desaparece progressivamente no vinho transformando-se em compostos com baixo poder aromático⁹. Os terpenos são encontrados também na fração aromática de muitos óleos essenciais de vegetais e podem ser emitidos para a atmosfera através das plantas. As estruturas desses terpenos são mostradas na Figura 6.

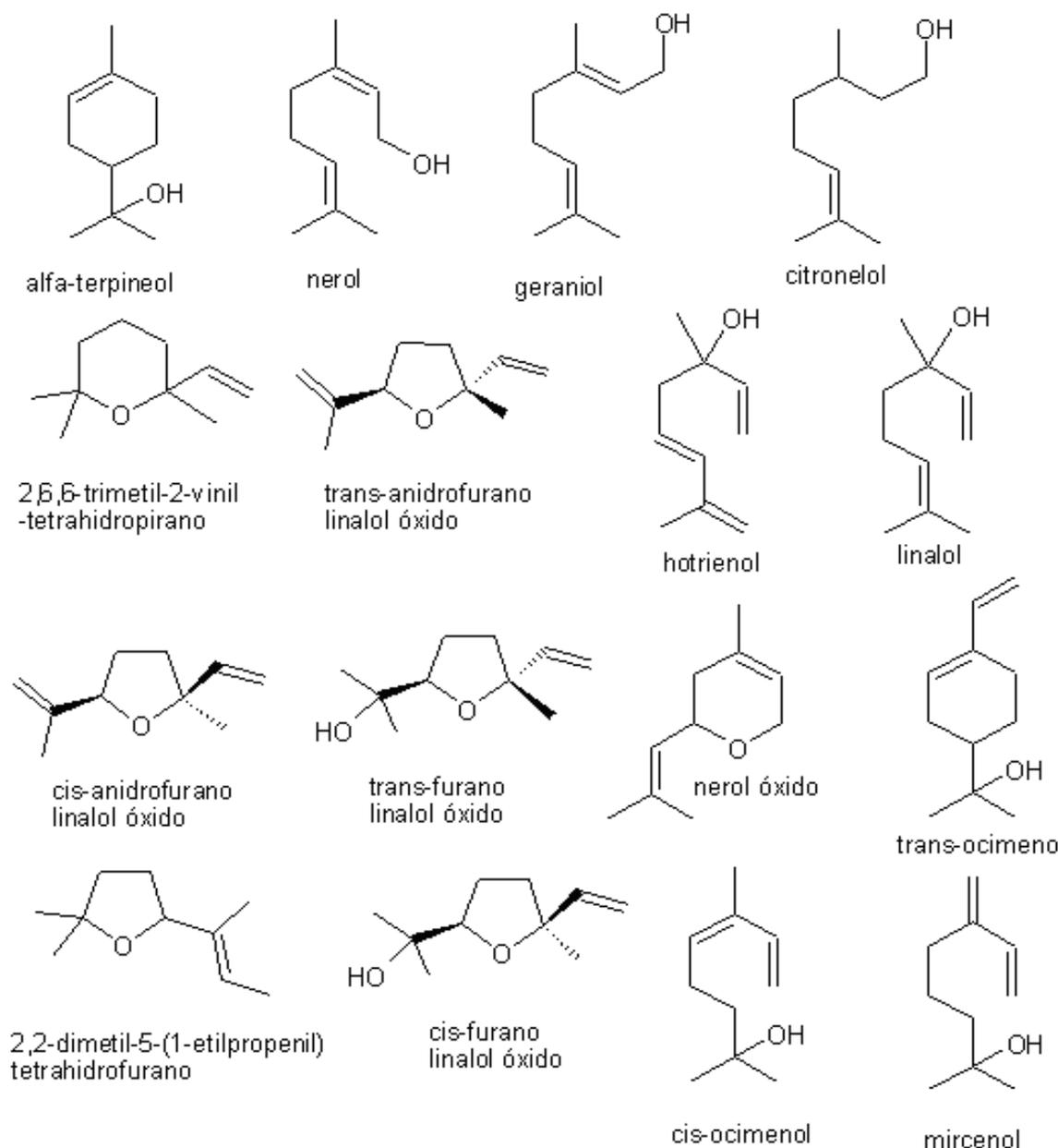


Figura 6. Principais compostos terpênicos presentes nas uvas e nos vinhos aromáticos⁹.

O mosto obtido de uvas menos aromáticas contem compostos voláteis representados principalmente por aldeídos e álcoois (C₆), ácido caprónico, álcool benzílico, α-butirolactona e numerosas substâncias presentes em quantidades inferiores a 1 µg L⁻¹ (9).

No estudo realizado por Rosillo e colaboradores²⁶, sobre sete variedades de uvas viníferas cultivadas na Espanha, sendo quatro variedades tintas e três brancas, também foi observada, além dos terpenos, a predominância de compostos contendo seis átomos de carbono no complexo aromático de todas

as variedades, cuja formação foi atribuída à ação conjunta do oxigênio e da lipoxigenase durante as etapas que vão desde a colheita até o início da fermentação alcoólica. Estes compostos são classificados como “constituintes precursores do aroma”^{26,27}. Além dos terpenos, outro grupo de compostos que apresenta papel importante neste complexo, segundo os autores, são os ácidos orgânicos, sendo o mais abundante o ácido caprílico.

Por sua vez, o aroma secundário é formado por substâncias resultantes do metabolismo de leveduras e bactérias lácticas durante as fermentações alcoólica e malolática. A superfície das uvas possui uma grande variedade de bactérias e leveduras que são transferidas ao mosto no momento da maceração. Alguns desses microrganismos são inativados e outros têm seu crescimento estimulado pela adição de compostos químicos nos tanques de fermentação. As várias espécies de leveduras que conseguem desenvolver no processo fermentativo global metabolizam os constituintes do mosto, principalmente os açúcares, a uma grande quantidade de produtos finais voláteis ou não-voláteis, que influenciam e determinam o tipo e a concentração de muitos componentes formadores das características do aroma e do sabor do vinho, contribuindo de forma positiva para o aroma final.

Os maiores produtos voláteis resultantes dessa interação microbiana são o etanol e o CO₂, que não contribuem significativamente para o aroma. Contrariamente, ácidos orgânicos, álcoois superiores, ésteres, compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas), compostos sulfurados e nitrogenados, lactonas e fenóis voláteis constituem o maior grupo de compostos que formam o “bouquet fermentativo” e representam, quantitativamente, a maior parte dos constituintes do aroma do vinho. No entanto, quando presentes em grandes concentrações, estes compostos podem também ser indesejados²⁷.

O aroma terciário é formado durante a estocagem do vinho e constituído por substâncias provenientes em parte da uva e em parte originadas no curso da fermentação, as quais são formadas lentamente, dando origem a outras substâncias responsáveis pelo *bouquet*. O *bouquet* é o “perfume” característico dos grandes vinhos e se desenvolve na garrafa, durante o envelhecimento em ambiente redutor³. Esses compostos ainda são pouco conhecidos, mas acredita-se que sejam derivados de precursores específicos da variedade da uva utilizada⁹.

Muitos compostos formadores do aroma também são produzidos nos vinhos envelhecidos em barricas de madeira (predominantemente de carvalho), principalmente no caso dos tintos. Diversos tipos de madeira são usados em todo o mundo na construção das barricas que irão receber o vinho para o seu envelhecimento, contribuindo para o caráter “maduro” desta bebida, uma vez que seus componentes voláteis e não-voláteis são extraídos e interagem de forma complexa com os constituintes do vinho. Um exemplo disso são os aldeídos vanílicos e siríngicos e os diastereoisômeros da 3-metil- γ -octalactona, citados como os componentes que mais contribuem para o aroma amadeirado na bebida. O ambiente interno da barrica favorece também as reações de oxidação, hidrólise e polimerização.

2.3. COMPOSTOS CARBONÍLICOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS

Os compostos carbonílicos (CCs) de baixa massa molar, assim como outros compostos orgânicos, encontram-se bastante difundidos na natureza e são assimilados pelo homem através da respiração de seus vapores, por absorção cutânea ou pela ingestão de alimentos e bebidas²⁸.

Grande atenção tem sido dada aos CCs que apresentam propriedades patológicas aos seres vivos, com sintomas que variam de irritação dos olhos, pele e trato respiratório até características fitotóxicas, teratogênicas, mutagênicas e principalmente carcinogênicas. Essas propriedades são mais acentuadas nos aldeídos e cetonas de menor massa molar que possuem insaturação e substituintes halogenados²⁸.

Alimentos e bebidas, em particular, contêm esses compostos de maneira bastante difundida, podendo influenciar significativamente na sua qualidade. A presença de CCs em bebidas alcoólicas está relacionada com sintomas como náusea, vômito, inquietação, suor, confusão, queda na pressão e dores de cabeça²⁹. Por esse motivo, o interesse no estudo das concentrações desses compostos em alimentos e bebidas alcoólicas ou não-alcoólicas tem aumentado. Além do efeito nocivo à saúde, os aldeídos e cetonas afetam as características sensoriais das bebidas, pois a ocorrência nestes produtos pode ser um indicador de deterioração provocada por superaquecimento ou

fermentação, ou indicador de contaminação pelo uso de embalagens compostas por determinados materiais plásticos ou processo inadequado de engarrafamento³⁰.

Apesar de todos esses aspectos negativos, é importante salientar que, em estudos direcionados à caracterização química de alimentos e bebidas, principalmente aqueles que buscam identificar compostos formadores do aroma, é possível observar que, entre os componentes responsáveis pela qualidade sensorial do produto, aparecem freqüentemente alguns CCs. Portanto, fica evidente a necessidade de se conhecer melhor o perfil e a influência desses compostos em alimentos e bebidas, para que possam ser classificados como marcadores negativos ou positivos nestes produtos.

2.3.1. Compostos carbonílicos identificados em vinhos

Os aldeídos e cetonas presentes em vinhos têm sido identificados de forma isolada^{1-3,5-7,11,13,26,31-37}, mas poucos estudos focalizam a investigação no conjunto dos CCs presentes, assim como existem poucas informações sobre o papel destes compostos na tipificação desta bebida. A literatura registra algumas informações sobre formaldeído, acetaldeído, furfural, 5-hidroximetil furfural, hexanal, *E*-oct-2-en-1-al, *E*-non-2-en-1-al, benzaldeído, diacetil, octan-3-ona, acroleína, β -ionona, damascenona, cujas principais características serão apresentadas a seguir:

Formaldeído

É o aldeído mais simples, mas provavelmente o mais estudado devido à sua freqüente incidência na atmosfera e hidrosfera, provocando irritação nos olhos e no trato respiratório, náuseas, dor de cabeça, cansaço e sede^{38,39}.

O odor do formaldeído pode ser percebido em concentrações de aproximadamente 1,00 mg L⁻¹, acima disso, torna-se irritante ao trato respiratório e em concentrações maiores que 30,0 mg L⁻¹ pode provocar pneumonia, bronquite ou resultar em morte quando esta concentração exceder 100 mg L⁻¹. Por isso, é importante conhecer as concentrações desse aldeído no ar, na água e nos alimentos para minimizar os danos à saúde⁴⁰. Nos vinhos

brancos foram encontradas concentrações que variaram de 0,22 a 0,88 mg L⁻¹, em diferentes marcas da bebida¹³.

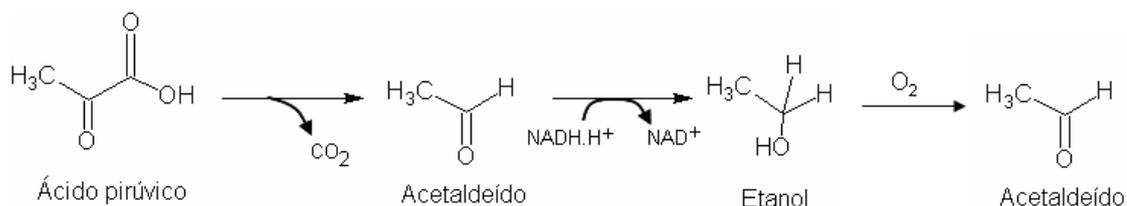
Acetaldeído

O acetaldeído é o principal aldeído presente no vinho, do ponto de vista quantitativo. Caracteriza-se como um composto de alta reatividade química, presente também no conjunto de compostos voláteis em outros alimentos e bebidas fermentados, assim como na composição do ar⁹.

O limite de percepção olfativa (menor concentração de uma substância no meio ambiente ou em solução, detectável através do odor) do acetaldeído no ar é de 0,21 mg L⁻¹, podendo tornar-se irritante ao aparelho respiratório quando em concentração superior a 134 mg L⁻¹ (40). No vinho, o limite de percepção olfativa é de aproximadamente 100 mg L⁻¹ (41). O acetaldeído tem se mostrado um potente embriotóxico e teratogênico em ratos, podendo ser considerado também como um agente mutagênico e carcinogênico⁴¹.

A maior parte do acetaldeído encontrado em vinho é resultante da oxidação microbiana do etanol em condições aeróbias¹⁶, sendo que a sua principal via metabólica é através do processo fermentativo das leveduras durante a fermentação alcoólica (Esquema 1), quando o ácido pirúvico é transformado pela ação da enzima piruvato carboxilase^{9,41,42}. Pode ainda ser produzido, em pequenas quantidades, através da oxidação não-enzimática.

O acetaldeído é produzido por várias cepas de leveduras em concentrações variáveis (10,0 a 140,0 mg L⁻¹), sendo que esta variação dependerá do tipo de uva vinífera utilizada na produção do mosto e também da quantidade de SO₂ livre adicionado no processo¹. Como o SO₂ é um agente anti-séptico, as leveduras irão se defender produzindo acetaldeído, que irá se combinar com o bissulfito formando o ácido α-hidroxietanossulfônico^{43,44}.



Esquema 1. Via metabólica da fermentação alcoólica

Segundo Pontalier (citado por ref. 9), nos vinhos tintos o acetaldeído também pode ser produzido através da oxidação do etanol provocada pelo peróxido de hidrogênio formado na reação entre os polifenóis presentes no mosto das uvas tintas e o oxigênio que se difunde através da madeira da barrica e é dissolvido lentamente.

Na indústria de bebidas, é importante conhecer as concentrações de acetaldeído, pois este tem um papel central na manifestação da intoxicação alcoólica. A legislação brasileira admite os seguintes valores máximos de aldeídos totais em bebidas destiladas, expressos em mg de acetaldeído/100mL de etanol anidro: aguardente 30,0 mg/100mL, conhaque 40,0 mg/100mL, graspa 80,0 mg/100mL, destilado simples de uva 40,0 mg/100mL, pisco 20,0 mg/100mL^{45,46}.

Vinhos estocados em tanques ou barricas de madeira que não estejam completamente plenos favorecem o desenvolvimento rápido de leveduras fermentativas ou oxidativas (*cândida* ou *pichia*) que oxidam o etanol e o glicerol, deixando níveis altos e inaceitáveis de acetaldeído e outros componentes ainda pouco conhecidos⁴. Altas concentrações de acetaldeído resultam em um aroma herbáceo indesejável ao vinho⁴⁷, apesar de estar associado a um agradável aroma de maçã quando presente em pequenas concentrações²⁷. Nos vinhos brancos, em especial, a presença do acetaldeído influencia na formação do aroma “amadeirado” ou de “ranço”⁴⁸, além das notas de “solvente”, “cola” e “esmalte”.

Furfural (F) e 5-hidroximetil-furfural (HMF)

Os aldeídos furânicos, furfural (F) e 5-hidroximetil-furfural (HMF) são compostos formados durante as reações de escurecimento não enzimático dos alimentos. A toxicidade desses compostos furânicos ainda não é bem conhecida, com exceção do furfural, para o qual já está estabelecido o valor IDLH (Immediately Dangerous to Life or Health Air Concentration) que é de 100 mg L⁻¹(^{49,50}). A literatura sugere que o contato prolongado ou repetitivo com o furfural possa causar dermatites, irritação da mucosa e trato respiratório, além de afetar o sistema nervoso central. Todos esses dados são baseados em testes realizados com animais de laboratório, não havendo estudos conclusivos sobre os efeitos desses aldeídos sobre humanos^{40,50,51}.

Tanto o F como o HMF podem ser considerados indicadores de degradação de alimentos e bebidas, quando encontrados em grandes concentrações. No mel, por exemplo, o aumento do conteúdo de HMF é associado ao tratamento térmico severo ou à temperatura inadequada de estocagem⁵²⁻⁵⁵.

O aumento da concentração do furfural está relacionado com as mudanças no aroma do alimento⁵⁴, enquanto que o aumento da concentração do HMF está relacionado com reações que promovem mudanças na cor, principalmente naqueles alimentos que sofrem reação de Maillard ou caramelização⁵³⁻⁵⁶. Entretanto, quando presentes em baixas concentrações, compõem o aroma de algumas bebidas como brandies (conhaques) e vinhos envelhecidos em barricas de madeira^{31,57,58}.

A composição química da madeira inclui, além de muitas outras substâncias, lignina e polissacarídeos como a celulose e a hemicelulose. Quando uma barrica está sendo construída, a parte interna da madeira é queimada e em seguida molhada para evitar futuras rachaduras. Esse tratamento resulta na redução parcial da celulose a HMF.

A adição de caramelo é outra possível fonte desses aldeídos furânicos em vinhos destilados (brandies), pois na sua composição química é encontrada uma grande quantidade de HMF⁵⁸.

Ao estudar o efeito do envelhecimento estático (quando o vinho permanece na mesma barrica durante o envelhecimento) e dinâmico (envolve a troca parcial do conteúdo de uma barrica para outra contendo um vinho mais velho, durante vários anos) de brandies comerciais em barricas de madeira, Granados e colaboradores⁵⁶ observaram que a adição intencional de caramelo resulta realmente em concentrações de HMF significativamente maiores do que de furfural^{31,32,36,56}. De acordo com o estudo, nos dois processos de envelhecimento, a razão F/HMF encontrada em quase todas as amostras foi sempre inferior a 1 (Figura 7). Os autores utilizaram recursos estatísticos para confirmar que as diferenças na razão entre os dois aldeídos furânicos são conseqüências da adição de caramelo e não um fato ao acaso.

No mesmo estudo os autores submeteram brandies isentos de caramelo ao envelhecimento estático e puderam perceber que na sua ausência a relação F/HMF foi sempre maior que 1 (Figura 8), ou seja, se não houver caramelo na

bebida a relação F/HMF será alta ($F/HMF > 1$) e na presença deste corante a relação será baixa ($F/HMF < 1$).

A relação F/HMF poderá indicar também a origem do HMF, que pode ser proveniente da termólise da celulose ($F/HMF > 1$) ou como consequência do caramelo adicionado como agente corante ($F/HMF < 1$).

O 5-hidroximetil-furfural também faz parte da fração aromática do Xerez³³, um vinho branco muito seco, elaborado no sudoeste da Espanha⁵⁹ e de alta graduação alcoólica. Este tipo de vinho também é submetido a processos de envelhecimento estático e/ou dinâmico. Durante a produção do Xerez, processos químicos bem diferentes podem ser empregados, gerando bebidas com características também diferentes. Na produção do Xerez “fino”, processos redutores predominam, enquanto que na elaboração do “aromático” os processos são somente oxidativos. Já na elaboração do Xerez “amontilado” ocorre a combinação de processos oxidativos e redutores.

Ao comparar o comportamento dos aldeídos furânicos e fenólicos nos três tipos de Xerez³¹, foi observado que no tipo “fino” a presença desses compostos é muito pequena ou inexistente. No entanto, foi observado que o F, HMF, o p-hidroxi-benzaldeído, a vanilina e o siringaldeído estão presentes em maiores concentrações no Xerez dos tipos “aromático” e “amontilado”, ambos associados a processos oxidativos de envelhecimento^{31,36}.

O furfural presente no vinho pode ser proveniente também das rolhas de cortiça, pois já foi identificado entre os 50 compostos voláteis naturais formadores do aroma das cortiças que não contêm defeitos de contaminação microbiana³⁴.

O 5-metil furfural também pode ser associado ao aroma “amadeirado” apresentado em alguns vinhos¹³. Foram encontrados teores de 0,10 a 51 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ deste aldeído em vinhos tintos e brancos, respectivamente¹⁰. Seu impacto sobre o aroma não parece ser tão significativo quanto do F e HMF, pois seu limite de percepção olfativa é muito maior do que os teores encontrados ($20000 \mu\text{g L}^{-1}$)⁶⁰.

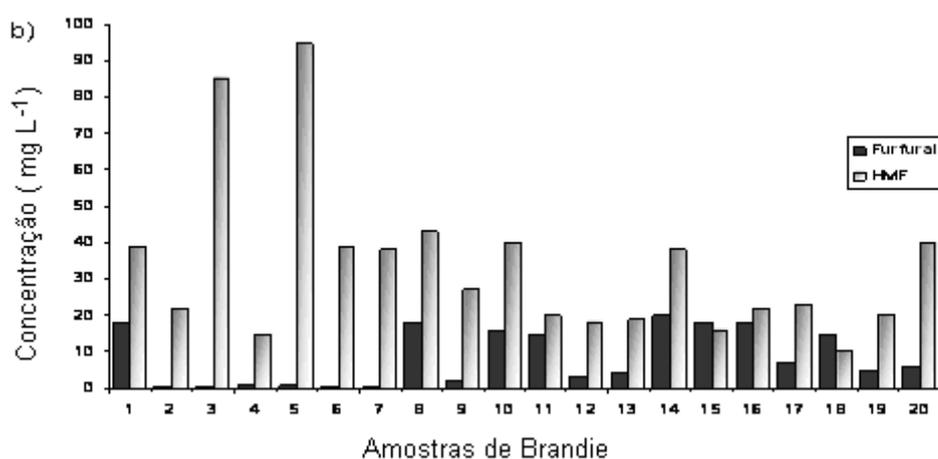
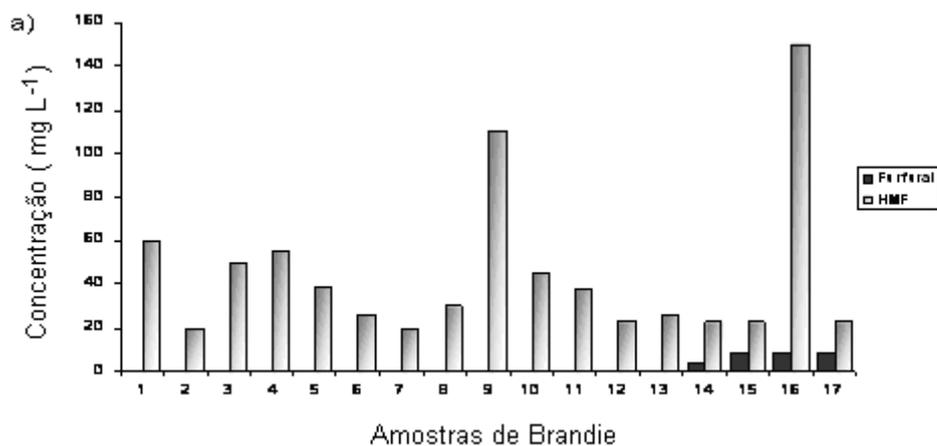


Figura 7: Concentrações de furfural e 5-hidroximetil-furfural (HMF) determinadas em brandies comerciais, com caramelo adicionado. a) envelhecimento em sistema dinâmico; b) envelhecimento em sistema estático⁵⁶.

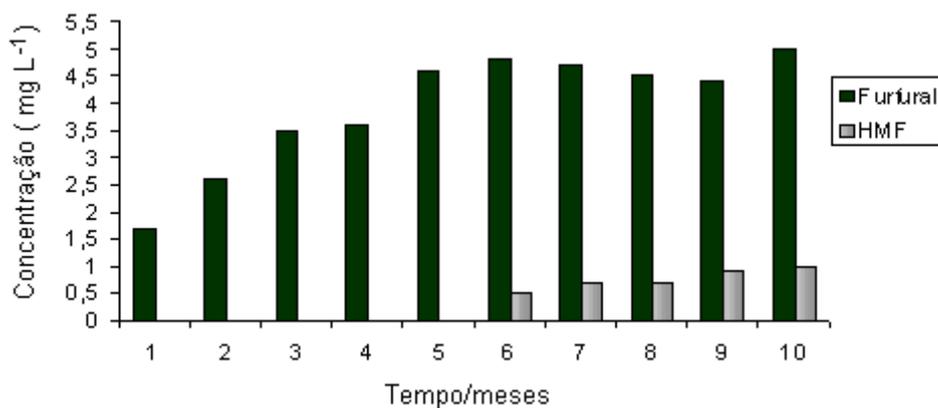
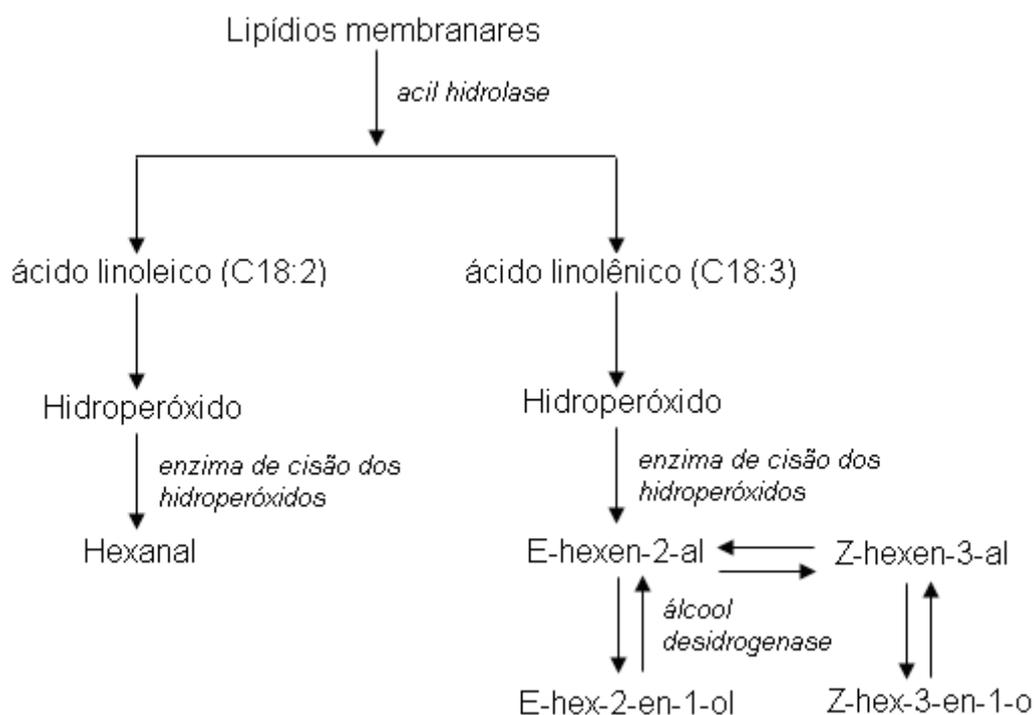


Figura 8. Concentrações de aldeídos furfural e 5-hidroximetil-furfural (HMF) determinadas em *brandie* envelhecido em barril de madeira, sem adição de caramelo⁵⁶.

Hexanal, E-oct-2-en-1-al e E-non-2-en-1-al

Os aldeídos Hexanal, E-oct-2-en-1-al e E-non-2-en-1-al são produtos da degradação oxidativa de ácidos graxos insaturados em alimentos. As concentrações que podem afetar a saúde humana ainda não estão estabelecidas, mas a literatura afirma que podem causar irritação no trato respiratório, sistema digestivo e na pele, podendo ocasionar também edema pulmonar grave^{40,50,51}.

O hexanal é considerado um indicador importante da oxidação lipídica por ser o produto mais abundante desta reação⁶¹, além de ser responsável pelo aroma herbáceo resultante da degradação de ácidos graxos em uvas semi-amadurecidas²⁷. As enzimas responsáveis pela produção de aldeídos contendo seis átomos de carbono na cadeia, a partir dos ácidos graxos polinsaturados da uva, são: acil hidrolase, lipoxigenase e álcool desidrogenase. O mecanismo de obtenção desses compostos está mostrado no Esquema 2.



Esquema 2. Formação de aldeídos e álcoois contendo seis átomos de carbono na cadeia, a partir de ácidos graxos polinsaturados da uva²⁷.

Este aldeído contribui com o odor final indesejável e pode ser encontrado em concentrações crescentes durante a estocagem dos produtos alimentícios. O limite de percepção do hexanal em água é de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

As características desses aldeídos mudam significativamente com o aumento da cadeia carbônica e em geral o limite de percepção diminui entre os componentes de cadeia mais longa⁶². A Tabela 1 apresenta algumas dessas características.

Tabela 1. Propriedades sensoriais e limites de percepção de alguns trans-alcenais⁶².

Aldeído	Limite de percepção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Descritor olfativo
<i>E</i> -pent-2-en-1-al	1500	Forte
<i>E</i> -hex-2-en-1-al	17	Forte, herbáceo, amêndoa
<i>E</i> -hept-2-en-1-al	13	Herbáceo
<i>E</i> -oct-2-en-1-al	0,10	Oleoso, óleo de limão, amadeirado
<i>E</i> -non-2-en-1-al	0,07	Intensivamente oleoso, vegetal cozido
<i>E</i> -dec-2-en-1-al	0,30	Oleoso
<i>E</i> -undec-2-en-1-al	-	Cítrico, herbáceo
<i>E</i> -dodec-2-en-1-al	-	Herbáceo

Nos vinhos o hexanal e o *E*-oct-2-en-1-al foram associados ao aroma “amadeirado” da bebida, sendo esta característica freqüentemente descrita em vinhos velhos e oxidados. O *E*-oct-2-en-1-al foi encontrado em quatro vinhos tintos e quatro vinhos brancos diferentes analisados por Culleré e colaboradores.⁶³ De acordo com os autores, este aldeído provavelmente compõe o grupo de voláteis com alto impacto no aroma dos vinhos analisados, pois os valores obtidos ($0,19$ a $0,97 \mu\text{g L}^{-1}$ nos vinhos tintos e $0,66$ a $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ nos vinhos brancos) são superiores ao seu limite de percepção olfativa ($0,10 \mu\text{g L}^{-1}$)⁶³.

A deterioração oxidativa do vinho e da cerveja resulta também em odor de “vegetal cozido” ou “serragem”, atribuído ao *E*-non-2-enal^{11,64}. Este aldeído não faz parte dos compostos majoritários da fração volátil dos vinhos e, no entanto, exerce uma grande influência sobre o aroma uma vez que seu limite de percepção é muito baixo ($0,07 \mu\text{g L}^{-1}$)⁶⁴. Nos vinhos Chardonnay e Merlot os respectivos teores encontrados foram de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,23 \mu\text{g L}^{-1}$ (64).

4-metil-benzaldeído

O 4-metil-benzaldeído foi identificado durante a fermentação da uva *Muscadine*³⁵, porém existem poucas informações sobre este aldeído na literatura revisada. Aparentemente, a síntese e degradação ocorrem durante a fermentação alcoólica, restando concentrações muito baixas do 4-metil-benzaldeído no vinho engarrafado.

Benzaldeído

O benzaldeído é um composto de odor amargo, nocivo à saúde, podendo causar dermatite e irritação gastrointestinal, além de afetar o sistema nervoso central, provocando inconsciência ou coma⁵⁰. Seu limite de percepção no ambiente é de 0,04 mg L⁻¹, mas os valores IDLH ainda não estão definidos⁴⁰. Segundo a literatura, quando presente em concentrações de 1,40 a 13,5% em volume no ar, já começa a ser irritante aos olhos e vias respiratórias⁵¹.

No vinho, o benzaldeído está associado ao aroma de amêndoa amarga e ao grupo dos compostos formadores do aroma das cerejas⁶⁵. Pode ser encontrado tanto em vinhos de uvas tintas quanto em vinhos brancos, mas em geral é encontrado em pequenas concentrações (0,08 a 0,23 mg L⁻¹)⁴⁶.

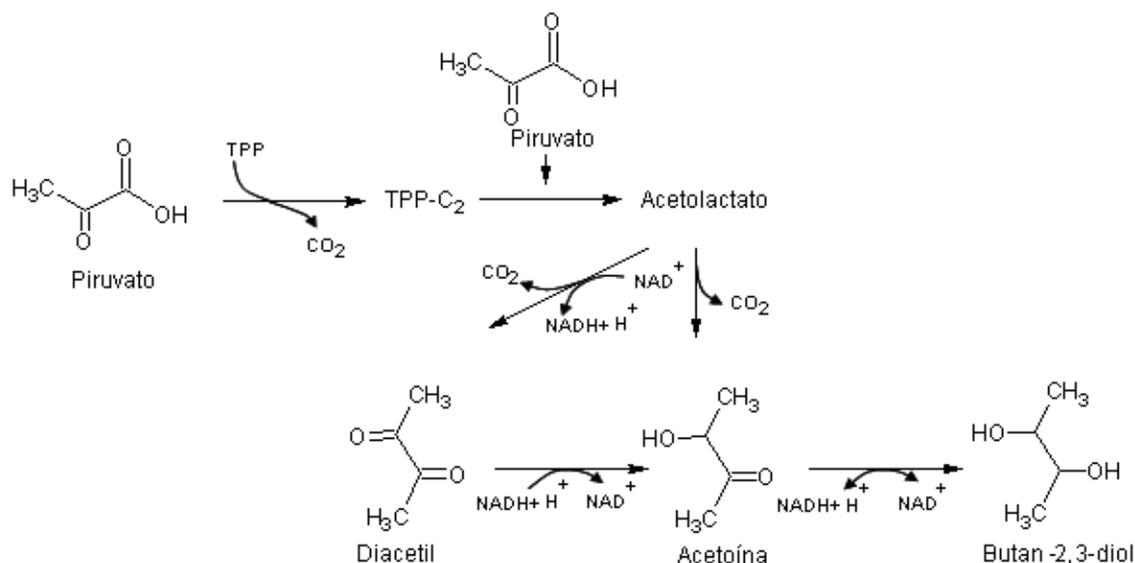
Alguns autores citam a importância do benzaldeído como marcador químico utilizado para diferenciação entre variedades de uvas viníferas^{35,65}. Nos vinhos, sua presença pode estar relacionada também ao odor de “vegetal cozido” ou à característica “alcoólica” do odor.

Diacetil

O diacetil, ou butan-2,3-diona, é um composto dicarbonílico cujo contato prolongado ou repetitivo pode causar sensibilização cutânea. Seus vapores podem provocar irritação nos olhos, nariz e garganta⁵¹. Não existem valores de concentração (IDLH) relacionados com a sua toxicidade em humanos⁵⁰.

O diacetil é um componente de importância sensorial e encontra-se presente na composição do aroma da manteiga, do vinagre, do café e de outros alimentos^{50,66}. É um composto carbonílico secundário formado durante a fermentação malolática, por interferência de leveduras⁶⁶. A reação se inicia com a condensação do piruvato com uma molécula de acetaldeído combinada com o pirofosfato de tiamina, formando ácido α -acetoláctico. O ácido α -

acetoláctico sofre então uma descarboxilação não oxidativa e é convertido em diacetil (Esquema 3).

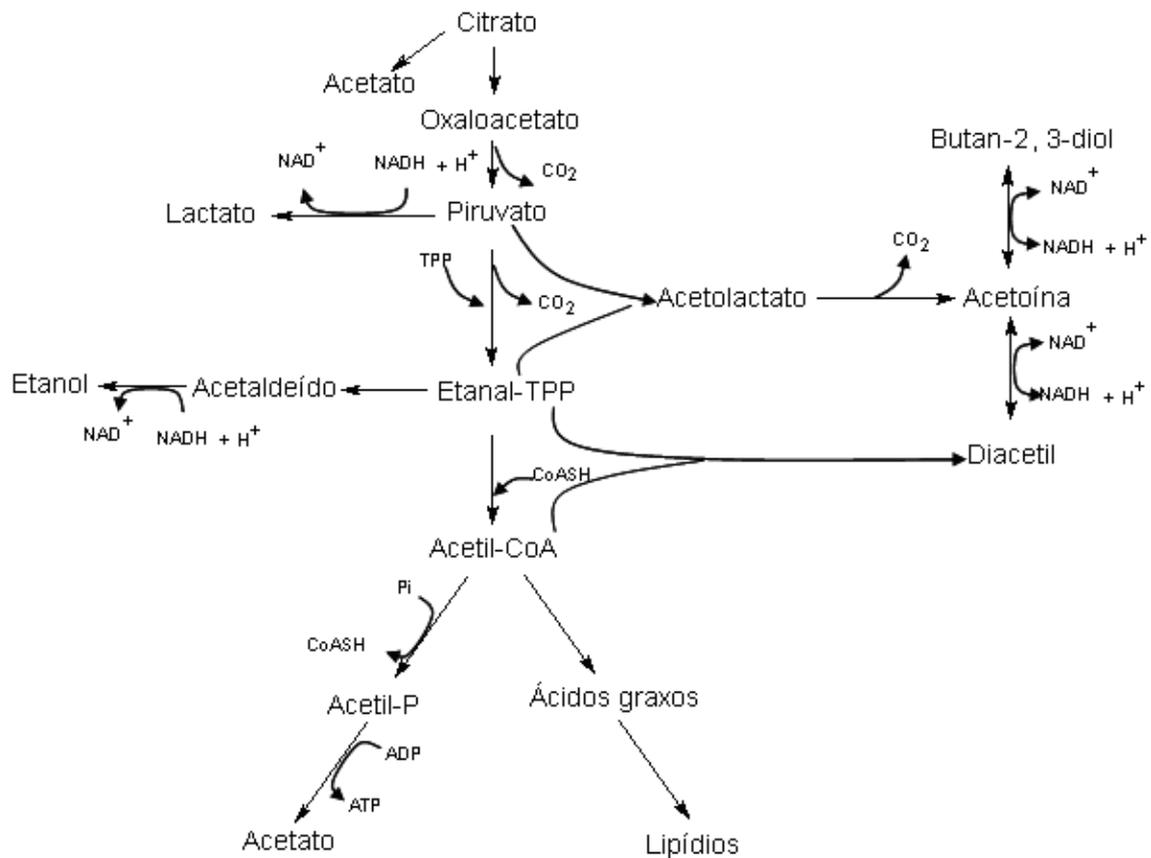


Esquema 3. Formação de diacetil por levedura, em anaerobiose (TPP: pirofosfato de tiamina; TPP- C_2 : acetaldeído ativo)⁴³.

A acetoína e o butan-2,3-diol são igualmente formados a partir do piruvato.

Em concentrações superiores a $2,0 - 4,0 \text{ mg L}^{-1}$ pode conferir um aroma de manteiga ao vinho. Existem evidências de que a produção de diacetil nos vinhos esteja relacionada principalmente com a variedade da uva^{5,33}.

Além de estar associada à fermentação malolática, a produção do diacetil pode também ocorrer por degradação do ácido cítrico, através da interferência de bactérias lácticas (Esquema 4). Neste metabolismo, o ácido cítrico é degradado a oxaloacetato e acetato por enzimas presentes no interior da bactéria. O oxaloacetato é descarboxilado a piruvato, que por sua vez, dará origem aos compostos acetoínicos (diacetil, acetoína e butan-2,3-diol)⁴³.



Esquema 4. Vias metabólicas de degradação do ácido cítrico por bactérias lácticas⁴³.

De acordo com Pripis-Nicolau e colaboradores⁶⁷, assim como o diacetil, outros compostos α -dicarbonílicos são encontrados no vinho, em equilíbrio com sua forma reduzida (α -hidroxicetonas e α -dióis) e, devido à alta reatividade da carbonila em meio aquoso, eles podem interagir com aminoácidos presentes no vinho, gerando compostos de forte impacto no aroma⁶⁷. Segundo os autores, em seu estudo foi possível observar que a interação do acetil com os aminoácidos cisteína, metionina, valina, leucina, isoleucina e fenilalanina gerou compostos com aroma à “tostado, batata, queijo, amílico, frutado e floral”, respectivamente⁶⁷.

Octan-3-ona

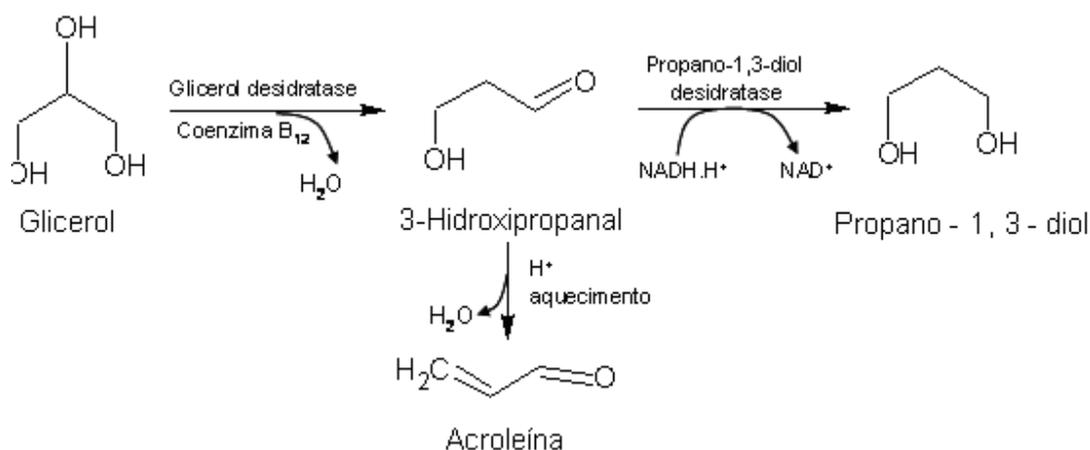
A octan-3-ona é uma cetona produzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação. Sua produção é resultante da interação entre a levedura e fungos presentes no mosto da uva. Estes fungos produzem metabólitos como a oct-1-en-3-ona, cuja influência é refletida no aroma “a

fungo” observado na bebida. A levedura converterá este metabólito em octan-3-ona, abrandando o odor citado⁶⁶.

Acroleína

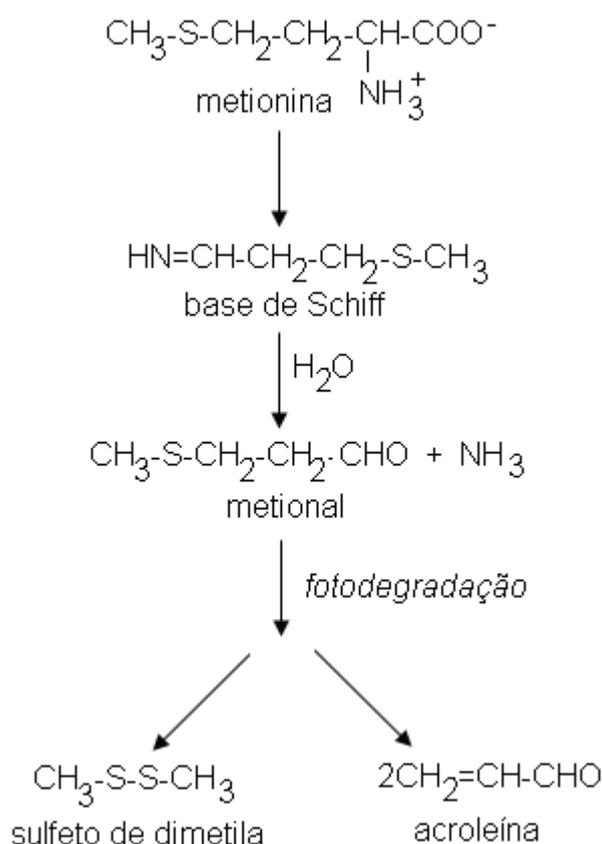
A acroleína (ou propenal) é extremamente tóxica por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos^{4,25,66}. Os vapores de acroleína são lacrimogênicos, muito irritantes aos olhos, nariz e garganta⁵¹. O limite de percepção olfativa da acroleína no ambiente é de 0,21 mg L⁻¹ e concentrações dez vezes maiores são consideradas perigosas à vida e à saúde⁴⁰.

A produção de acroleína pela transformação de 3-hidroxiopropanal é comum em cidras e provoca uma alteração indesejada, conhecida por “*piqûre acroleique*”, responsável pelo aroma de pimenta e pela sensação picante e irritante nas bebidas. O Esquema 5 mostra a reação simplificada de obtenção da acroleína.



Esquema 5: Via metabólica de obtenção da acroleína⁶⁸.

Nos vinhos, este metabolismo é associado à presença das bactérias termofermentativas: *Bacillus amaracrylus* e *Lactobacillus colinoides*^{68,69}. Neste caso, os principais doadores de hidrogênio são os aminoácidos sulfurados cisteína e metionina. A metionina, por exemplo, é transformada no aldeído 3-metil sulfanil propanal (metional) e este é fotodegradado em acroleína e sulfeto de dimetila, conforme mostrado no Esquema 6²⁷.



Esquema 6. Formação de acroleína a partir de aminoácidos sulfurados²⁷.

A acroleína obtida por fotodegradação está associada ao “gosto de luz”, defeito que se manifesta essencialmente nos vinhos brancos após o engarrafamento e exposição à luz²⁷.

β-ionona

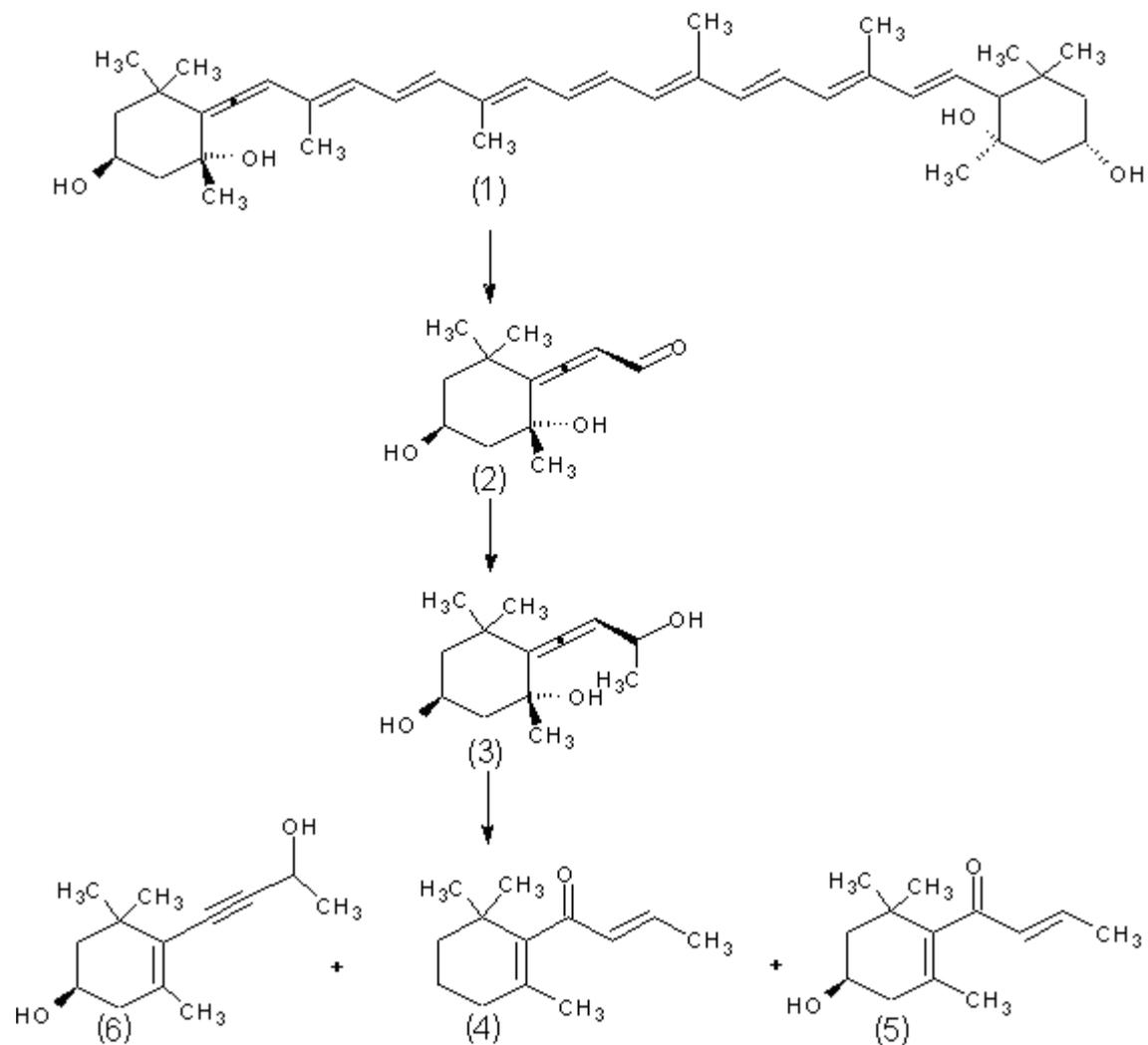
A cetona β-ionona, cujo odor está associado à “rosa”, “violeta” e “balsâmico”, apresenta limite de percepção de 0,005 mg L⁻¹ (determinado em solução a 10% v/v de etanol, com pH ajustado para 3,5 com ácido tartárico)^{6,32,36}. É muito utilizado em perfumaria devido ao seu aroma floral característico, quando diluído em solução aquosa⁵⁰. Alguns descritores de aroma para esta cetona incluem também “fruta”, “banana” e “doce”⁷⁰. Ainda não existem dados conclusivos sobre suas propriedades toxicológicas, mas sabe-se que em elevadas concentrações pode causar irritação no trato digestivo, respiratório, pele e olhos⁵⁰.

Nos vinhos, a β -ionona faz parte do grupo de compostos cetônicos obtidos através da degradação de carotenóides da uva sob influência da luz e de enzimas como a polifenoloxidase e lipoxigenase²⁷. As demais cetonas obtidas desta forma são encontradas em quantidade traço, mas possuem importante papel no aroma dos vinhos. A concentração média de β -ionona encontrada em vinhos tintos foi de $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto em vinhos brancos foram encontrados apenas concentração “traços” do composto⁶⁰.

Damascenona

A damascenona é uma cetona de grande importância no estudo dos compostos voláteis, estando presente em muitos produtos derivados de vegetais. A produção e comercialização estão direcionadas atualmente para atender às indústrias de perfumes e aromas. Apresenta um limite de percepção de $2,0 \text{ ng L}^{-1}$ em água e é descrita como uma das substâncias responsáveis pelo aroma floral nas bebidas destiladas e nos vinhos tintos^{36,71}. Também está associada à nota de “fruta exótica”²⁷. Um estudo de identificação de compostos voláteis em dez tipos de vinhos elaborados com diferentes variedades de uvas tintas revelou a presença da β -damascenona em todas as amostras². Acredita-se que a sua presença nos vinhos seja proveniente da degradação térmica do carotenóide neoxantina, por um mecanismo complexo^{5,36}.

Estudos recentes em uvas viníferas indicam que a β -damascenona pode ser formada *in vivo* numa seqüência de reações como mostrado no Esquema 7. De acordo com o esquema proposto, as neoxantinas (1) são convertidas em uma cetona (2) e em seguida transformadas em um triol (3), identificado como um componente do extrato da uva tratada com enzima glicosidase. O referido triol é convertido rapidamente nos produtos: β -damascenona (4), 3-hidroxi-damascenona (5), e 5,7-enina-3,9-diol (6). O diol formará lentamente tanto β -damascenona quanto 3-hidroxi-damascenona, podendo gerar esses produtos no vinho engarrafado por vários anos, enquanto durar seu envelhecimento. No entanto, não será um precursor significativo em variedades de uvas para vinhos jovens⁷¹.



Esquema 7: Via metabólica da obtenção da damascenona (4)⁷¹.

Aproximadamente 40 aldeídos e cetonas foram citados por estarem presentes em uvas e vinhos (Tabela 2 e Figuras 9 e 10). Alguns são citados com maior frequência devido à sua maior representatividade em relação aos outros ou pela influência que exercem no aroma ou na saúde do consumidor.

De acordo com Laws e colaboradores³³, uma parte dos CCs provenientes da uva é quimicamente reduzida pela levedura durante a fermentação do mosto. Apesar disso, os autores ressaltam que há registros do aumento da concentração de alguns aldeídos como o furfural, o acetaldeído e outros CCs

de maior massa molar durante a fermentação, estocagem e envelhecimento do vinho, especialmente sob temperaturas elevadas³³.

O nonanal, decanal, 3-hidroxi-butan-2-ona e 6-metil-5-hepten-2-ona foram identificados, entre outros, por Girard e colaboradores⁷² como produtos da fermentação alcoólica do mosto da uva Pinot noir. Esses compostos foram encontrados em concentrações respectivas de 123,0; 19,4; 28,3 e 5,50 mg L⁻¹ (72). A presença de octanal está relacionada com as leveduras envolvidas no envelhecimento biológico de alguns vinhos, sua descrição aromática envolve características como “gorduroso”, “cítrico”, “maçã”, “terpênico” e “rosa”^{36,70}. A butan-2,3-diona (diacetil) e pentan-2,3-diona são outros CCs importantes formados durante a fermentação, eles são obtidos pela descarboxilação espontânea de α -ceto ácidos⁷³. No mosto da uva Muscadine o aldeído resultante da fermentação foi o 4-metil benzaldeído, cuja concentração aumentou durante os dez primeiros dias, diminuindo progressivamente após este período³⁵.

Outros aldeídos benzóicos, por sua vez, têm sua origem ligada à composição da uva ou à estocagem em barricas de madeira, de onde são extraídos. A vanilina, o p-hidroxibenzaldeído e o siringaldeído, por exemplo, foram encontrados em vinhos tipo xerez e vinho tinto de Tempranillo, produzidos sob condições de envelhecimento oxidativo em barricas de carvalho^{31,70}. De acordo com a literatura, eles são formados através da degradação da lignina da madeira pelo álcool, podendo ser encontrados também em bebidas como conhaque, whiskies e brandies^{31,74}. Os teores de vanilina podem alcançar 140,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, em vinhos tintos⁶⁰.

Tabela 2. Compostos carbonílicos identificados em amostras de vinho.

Compostos carbonílicos	Fórmula	Massa	Citações (referências)
ALDEÍDOS	Molecular	Molar	
Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	96,090	11,32,33,36,56,57,58,75,72
4-Metil benzaldeído	C ₈ H ₈ O	120,16	35
5-Metil furfural	C ₆ H ₆ O ₂	110,11	11,75,60,70
Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100,16	11
E- Oct-2-en-1-al	C ₈ H ₁₄ O	126,20	11
Benzaldeído	C ₇ H ₆ O	106,13	11,26,36,72
E- Non-2-en-1-al	C ₉ H ₁₆ O	140,23	11,64
Acetaldeído	C ₂ H ₄ O	44,050	1,11,13,30,32,33,36,38,41
Formaldeído	CH ₂ O	30,030	13,30,38
Acroleína	C ₃ H ₄ O	56,060	36,68
5-Hidroximetil-furfural	C ₆ H ₆ O ₃	126,11	11,31,56,57,70,50
Nonanal (nonil aldeído)	C ₉ H ₁₈ O	142,24	36,72,64
Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	156,27	5,26,36,72,64
E-Cinamalaldeído	C ₉ H ₈ O	132,16	36
Propanal	C ₃ H ₆ O	58,070	71
Butanal e iso- butanal	C ₄ H ₈ O	72,100	66
Iso-pentanal	C ₅ H ₁₀ O	86,000	31
p-Hidroxi-benzaldeído	C ₇ H ₆ O ₂	122,12	31,36
Siringaldeído	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,18	31,70
Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	152,15	31,60,70,76,74,73,
3-Metil butanal	C ₅ H ₁₀ O	85,600	36
Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114,18	36
Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128,21	32,36,64
CETONAS			
4-Hidroxi-4-metil-pentanona	C ₆ H ₁₂ O ₂	116,16	11
β-Ionona	C ₁₃ H ₁₉ O	192,30	3,6,36,72,60,73
Nonan-2-ona	C ₉ H ₁₈ O	142,24	11
3-Etoxi-butan-2-ona	C ₆ H ₁₂ O ₂	116,16	33
3-Etoxi-pentan-2-ona	C ₇ H ₁₄ O ₂	130,19	36,72
3-Hidroxi-butan-2-ona	C ₄ H ₈ O ₂	88,110	36,72
6-Metil-5-hepten-2-ona	C ₈ H ₁₄ O	126,20	2,66
Octanona	C ₈ H ₁₆ O	128,22	2,5,36,60
β-Damascenona	C ₁₃ H ₁₈ O	190,28	77
Benzoquinona	C ₆ H ₄ O ₂	108,10	36
Heptan-3-ona	C ₇ H ₁₄ O	114,19	36
Heptan-2-ona	C ₇ H ₁₄ O	114,19	36
Octen-3-ona	C ₈ H ₁₄ O	126,20	36
Decan-2-ona	C ₁₀ H ₂₀ O	156,27	36
Undecanona	C ₁₁ H ₂₂ O	170,30	36
2-Acetilciclopentanona	C ₇ H ₁₀ O ₂	126,16	36
Butan-2,3-diona (diacetil)	C ₄ H ₆ O ₂	86,090	36,73

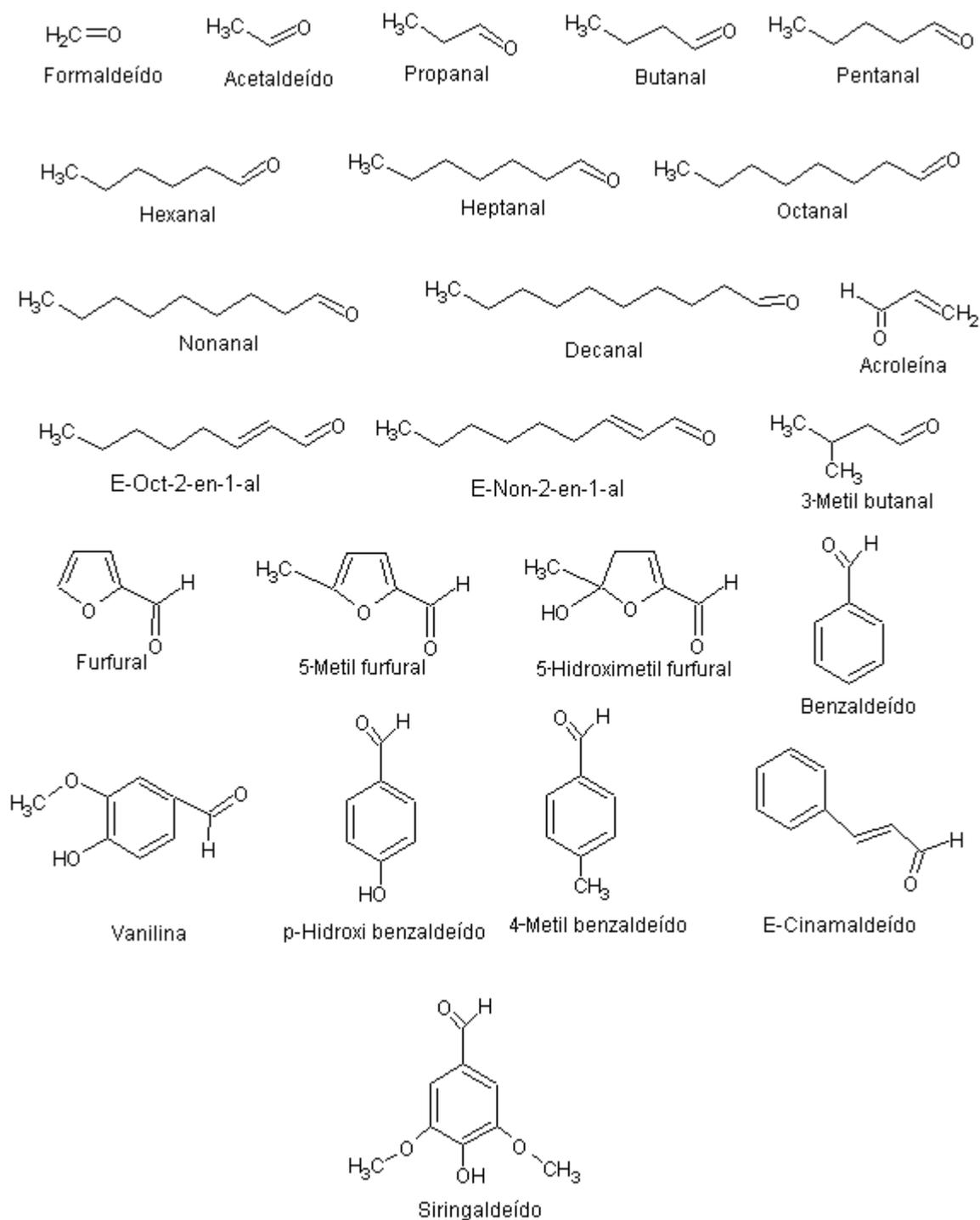


Figura 9. Fórmulas estruturais dos aldeídos identificados em vinhos

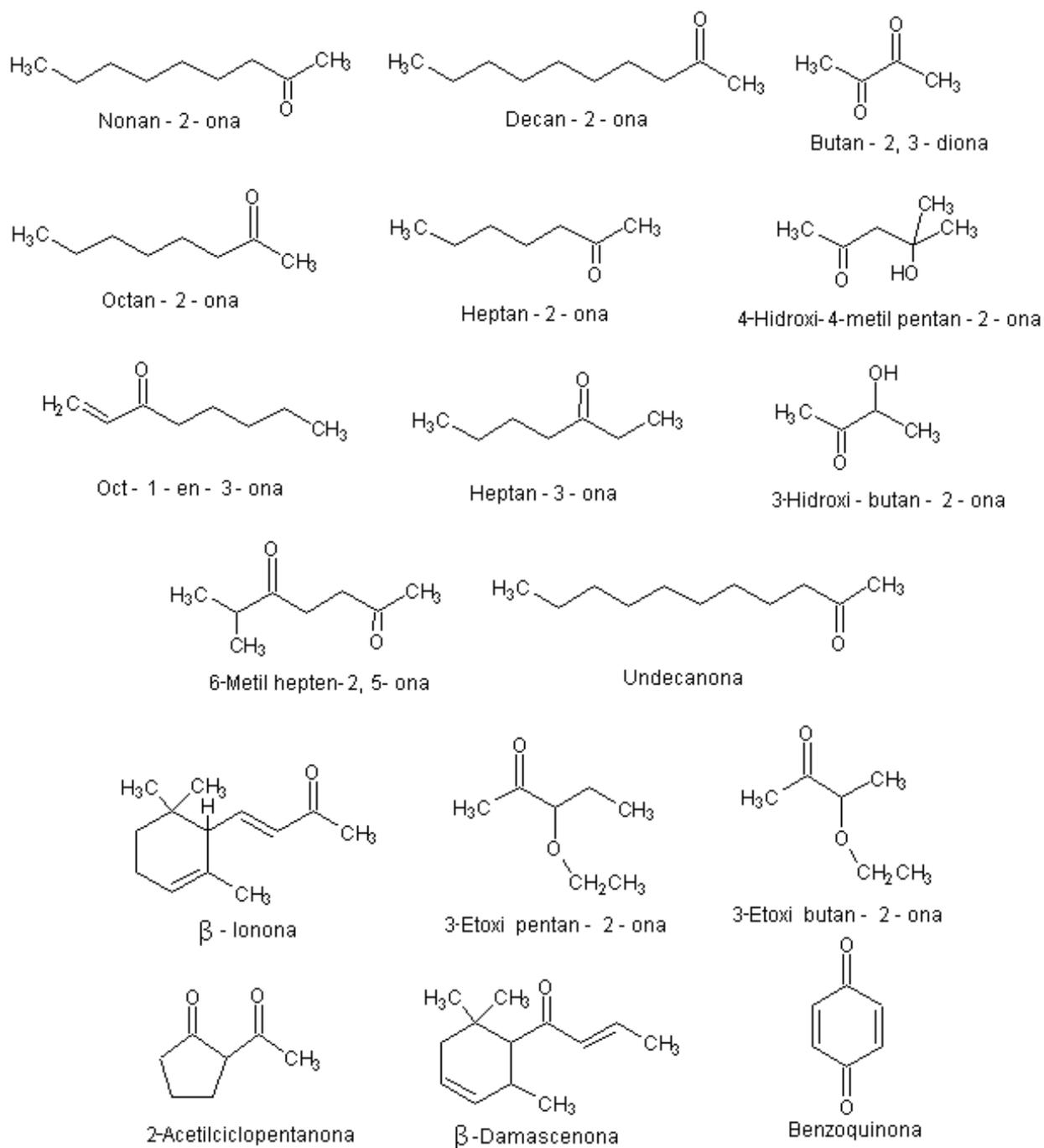


Figura 10. Fórmulas estruturais das cetonas identificadas em vinhos

2.3.2. Influência dos CCs na qualidade dos vinhos

Os compostos carbonílicos, em particular os aldeídos, estão amplamente distribuídos em vinhos e bebidas em geral, influenciando significativamente no aroma desses produtos devido ao baixo valor de seus limites de percepção olfativa^{64, 77}.

O tipo e concentração desses CCs podem variar tanto quanto o poder de conferir notas agradáveis ou desagradáveis ao aroma, ou seja, um único aldeído poderá influenciar positiva ou negativamente nas características sensoriais do vinho, dependendo principalmente da sua concentração no meio⁶⁴. Por esse motivo, a identificação de CCs pode ser um recurso importante na busca pela sua padronização.

Alguns aspectos positivos e negativos da presença de CCs em vinhos serão discutidos a seguir:

Aspectos positivos

Em alimentos, a reação de Maillard entre sacarídeos e peptídeos contendo lisina ou outros resíduos de aminoácidos pode gerar compostos carbonílicos que irão interferir no aroma, especialmente os CCs furânicos³¹. O 2-metil butanal, por exemplo, é o composto resultante da interação entre isoleucina e os compostos dicarbonilados do vinho, sendo um dos responsáveis pelo aroma “frutado” desta bebida⁵¹. Os produtos da interação entre fenilalanina e os compostos dicarbonilados são o benzaldeído e o fenilacetaldéido, ambos descritos como responsáveis pelo aroma “floral”⁽⁶⁷⁾.

O grupo de CCs voláteis responsáveis pelos aromas “floral” e “frutado” é composto principalmente por cetonas e aldeídos benzóicos (β -ionona, β -damascenona, vanilina, siringaldeído e benzaldeído) e também por aldeídos alifáticos de cadeia longa (octanal e decanal). Alguns deles são extraídos da madeira da barrica na qual o vinho é colocado para envelhecer, outros são provenientes da própria uva.

A vanilina é um dos aldeídos benzóicos mais importantes, pois é encontrada em concentrações elevadas conferindo aromas agradáveis, descritos pelas expressões: “caramelo”, “fruta”, “algodão”, “doce” e “pêssego”, além de ser o componente mais importante do aroma da baunilha⁶². Os descritores aromáticos para a β -ionona, β -damascenona e octanal são

semelhantes e incluem: “frutado”, “floral”, “rosa”, “violeta”, “banana”, “maçã” e “doce”. O decanal foi descrito como “cítrico”^(70,78).

Os aldeídos furânicos, furfural, 5-metil furfural e 5-hidroximetil furfural, também extraídos da madeira ou provenientes da caramelização, podem conferir sabores e aromas agradáveis quando presentes em baixas concentrações. Esses aromas são descritos como notas de “madeira” e ajudam na complexidade dos vinhos envelhecidos^{11,34}. As notas de “madeira” também estão relacionadas com aldeídos cinâmicos como o coniferaldeído e sinapaldeído que, da mesma forma que os aldeídos furânicos e benzóicos, passam para os vinhos envelhecidos em barricas de madeira por extração⁷⁶.

Alguns CCs como o hexanal e o E-hex-2-en-1-al foram relacionados ao grupo de compostos formadores do aroma em calvados (bebida obtida da destilação da sidra). Esses compostos são formados durante o processo de trituração da maçã para obtenção do suco que será fermentado e podem ser total ou parcialmente convertidos em outros compostos voláteis durante a fermentação. A β -damascenona e as heptanonas metiladas, originadas pela degradação térmica de carotenóides, são citadas como cetonas constituintes do sabor característico da bebida após a destilação, originadas pela degradação térmica de carotenóides³⁶.

De uma forma geral, é possível perceber que os CCs que constituem as notas aromáticas mais agradáveis dos vinhos são compostos de alta massa molar, envolvendo longas cadeias carbônicas ou cadeias aromáticas.

Aspectos negativos

A qualidade de certos vinhos pode ser prejudicada por odores e sabores indesejáveis, que conferem diferentes notas de aroma à bebida.

Os “gostos amílicos”, por exemplo, são sabores provenientes de uma fermentação inadequada, resultando em grandes concentrações de ésteres, álcoois ou aldeídos. Esta característica é muito comum em vinhos brancos vinificados a temperaturas muito baixas. O 3-metil butanal também está associado a esta característica e, segundo a literatura, é um dos produtos da degradação de Strecker, iniciada com a interação entre o aminoácido leucina e compostos dicarbonilados do vinho⁶⁷. Este aldeído foi identificado em oito tipos de vinhos (quatro tintos e quatro brancos), em concentrações que variaram entre 4,45 a 13,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, levando a concluir que sua presença pode afetar

significativamente o aroma do vinho, uma vez que seu limite de percepção é de apenas $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁽⁶³⁾. Quando o aminoácido envolvido é a cisteína (contém enxofre na estrutura), os produtos da reação possuirão descritores de aroma como: “ovo podre”, “sulfídrico”, “assado”, “tostado”, etc. Se o aminoácido envolvido for a valina, resultará em 2-metil propanal, um indicador de aroma de “queijo” desagradável⁶⁷.

Os “gostos herbáceos” são atribuídos à presença de álcoois e aldeídos resultantes de uma série de oxidações enzimáticas dos ácidos graxos insaturados (ácidos linoleico e linolênico) presentes na casca da uva e/ou de uvas não amadurecidas suficientemente ou da presença de folhas na vinificação³². O hexanal é o principal deles, mas o E-oct-2-en-1-al e o E-non-2-en-1-al também podem ser responsáveis por este defeito no aroma. Durante a fermentação esses aldeídos poderão ser transformados em seus respectivos álcoois, com sabores mais toleráveis^{11,39}.

O E-non-2-en-1-al e o benzaldeído foram mencionados na literatura por conferirem o aroma à “vegetal cozido” ou “serragem” em alguns vinhos brancos, mas a nota aromática atribuída com maior frequência ao benzaldeído é de “amêndoa amarga”^(35,39,40). Os teores de E-non-2-en-1-al no vinho são muito baixos, entre $0,10$ a $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$, mesmo assim, podem influenciar negativamente o aroma⁶⁴.

O fenilacetaldéido está relacionado com o aroma a “madeira velha”, sendo citado na literatura como importante odorífero por ter sido encontrado em vários tipos de vinho em concentrações bem acima de seu limite de percepção ($0,20$ a $0,40 \mu\text{g L}^{-1}$). Os valores encontrados variaram de $4,82$ a $30,3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente nos vinhos brancos e tintos^{78,63}.

Outra característica indesejada relacionada com a presença de aldeídos é o “gosto acético”. A produção de acetaldeído é, até certo ponto, um processo natural; no entanto, concentrações de acetaldeído iguais ou superiores a $50,0 \text{mg L}^{-1}$ manifestam a característica “oxidada” do vinho. Esse defeito pode ser resultante da aeração do vinho, da contaminação por leveduras estranhas ao processo ou da conservação em recipiente cujo volume em líquido esteja incompleto, permitindo o contato com a camada interna de ar⁹.

O “defeito acroleína” é característico em vinhos contaminados por bactérias lácticas específicas e pela interação dos polifenóis com alguns componentes

químicos do mosto. Ele confere um odor picante com pequenas notas de plástico.

A interação entre a *Sccharomyces cerevisiae* e fungos presentes no mosto produz a oct-1-en-3-ona, cetona responsável pelo aroma à “fungo” ou “cogumelo”³¹. As bactérias envolvidas na fermentação malolática, por sua vez, são responsáveis pela produção de diacetil (butan-2,3-diona), cetona relacionada com o aroma à “manteiga”⁵. Alguns compostos carbonilados como isobutanal, isovaleraldeído, nonan-2-ona e undecan-2-ona participam na nota a “ranço”²⁷.

É importante ressaltar que os CCs do vinho não existem apenas na forma livre, mas parcialmente ligados ao dióxido de enxofre, formando ácidos hidroxialquilsulfônicos que serão tanto mais estáveis quanto menor for o pH do vinho. Os referidos ácidos também irão influenciar na qualidade da bebida e serão discutidos a seguir⁹.

2.3.3. Interação dos CCs com o SO₂ e formação de ácidos hidroxialquilsulfônicos

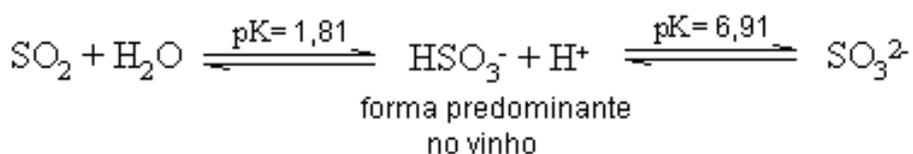
2.3.3.1. Importância do SO₂ na elaboração de vinhos

Os compostos sulfurados (Na₂S₂O₅ ou K₂S₂O₅ - metabissulfito de sódio ou potássio e/ou KHSO₃ - bissulfito de potássio) têm sido usados pelas vinícolas para solucionar os problemas de oxidação e interferências microbianas em vinhos⁷⁵.

Considerando que o uso destes compostos se difunde cada vez mais, deve ser levado em conta também os fatores relacionados com seu efeito prejudicial à saúde, particularmente porque eles estão associados aos problemas de asma entre os consumidores de bebidas alcoólicas⁷⁹. Os níveis de concentração de SO₂ total permitidos pela EU (União Européia) e OIV (Organização Internacional da Uva e do Vinho) para alguns tipos de vinho variam respectivamente de 160 a 260 mg L⁻¹ e de 175 a 360 mg L⁻¹ (43). Entretanto, de acordo com a literatura, concentrações inferiores a 10,0 mg L⁻¹ são suficientes para provocar ataques de asma⁸⁰.

Em solução aquosa estes compostos produzem várias espécies de S(IV), envolvidas em um equilíbrio que depende principalmente do pH do meio. Especialmente no vinho ocorre um equilíbrio entre as formas livre e ligada das espécies de S(IV)⁴³. O “SO₂ ligado” se refere aos compostos de adição entre S(IV) e outras substâncias como aldeídos, ácidos orgânicos, antocianinas, proteínas e açúcares. Nesta forma ele tem pouco efeito inibidor sobre a maioria das leveduras e bactérias, mas na forma “livre” irá atuar como agente antimicrobiano e antioxidante.

As concentrações do SO₂ livre encontradas em diferentes tipos de vinho podem variar em função da composição da bebida, da quantidade do bissulfito e/ou o metabissulfito adicionados e da maior ou menor facilidade de interação entre S(IV) e alguns componentes carbonílicos da matriz (estes componentes serão discutidos na seqüência). Como os vinhos contêm níveis significativos destes CCs, esta combinação deve ser considerada, pois podem influenciar a redução da concentração do SO₂⁴³. O equilíbrio da formação do aduto depende da temperatura, do pH do meio, e do tipo de constituintes químicos que combinam com as espécies de S(IV). Além disso, qualquer mudança na composição do vinho afeta inevitavelmente este equilíbrio, o que é demonstrado no Esquema abaixo^{43,81}:



Esquema 8: Distribuição das diferentes formas de S(IV) em solução aquosa.

No vinho, cujo pH varia de 3 a 4, a espécie de S(IV) predominante é o íon bissulfito^{43,82,83}. A Tabela 3 mostra a abundância relativa das espécies de S(IV) no vinho, tanto na forma livre (SO₂ - espécie ativa) como na forma de HSO₃⁻, nesta faixa de pH.

Tabela 3. Abundância relativa das duas espécies de S(IV) em função do pH, a 20°C, em solução aquosa⁴³.

pH	SO ₂ livre(%)	HSO ₃ ⁻ (%)
3.00	6.06	94.9
3.10	4.88	95.1
3.20	3.91	96.1
3.30	3.13	96.9
3.40	2.51	97.5
3.50	2.00	98.0
3.60	1.60	98.4
3.70	1.27	98.7
3.80	1.01	99.0
3.90	0.81	99.2
4.00	0.64	99.4

Os dados mostram que em vinhos com pH's mais elevados, a quantidade de SO₂ livre diminui, justificando a necessidade de uma sulfitagem maior quando o pH do mosto ou do vinho é elevado.

Apesar de existirem poucas evidências, acredita-se também que o bissulfito possa impedir a ocorrência da reação de Maillard nos vinhos. Ele atuaria bloqueando os grupos carbonílicos ativos - presentes nos açúcares redutores, aldeídos e cetonas - evitando a condensação entre estes grupos e os aminoácidos e proteínas do vinho e, conseqüentemente, promovendo a paralisação da seqüência desta reação de escurecimento⁷⁷.

Em linhas gerais, o papel das espécies de S(IV) no suco da uva ou no vinho está relacionado com sua capacidade em competir com o oxigênio pelos grupos químicos susceptíveis à oxidação, inibindo algumas reações de oxidação. Ainda não se conhece o mecanismo exato da inibição, mas sabe-se que essas espécies desestabilizam as pontes de enxofre que mantêm a conformação natural das enzimas oxidativas responsáveis pelo escurecimento.

2.3.3.2. Moléculas que se combinam com o S(IV)

Vários compostos presentes no vinho se ligam ao bissulfito, especialmente aqueles que possuem carbonila em sua estrutura, como por exemplo: formaldeído, acetaldeído, glicoxal, metilglicoxal, os ácidos pirúvico, α -cetoglutárico, galacturônico, glucurônico, 2-cetoglucônico, 2,5-dicetoglucônico,

os carboidratos xilose, 5-cetofrutose e o hidroxipropanedial^{43,83,84}. Alguns desses compostos são listados abaixo:

HCHO

CH₃-CHO

CHO-CHO

CH₃-CO-CHO

CH₃-CO-COOH

CH-CO-CHOH-CHOH-CH₂OH

COOH-CO-CH₂-CH₂-COOH

CHO-CHOH-CHOH-CHOH-CHOH-COOH

CHO-CHOH-CHOH-CHOH-CHOH-COOH

COOH-CO-CHOH-CHOH-CHOH-CH₂OH

COOH-CO-CHOH-CHOH-CO-CH₂OH

CH₂OH-CO-CHOH-CHOH-CO-CH₂OH

CHO-CHO-CHO

Formaldeído

Acetaldeído

Glioxal

Metilglioxal

Ácido pirúvico

Xilosana

Ácido α-cetoglutarico

Ácido galacturônico

Ácido glucurônico

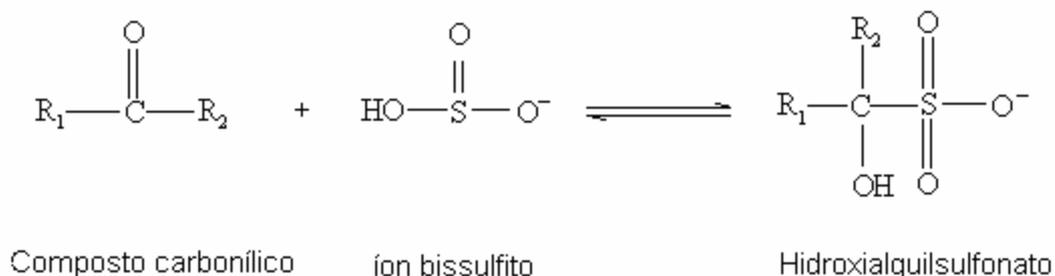
Ácido ceto-2-glucônico

Ácido diceto-2,5-glucônico

Ceto-5-frutose

Hidroxipropanodial

Em soluções aquosas, as espécies de S(IV) podem se ligar aos compostos carbonílicos de várias maneiras e uma destas combinações pode conduzir à formação dos compostos de adição conhecidos como ácidos hidroxialquilsulfônicos (AHAS) (Esquema 9)^{85,86}.



Esquema 9. Reação de formação dos ácidos hidroxialquilsulfônicos.

Como já foi mencionado, a combinação do bissulfito com os CCs, em geral, resulta em compostos de adição com baixa estabilidade, à exceção da combinação com o formaldeído e acetaldeído. Porém, quando a concentração de S(IV) livre é muito reduzida em decorrência de processos de oxidação, o equilíbrio será restabelecido com a dissociação do aduto para regenerar S(IV) livre.

As moléculas dicarboniladas (glioxal, metil glioxal e hidroxipropanodial), por sua vez, estão presentes em maiores concentrações no mosto proveniente de uvas atacadas por microrganismos causadores de apodrecimento dos frutos.

Como possuem dois grupos carbonílicos, podem combinar com dois íons bissulfito. Por isso, podem apresentar um importante papel, ainda pouco conhecido, nas combinações de bissulfito em alguns vinhos.

Os ácidos cetônicos são produtos secundários da fermentação alcoólica e também constituem importantes compostos de combinação. São formados no início do processo fermentativo e encontrados em maiores concentrações nos vinhos doces. Altas temperaturas, pH elevado e aerações favorecem a síntese e acúmulo destes ácidos.

O acetaldeído, em particular, reage rapidamente com os íons bissulfito formando um produto de adição não volátil e, por este motivo, reduzindo a percepção do seu odor⁴⁴. Isto justifica o uso dos compostos sulfurados para mascarar o excesso deste aldeído no vinho. O aduto formado – ácido α -hidroxietanosulfônico – consiste em uma forte espécie ácida envolvida no equilíbrio.

Compostos carbonílicos que possuem maiores massas molares também formam AHAS. A estabilidade desses ácidos também dependerá da estrutura do CC ligado, do pH e da temperatura do meio^{26,9}. É importante conhecer as concentrações desses ácidos formados com compostos carbonílicos mais complexos para entender o equilíbrio das reações de formação do aduto (AHAS) e para possibilitar a quantificação de CCs totais presentes nas amostras do vinho ou de outras bebidas fermentadas.

2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS

Os métodos analíticos de referência para análises de vinho são aqueles padronizados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ou pela OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). No entanto, muitas vinícolas adotam outros métodos para análises de rotina que também são aceitos pela comunidade científica, principalmente quando conseguem reproduzir os resultados de forma rápida e segura⁴⁷.

O método clássico para determinação de aldeídos totais utiliza titulometria e baseia-se na forte afinidade entre CC e espécies de S(IV). A amostra é inicialmente misturada com solução de metabissulfito de potássio e solução de amido a 0,2%, que serve como indicador. Em seguida ela é titulada com soluções de iodo 0,10 mol L⁻¹ e 0,02 mol L⁻¹, respectivamente em pH 2,0 e 9,0, para cada titulação⁴⁷. Este método não é específico, consome muito tempo para análise e requer bastante habilidade do analista.

Por esse motivo, apesar de ainda ser bastante utilizada, esta metodologia precisa ser otimizada ou substituída por procedimentos mais seguros e práticos, como a espectrofotometria e a cromatografia. Ao compararem essas duas técnicas para análise de aldeídos em conhaque, Granados e colaboradores⁵⁸ observaram que não havia diferença estatística significativa entre os resultados encontrados, mas salientou que empregando a cromatografia a análise pode ser realizada em menos tempo⁵⁸. Além disso, segundo Pereira e colaboradores⁴, o método espectrofotométrico não é suficientemente sensível para amostras com concentrações muito baixas de CCs, ficando restrito à detecção apenas de aldeídos totais, necessitando de um rigoroso controle do tempo e temperatura da reação e gerando produtos instáveis que podem levar a uma baixa recuperação e grande variação estatística dos resultados⁴.

Alguns autores mencionam as vantagens da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - fase reversa (CLAE) sobre os demais métodos devido à sua rapidez e maior eficiência de separação dos compostos carbonílicos e seus derivados^{87,88}, além de apresentar maior precisão nas análises quantitativas e capacidade de analisar compostos termicamente instáveis⁸⁹.

Por estes motivos são encontrados com muita frequência trabalhos que utilizam a CLAE na determinação de compostos carbonílicos, principalmente em matrizes como alimentos, bebidas ou amostras ambientais. Desta forma, neste trabalho escolheu-se para análise dos CCs CLAE em fase reversa com detecção no UV.

2.4.1. Reação de derivatização do analito

A maioria dos trabalhos que utiliza a CLAE-fase reversa na separação e identificação de compostos carbonílicos em diferentes tipos de amostras se refere à necessidade de converter estes componentes em seus derivados antes da separação cromatográfica. Esse tratamento é necessário devido à relativa instabilidade química da carbonila em meios complexos como os alimentos e bebidas^{13,90-95}. Com a derivatização é possível aumentar a resposta do detector e a seletividade dos CCs, além de tornar mais segura a análise dos aldeídos de baixa massa molar como formaldeído, acetaldeído e propanal, que são altamente voláteis e reativos^{89,96}. Tais características dificultam as suas análises diretas, fazendo com que suas determinações por métodos indiretos, via reações de derivatização, sejam mais apropriadas⁸⁹.

Muitos agentes derivatizantes como 5,5-dimetil-1,3-ciclo-hexanodiona, 2,4-dinitro-3,5,6-trideuterofenilhidrazina, hidroxilamina, semicarbazina e 2,4-dinitrofenilhidrazina são empregados para este fim, mas as principais reações de derivatização são as que envolvem a adição de um átomo de nitrogênio nucleofílico ao carbono da carbonila para formar produtos estáveis^{88,89,97}.

Entre as reações de adição de CCs e nucleófilos, a mais empregada é a condensação com solução acidificada de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), descrita em 1930 por Allen (citado por ref. 89). Esta reação está representada na Figura 11.

As hidrazonas (2,4-DNPHo-CC) formadas são analisadas normalmente por CGAR e por CLAE-fase reversa, sendo que entre estas duas técnicas, a CLAE-fase reversa tem se mostrado mais atraente. A CGAR tem limitações no que diz respeito à baixa volatilidade e instabilidade térmica dos derivados⁸⁹.

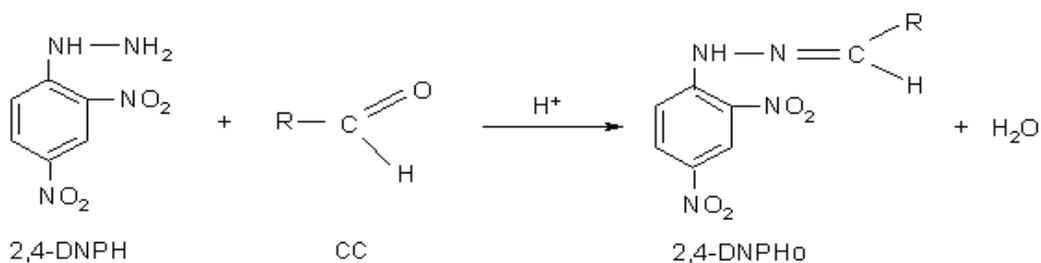


Figura 11. Reação de derivatização dos compostos carbonílicos com 2,4-DNPH.

A 2,4-DNPH é uma das melhores alternativas para determinação de aldeídos e cetonas tanto em amostras líquidas como gasosas. O principal motivo para a sua ampla utilização como agente derivatizante é que a reação com os CCs é altamente específica favorecendo um preparo de amostra mais rápido e minimizando os efeitos de matriz. Soma-se a essas vantagens o fato de que a reação é seletiva e ocorre facilmente em temperatura ambiente.

A formação das hidrazonas deve ocorrer em condições ácidas, pois a catálise ácida ativa o carbono carbonílico por meio da protonação do oxigênio, tornando-o muito mais eletrofílico e passível de ser atacado por um nucleófilo fraco, como a 2,4-DNPH⁸⁹. De acordo com Veloso⁸⁹, “a influência do valor do pH nesta reação deve-se à competição entre a nucleofilicidade e a basicidade da 2,4-DNPH e ao caráter eletrofílico do carbono do grupamento carbonílico. Em valores de pH muito baixos a 2,4-DNPH atua como base e é protonada, diminuindo a sua ação como nucleófilo. Em valores de pH altos a reatividade do grupamento carbonílico diminui. Assim, é necessário estabelecer valores ótimos de pH para equilibrar ambos os fatores”. Em seu estudo, Veloso⁸⁹ definiu como faixa ideal de pH o intervalo que garantiu o melhor rendimento de recuperação dos CCs, compreendido entre 1,50 e 2,20.

Para acidificação da solução derivatizante de 2,4-DNPH, a literatura sugere alguns ácidos como o ácido clorídrico, perclórico e fosfórico. De acordo com Uchiyama e colaboradores⁹⁸, o uso do ácido clorídrico apresenta o inconveniente de necessitar de uma etapa de filtração e lavagem do derivado obtido e posterior dissolução em solvente apropriado antes da injeção no sistema CLAE, tornando a análise demorada e trabalhosa. O uso dos ácidos perclórico e fosfórico, por sua vez, permite a injeção direta da solução derivatizada⁹⁸. A acidificação com o ácido fosfórico pode trazer benefícios analíticos que vão além do aumento da velocidade de derivatização. De acordo com os autores⁹⁸, na fase líquida a derivatização em meio acidificado com ácido fosfórico conduz à formação equilibrada de isômeros *E* e *Z* das hidrazonas, prevenindo a ocorrência de erro analítico relacionado com a detecção de apenas *E*-isômeros quando o ácido não é usado na derivatização.

As condições ótimas de derivatização de alguns aldeídos furânicos (F e HMF) com 2,4-DNPH foram estudadas por Lo Coco e colaboradores⁵⁴. Foi observado que a reação é quantitativa quando a razão reagente/analito é de, no mínimo, 2,5:1 e o pH do meio está próximo a 1,0. Nestas condições, tanto o F como o HMF são convertidos às suas hidrazonas em 25 minutos⁵⁴.

2.4.2. Condições de separação e detecção

Os compostos carbonílicos derivatizados pela 2,4-DNPH são geralmente separados por cromatografia líquida de fase reversa. A literatura descreve variadas condições de separação para CCs em amostras ambientais, alimentos e bebidas, empregando CLAE^{12,13,29-31,53-55,73,74,87,98-104}. As características como dimensões das colunas, composição de fase móvel, comprimento de onda e vazão, estão agrupadas na Tabela 4.

É possível observar que o tamanho das colunas varia de 110 a 300 mm, sendo mais comum o uso de colunas com 250 mm de comprimento. O diâmetro interno é de 3,0 a 10,0 mm e a maioria é recheada com partículas de 5 µm de diâmetro, sendo o material do recheio constituído basicamente pelo octadecilsilano (C18).

Para a fase móvel, é comum o emprego dos solventes: acetonitrila/água e/ou metanol/água, cuja eluição ocorre por gradiente.

Os compostos carbonílicos foram detectados por detector UV, em comprimentos de onda com faixa de variação de 254 a 385 nm.

Tabela 4. Sistemas de separação e detecção de compostos carbonílicos em amostras ambientais, alimentos e bebidas, por CLAE (coluna C18).

Amostra	CC detectados	λ (nm)	Fase móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Dimensões da coluna	Referências
Água	acetaldeído	350 – 365	ACN/H ₂ O(57/43%)	1,0	250x4,6mm (5 μ m)	30
	formaldeído	254	ACN/H ₂ O(60/40%)	1,0	250x4,6mm (5 μ m)	87
	acroleína	370	ACN/H ₂ O(10/90%)	1,5	-	99
	benzaldeído		ACN (100%)			
	butanona					
	propanona					
	glioxal metilglioxal crotonaldeído					
Ar	formaldeído	365	MeOH/ACN/H ₂ O (74,5/0,5/25%)	1,0	250x4,6mm (5 μ m)	12
	acetaldeído					
	propanona	360	MeOH/água(73/27%)	0,7	250x4,6mm (5 μ m)	100
	butanona	350	ACN/H ₂ O (57/43%)	1,0	300x4,0mm (5 μ m)	13
	acroleína	360	ACN/H ₂ O	-	250x4,6mm (5 μ m)	98
	benzaldeído					
	propanal	360	ACN/H ₂ O (55/45%)	1,0	110x4,7mm (5 μ m)	101
	hexanal					
	crotonaldeído		ACN/H ₂ O (54/46%)	1,4	150x4,7mm (5 μ m)	
	metacroleína butanal valeraldeído tolualdeído					
Mel	furfural	385	ACN/H ₂ O (55/45%)	1,0	250x4,6mm(5 μ m)	54
	5-hidroxi metil furfural					
Tomate	5-hidroxi metil furfural	-	MeOH/H ₂ O (80/20%)	1,5	250x4,0mm(10 μ m)	55

Tabela 4. Sistemas de separação e detecção de compostos carbonílicos em amostras ambientais, alimentos e bebidas, por CLAE (coluna C18)(continuação).

Amostra	CC detectados	λ (nm)	Fase móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Dimensões da coluna	Referências
Cachaça	formaldeído	365	MeOH/H ₂ O (65/35%)	1,0	150x6,0mm (5 μ m)	29
	acetaldeído butanal		MeOH/H ₂ O (85/15%)			
	acroleína		MeOH/H ₂ O (80/20%)			
	benzaldeído	365	ACN/H ₂ O (43/57%)	1,2	250x3,9mm(5 μ m)	103
Cachaça	butiraldeído	365	MeOH/H ₂ O (65/35%)	1,0	150x6,0mm(5 μ m)	104
	valeraldeído		MeOH/H ₂ O (85/15%)			
	furfural		MeOH/H ₂ O (80/20%)			
	hidroxi metil furfural					
vinho	propanal					
	hidroxi metil furfural	280 e 340	MeOH/ácido acético/ H ₂ O	1,0	300x3,0mm (10 μ m)	31
	hidroxibenzaldeído		A (10/2/88%) B (90/2/8%)			
	siringaldeído	280 e 320	H ₂ O /ácido fórmico (98/2%)	1,0	250x4,6mm (5 μ m)	102
	p-hidroxi- benzaldeído		MeOH/ác.fórm./ H ₂ O (68,6/2/29,4%)			
vinho	furfural	280	ACN/H ₂ O/ácido acético (80/15/5%)	1,0	250x4,6mm (5 μ m)	74
	vanilina	350	H ₂ O (100%) EtOH (100%)	2,0	250x10mm (5 μ m)	73
Cerveja	formaldeído	385	ACN/H ₂ O (55/45%)	1,0	250x4,6mm (5 μ m)	53
	acetaldeído	365	ACN/H ₂ O (57/43%)	1,0	250x4,6mm (5 μ m)	53
Cerveja	furfural					
	hidroxi metil furfural					

2.4.3. Quantificação de CCs e seus ácidos hidroxialquilsulfônicos

Os compostos carbonílicos do vinho interagem com o bissulfito presente formando ácidos hidroxialquilsulfônicos (AHAS). Portanto, a quantificação dos CCs nessas condições deverá levar em conta os teores de CCs livres e ligados na forma de aduto (ácido hidroxialquilsulfônico-AHAS).

De acordo com de Andrade e Tanner¹⁰⁵, aldeídos livres podem ser determinados diretamente em CLAE após derivatização com a solução de 2,4-DNPH. A quantificação de CCs totais, no entanto, está baseada na decomposição do aduto AHAS. Neste caso, a literatura sugere que a amostra seja inicialmente acidificada com HCl e levemente aquecida (50 °C) para eliminar o excesso de SO₂. Em seguida, uma solução de NaOH deve ser adicionada à amostra para tornar o meio suficientemente alcalino para decompor o AHAS. Este estágio é seguido pela derivatização e quantificação, como descrito para CCs livres. As concentrações dos AHAS são determinadas pela diferença entre os conteúdos dos CCs totais e livres, para todos os CCs^{13,82,106}.

De Oliveira e de Andrade¹³ avaliaram a presença de formaldeído e acetaldeído, assim como de seus ácidos, em três amostras de vinho branco e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração (mg L⁻¹) de formaldeído, acetaldeído e seus respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos¹³.

Amostra	HCHO Livre	HCHO Total	AHMS	CH ₃ CHO Livre	CH ₃ CHO Total	AHES
I	nd	0,880	0,880	1,59	17,1	15,5
II	nd	0,810	0,810	8,81	50,2	41,4
III	nd	0,220	0,220	7,76	18,1	10,3

nd= não detectado

Os autores constataram que, de fato, há uma interação entre os aldeídos estudados e o bissulfito presente nas amostras. O formaldeído apresentou maior interação com o bissulfito, uma vez que foi encontrado predominantemente na forma de aduto, enquanto o acetaldeído foi encontrado tanto na forma livre, em menor quantidade, quanto na forma de aduto, em maior quantidade¹³.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o comportamento dos compostos carbonílicos de baixa e alta massa molar e seus respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos presentes em vinhos brancos e tintos e em algumas variedades de uvas viníferas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar a metodologia existente para detecção de CCs de baixa massa molar disponível para amostras gasosas, para ser usada na análise de uvas e vinhos;
- Identificar e quantificar os principais CCs presentes em em uvas viníferas e vinhos brancos e tintos;
- Desenvolver metodologia analítica de determinação de compostos carbonílicos de alta massa molar;
- Desenvolver procedimento analítico para a quantificação de ácidos hidroxialquilsulfônicos em vinhos;
- Estudar os equilíbrios envolvendo compostos carbonílicos, bissulfito e os respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos, estabelecendo um comparativo entre as interações destes componentes nos vinhos comerciais e em solução modelo;

4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Os compostos carbonílicos, em particular os aldeídos, possuem grande importância como compostos de aromas devido aos seus baixos Limites de Percepção Olfativa. Diante da evidência de que poderá haver influência positiva ou negativa relacionada com a presença desses compostos sobre as propriedades sensoriais do vinho, e que essa influência poderá ser determinante na sua comercialização, surge então a necessidade de identificá-los e quantificá-los através de técnicas analíticas adequadas, de forma que possam ser adotadas pelos laboratórios de controle de qualidade das vinícolas ou de indústrias de bebidas em geral. Desta forma, será possível dar uma abrangência química maior à investigação de aldeídos, pois atualmente, nas práticas de controle laboratorial de rotina, as suas concentrações são expressas apenas em teores de acetaldeído.

Além disso, o estudo da interação CC-S(IV) relacionado aos compostos de S(IV) adicionados durante o processo de elaboração pode também elucidar a influência desse aditivo sobre os CCs, minimizando os prejuízos sensoriais causados por ambos os constituintes químicos e influenciando igualmente na sua quantificação. Até então, poucos estudos focaram a formação do aduto resultante da combinação CC-S(IV) neste tipo de matriz.

O presente estudo propõe, portanto, o desenvolvimento e aplicação de uma nova metodologia analítica que possibilite o estudo simultâneo de vários CCs presentes no vinho, quantificando, inclusive, aqueles que se encontram na forma de aduto (ácidos hidroxialquilsulfônicos). Durante o desenvolvimento deste trabalho foi dada grande atenção a esses ácidos, pois a dissociação desse aduto exige condições de pH específicas, que foram estudadas em detalhe para garantir a confiabilidade dos resultados.

Os resultados obtidos através dessa nova metodologia analítica poderão ser usados para diferenciação entre variedades de uvas viníferas, identificação da presença de microrganismos contaminantes no mosto, fermentação inadequada, tipificação de vinhos, fraude por adição de compostos não permitidos pela legislação (ex.: aldeídos furânicos do caramelo), etc.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. REAGENTES, SOLVENTES E SOLUÇÕES

5.1.1. Reagentes

Os padrões utilizados para obtenção das hidrazonas de compostos carbonílicos (2,4-DNPHo-CC) foram das marcas Merck, Aldrich e Sigma e o tipo e características desses padrões encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Padrões de compostos carbonílicos utilizados e suas características.

Padrão de carbonílico	Densidade (g mL ⁻¹)	Pureza (%)	Fabricante
Formaldeído	1,089	36,0*	Merck
Acetaldeído	0,780	99,0	Aldrich
Ciclo pentanona	0,948	99,0	Aldrich
Benzaldeído	1,040	98,0	Aldrich
Hexanal	0,834	98,0	Aldrich
Octanal	0,821	99,0	Aldrich
Glioxal	1,265	40,0*	Aldrich
Heptanal	0,818	95,0	Aldrich
Nonanal	0,827	95,0	Aldrich
Decanal	0,832	99,0	Sigma
Heptan-4-ona	0,817	98,0	Aldrich
Pentanal	0,810	98,0	Acros Organics
Propanal	0,805	98,0	Aldrich
Heptan-2-ona	0,815	99,0	Fluka
Hexan-2-ona	0,812	98,0	Aldrich
β-ionona	0,945	96,0	Aldrich
Salicilaldeído	1,166	99,5	Fluka
Nonan-2-ona	0,832	99,0	Aldrich
Octan-2-ona	0,817	98,0	Merck
Decan-2-ona	0,822	95,0	Merck
Acroleína	0,839	90,0	Aldrich
Propanona	0,790	99,5	Aldrich
5 Hidroximetil furfural	1,243	99,0	Aldrich
E-pent-2-em-1-al	0,860	95,0	Aldrich
E-hex-2-em-1-al	0,846	98,0	Aldrich
E-hept-2-em-1-al	0,857	97,0	Aldrich
E-oct-2-em-1-al	0,846	94,0	Aldrich
2,4-DNPH	-	98,0	Aldrich

*valores de concentração do aldeído em água

5.1.2. Solventes

Os solventes utilizados no preparo de amostra, solução padrão e fase móvel (acetonitrila e metanol), foram de grau cromatográfico HPLC J. T. Baker. A água deionizada, também presente na composição da fase móvel, foi obtida pelo sistema de purificação Barnstead, modelo NANOpure Diamond.

Após o preparo da fase móvel foram realizadas filtrações através de filtros Millipore para solventes orgânicos (0,45 μm) e degasagem à vácuo sob sonicação por quinze minutos. A remoção da poeira e material particulado previne danos no sistema de bombeamento e injeção e entupimento da coluna. As bolhas de ar são retiradas (degasagem) para evitar diminuição da eficiência do detector⁹⁶.

5.1.3. Preparo e purificação da solução de hidrazina (2,4-DNPH)

A solução de 2,4-DNPH 0,04% foi preparada dissolvendo 0,05 g de 2,4-DNPH em 60 mL de acetonitrila, 39 mL de água deionizada e 1 mL de ácido fosfórico concentrado, de forma que o pH final era de aproximadamente 2,0. Para a solução de 2,4-DNPH 0,4% a massa utilizada foi de 0,50 g, para os mesmos volumes dos demais componentes da mistura. A purificação destas soluções foi feita através de extração descontínua líquido-líquido, usando pequenos volumes de tetracloreto de carbono ou diclorometano (Figura 12). Após a purificação, uma alíquota da solução era injetada em CLAE-UV para conferir a sua pureza e em seguida estocada sob refrigeração em frasco âmbar¹⁰⁷.



Figura 12. Extração e purificação da solução de 2,4-DNPH.

5.1.4. Síntese de hidrazonas dos compostos carbonílicos (2,4-DNPHo-CC)

A reação de derivatização entre CCs e a 2,4-DNPH produz derivados 2,4-dinitrofenilhidrazônicos (2,4-DNPHo-CC), cujos cristais, depois de purificados, são utilizados no preparo de soluções-estoque que foram usadas como padrões na quantificação dos CCs igualmente derivatizados em amostras de vinho.

A síntese da hidrazona consiste em adicionar inicialmente 0,8 g da hidrazina a uma mistura contendo 6 mL de água deionizada e 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em outro recipiente, um volume de solução de CC, equivalente à massa de 0,10 g, é diluído em 20 mL de etanol e esta solução é misturada à solução inicial de hidrazina. A mistura resultante é colocada em repouso à temperatura ambiente para aguardar a formação completa dos cristais, que são posteriormente filtrados e transferidos para um béquer para serem recristalizados^{107,108}.

Para a recristalização foram realizados testes com metanol, etanol e diclorometano no intuito de definir o solvente que favorecesse a formação dos cristais. Em seguida, uma nova filtragem foi realizada e os cristais devidamente acondicionados em dessecador, ao abrigo da luz, até o seu uso.

Os derivados 2,4-DNPHo-CC foram detectados no sistema CLAE-fase reversa por detector de UV, em comprimento de onda de 365 nm, com tempos de retenção característicos para cada hidrazona.

5.1.5. Preparo das soluções-estoque de hidrazonas (2,4-DNPHo-CC)

A partir das 2,4-DNPHo-CC, foram preparadas soluções-estoque por meio de pesagem e dissolução dos cristais das 2,4-DNPHo sólidas de cada CC em acetonitrila. As massas pesadas e as concentrações de cada hidrazona nas soluções-estoque encontram-se na Tabela 7, estando expressas como concentração da hidrazona e como sua concentração correspondente em composto carbonílico.

Estas soluções foram armazenadas sob refrigeração em frascos âmbar, lacrados com filme de teflon e envolvidos em papel alumínio para evitar contaminação ou degradação pela luz. As soluções-estoque foram utilizadas na

preparação de soluções padrão de trabalho empregadas na construção das curvas analíticas e demais testes.

Tabela 7. Concentrações das soluções-estoque de hidrazonas, fator individual de correção de cada CC e concentrações corrigidas dos CCs.

Composto Carbonílico	MM _{CC}	MM _{DNP_HO-CC}	f _c	m _{DNP_HO-CC} (mg)	C _{DNP_HO-CC} (mg L ⁻¹)	C _{CC} (mg L ⁻¹)
Formaldeído	30,03	210,2	0,1429	9,960	199,2	28,47
Acetaldeído	44,05	224,2	0,1965	10,05	201,0	39,50
Ciclo pentanona	84,12	264,2	0,3183	9,850	197,0	62,70
Benzaldeído	106,1	286,2	0,3707	10,25	205,0	75,99
Hexanal	100,2	280,3	0,3574	102,7	205,4	73,41
Octanal	128,2	308,3	0,4158	10,16	203,2	84,49
Heptanal	114,2	294,3	0,3880	2,300	46,00	17,84
<i>E</i> -Pent-2-en-1-al	84,10	264,2	0,3183	103,1	206,2	65,63
Propanal	58,08	238,2	0,2438	11,42	228,4	55,71
Propanona	58,08	238,2	0,2438	10,01	200,2	48,81
Ciclo hexanona	98,14	278,3	0,3527	10,44	208,8	73,64
2 Etil hexanal	128,2	308,3	0,4158	10,16	203,2	84,49
Iso butanal	72,11	252,2	0,2859	10,00	200,0	57,18
Butanal	72,11	252,2	0,2859	10,27	205,4	58,72
<i>E</i> -Hex-2-en-1-al	98,10	278,2	0,3526	10,76	215,2	75,90
Butanona	72,10	252,2	0,2859	10,60	212,0	60,61
Acroleína	56,06	236,2	0,2374	25,00	500,0	118,7
Salicilaldeído	122,12	300,2	0,4040	4,800	96,00	38,78
Furfural	96,09	276,2	0,3479	10,48	209,6	72,92

MM_{CC} = Massa molar do CC

MM_{DNP_HO-CC} = Massa molar da hidrazona

f_c = Fator de correção de massa = MM_{CC} / MM_{DNP_HO-CC}

m_{DNP_HO-CC} = massa da hidrazona (g)

C_{DNP_HO-CC} = Concentração da solução de hidrazona (mg L⁻¹)

C_{CC} (mg L⁻¹) = Conc. correspondente do CC na solução (mg L⁻¹) = C_{DNP_HO-CC} × f_c

5.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Balança analítica Sartorius, modelo 42, com precisão de 0,1 mg;
- Banho de ultra-som Arruda, modelo SX-10;
- Deionizador Nanopure Diamond, Barnstead;
- Phmetro digital Digimed;
- Micro-seringas de vidro 10, 25, 50 e 100 µL Hamiltom, EUA;
- Cartucho C18 Sepak, Waters, USA;
- Bomba de vácuo FABRE-PRIMAR, modelo 151;

- Filtros Millipore descartáveis, com membrana durapore HV de 0,45 µm de poro e 25 mm de diâmetro;
- Cromatógrafo a líquido com sistema de eluição isocrático. Para análise em sistema isocrático de fase reversa: bomba Intralab modelo 5010, válvula injetora RHEODYNE *loop* de 10 µL, detector Intralab modelo UV-5100 com lâmpada de deutério e integrador/processador Intralab modelo 4290 (programação: CS=0,25, PT=100, AT= variável). Os compostos foram separados em coluna Zorbax C-18 HP (250 x 0.46 mm – 5 µm)
- Cromatógrafo a líquido com sistema de eluição com gradiente de solvente. Para análise em sistema gradiente de fase reversa: bomba Perkin Elmer Série 200, válvula injetora RHEODYNE *loop* de 20 µL, detector Perkin Elmer série 200 UV/VIS 5100 com lâmpada de deutério, integrador/processador Intralab, modelo 4290 (programação: CS=0,25, PT=100, AT= variável, MA=1000). Os compostos foram separados em coluna LichroCART 250-4 (Merck) RP-18 (5 µm).

5.3. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

Em todos os experimentos foram utilizados vinhos brancos (*Moscato Canelli*) e tintos (*Syrah*) de diferentes vinícolas da região do Vale do São Francisco, safras 2003 e 2004, adquiridos diretamente nas vinícolas e acondicionados em ambiente refrigerado (aproximadamente 15 °C) até o momento da análise.

As uvas analisadas foram colhidas e imediatamente refrigeradas a 4 °C para serem analisadas dentro de um período de 48 horas. Foram avaliadas uvas brancas das variedades *Moscato Canelli*, *Chenin Blanc*, *Schomburger* e *Riesling Itálico* e tintas *Syrah*, *Cabernet Sauvignon*, *Alicante Bouschet*, *Alfocheiro*, *Pinnot Noir* e *Ruby Cabernet* (Figura 13).



Cabernet sauvignon



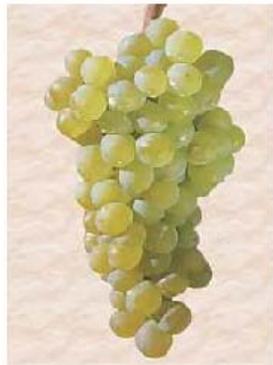
Syrah



Ruby cabernet



Moscato



Chenin blanc



Riesling



Schomburger



Pinot noir



Alfocheiro



Alicante bouschet

Figura 13. Uvas viníferas analisadas.

5.4. ANÁLISE DE pH DO VINHO

O pH dos vinhos foi determinado imediatamente após a abertura das garrafas, por leitura direta em 20 mL da bebida, com auxílio de um potenciômetro digital Digimed, devidamente calibrado com as soluções tampão (pH 4,0 e 7,0).

5.5. ANÁLISE DO BRUX DA UVA

O Brix de uma amostra representa o teor de sólidos dissolvidos, sendo, em geral, expresso pelo percentual de açúcares presentes na amostra. A análise do brix do extrato de uva foi feita em dez variedades de uvas viníferas através de refratômetro manual. Seis amostras de cada variedade foram analisadas.

5.6. ANÁLISE DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS POR CLAE

5.6.1. Preparo de amostras

5.6.1.1. Amostras de uvas

A determinação de CCs nas uvas foi feita com o objetivo de identificar, entre os CCs, aqueles que poderiam contribuir com o aroma primário do vinho, ou seja, os CCs presentes no vinho e originários da uva. Os extratos das uvas foram obtidos por esmagamento das bagas desengaçadas em almofariz, em seguida o extrato foi filtrado em filtros Millipore descartáveis, com membrana durapore HV de 0,45 µm de poro e 25 mm de diâmetro. Uma alíquota de 1 mL do filtrado foi derivatizada com solução 0,4% de 2,4-DNPH e submetida a sonicação por 15 minutos para ser injetada diretamente no cromatógrafo para separação e quantificação por CLAE-UV (Figura 14).

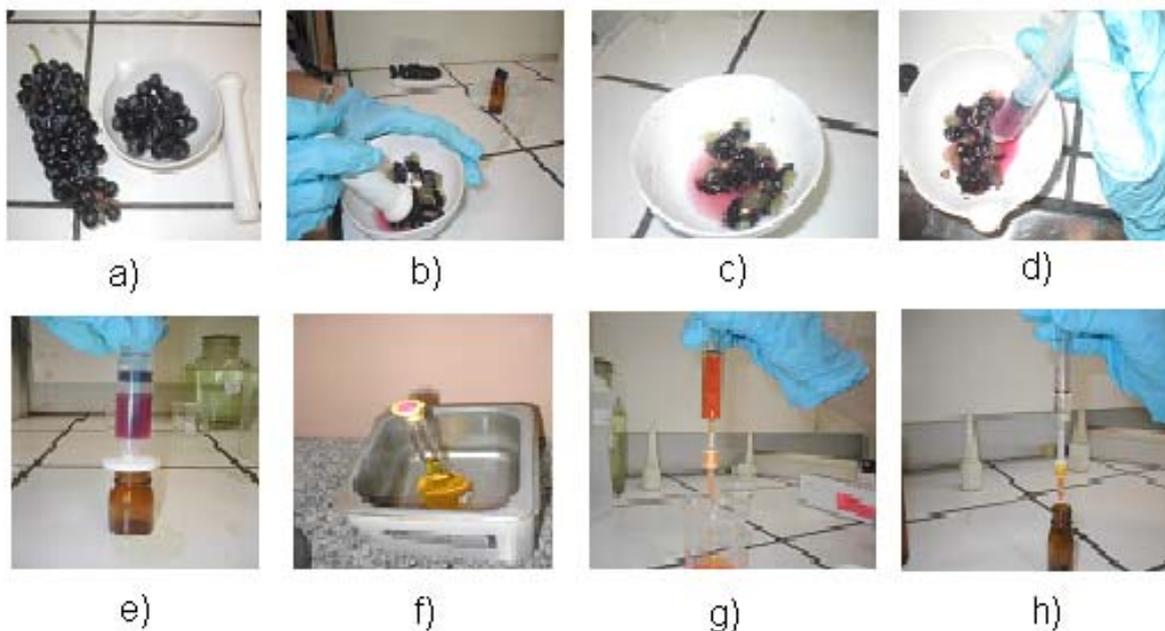


Figura 14. Esquema de preparo de amostra para análise de CCs em uvas por CLAE: a) uvas inteiras desengaçadas; b) esmagamento para retirada do suco; c) suco; d) remoção do extrato com seringa; e) filtragem; f) derivatização sob sonicação; g) pré concentração em cartucho C18 e h) eluição com acetonitrila.

5.6.1.2. Amostras de vinhos

A quantificação de CCs em vinhos foi realizada levando-se em conta a presença desses compostos nas formas livre (CCL) e ligada (CCLig). A forma livre representa o CC no estado normal e a forma ligada representa o CC combinado com o bissulfito, formando o ácido hidroxialquilsulfônico. Na prática, o teor de CC ligado foi determinado pela diferença entre CCs totais (CCT) e CCs livres (CCLig = CCT - CCL).

Para determinação de CC na forma livre, uma alíquota do vinho era transferida para um frasco âmbar contendo 5 mL de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), sendo em seguida submetida à sonicação por 15 minutos em banho de ultrassom. Desta forma, os CCs são transformados em suas respectivas hidrazonas e a amostra já se encontra pronta para injeção em CLAE.

A determinação de CCs na forma ligada foi realizada a partir da dissociação do aduto CC-S(IV) de modo que todo composto carbonílico presente na amostra pôde ser quantificado na forma de CCT e então, por diferença, podia ser encontrada a

concentração de CCLig. Para isso o pH do vinho, que é de aproximadamente 3,50, foi ajustado para que o meio se tornasse alcalino e o aduto pudesse ser desfeito. As amostras de vinho foram alcalinizadas com solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ até pH = 11,0 antes da derivatização com 2,4-DNPH. Após o ajuste do pH o procedimento utilizado no preparo da amostra foi o mesmo usado para determinação dos compostos na forma livre. Devido às pequenas diferenças no procedimento de preparo de amostra, os testes foram divididos em três etapas.

Na primeira etapa dos testes, foram derivatizadas amostras de 1 mL de vinho para identificação dos CCL e CCT. Em ambos os casos, na derivatização, o vinho foi inicialmente acidificado com HCl 1 mol L⁻¹ e em seguida aquecido a 50 °C por 15 segundos com a finalidade de eliminar o excesso de bissulfito, seguindo metodologia sugerida por de Andrade e Tanner¹⁰⁵. Na determinação dos CCL, após o aquecimento, foi feita a derivatização com solução de 2,4-DNPH 0,04% (1:5) e sonicação por 15 minutos seguida da injeção direta em CLAE. Para os CCs totais, no entanto, adicionou-se NaOH 1 mol L⁻¹ após a etapa de aquecimento para promover a dissociação do aduto CC-S(IV) e só depois foi feita a derivatização e sonicação por 15 minutos, seguida da injeção em CLAE. Neste teste foram analisadas 5 garrafas de vinho branco (da uva *Moscato Canelli*, safra 2003, marca Terra Nova), com 3 repetições para cada garrafa.

Na segunda etapa, um volume maior de vinho foi utilizado com a intenção de determinar os CCs de maior massa molar, que se encontravam em menores concentrações na bebida. Para isso, foram misturados 50 mL de amostra com solução 2,4-DNPH 0,04% (1:1), seguindo a mesma metodologia citada para a primeira etapa, eliminando as etapas de adição de ácido e de aquecimento. Após a reação de derivatização, as amostras foram filtradas e concentradas em cartucho C18 e eluídas com 3 mL de acetonitrila (Figura 15). Foram analisadas 6 garrafas de vinho branco, com 3 repetições para cada garrafa.

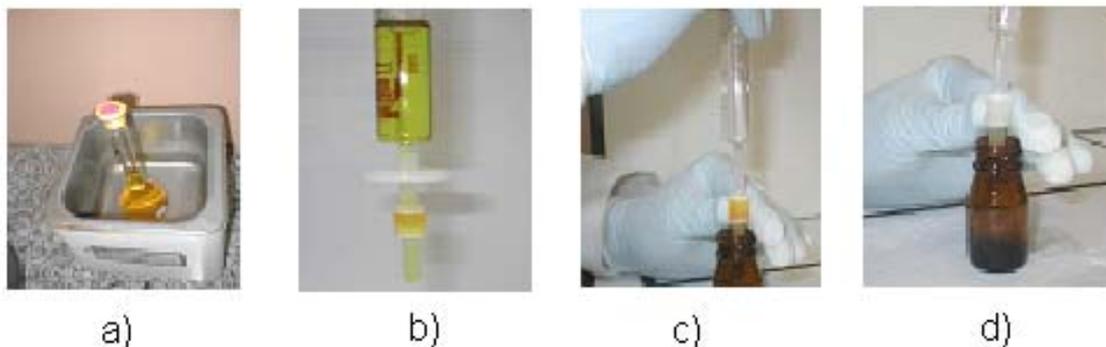


Figura 15. Esquema de preparo de amostra para análise de CCs em vinhos por CLAE: a) derivatização com 2,4-DNPH sob sonicação; b) filtragem da amostra derivatizada e concentração em cartucho C18; c) eluição com acetonitrila; d) amostra pronta para ser injetada em CLAE.

Na terceira etapa, alíquotas de 1 mL de vinho foram derivatizadas com 5 mL de 2,4-DNPH 0,4% (1:5). O mesmo procedimento analítico descrito na segunda etapa foi adotado, porém, não foi necessária a filtragem e concentração em cartucho C-18. Foram analisadas 5 garrafas de vinho branco e 5 garrafas de vinho tinto, ambos produzidos por fabricantes diferentes. Para cada garrafa foram feitas três repetições.

Os esquemas mostrados na Figura 16 detalham as técnicas de preparo de amostra nas três etapas distintas.

É importante ressaltar que em todas elas, as garrafas de vinho eram abertas no dia da análise e as amostras foram analisadas logo após o seu preparo e em seguida estocadas em frascos âmbar, vedados com fita teflon e armazenados em geladeira para possível re-análise.

5.6.2. Reação de derivatização

O estudo das melhores condições de reação de derivatização foi feito levando-se em conta inicialmente o volume de amostra na qual fosse possível detectar o maior número de CCs em níveis traço, sendo posteriormente avaliada a proporção de vinho e 2,4-DNPH ideal para garantir também a detecção de maior número desses compostos. Os dois testes são descritos nos itens 5.6.2.1 e 5.6.2.2.

5.6.2.1. Teste para definição do volume de amostra

Neste teste, foram preparadas amostras de 1, 5, 10, 25 e 50 mL de vinho branco submetidas à reação de derivatização com o mesmo volume de solução de 2,4-DNPH a 0,04%.

5.6.2.2. Teste de proporção amostra: 2,4-DNPH (v/v)

No teste para definição da proporção entre volume de amostra e volume de 2,4-DNPH a ser empregada na detecção dos CCs foram avaliadas amostras de vinho branco e tinto derivatizadas em soluções de 2,4-DNPH a 0,4%, nas seguintes proporções: 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; e 1:6.

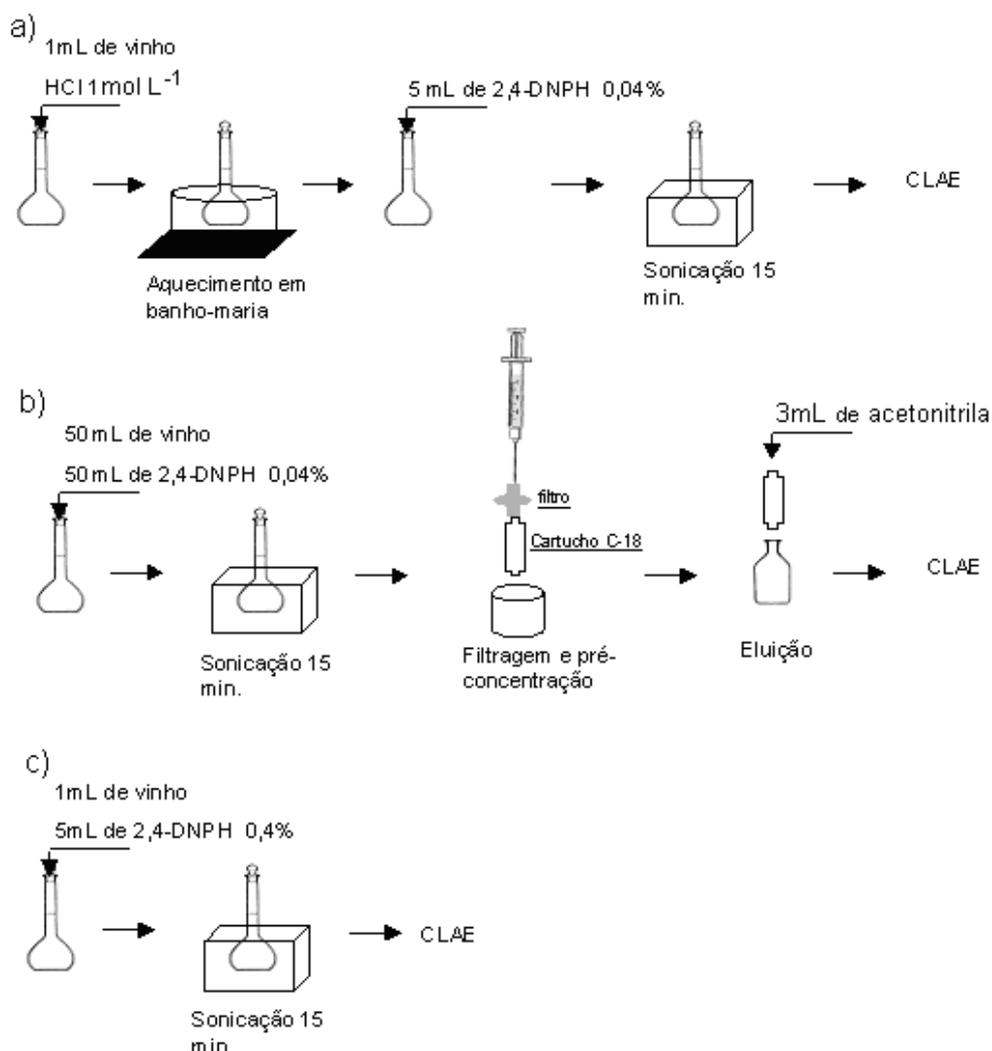


Figura 16. Esquemas de preparo de amostra para análise de CCs livres em vinhos: a) etapa I; b) etapa II; c) etapa III.

5.6.3. Condições cromatográficas

Durante o desenvolvimento da metodologia analítica para separação de compostos carbonílicos (CC), os testes foram divididos em três etapas, conforme descrito no item 5.6.1.2. Na etapa I utilizou-se cromatografia líquida com sistema de separação isocrático e nas etapas II e III utilizou-se o sistema binário de cromatografia em gradiente. As condições cromatográficas para os dois sistemas estão descritas na Tabela 8.

A definição das condições cromatográficas para o sistema gradiente citadas na tabela foi feita após os testes de programação e fase, que serão discutidos nos itens 5.6.3.1 e 5.6.3.2.

Tabela 8. Condições cromatográficas para separação de CCs em sistemas isocrático e gradiente.

Condições	Isocrático	Gradiente
Fase móvel (v/v/v)	Fase A: MeOH/ACN/H ₂ O (74,5:0,50:25,0%)	Fase A: MeOH/ACN/H ₂ O (74,5:0,50:25,0%) Fase B: MeOH (100%)
Vazão (mL min ⁻¹)	1,0	1,0
λ (nm)	365	365
Programação	Tempo 32'	Fase 100%A
		Tempo 0'
		Fase 100% A
		12'
		100% A
		12'
		100% A→B
		3'
		100% B
		10'
		100% B→A
Tempo total da corrida	32 minutos	37 minutos

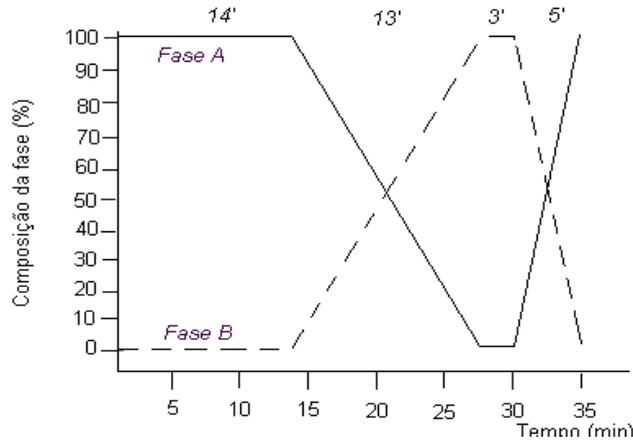
5.6.3.1. Testes de programação de separação

Uma vez evidenciada a dificuldade de utilização do sistema isocrático em separar os CCs de maior massa molar e a necessidade de realizar esta separação

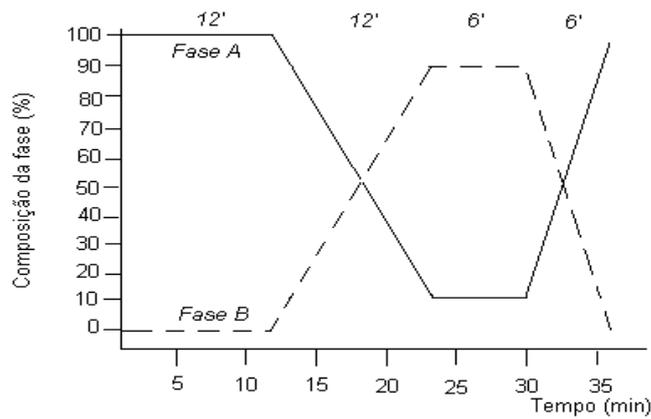
em sistema gradiente de eluição, foram realizados testes de programação, visando obter a melhor resolução possível dos picos.

As programações testadas foram:

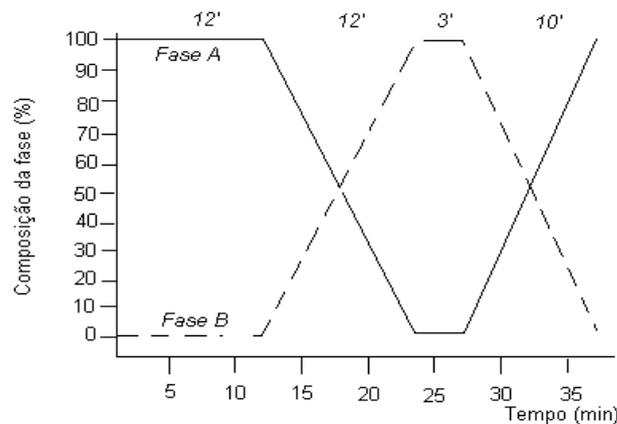
- Programação n°1



- Programação n°2



- Programação n°3



5.6.3.2. Testes de fases móveis

Após a definição da programação n°3 para separação dos CCs, baseada na melhor resolução observada, esta foi utilizada para realização de testes com

diferentes composições de fases móveis com o objetivo principal de melhorar a separação dos CCs mais leves. As variações de fases realizadas nos testes foram:

- *Teste de fase nº1*

Fase A: ACN/H₂O (75,0/25,0%)

Fase B: MeOH (100%)

- *Teste de fase nº2*

Fase A: MeOH/H₂O/ACN (74,5/25,0/0,50%)

Fase B: MeOH (100%)

- *Teste de fase nº3*

Fase A: ACN/H₂O (75,0/25,0%)

Fase B: ACN (100%)

5.6.4. Figuras de mérito

Para garantir a qualidade analítica dos resultados foram feitos testes de validação seguindo as orientações do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” - Resolução nº475, do Ministério da Saúde/ANVISA¹⁰⁹. De acordo com a resolução citada, a metodologia analítica será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros: Seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez. Dentro do possível, foram utilizados alguns desses parâmetros para conferir a qualidade dos resultados.

5.6.4.1. Seletividade

O teste de seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental¹¹⁰. É aplicado quando desejamos saber se a metodologia analítica é capaz de produzir respostas para vários analitos e, além disso, se é possível distinguir a resposta de um analito da resposta de outros componentes que podem interferir na sua determinação¹¹¹.

O estudo de seletividade de um método sobre uma matriz complexa como o vinho, na qual não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse, deve ser realizado através do método de adição-padrão¹¹⁰.

Devido a essas características do vinho, ou seja, pela impossibilidade de obter um vinho sem CCs, foi realizado o teste de seletividade comparando os valores das inclinações das duas curvas de regressão linear obtidas após a adição-padrão. A primeira curva foi construída apenas com padrões contendo sete níveis diferentes de concentração dos CCs enquanto a segunda curva foi construída com amostras de vinho adicionadas dos mesmos padrões de CCs, também em sete níveis de concentração diferentes. Neste caso, o método será considerado seletivo se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, ou muito próximas, indicando que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito¹¹¹.

5.6.4.2. Linearidade e faixa linear de trabalho

A quantificação de analitos requer o conhecimento da dependência entre a resposta medida e a sua concentração. Através do estudo da linearidade é possível demonstrar se o método analítico é capaz de produzir uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado^{109,110}.

A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração do analito de interesse foi expressa através das equações das retas (curvas analíticas) e seus respectivos coeficientes de correlação (r). Considerou-se como evidência de um ajuste ideal dos dados para linha de regressão, valores de $r > 0,9900$.

Muitas vezes, mesmo que um método analítico demonstre ser linear, torna-se necessário conhecer a faixa de concentração na qual a sensibilidade possa ser considerada constante, definindo o intervalo que possibilite a determinação da concentração do analito com a precisão, exatidão e linearidade necessários para o ensaio^{111,112}. Este intervalo pode receber diferentes denominações como: faixa de variação¹¹³, faixa linear dinâmica¹¹⁰, intervalo¹¹² ou faixa linear de trabalho¹¹¹.

Neste estudo a faixa linear de trabalho foi definida conforme sugerido por Ribani e colaboradores¹¹⁰. Foi construído um gráfico contendo a resposta relativa (área do pico/concentração do analito) no eixo y e as concentrações correspondentes em

escala logarítmica no eixo x. Três linhas horizontais e paralelas ao eixo x foram colocadas, representando o valor médio das respostas relativas a 95,0 e 105% deste valor para a linha inferior e superior, respectivamente. Após a plotagem dos pontos no gráfico considerou-se como faixa linear de trabalho os pontos onde a resposta relativa estava inserida entre os limites inferiores e superiores do gráfico¹¹⁰.

5.6.4.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, podendo ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade^{109,111}.

Neste estudo, a precisão foi expressa como o desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação) de uma série de medidas¹⁰⁹, através da equação (1):

$$\text{DPR} = s/\text{CMD} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

DPR = desvio padrão relativo;

s = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada;

O valor máximo aceitável de DPR geralmente irá depender da metodologia empregada, da concentração do analito na amostra, do tipo de matriz e da finalidade do método, porém, não deve ultrapassar 5%⁽¹¹²⁾. No entanto, em métodos de análises de traços são aceitos DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra¹¹⁰.

A avaliação da precisão do método desenvolvido para análise de CC em vinhos foi feita com base na repetibilidade dos dados.

5.6.4.4. Limite de detecção (LD)

Segundo Soares¹¹², o conceito de limite de detecção tem sido objeto de diferentes definições conforme a área de trabalho¹¹². Por este motivo, foram encontradas algumas variações em relação às técnicas de obtenção do LD na literatura. De maneira geral, essa expressão refere-se à menor concentração do analito que pode ser detectado em uma amostra sob as condições experimentais estabelecidas¹⁰⁹. Em um primeiro momento, o limite de detecção foi calculado com base na referência 109, na qual sugere que o limite de detecção pode ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o menor nível detectável¹⁰⁹.

Para fins de comparação, o limite de detecção do método desenvolvido neste estudo foi também calculado a partir do quociente entre o desvio padrão do coeficiente linear e o coeficiente angular das curvas analíticas e este multiplicado por 3, de acordo com a equação (2):

$$LD = 3s/a \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde **s** é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e **a** é o coeficiente angular (inclinação) da mesma¹⁰⁸.

5.6.4.5. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental¹¹⁰. O LQ do método desenvolvido neste estudo também foi calculado a partir do quociente entre o desvio padrão do coeficiente linear e o coeficiente angular das curvas analíticas, sendo este multiplicado por 10, de acordo com a equação III:

$$LD = 10s/a \quad (\text{Eq 3})$$

Onde **s** é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e **a** é o coeficiente angular (inclinação) da mesma¹⁰⁸.

5.6.4.6. Validação (teste de recuperação)

O teste de recuperação se fundamenta na medição do teor do componente adicionado em uma porção analítica da amostra e na verificação da eficiência dessa medição pelo método proposto¹¹³.

Nos testes de recuperação foram adicionadas concentrações conhecidas de alguns CCs a uma amostra de vinho branco e em seguida a amostra foi injetada no sistema CLAE, seguindo o procedimento analítico já descrito anteriormente na sessão 5.6.1.2 (Figura 19c). Cada CC foi adicionado a diferentes alíquotas do vinho, em sete níveis de concentração diferentes. Os teores medidos dos CCs adicionados foram divididos pelos valores efetivamente adicionados e multiplicados por 100, obtendo-se assim as percentagens de recuperação.

5.6.5. Testes com solução modelo

5.6.5.1. Preparo da solução modelo

A presença de espécies de S(IV) nos vinhos, adicionadas com a intenção de conservar a bebida, deve ser entendida como um fator importante na quantificação de compostos carbonílicos, uma vez que pode ocorrer a interação entre esses dois componentes. Ainda não está bem estabelecida, no entanto, quão intensa ou estável é esta interação. Por este motivo, foram realizados testes com solução contendo padrões de CCs em condições que se aproximavam às do vinho, como teor alcoólico, teor de bissulfito e pH. Esta solução foi denominada “solução modelo”.

A “solução modelo” foi preparada conforme metodologia adaptada de Ancin e colaboradores⁸⁵, a partir da mistura contendo padrões de carbonílicos ($C_{\text{final}} = 10 \text{ mg L}^{-1}$), bissulfito ($C_{\text{final}} = 50 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido tartárico⁸⁵, cuja finalidade era ajustar o pH para que ficasse próximo ao do vinho, ou seja, 3,5, em solução de etanol a 11%. Os reagentes e padrões utilizados foram de grau analítico e os solventes (acetonitrila, metanol e etanol) de grau HPLC. Para o preparo das soluções envolvidas foi utilizada água deionizada obtida por sistema Millipore.

Os 22 CCs estudados foram: formaldeído, acetaldeído, propanal, pentanal, hexanal, octanal, nonanal, decanal, *E*-pent-2-en-1-al, *E*-hex-2-en-1-al, *E*-hept-2-en-1-al, *E*-oct-2-en-1-al, benzaldeído, salicilaldeído, propanona, hexan-2-ona, heptan-2-ona, octan-2-ona, nonan-2-ona, decan-2-ona, β -ionona e ciclo pentanona. Todos

estes CCs foram citados como constituintes da fração volátil de vinhos^{63,83,84,95,114-116}.

Soluções padrões de cada CC foram preparadas de forma a se obter concentração final de 1000 mg L⁻¹ do analito. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico A e outra para um balão B de mesma capacidade (Figura 17). Em ambos os casos, os volumes foram aferidos com solução de etanol 11% para obter uma concentração de 100 mg L⁻¹ de cada CC. Ao balão B foram adicionados ácido tartárico e bissulfito de sódio (para favorecer a formação do aduto AHAS), sendo esta amostra denominada de **solução modelo (SM)**.

Alíquotas de 1 mL das soluções A e B foram transferidas para os frascos A1 e B1 e aferidas com solução de etanol 11% para obter concentração final de 10 mg L⁻¹. Em seguida, 1 mL de ambos os balões foi transferido para frascos âmbar contendo 5 mL de 2,4-DNPH a 0,4%, acidificada com ácido fosfórico, para que o composto carbonílico fosse derivatizado. As misturas foram sonicadas por 15 minutos e injetadas no sistema CLAE. Os **compostos carbonílicos livres (CCL)** contidos nos balões A1 e B1 foram então analisados.

Alíquotas de 1 mL do vinho sintético (B) foram transferidos para os balões C1, C2, C3, C4 e C5. O pH das soluções contidas em cada balão foi ajustado para 9,10,11,12 e 13, respectivamente, através da adição de NaOH 1 mol L⁻¹. Todos os balões foram aferidos com solução de etanol a 11%. Uma alíquota de 1 mL contida em cada balão foi derivatizada com 5 mL de solução de 2,4-DNPH a 0,4% e usada para análise de **compostos carbonílicos totais (CCT)**.

Com a finalidade de avaliar o papel de cada CC na formação do aduto (individualmente ou em mistura), em valores de pH diferentes, realizou-se em um primeiro momento os testes com soluções modelos feitas de forma individual, ou seja, para cada composto carbonílico foram preparadas amostras de branco, livre e total isoladamente, de forma que fosse possível observar o comportamento de cada um deles mediante a presença do bissulfito. O mesmo procedimento de preparo da amostra foi repetido em seguida para obter uma única solução contendo todos os CCs juntos, com o intuito de avaliar a influência das diversas estruturas desses CCs sobre a interação com o bissulfito.

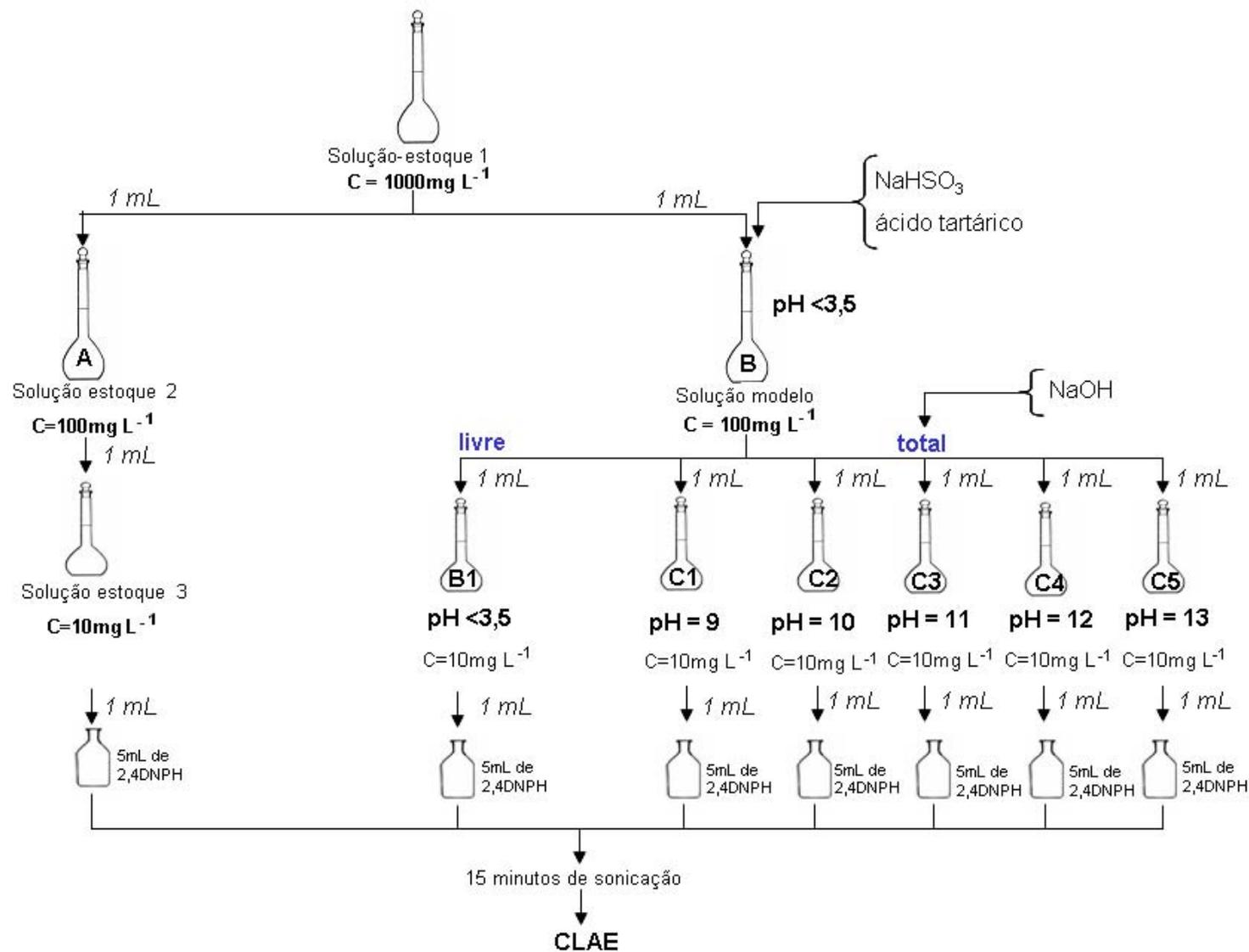


Figura 17. Diagrama de preparo de amostra para avaliação da estabilidade do aduto AHAS em “solução modelo”.

5.6.5.2. Condições de análise

Os compostos carbonílicos e seus respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos foram separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com sistema gradiente de fase reversa através da passagem das fases móveis A (74,5% Metanol/0,5% acetonitrila/25% água v/v/v) e B (100% metanol), de acordo com a seguinte programação: 12 min – 100%A; 12 min – 100% A→B; 3 min – 100% B; 10 min – 100% B→A; e quantificados com detector UV/VIS em 365nm.

5.6.5.3. Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos com a “solução modelo” foi baseado na análise multivariada da matriz de dados. A matriz de dados original consiste de 22 amostras e 10 variáveis, em pHs diferentes, ou seja, a matriz original de dados possui o formato 22x10. As amostras correspondem aos CCs pesquisados, enquanto a concentração dos compostos carbonílicos sob a forma ligada (CCLig) e total (CCT) representam as variáveis. As concentrações dos CCs na forma ligada e total foram medidas, na solução modelo, em pH's 9, 10, 11, 12 e 13. Os valores de CCL não foram utilizados na execução do tratamento estatístico.

O método utilizado foi Análise de Componentes Principais (ACP), usando o programa computacional Unscrambler versão 7.6⁽¹¹⁷⁾. Neste método, os dados são explorados e comprimidos, agrupando as amostras semelhantes e selecionando as variáveis mais relevantes. Inicialmente, utilizou-se um pré-processamento do tipo autoescalamento de forma a fornecer a mesma importância (peso) para todas as variáveis. Após efetuar o autoescalamento, obteve-se a matriz de correlação; esta é quadrada, simétrica e possui elementos da diagonal igual a 1. Assim, o coeficiente de correlação entre as variáveis é bastante elevado, confirmando a correlação entre elas. Em um segundo momento, com a execução da ACP, estas variáveis são agrupadas em uma nova variável (Componente Principal), direcionada ao longo do eixo de maior espalhamento dos dados, reduzindo então a dimensionalidade. Os diagramas de *scores* e *loadings* foram analisados.

Na análise multivariada o processo de redução da dimensionalidade espacial provoca conseqüentemente uma diminuição no número de variáveis. O intuito é obter parâmetros que não estejam altamente correlacionados entre si e que as

amostras sejam agrupadas e discriminadas. O processo de compressão das variáveis foi executado em etapas: a) Decomposição de Valores Singulares (SVD); b) Diagonalização da matriz de correlação. Primeiramente, a matriz original de dados (X) foi decomposta em três matrizes (A , B e C), decompondo o Método da Decomposição de Valores Singulares, de acordo com a equação (4), onde as matrizes A e C são quadradas e ortonormais, ou seja, as colunas de A e C são ortogonais entre si e normalizadas.

$$X = A \cdot B \cdot C^T \quad (\text{Eq. 4})$$

A matriz B é retangular e diagonal, possuindo valores singulares para todos os elementos fora da diagonal iguais a zero. Deste modo, o produto $A \cdot B$ representa a matriz de Scores T e C corresponde à matriz de *Loadings*. As colunas da matriz C contém os autovetores da matriz $X^T \cdot X$ e as colunas da matriz A contém os autovetores da matriz $X \cdot X^T$. Posteriormente, realizou-se a diagonalização da matriz de correlação, onde os autovetores C e os autovalores K foram calculados através da equação (5), sendo que a matriz de autovalores K é diagonal e seus elementos são iguais aos quadrados dos respectivos valores singulares (λ_k) de acordo com a equação (6).

$$X^T \cdot X \cdot C = K \cdot C \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\lambda_k = (S_{kk})^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Cada elemento λ_k da diagonal refere-se à variância dos dados originais descrita pela k -ésima componente principal. A quantidade de informação contida numa única componente principal pode ser fornecida pela porcentagem de variância explicada – (%Var λ_k). A variância total do conjunto é determinada pela somatória da variância de cada componente principal. Assim, a primeira componente principal sempre conterà maior porcentual de informação, conforme descrito anteriormente. Deve-se considerar todas as componentes principais suficientes para descrever cerca de 95,0% da informação original. Neste momento, tem-se o número de componentes principais significativas, ou seja, o *posto químico*, podendo também calcular (%Var acumulada) pelas componentes principais. Após tratamento por ACP executou-se o *cross-validation* (validação cruzada), com intuito de obter o

percentual validado da análise realizada. O programa Unscrambler versão 7.6 realiza o procedimento estatístico multivariado ACP utilizando SVD e diagonalização de matriz, obtendo a calibração do modelo resultante. O programa também executa o método de *cross-validation* interno, onde retira-se uma a uma as amostras com intuito de obter a capacidade de predição do modelo proposto. O método utilizado de *cross-validation* foi o randômico.

Utilizando a mesma matriz de dados, foi feita também a análise de regressão, escolhendo o modelo matemático pelo maior valor de R^2 ajustado e significância do coeficiente de regressão a 5,00% pelo teste t. Para a maioria dos CCs estudados, o modelo matemático que melhor se ajustou ao sistema foi o quadrático. A análise de regressão foi feita pelo programa SAEG-UFV, versão 8.1¹¹⁸ e seu principal objetivo era o de usar os modelos matemáticos para prever o comportamento dos valores de concentração dos CCs estudados em solução modelo em função das variações de pH em meio alcalino durante a análise de CCT e, desta forma, selecionar o pH (ou faixa de pH) no qual os valores da resposta do método fossem satisfatórios. Através da observação dos pontos críticos das curvas obtidas, definiu-se a faixa ideal de pH para ser aplicada no preparo de amostra.

5.6.5.4. Determinação de espécies de S(IV) por titulometria

A afinidade de um CC pelo bissulfito é representada pela constante de dissociação (K_d) do composto de adição correspondente, definida de acordo com a lei de ação das massas. Para encontrar os valores das constantes de equilíbrio dos CCs estudados na solução modelo e explicar melhor a afinidade destes CCs pelo bissulfito é necessário, portanto, avaliar os teores de bissulfito livre e ligado, nas mesmas condições. Para isso, foi feita a análise de bissulfito em amostra sintética de vinho, preparada conforme descrito no item 5.6.5.1., com concentração de 100 mg L⁻¹ para todos os CCs e 500 mg L⁻¹ de HSO₃⁻, sendo o pH ajustado para 3,5 com solução de ácido tartárico.

A metodologia usada para a análise baseia-se na titulação de uma alíquota de 10 mL da amostra contendo 1 mL de solução de HCl 25% com solução padrão de iodo 0,01 mol L⁻¹, usando como indicador solução de amido 1%. O ponto de viragem pode ser observado quando a amostra passa de incolor para lilás. Desta forma é determinada a concentração de HSO₃⁻ livre^{119,120,121}.

A partir dos dados obtidos na titulação e dos valores de CCT e CCL obtidos por CLAE, calcula-se o valor da constante de equilíbrio (Kd).

5.6.6. Testes com vinho comercial

Inicialmente foi realizado um estudo para identificar os CCs que seriam quantificados no vinho. A identificação foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos compostos encontrados na amostra e os tempos de retenção dos seus respectivos padrões puros. Também foi feita a co-cromatografia, na qual se adicionou uma quantidade de padrão na amostra e depois foi verificado o aumento na altura do pico, coincidentemente nos mesmos tempos de retenção. A cada dia de trabalho era feita também a comparação entre os cromatogramas da amostra e do padrão injetados no mesmo dia da realização das análises¹⁰⁷.

A quantificação dos compostos carbonílicos foi feita empregando-se o método de padronização externa, através das curvas analíticas construídas com os padrões e considerando-se as áreas integradas dos picos cromatográficos. Em algumas ocasiões foi necessário realizar os cálculos por fator de resposta devido às variações de sensibilidade do equipamento. As curvas analíticas de cada CC foram construídas com cinco a dez pontos, registrando-se área do pico *versus* a concentração, e obtidas por regressão linear¹¹².

5.6.7. Avaliação da estabilidade do vinho após abertura da garrafa

O estudo da estabilidade do vinho está relacionado, neste trabalho, com o comportamento dos teores de compostos carbonílicos após a abertura da garrafa e estocagem por um período determinado.

Para o estudo usou-se uma garrafa de vinho branco seco da marca Botticelli, safra 2006 (uva *Chenin Blanc*) e outra de vinho tinto da mesma marca e safra (uva *Cabernet Sauvignon*). Ambos foram analisados no dia de abertura das garrafas (dia 0) e depois com 8, 14, 23, 30 e 42 dias de estocagem sob refrigeração. As amostras foram analisadas em triplicata.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. OBTENÇÃO DAS HIDRAZONAS

A síntese de hidrazonas foi realizada com a finalidade de obter derivados puros dos CCs, desta forma, tornar possível a identificação e quantificação dos mesmos em amostras de vinho e uva. Foram feitos testes de derivatização com vinte aldeídos e cetonas (Tabela 9).

Em toda síntese os CCs puros foram derivatizados com a 2,4-DNPH em meio acidificado com ácido sulfúrico. Através do teste de solventes foi possível identificar o melhor entre eles (MeOH-metanol, DCM-diclorometano ou EtOH-etanol) no qual cada hidrazona cristalizava de forma mais eficiente, sendo o EtOH e o MeOH os mais empregados.

A síntese das hidrazonas não apresenta comportamento similar, ou seja, cada derivatização possui sua particularidade e algumas delas estão descritas na Tabela 9. É possível perceber, por exemplo, que à medida que são sintetizadas hidrazonas de CCs cujas estruturas moleculares são mais complexas ou ramificadas, ocorre maior dificuldade para dissolução dos cristais e recristalização. Isto foi observado principalmente para os CCs hidroxilados (4-hidroxi-4-metil-pentan-2-ona e 3-hidroxi-butan-2-ona).

Os CCs de cadeia alifática (propanal, butanal, pentanal, butan-2-ona, hexan-2-ona, heptan-2-ona, heptan-4-ona) são facilmente derivatizados e seus cristais se formam sem dificuldade em temperatura ambiente, mas para alguns deles (octanal, nonan-2-ona, hexanal, decanal, octan-2-ona) a dissolução dos cristais exige um aquecimento prévio para favorecer a recristalização, que deve ocorrer em banho de gelo.

As hidrazonas dos carbonílicos formaldeído, acetaldeído, butanal, benzaldeído, 2-etil-hexanal, propanona, ciclo hexanona e *E*-pent-2-en-1-al já estavam disponíveis no laboratório e por este motivo não foram sintetizadas.

Tabela 9. Observações importantes relacionadas à síntese e recristalização das hidrazonas

SÍNTESE			RECRISTALIZAÇÃO				
Composto Carbonílico	Densidade (g mL ⁻¹)	qtd	Teste de solventes			Solvente usado na recristalização	Observações importantes
			Solvente	à frio	à quente		
β-ionona	0,945	106,0 μL	MeOH DCM EtOH	I S I	S S PS	MeOH	A dissolução da hidrazona requer um grande volume de MeOH e aquecimento em banho-maria. A cristalização requer banho de gelo.
5-HMF	1,243	0,1 g	MeOH DCM EtOH	I I PS	I S I	DCM MeOH/DCM	Dissolve com DCM, mas não re-cristaliza, assim como não formou cristal também quando dissolvido com a mistura de MeOH/DCM.
Salicilaldeído	1,166	85,70 μL	MeOH DCM EtOH	I I I	S S I	DCM	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.
Heptan-2-ona	0,815	122,7 μL	MeOH DCM EtOH	PS S I	S S S	EtOH	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.
Hexan-2-ona	0,812	123,1 μL	MeOH DCM EtOH	I S I	S S S	EtOH	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.
Heptan-4-ona	0,817	122,4 μL	MeOH DCM EtOH	I. S I	S S S	EtOH	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.
2-Acetil ciclopentanona	1,060	94,30 μL	MeOH DCM EtOH	I. S I	S S S	EtOH	A dissolução da hidrazona requer aquecimento em banho-maria. Síntese com baixo rendimento de cristais.
2-Metil-2-hepten-6-ona	0,855	116,9 μL	MeOH DCM EtOH	I S I	S S S	EtOH	A cristalização requer banho de gelo.
Nonan-2-ona	0,832	120,0 μL	MeOH DCM EtOH	PS. S S	S S S	MeOH	A dissolução da hidrazona requer aquecimento em banho-maria. A cristalização requer banho de gelo e lavagem posterior dos cristais com MeOH gelado.
Octanal	0,821	122,0 μL	MeOH DCM EtOH	PS S I	S S S	EtOH	A dissolução da hidrazona requer aquecimento em banho-maria. A cristalização requer banho de gelo.

I= insolúvel; S=solúvel; PS=parcialmente solúvel; MeOH=metanol; EtOH=etanol; DCM=diclorometano.

Tabela 9. Observações importantes relacionadas à síntese e recristalização das hidrazonas (continuação)

SÍNTESE			RECRISTALIZAÇÃO				
Composto Carbonílico	Densidade (g mL ⁻¹)	quantidade	Teste de solventes			Solvente usado na recristalização	Observações importantes
			Solvente	à frio	à quente		
Hexanal	0,814	123,0 µL	MeOH DCM EtOH	I S PS	PS S S	MeOH	A cristalização requer banho de gelo.
Glioxal	1,265	395,0 µL	MeOH DCM EtOH	I I I	I I I	-	Não foi possível dissolver os cristais formados com os solventes testados (além dos citados foram testados também ACN e água).
Decanal	0,832	120,0 µL	MeOH DCM EtOH	PS S I	S S S	EtOH	A dissolução da hidrazona requer aquecimento em banho-maria.
4-Hidroxi-4-metil-pentan-2-ona	0,937	107,0 µL	MeOH DCM EtOH	- - -	- - -	-	Não formou cristal, não houve derivatização.
Octan-2-ona	0,817	122,0 µL	MeOH DCM EtOH	I S I	S S S	EtOH	A dissolução da hidrazona requer aquecimento em banho-maria.
3-Hidroxi-butan-2-ona	-	0,1g	MeOH DCM EtOH	I I I	I I I	-	Não formou cristal, não houve derivatização. Não foi possível dissolver os poucos cristais formados com os solventes testados.
Propanal	0,800	120,0µL	MeOH DCM EtOH	PS S I	S S S	EtOH	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.
Butanal	0,806	122,4µL	MeOH DCM EtOH	PS S I	S S S	EtOH	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.
Pentanal	0,810	120,0µL	MeOH DCM EtOH	PS S I	S S S	EtOH	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.
Butan-2-ona	0,800	120,0µL	MeOH DCM EtOH	I S I	S S S	EtOH	Cristalizou facilmente à temperatura ambiente.

I= insolúvel; S=solúvel; PS=parcialmente solúvel; MeOH=metanol; EtOH=etanol; DCM=diclorometano.

6.2. DETERMINAÇÃO DO pH DO VINHO

Entre os constituintes dos vinhos, aqueles relacionados à acidez são os que mais sofrem a interferência dos fatores naturais, como clima e solo. A acidez do mosto e do vinho pode ser avaliada através da determinação do pH, da acidez total e da concentração individual dos ácidos orgânicos¹²². Seu valor depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos, além da concentração de cátions, especialmente de potássio, que reage com o ácido tartárico formando tartarato¹²².

Apesar de não estar citado entre os Padrões de Identidade e Qualidade dos vinhos^{123,124}, sabe-se que o pH é um importante parâmetro a ser avaliado nesta bebida, pois condiciona a estabilidade biológica da bebida e influencia na cor e nas características gustativas dos vinhos. O pH de um vinho normalmente situa-se entre 2,8 e 3,8. Valores baixos de pH ($\approx 3,0$) reforçam a estabilidade dos mostos e dos vinhos nos planos biológico e químico. Este fenômeno é acentuado pelo fato de aumentar a proporção de SO_2 livre, quando o pH diminui¹²⁵. Os vinhos com um pH elevado ($> 3,7$), no entanto, são sensíveis a contaminações e alterações, uma vez que o desenvolvimento das bactérias, principais responsáveis pelas alterações dos mostos e dos vinhos, se encontra favorecido.

A intenção, ao realizar-se esta medição neste trabalho, foi a de conferir se o pH do vinho estava coerente com os valores normais esperados, pois a mudança nestes valores pode implicar em alterações no equilíbrio entre CC e espécies de S(IV)⁴⁷.

Os valores apresentados na Tabela 10 são referentes à análise de pH em treze amostras de vinhos brancos e treze amostras de vinhos tintos, de diferentes marcas, todas envolvidas nas análises de CCs realizadas neste trabalho.

Tabela 10. Valores de pH dos vinhos brancos e tintos analisados.

Vinhos	Faixa de pH	média	s	CV
Brancos	3,19 – 3,45	3,42	0,07	2,04%
Tintos	3,35 – 3,80	3,68	0,11	2,99%

s = desvio padrão; CV = Coeficiente de Variação

Na Tabela são mostrados os valores da média, desvio padrão e coeficiente de variação das medidas. O valor médio de pH para os vinhos brancos foi de 3,42 e para os vinhos tintos de 3,68, estando, portanto, dentro dos valores considerados normais para vinhos.

6.3. DETERMINAÇÃO DO BRIX DAS UVAS

Os valores de brix representam, na prática, os teores de açúcares presentes no extrato. É uma medida importante quando se deseja conhecer o estágio de maturação no qual a uva se encontra, influenciando na definição do momento ideal de colheita e processamento para obtenção do vinho.

A leitura do brix das 10 variedades de uvas citadas na Tabela 11 foi feita através de refratômetro manual, após adição de três gotas do extrato da uva peneirado e filtrado (em algodão) sobre o prisma do refratômetro. Para cada variedade foram feitas seis repetições.

A quantificação desses valores foi determinante na escolha das amostras para análise de CCs, pois foram avaliados os teores destes compostos apenas naquelas uvas nas quais o desenvolvimento fisiológico estivesse concluído, indicando que os constituintes responsáveis pelo aroma já haviam sido formados, entre eles os CCs. Tomou-se como referência o valor de 18,00 °brix, citado na literatura como valor indicativo da maturidade fisiológica para a maioria das uvas viníferas¹²⁶. Entre as variedades analisadas, apenas a *Schomburger* apresentou um valor de brix abaixo do esperado sendo, portanto, excluída da análise de CC nas uvas. A uva *Syrah* apresentou valor de brix muito próximo do desejado (17,75 °brix) e por este motivo foi incluída entre as amostras a serem analisadas. As demais apresentaram brix superior a 18,00 °brix.

Tabela 11. Valores de brix das uvas analisadas.

Uvas	^o Brix	s	CV
<i>Ruby Cabernet</i>	19,77	0,10	0,51%
<i>Cabernet Sauvignon</i>	23,05	0,12	0,52%
<i>Alicante Bouschet</i>	20,63	0,82	3,97%
<i>Pinnot Noir</i>	20,93	0,16	0,76%
<i>Alfrocheiro</i>	22,23	0,08	0,36%
<i>Riesling Itálico</i>	20,05	0,08	0,40%
<i>Chenin Blanc</i>	20,68	0,15	0,72%
<i>Moscato Canelli</i>	22,65	0,10	0,44%
<i>Shiraz</i>	17,75	0,19	1,07%
<i>Schomburguer</i>	15,33	0,11	0,72%

s = desvio padrão; CV = Coeficiente de Variação

6.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Como foi descrito no item 5.6.3., os experimentos desenvolvidos com a intenção de definir a metodologia analítica em cromatografia líquida de alta eficiência para análise de compostos carbonílicos em vinhos envolveu três etapas distintas. Em cada uma das etapas foram feitas algumas variações em relação ao preparo de amostra e programação de separação e os resultados obtidos em cada etapa serão discutidos a seguir.

6.4.1. Sistema isocrático (etapa I)

Na primeira etapa do experimento, alíquotas de 1 mL de vinho branco foram derivatizadas com solução de 2,4-DNPH a 0,04%. Foram analisadas cinco garrafas do vinho, com três repetições de cada garrafa. Os valores mínimos, médios e máximos de CCs livres (CCL) e totais (CCT) encontrados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Concentração de CCs (mg L⁻¹) no vinho branco, safra 2003: etapa I.

CC	CCL				CCT			
	min	méd	máx	s	min	méd	máx	s
Formaldeído	0,25	0,30	0,34	0,0425	0,54	0,67	0,72	0,0765
Acetaldeído	0,35	0,42	0,47	0,0523	1,2	1,3	1,4	0,1100
Furfural	0,27	0,41	0,50	0,0990	0,39	0,41	0,42	0,0114
Propanona	nd	nd	nd	nd	0,11	0,12	0,14	0,0144
Butanal	nd	nd	nd	nd	0,13	0,13	0,14	0,0050
Butanona	nd	nd	nd	nd	0,16	0,21	0,22	0,0454
Benzaldeído	nd	nd	nd	nd	0,17	0,19	0,24	0,0434

*nd= não detectado; s= desvio padrão

Os resultados obtidos para formaldeído e acetaldeído confirmam a previsão de que poderia haver uma fração dos CCs do vinho ligada às espécies de S(IV) e formando o aduto CC-S(IV), conhecido por AHAS. Tomando-se como referência os valores médios de CCT, observamos que 56,2% do formaldeído e 66,3% do acetaldeído se encontravam na forma de aduto. Por outro lado, os valores de concentração do furfural nas duas formas (respectivamente 0,41 e 0,41 mg L⁻¹ para livre e total) revelam que este composto carbonílico não é encontrado na forma ligada e provavelmente a justificativa para este fato esteja relacionada à presença de um sistema aromático conjugado com o grupo carbonílico do furfural. Esta conjugação diminui o carácter eletrofilico do carbono diminuindo assim a disponibilidade de interação com outros componentes.

Para os demais CCs só foi possível a quantificação na forma total, pois como se observa na tabela, a técnica analítica desenvolvida na etapa I é mais apropriada para determinação dos CCs que se encontram em maiores concentrações na amostra, não sendo possível detectar outros CCs a não ser pequenas concentrações de propanona, butanal, butanona e benzaldeído na forma total (respectivamente 0,12; 0,13; 0,21 e 0,19 mg L⁻¹). Provavelmente as concentrações dos CCs de maior massa molar na forma livre estejam em valores menores que o limite de detecção do método.

Além do mais, como foi utilizado o sistema isocrático de separação, foi possível perceber que, em uma mistura de dezesseis padrões de CCs, aqueles de maior massa molar não são separados de forma eficiente através desse sistema. O cromatograma apresentado na Figura 18 mostra que em CLAE por sistema isocrático apenas os CCs leves são separados com melhor eficiência, havendo co-eluição dos demais e gerando a necessidade do uso de um solvente mais polar para separação.

Nesse sentido, novos testes foram realizados na segunda etapa dos experimentos, desta vez, modificando o preparo da amostra e utilizando o sistema de cromatografia líquida por gradiente binário de eluição. Os resultados serão discutidos no item a seguir.

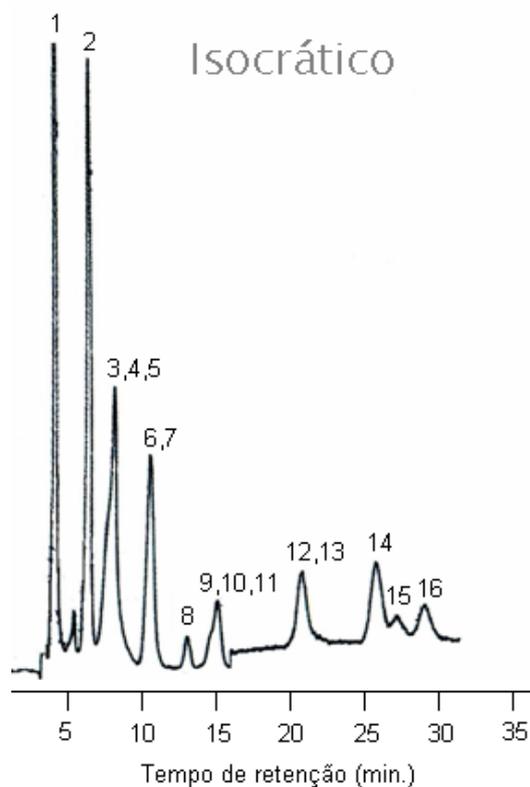


Figura 18. Cromatograma de uma solução contendo padrões de 16CCs submetidos à separação por CLAE em sistema isocrático. Picos: 1 – formaldeído; 2 – acetaldeído; 3 – furfural; 4 – propanal; 5 – propanona; 6 – butanal; 7 – iso-butanal; 8 – ciclo pentanona; 9 – benzaldeído; 10 – *E*-pent-2-en-1-al; 11 – ciclo hexanona; 12- *E*-hex-2-en-1-al; 13 – hexanal; 14 – heptanal; 15 – octanal; 16 – 2-etil-hexanal.

6.4.2. Sistema gradiente (etapas II e III)

Na segunda etapa dos experimentos, um volume maior de amostra foi derivatizado (50 mL de vinho) com volume igual de 2,4-DNPH 0,04% e após a derivatização a amostra foi filtrada e pré-concentrada em cartucho C-18. Os CCs retidos no cartucho foram eluídos com 3 mL de acetonitrila e injetados diretamente no sistema CLAE-fase reversa. As condições de eluição que permitiram a separação dos compostos em estudo e a redução dos tempos de retenção daqueles de massas molares mais elevadas foram:

- Fases móveis:
Fase A = MeOH/ACN/H₂O (74,5/0,50/25,0%)
Fase B = MeOH (100%)
- Programação:
100% de A por 12 minutos, levando mais 12 minutos para passar a 100% de B, condição que permanece por 3 min, em seguida retorna a 100% de A em 10 min.
- Comprimento de onda:
Todas as hidrazonas foram detectadas em 365 nm.

Para comparar os sistemas de separação isocrático e gradiente, inicialmente uma solução contendo dezesseis padrões de 2,4-DNPHo-CC foi injetada e separada por ambos os sistemas. Os cromatogramas mostrados na Figura 19 revelam a visível diferença entre os dois, justificando o uso do sistema de separação por gradiente de eluição nos demais ensaios realizados neste trabalho. Em seguida uma amostra de vinho preparada de acordo com o descrito para a etapa II foi também injetada nas duas condições referidas e os cromatogramas obtidos para a amostra são mostrados na Figura 20.

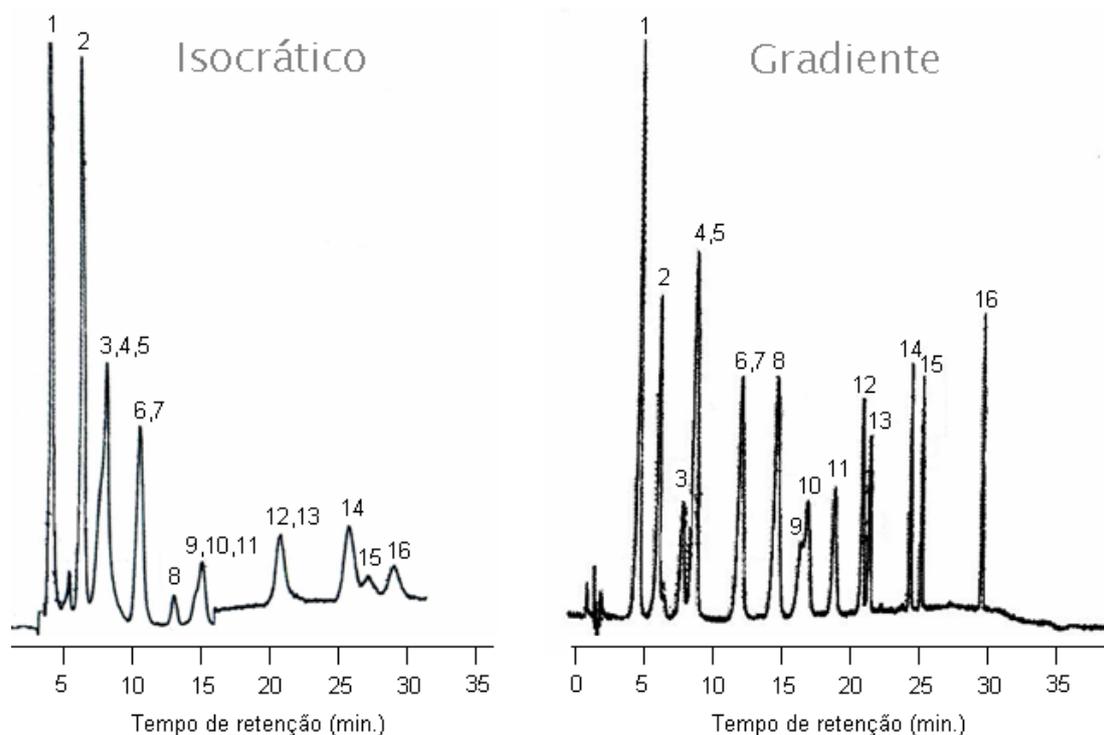


Figura 19. Cromatogramas comparativos de uma solução contendo padrões de 16 CCs submetidos à separação por CLAE em sistemas isocrático e gradiente. Picos: 1 – formaldeído; 2 – acetaldeído; 3 – furfural; 4 – propanal; 5 – propanona; 6 – butanal; 7 – iso-butanal; 8 – ciclo pentanona; 9 – benzaldeído; 10 – *E*-pent-2-en-1-al; 11 – ciclo hexanona; 12- *E*-hex-2-en-1-al; 13 – hexanal; 14 – heptanal; 15 – octanal; 16 – 2-etil-hexanal.

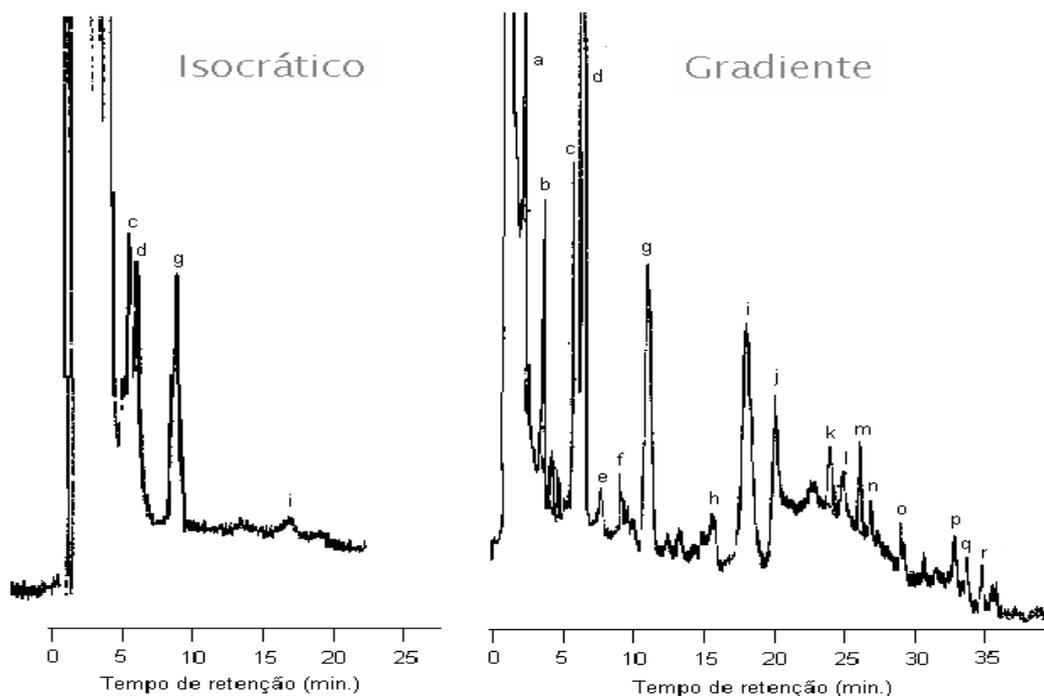


Figura 20. Cromatogramas de uma amostra de vinho branco submetida à análise por CLAE em sistemas isocrático e gradiente. As letras indicam os diversos CCs separados na amostra.

Analisando a Figura 20 é possível perceber que o uso de um volume maior de amostra, associado ao método de pré-concentração e separação com fases móveis de polaridades diferentes favorece a detecção de um maior número de compostos carbonílicos. Para o sistema de separação em gradiente, dezoito picos foram detectados no vinho analisado, contra quatro detectados na mesma amostra pelo sistema isocrático (as letras indicadas no cromatograma da Figura 20 são referentes aos diversos CCs separados na amostra, mas ainda não identificados no momento da análise).

Apesar do gradiente de solvente utilizado ter favorecido a separação de dezoito CCs na amostra de vinho branco, posteriormente foram identificados e quantificados apenas dez deles. A identificação dos CCs foi feita através da adição individual dos padrões correspondentes aos prováveis compostos carbonílicos presentes no vinho e confirmação pelo aumento do sinal detectado no mesmo tempo de retenção. A quantificação foi feita através das equações obtidas após a construção das curvas analíticas de cada CC em estudo e os resultados são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentração de CCs (mg L^{-1}) no vinho branco, safra 2003: etapa II.

CC	CCL				CCT			
	min	Méd	máx	s	min	méd	máx	s
Formaldeído	0,03	0,04	0,05	0,0064	0,06	0,08	0,10	0,0139
Acetaldeído	0,31	0,32	0,34	0,0136	1,3	1,3	1,4	0,0326
Furfural	0,28	0,31	0,33	0,0287	1,3	1,4	1,5	0,1015
Propanona	0,02	0,02	0,02	0,0034	0,05	0,05	0,05	0,0028
Butanal	0,02	0,02	0,03	0,0020	0,15	0,17	0,19	0,0151
Ciclo pentanona	0,02	0,03	0,03	0,0047	nd	nd	nd	nd
Ciclo hexanona	0,07	0,09	0,11	0,0181	0,002	0,003	0,004	0,0004
<i>E</i> -Pent-2-en-1-al	0,03	0,03	0,03	0,0025	0,02	0,02	0,02	0,0002
Hexanal	0,89	1,1	1,1	0,0943	nd	nd	nd	nd
2-Etil hexanal	0,05	0,06	0,06	0,0078	0,34	0,37	0,44	0,0556

*nd= não detectado; s= desvio padrão

Entre os compostos carbonílicos identificados no vinho por este método, os mais significativos do ponto de vista quantitativo são o acetaldeído, furfural e 2-etil-hexanal, presentes em concentrações de 1,3; 1,4 e 0,37 mg L^{-1} , respectivamente.

Os resultados desta etapa foram considerados satisfatórios, pois o volume de amostra (50 mL) utilizado favoreceu a detecção de uma grande quantidade de CCs contidos no vinho, inclusive em quantidades “traços”. Também foi

observado que o desvio padrão calculado para os valores de concentração dos CCs obtidos por este método é menor do que aqueles obtidos na etapa anterior, indicando melhor repetibilidade da metodologia de análise. No entanto, surgiu a necessidade de tornar o preparo de amostra mais fácil (eliminando a pré-concentração), rápido e menos dispendioso, gerando também menor volume de resíduo tóxico.

Na etapa III dos experimentos foi averiguada a possibilidade de trabalhar com volumes menores de amostra e de solução de hidrazina, pois na etapa anterior eram utilizados 50 mL de cada uma delas. Para isso, foram realizados testes com uma solução de hidrazina dez vezes mais concentrada que a anterior, passando de 0,04% para 0,4% e reduzindo o volume de amostra de 50 mL para 1 mL. As condições de separação desta etapa foram as mesmas adotadas nas análises da etapa II (sistema gradiente) que, por sua vez, foram estabelecidas após os testes de programação (6.4.2.1) e fase móvel (6.4.2.2) que serão discutidos na seqüência. Para otimização das novas condições exigidas na etapa III foram realizados também testes de volume de amostra (6.4.2.3) e testes para definição da proporção amostra:2,4-DNPH (6.4.2.4). A quantificação de CCs em vinhos brancos, vinhos tintos e uvas viníferas foi feita após todos esses ensaios prévios e será discutida respectivamente nos itens 6.6, 6.7 e 6.8.

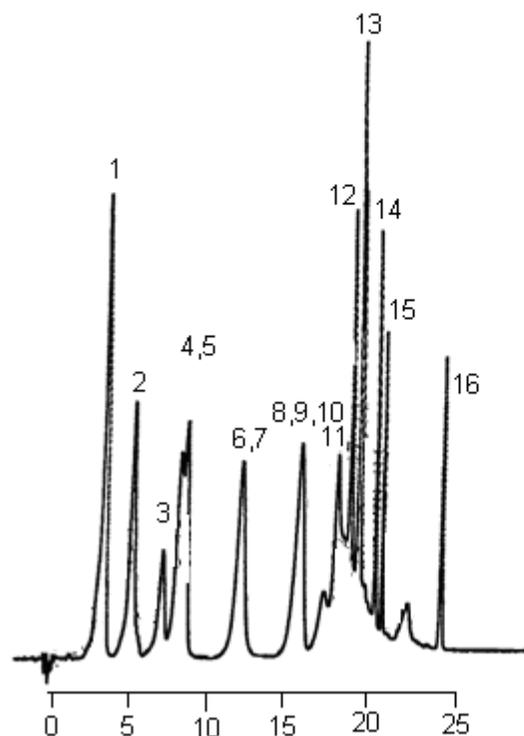
6.4.2.1. Teste de programação

Na Figura 21 são apresentados os cromatogramas de uma mistura contendo dezesseis 2,4-DNPHo-CC e obtidos por CLAE em sistema gradiente em três diferentes programações de separação.

Em ambas as programações a fase móvel A (MeOH/ACN/H₂O-74,5/25,0/0,50%) foi mantida a 100% durante os doze minutos iniciais da corrida cromatográfica, período no qual houve a separação dos cinco primeiros CCs da mistura: formaldeído, acetaldeído, furfural, propanal+propanona. A partir daí as programações foram modificadas para atender à necessidade de resolver melhor a separação dos CCs, principalmente daqueles de maior massa molar.

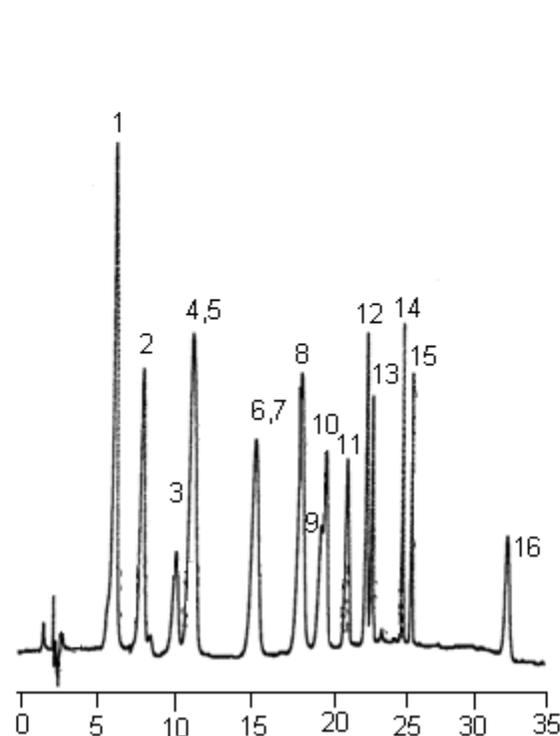
a) Programação 1:

0 min. 1mL/min 100%A
14 min. 1mL/min 100%A
13 min. 1mL/min A-B
3 min. 1mL/min 100%B
5 min. 1mL/min B-A



b) Programação 2:

0 min. 0,8mL/min 100%A
12 min. 0,8mL/min 100%A
8 min. 0,8mL/min 10%A 90%B
6 min. 0,8mL/min 10%A 90%B
6 min. 0,8mL/min 100%A



c) Programação 3:

0 min. 1mL/min 100%A
12 min. 1mL/min 100%A
12 min. 1mL/min A-B
3 min. 1mL/min 100%B
10 min. 1mL/min B-A

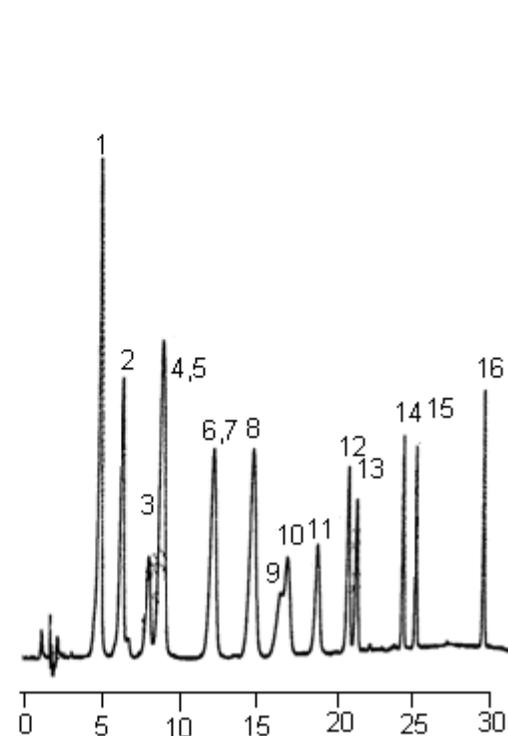


Figura 21. Cromatogramas de uma solução padrão contendo 16 CCs, obtidos em três programações diferentes. Picos: 1 – formaldeído; 2 – acetaldeído; 3 – furfural; 4 – propanal; 5 – propanona; 6 – butanal; 7 – iso-butanal; 8 – ciclo pentanona; 9 – benzaldeído; 10 – *E*-pent-2-en-1-al; 11 – ciclo hexanona; 12 – *E*-hex-2-en-1-al; 13 – hexanal; 14 – heptanal; 15 – octanal; 16 – 2-etil-hexanal.

Observando o cromatograma referente à programação nº 1 (Figura 21) percebe-se que houve co-eluição dos CCs propanal+propanona, butanal+isobutanal e ciclo pentanona+benzaldeído+E-pent-2-en-1-al, representados pelos picos cujos tempos de retenção (TR) foram respectivamente de 9,07; 12,46 e 15,66 minutos, e que os picos dos demais CCs se agrupavam no final do cromatograma, dificultando sua visualização e quantificação. Por este motivo, foi feita uma nova tentativa (programação nº2) na qual o tempo total da corrida foi reduzido para 32 minutos e o gradiente modificado, melhorando a resolução dos picos no final da corrida e separando melhor a ciclo pentanona do benzaldeído e do E-pent-2-en-1-al. Nesta programação obteve-se um cromatograma com melhor separação, no entanto, como o último CC (2-etilhexanal) eluiu em TR=32 min, optou-se por realizar mais um teste (programação nº3) com a finalidade de reduzir um pouco mais esse tempo. No último teste, o TR para o 2-etilhexanal foi de 30 minutos e houve uma melhor resolução na separação dos picos, principalmente entre os mais pesados.

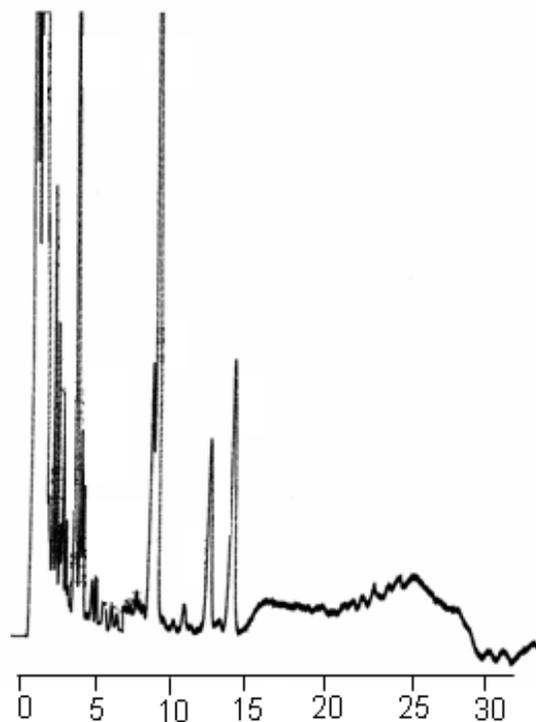
Portanto, a programação nº3 foi definida como a mais apropriada, sendo utilizada em todos os testes deste trabalho.

6.4.2.2. Teste de fase móvel

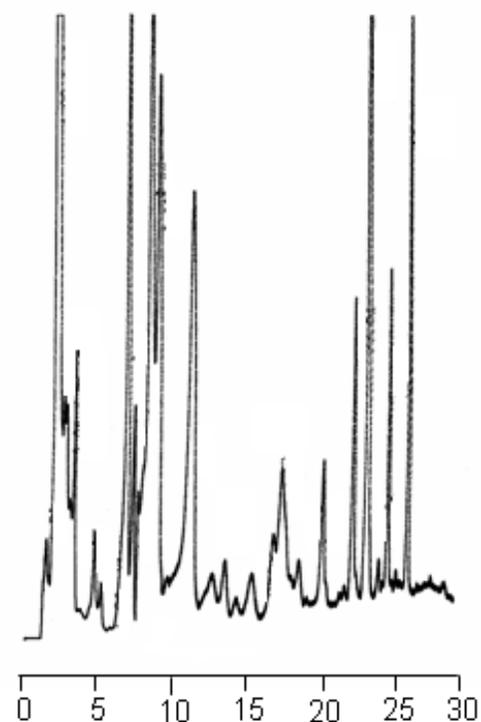
Nos testes de fase móvel foi empregada uma amostra de vinho derivatizada em substituição à solução contendo os dezesseis padrões de CCs que estava sendo usada anteriormente. A amostra eluiu através da coluna cromatográfica com auxílio de três combinações de fases móveis preparadas com acetonitrila, metanol e água deionizada, em proporções variadas e empregando a programação nº 3 discutida no item anterior. Os cromatogramas obtidos e as fases empregadas estão apresentados na Figura 22.

Nos testes 1 e 3 a fase móvel ACN/H₂O (75,0/25,0%) foi utilizada isocriticamente por 12 minutos sendo então iniciado o gradiente com a fase B (ACN 100% para o teste 1 ou MeOH 100% para o teste 3). Em ambos os testes ocorreu registro de picos nos primeiros 12 minutos, havendo uma significativa co-eluição nos primeiros 8 minutos (Figura 22), indicando que a composição de fase móvel inicial (ACN/H₂O - 75,0/25,0%) não foi adequada para separação de CCs no vinho.

Teste de fase nº 1
FASE A: Acetonitrila/água (75/25%)
FASE B: Metanol (100%)



Teste de fase nº 2
FASE A:
Metanol/água/acetonitrila
(74,5/25/0,5%)
FASE B: Metanol (100%)



Teste de fase nº 3
FASE A: Acetonitrila/água
(75/25%)
FASE B: Acetonitrila (100%)

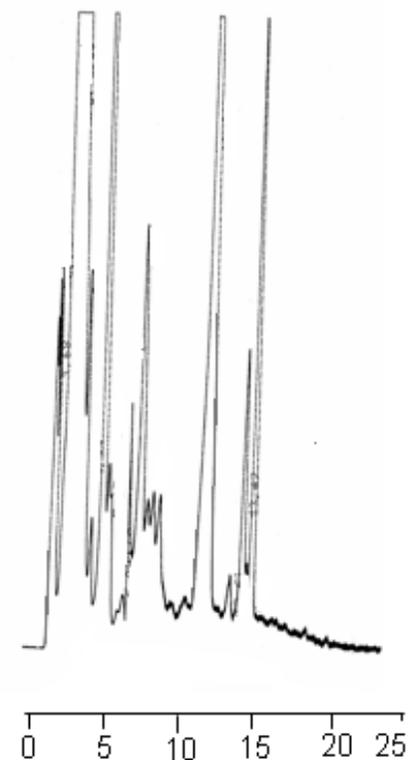


Figura 22. Cromatogramas de uma amostra de vinho branco separada por CLAE, por diferentes fases móveis. Os picos representam os diversos CCs presentes na amostra, posteriormente identificados.

No teste nº 2 foi incluído o metanol à fase A e a mistura passou a ter na composição: metanol/água/acetonitrila (74,5/25,0/0,5%). O metanol foi utilizado também como solvente da fase B (100%) e obteve-se uma melhor separação, na qual vários CCs leves e pesados foram detectados. As fases móveis A e B utilizadas neste teste foram, portanto, escolhidas para separação de CCs em vinhos e uvas.

6.4.2.3. Teste de volume de amostra

Este teste foi realizado com o intuito de otimizar o volume de vinho empregado no procedimento de preparo de amostra. Foram feitos ensaios com 1, 5, 10, 25 e 50 mL de vinho e avaliou-se a influência da quantidade de amostra sobre o número de compostos detectados. O número de picos obtidos nos testes pode ser visto na Tabela 14.

Tabela 14. Número de picos obtidos em teste de variação de volume de amostra.

Volume de vinho (mL)	Volume de 2,4-DNPH (mL)	Volume após pré-concentração (mL)	Número de picos obtidos
1	1	-	9
5	5	-	9
10	10	-	9
25	25	3	11
50	50	3	18

Era de se esperar que volumes maiores favorecessem a detecção de maior quantidade de compostos carbonílicos, principalmente por estar envolvida uma etapa de pré-concentração. Quando foram utilizados 25 e 50 mL, por exemplo, obtiveram-se 11 e 18 picos, respectivamente. Com volumes menores, apenas 9 picos foram detectados.

Apesar da evidente vantagem de se utilizar maiores volumes de vinho (25 e 50 mL), percebeu-se que nessas condições grandes quantidades de formaldeído e acetaldeído eram perdidas devido à saturação do cartucho C18 empregado na etapa de pré-concentração. Além disso, eram necessários

grandes volumes de solução de 2,4-DNPH e um preparo mais trabalhoso e dispendioso. Como não havia diferença entre a quantidade de picos detectados nos demais testes (1, 5 e 10 mL), optou-se por trabalhar com alíquotas de 1 mL, usando soluções de 2,4-DNPH mais concentradas (0,4%). Desta forma foi possível melhorar o sinal das 2,4-DNHPo-CC, reduzindo o volume de reagentes e amostra necessários para a análise.

6.4.2.4. Definição da proporção de amostra:2,4-DNPH

As novas condições de preparo exigiram um teste no qual foram avaliadas diferentes proporções de vinho:2,4-DNPH 0,4%, visando estabelecer a mais adequada proporção para a nova situação de derivatização, tanto em vinhos brancos quanto em vinhos tintos.

Foram testadas as proporções: 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 e 1:6 e tomada como referência a melhor resposta dos valores das concentrações de formaldeído, acetaldeído, 2-etil-hexanal e ciclo hexanona presentes no vinho. A Figura 23 mostra o perfil de concentração de CCs nas amostras de vinho branco e tinto empregando as diferentes proporções.

Para o vinho branco, à medida que era aumentada a quantidade de 2,4-DNPH, aumentava também o sinal analítico referente à concentração dos quatro CCs em estudo. A partir do quinto teste (proporção 1:4) os valores mantiveram-se constantes para ciclo hexanona, 2-etil hexanal e formaldeído, mas continuaram aumentando para o acetaldeído, sendo o sexto teste (proporção 1:5) escolhido como mais adequado para este tipo de vinho.

Na proporção 1:6 há um aumento do sinal para o acetaldeído e um decréscimo do sinal do 2-etil hexanal (Figura 23a).

No teste de proporção realizado com vinho tinto, o aumento gradual dos volumes de 2,4-DNPH não influenciou de forma significativa na resposta. Com exceção da ciclo hexanona, os valores encontrados para acetaldeído, formaldeído e 2-etil hexanal mantiveram-se muito próximos. Como o sinal do acetaldeído foi discretamente maior na proporção 1:5, também foi adotada esta como a mais adequada, até porque, na proporção 1:6, observa-se uma tendência à diminuição do sinal para os quatro CCs (Figura 23b).

Conclui-se, portanto, que a melhor resposta (maior concentração) será obtida quando um volume de amostra for derivatizado em cinco volumes de 2,4-DNPH 0,4%, para os dois tipos de vinho.

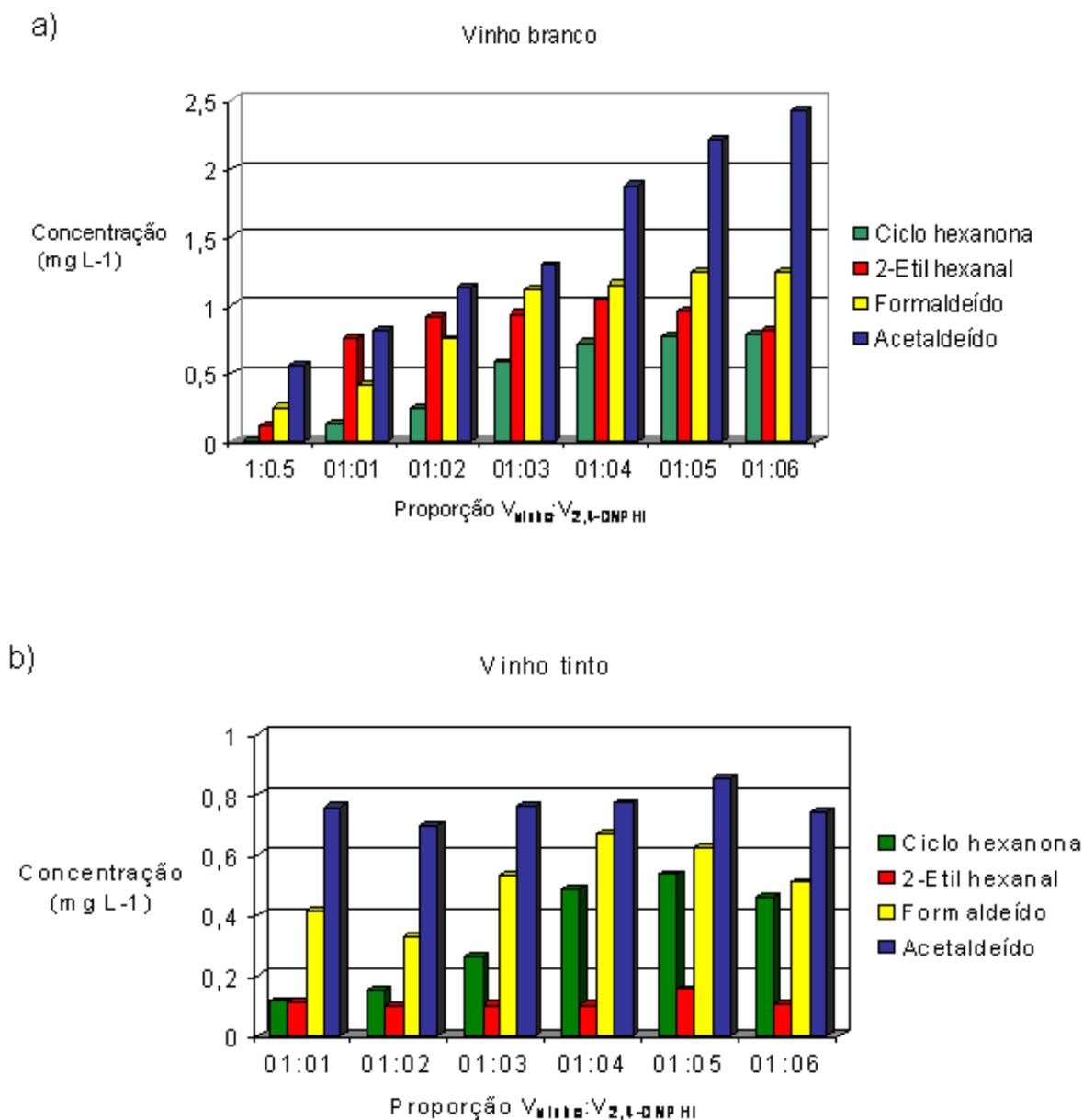


Figura 23. Concentrações de formaldeído, acetaldeído, 2-etil-hexanal e ciclo hexanona em vinhos brancos (a) e tintos (b), obtidos no teste de proporção amostra:2,4-DNPH 0,4%.

6.5. FIGURAS DE MÉRITO

Após avaliação das três etapas envolvidas nos testes de desenvolvimento da metodologia analítica para análise de compostos carbonílicos em vinhos, consideramos que as melhores condições para a análise em questão são aquelas descritas na etapa III, cujo esquema detalhado de preparo é mostrado na figura 16c do item 5.6.2.2.

Descrevendo resumidamente o método, pode-se dizer que este envolve um preparo de amostra simples, no qual 1 mL de vinho é misturado com 5 mL de 2,4-DNPH a 0,4% para que os CCs presentes possam ser derivatizados e analisados na forma livre. A determinação de CCs na forma ligada requer uma alcalinização prévia da alíquota de vinho até pH 11, adicionando 2 a 3 gotas de NaOH 1 mol L⁻¹, sendo feita em seguida a derivatização. Em ambos os casos, a mistura é sonicada por 15 minutos e injetada em sistema CLAE-fase reversa. Para isso, o tempo de preparo das amostras não ultrapassa 30 minutos.

A separação das 2,4-DNPHo-CC é feita por um sistema binário de eluição das fases móveis A (MeOH/ACN/H₂O – 74,5/0,50/25,0% v/v/v) e B (MeOH – 100%), submetidas a uma programação que permite inicialmente a passagem da fase A por 12 minutos, em seguida leva-se 12 minutos para passar da fase A para B, mantendo 100% da fase B por 3 minutos e retornando à fase A em um intervalo de 10 minutos. Cada corrida envolverá um tempo total de 37 minutos. A detecção de todas as 2,4-DNPHo-CC foi realizada por detector UV, em comprimento de onda de 365 nm.

Alguns parâmetros foram utilizados para medir a qualidade analítica dos resultados gerados por este método. Estes parâmetros incluem: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, limites de detecção e quantificação e percentual de recuperação.

6.5.1. Seletividade

A avaliação da seletividade do método proposto neste trabalho foi realizada através da comparação entre os valores das inclinações das duas retas (coeficiente angular-*a*) obtidas com soluções contendo apenas padrões de alguns CCs identificados (*a*_{padrão}) e amostras de vinho adicionadas dos

referidos padrões ($a_{\text{vinho+padrão}}$), sendo eles: formaldeído, acetaldeído, butanal, furfural, hexanal, E-pent-2-en-1-al, propanona e 2-etil-hexanal. Neste caso, quando as inclinações das duas retas são iguais ou muito próximas, com razão entre os dois coeficientes se aproximando de 1, significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja, não há efeito de matriz e, portanto, o método será seletivo¹¹¹.

As retas das amostras adicionadas de padrões e dos padrões puros são mostradas na Figura 24, assim como suas equações. Através delas podemos observar que o método desenvolvido é considerado seletivo para os compostos carbonílicos formaldeído, acetaldeído, furfural, E-pent-2-en-1-al, propanona, butanal, hexanal e 2-etil-hexanal, pois os valores resultantes da razão $a_{\text{vinho+padrão}}/a_{\text{padrão}}$ para cada um deles foram, respectivamente: 1,3518; 1,4604; 1,1938; 1,2719; 1,3804; 1,3529; 1,3235; 1,2591.

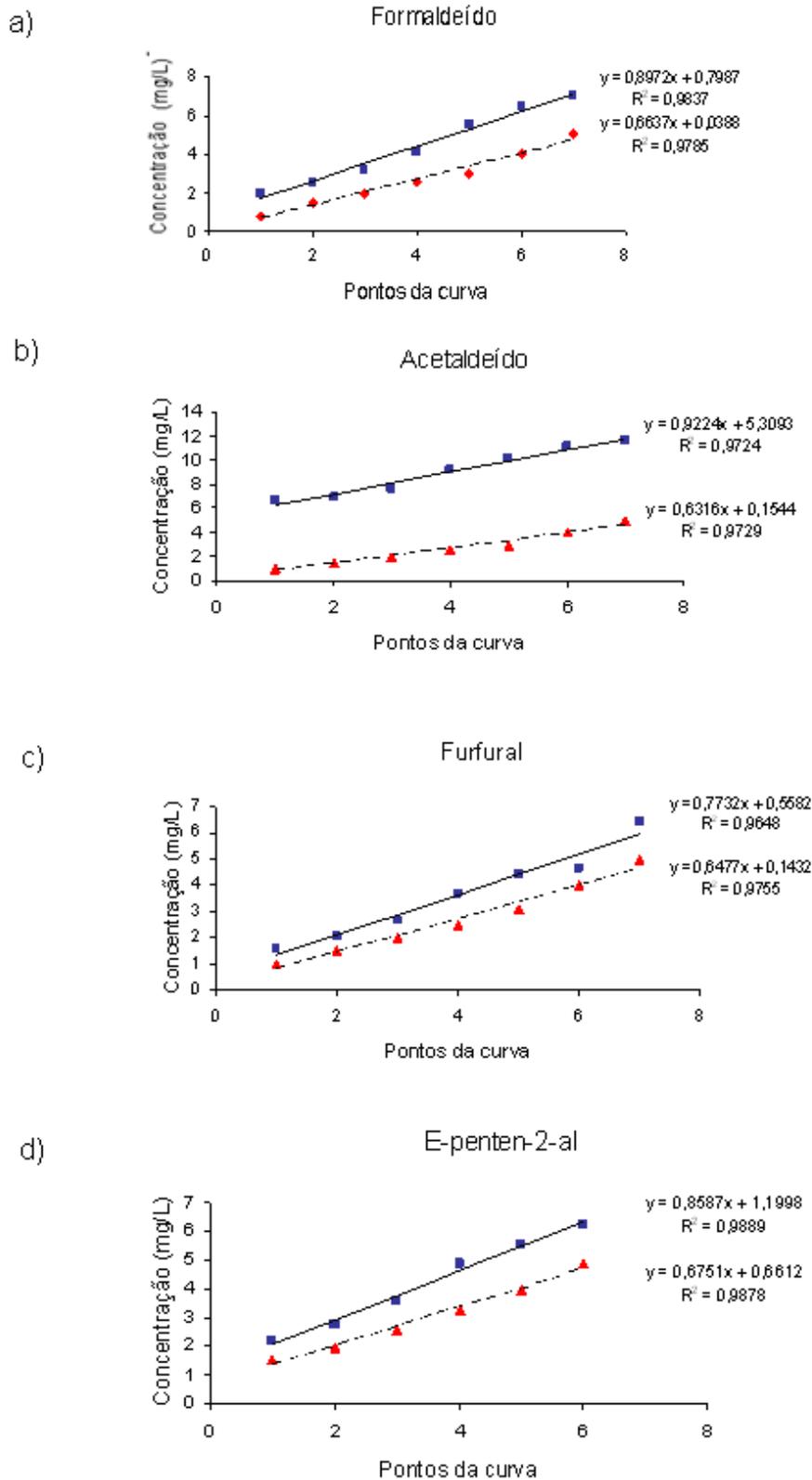
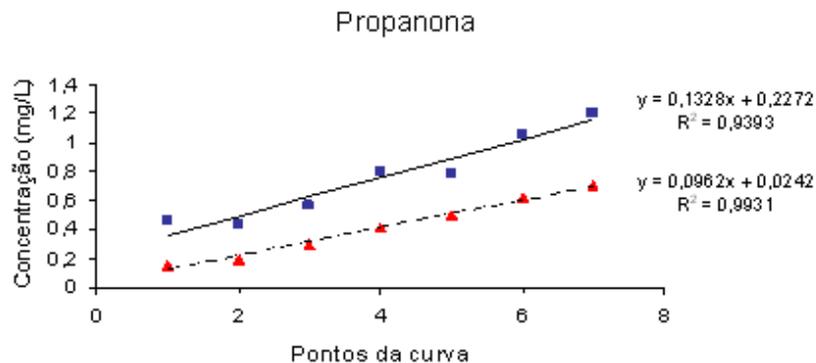
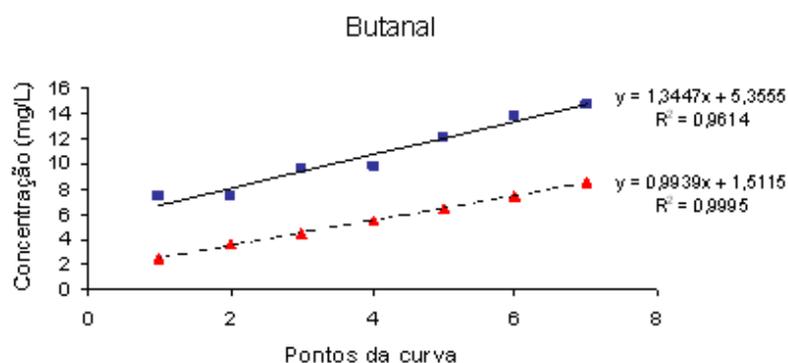


Figura 24. Curvas analíticas das amostras com adição de padrões (—) e dos padrões puros (---), utilizadas na verificação do teste de seletividade do método: a) formaldeído, b) acetaldeído, c) furfural, d) E-pent-2-en-1-al, e) propanona, f) butanal, g) hexanal, h) 2-etil-hexanal.

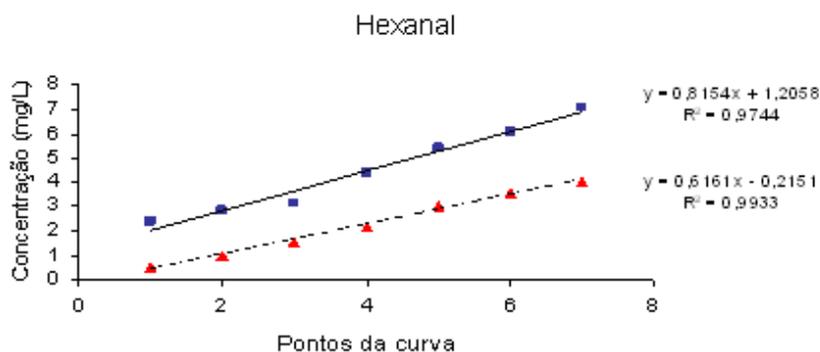
e)



f)



g)



h)

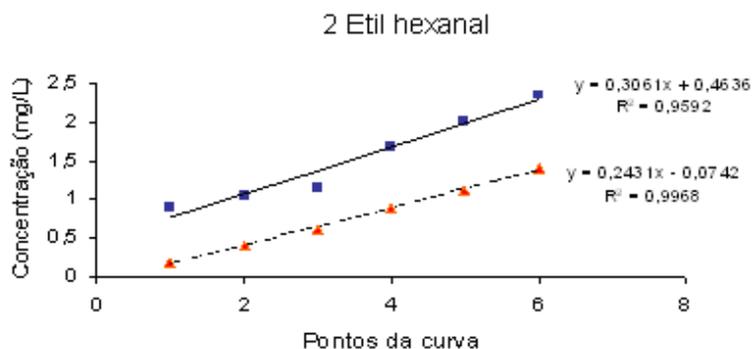


Figura 24. Curvas analíticas das amostras com adição de padrões (—) e dos padrões puros (---), utilizadas na verificação do teste de seletividade do método: a) formaldeído, b) acetaldeído, c) furfural, d) E-pent-2-en-1-al, e)propanona, f) butanal, g) hexanal, h) 2-etil-hexanal. (continuação).

6.5.2. Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade reflete a capacidade do método de produzir uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado^{109,110}. Após a construção das curvas analíticas dos CCs identificados nos vinhos, os resultados dos testes foram tratados estatisticamente para que fosse avaliada a linearidade do método em relação à presença desses CCs.

Com frequência, a linearidade é avaliada através do coeficiente de correlação (R^2), que expressa a relação de x e y na curva, onde se espera um valor ideal próximo de 1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, maior a probabilidade de existir uma relação linear definida¹²⁷. Na Tabela 15 são mostrados os coeficientes de correlação das curvas analíticas dos CCs estudados. Para todos eles (exceção da ciclo hexanona), os valores de R^2 foram maiores que 0,99, indicando boa linearidade do método para a maioria dos CCs.

Tabela 15. Curvas analíticas ($y = ax + b$) para determinação de 2,4-dinitrofenil hidrazonas de CCs, por CLAE.

CC	Equações	R^2
Formaldeído	$Y = 285921x + 51841$	0,9932
Acetaldeído	$Y = 213294x - 1295,7$	0,9991
Furfural	$Y = 29327x - 2245,7$	0,9965
Propanona	$Y = 175376x - 2607$	0,9981
Butanal	$Y = 7901,6x - 921,91$	0,9943
Ciclo pentanona	$Y = 121747x - 16995$	0,9979
E-Penten-2-al	$Y = 151335x - 41885$	0,9956
Ciclo hexanona	$Y = 24217x + 1891,9$	0,9674
Hexanal	$Y = 21072x + 1657,4$	0,9987
2 Etil Hexanal	$Y = 12995x + 162,51$	0,9986

De acordo com Barros Neto e colaboradores¹²⁸, uma outra maneira de conferir a linearidade é através da comparação entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ (F_c) e F_{tabelado} (F_t), obtidos das curvas de calibração¹²⁸. O teste F é um teste de variância e o valor F representa quantas vezes a variação do fator estudado (concentração do CC) é maior do que a variação provocada pelo acaso. Segundo os autores, para que a reta seja linear, o ideal é que o valor de F_c

seja, no mínimo, maior que dez vezes o valor de F_t . O valor de F_c é obtido da razão entre MQ_R (média quadrática devida à regressão) e MQ_r (média quadrática residual), ambas mostradas na Tabela 16. Observa-se que, entre os CCs estudados, a ciclo hexanona novamente não apresentou boa linearidade para o método proposto, pois os valores de F_c e F_t foram respectivamente 59,33 e 18,51. Os demais CCs apresentam uma boa relação linear, pois, para eles, os valores de F_c foram, no mínimo, duzentas vezes maior que F_t .

As regressões obtidas para as curvas analíticas dos CCs listados na Tabela 16 mostraram ser estatisticamente significativas no nível de 95% de confiança.

Tabela 16. Resultados da análise de variância das curvas analíticas ($gl_1 = 1$; $gl_2 = 8$)

CC	SQ_R	MQ_R	SQ_r	MQ_r	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Formaldeído	$2,79 \times 10^{12}$	$2,79 \times 10^{12}$	$1,93 \times 10^{10}$	$2,41 \times 10^9$	1160,81	5,32
Acetaldeído	$1,56 \times 10^{12}$	$1,56 \times 10^{12}$	$1,35 \times 10^9$	$1,69 \times 10^8$	9269,30	5,32
Furfural	$3,02 \times 10^{10}$	$3,02 \times 10^{10}$	$1,05 \times 10^8$	$1,31 \times 10^7$	2290,81	5,32
Propanona	$2,74 \times 10^{10}$	$2,74 \times 10^{10}$	$5,11 \times 10^7$	$6,39 \times 10^6$	4285,43	5,32
Butanal	$5,13 \times 10^9$	$5,13 \times 10^9$	$2,95 \times 10^7$	$3,69 \times 10^6$	1390,01	5,32
Ciclo pentanona	$5,37 \times 10^{11}$	$5,37 \times 10^{11}$	$1,13 \times 10^9$	$1,42 \times 10^8$	3791,12	5,32
E-Penten-2-al	$7,61 \times 10^{11}$	$7,61 \times 10^{11}$	$3,34 \times 10^9$	$4,18 \times 10^8$	1821,22	5,32
Ciclo hexanona	$1,36 \times 10^9$	$1,36 \times 10^9$	$4,59 \times 10^7$	$2,29 \times 10^7$	59,3300	18,5
Hexanal	$8,13 \times 10^9$	$8,13 \times 10^9$	$7,28 \times 10^6$	$9,10 \times 10^5$	8931,15	5,63
2 Etil Hexanal	$4,01 \times 10^9$	$4,01 \times 10^9$	$5,56 \times 10^6$	$6,95 \times 10^5$	5769,43	5,32

SQ_R = soma quadrática devida à regressão

$g.l_1$ = grau de liberdade de SQ_R

MQ_R = média quadrática devida à regressão

SQ_r = soma quadrática residual

$g.l_2$ = grau de liberdade de SQ_r

MQ_r = média quadrática residual

$F_{\text{calculado}} = MQ_R/MQ_r$

F_{tabelado} = ponto de percentagem da distribuição F em nível de 95% de confiança

O estudo da faixa linear de trabalho para cada CC foi feito como complemento ao teste de linearidade, visando à definição do intervalo de concentrações no qual fosse possível quantificar de forma segura os analitos. Para isto, foram construídos os gráficos mostrados na Figura 25.

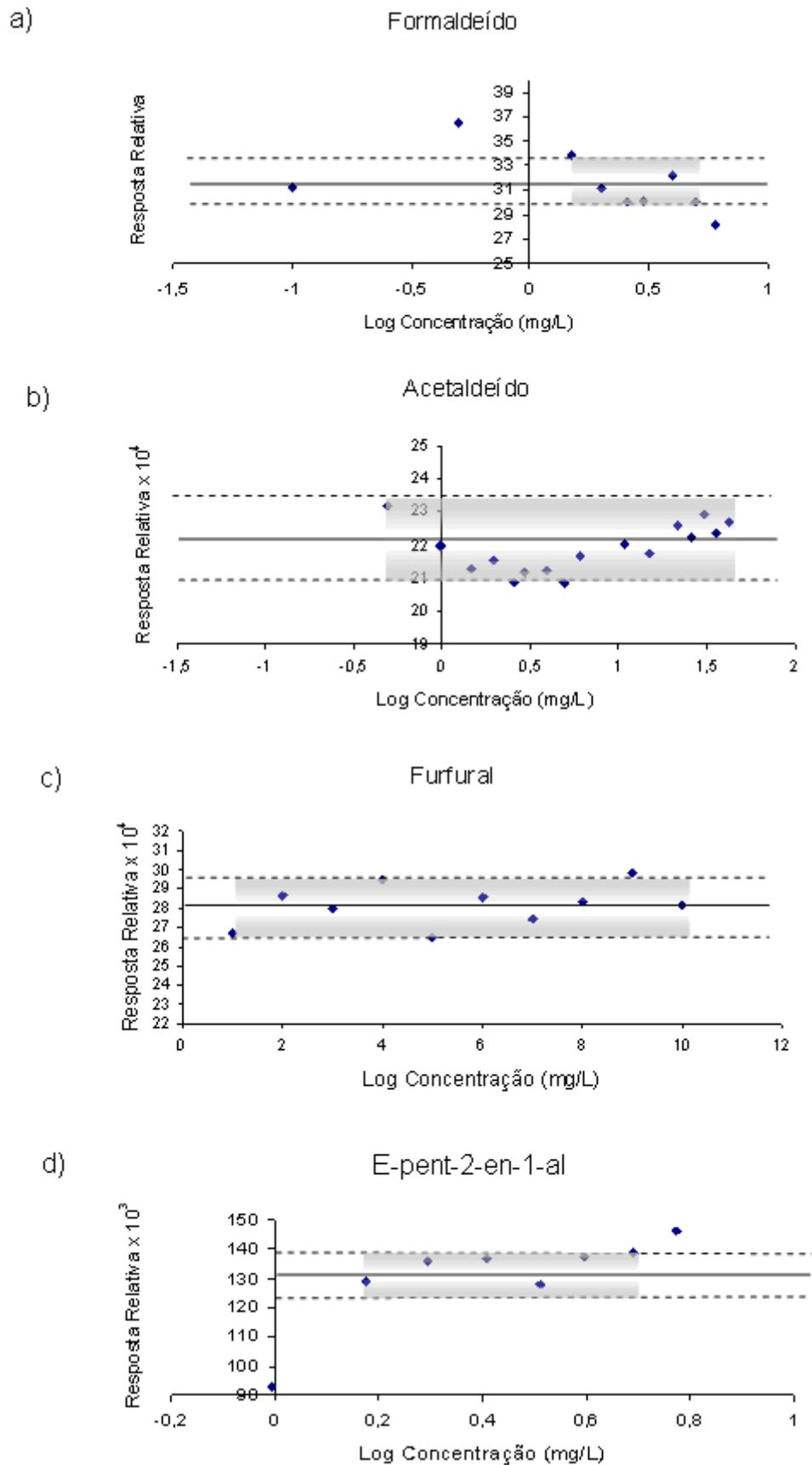


Figura 25: Intervalos de faixa linear de trabalho para os CCs identificados no vinho: a) formaldeído, b) acetaldeído, c) furfural, d) E-pent-2-en-1-al, e) propanona, f) butanal, g) hexanal, h) 2-etil-hexanal.

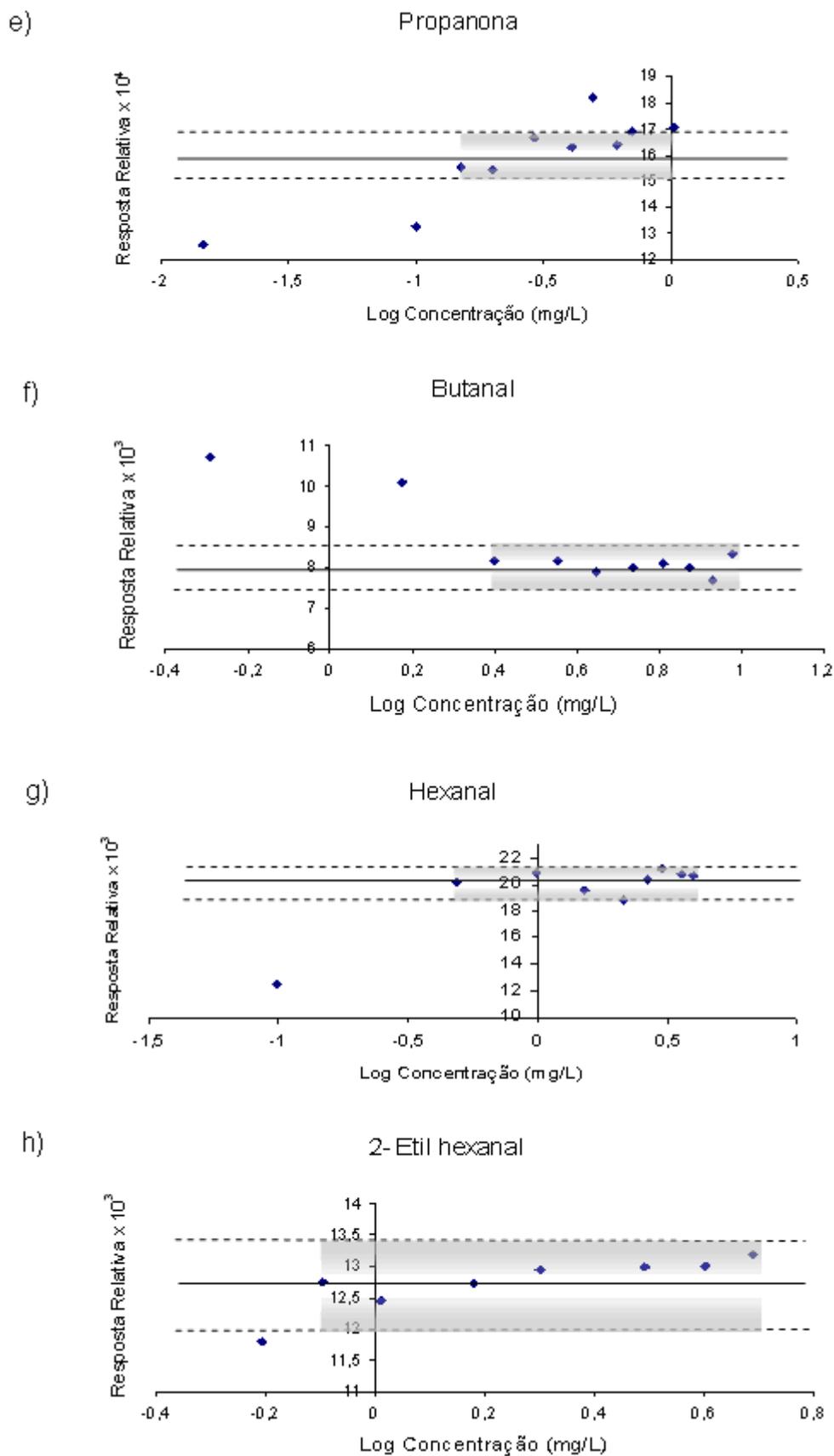


Figura 25: Intervalos de faixa linear de trabalho para os CCs identificados no vinho: a) formaldeído, b) acetaldeído, c) furfural, d) E-pent-2-en-1-al, e)propanona, f) butanal, g) hexanal, h) 2-etil-hexanal (continuação).

Nos gráficos, o eixo y contém a resposta relativa resultante da razão entre a área do pico e a concentração do analito e o eixo x as concentrações correspondentes em escala logarítmica. A construção da curva com a concentração em escala logarítmica permite melhor visualização da faixa linear. As três linhas horizontais e paralelas ao eixo x representam o valor médio das respostas relativas e 95,0 e 105% deste valor para a linha inferior e superior, respectivamente.

Foi considerada como faixa linear de trabalho os intervalos nos quais os pontos estavam inseridos entre os limites inferiores e superiores do gráfico. Para cada CC foram avaliados, no mínimo, seis níveis de concentração, conforme sugerido pela IUPAC¹⁰. A IUPAC especifica que os pontos devem ser igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse e que esta faixa compreenda 0 -150% ou 50,0 - 150% do valor esperado¹²⁹.

Os intervalos lineares de trabalho obtidos pela metodologia proposta são mostrados de forma resumida na Tabela 17. Entre os CCs, aquele que apresentou maior faixa linear de trabalho foi o acetaldeído (0,50 - 42,0 mg L⁻¹), enquanto o menor intervalo foi obtido para a propanona (0,15 - 1,00 mg L⁻¹).

Tabela 17. Faixa linear de trabalho (valores em mg L⁻¹) para os CCs encontrados na uva e nos vinhos.

CC	Faixa linear de trabalho	
	mínimo	máximo
Formaldeído	1,50	5,00
Acetaldeído	0,50	42,0
Furfural	0,10	6,00
Propanona	0,15	1,00
Butanal	2,50	9,50
<i>E</i> -Pent-2-en-1-al	1,50	5,00
Ciclo hexanona	1,50	5,00
Hexanal	0,50	4,00
2-Etil-hexanal	0,80	5,00

6.5.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada através de testes de repetibilidade. A repetibilidade representa a concordância entre medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições e envolvendo várias

medições da mesma amostra, podendo ser expressa através da estimativa do coeficiente de variação (CV) das medições. O INMETRO recomenda que sejam feitas sete ou mais repetições para este cálculo e que o valor máximo do CV não ultrapasse 5,0%^{109,113}.

Para avaliação da repetibilidade do método proposto foram calculados os coeficientes de variação (CV) dos ensaios feitos com cada CC presente na amostra, em um total de oito repetições. Na Tabela 18 são mostradas as concentrações obtidas, assim como os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Os valores de CV obtidos para os CCs encontram-se dentro do limite de 5% permitido, com exceção da ciclo hexanona, cujo CV foi de 14,41%. Podemos concluir, portanto, que o método apresenta precisão para a maioria dos CCs identificados em uvas e vinhos.

Tabela 18. Média, desvio-padrão e coeficiente de variação da concentração de CCs em amostras de solução modelo.

CC	Média da concentração (mg L ⁻¹) ± s	CV (%)
Formaldeído	1,5968 ± 0,0779	4,8761
Acetaldeído	1,6093 ± 0,0839	5,2168
Furfural	0,4145 ± 0,0211	5,0847
Propanona	1,6111 ± 0,0268	1,6665
Butanal	0,8281 ± 0,0383	4,6270
<i>E</i> -Penten-2-al	1,0874 ± 0,0518	4,7633
Benzaldeído	1,7471 ± 0,0799	4,5753
Ciclo hexanona	0,1371 ± 0,0197	14,411
Hexanal	1,4427 ± 0,0619	4,2893
2-Etil-Hexanal	0,1013 ± 0,0055	5,4326

6.5.4. Limites de detecção e quantificação

Como já foi mencionado anteriormente, o conceito de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) pode variar conforme a área de trabalho¹¹³. Segundo Silva¹⁰⁸ e Swartz¹¹³, uma alternativa para encontrar os LD e LQ do método é calculá-los com base na razão entre o desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica¹⁰⁸. O valor resultante da razão será, então, multiplicado por três para obtenção do LD e por dez para obtenção do LQ^{108,113}. Outra alternativa seria estabelecer o LD por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o menor nível detectável⁹⁸, sendo o LQ equivalente a cinco vezes o LD¹¹³.

Os dois procedimentos citados foram executados neste trabalho, visando à avaliação daquele que melhor se enquadrava às características do método. Na análise feita através dos dados fornecidos pelas curvas analíticas contidas na Tabela 15 e mostrados na Tabela 19 os limites foram considerados altos em relação aos obtidos através de soluções de concentrações decrescentes, mostrados na Tabela 20.

Tabela 19. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) do método para os CCs encontrados no vinho, obtidos através dos dados fornecidos pelas curvas (sistema gradiente).

Carbonílicos	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Formaldeído	0,2784	0,9280
Acetaldeído	0,0981	0,3271
Furfural	0,1997	0,6656
Propanona	0,0229	0,0762
Butanal	0,4636	1,5447
E-penten-2-al	0,2200	0,7333
Ciclo hexanona	0,4977	1,6590
Hexanal	0,0734	0,2448
2-Etil-hexanal	0,0953	0,3178

Tabela 20. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) do método para os CCs encontrados no vinho, obtidos por concentração decrescente, nos sistemas isocrático e gradiente.

Carbonílicos	Isocrático		Gradiente	
	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Formaldeído	0,0030	0,0150	0,0064	0,0320
Acetaldeído	0,0071	0,0355	0,0073	0,0365
Furfural	0,0120	0,0600	0,0127	0,0635
Propanona	0,0100	0,0500	0,0176	0,0880
Butanal	0,0200	0,1000	0,0230	0,1150
E-penten-2-al	-	-	0,0087	0,0435
Ciclo hexanona	-	-	0,0085	0,0425
Hexanal	-	-	0,0432	0,2160
2-Etil-hexanal	-	-	0,0071	0,0355

Apesar de saber que alguns aspectos cromatográficos, como idades da coluna e da lâmpada do detector, podem interferir nestes resultados, considerou-se significativa a diferença entre os valores obtidos pelos dois procedimentos. Por este motivo, considera-se que a maneira mais indicada para definição dos valores de LD e LQ para analitos quantificados por CLAE-fase reversa, pela metodologia proposta, é através do uso de soluções estoque contendo concentrações conhecidas do padrão em diluições sucessivas até obtenção do menor sinal que possa ser diferenciado do ruído apresentado no cromatograma. Deste modo, o LD e LQ recomendados são os registrados na Tabela 20.

6.5.5. Validação do método

Um método analítico pode ser validado através de testes de recuperação que são complementados com ensaios em materiais de referência certificados ou por comparação com outro método já em uso¹³⁰.

Levando-se em conta que não existem materiais de referência que reproduzam as características necessárias nos vinhos para este experimento e que a metodologia de análise simultânea de CC ainda está sendo desenvolvida, a validação do método proposto neste trabalho ficará restrita aos resultados do teste de recuperação.

Os resultados mostrados na Tabela 21 fornecem um panorama do comportamento do método com relação aos compostos de interesse presentes na matriz, ou seja, informam a proporção da quantidade da substância de interesse que é extraída e passível de ser quantificada¹¹².

Tabela 21. Recuperações dos CCs adicionados em determinada amostra de vinho e em diferentes concentrações (concentração em mg L⁻¹, n = 7).

CC	Quantidade (mg L ⁻¹)				
FORMALDEÍDO	amostra	adicionada	total esperada	total obtida	% recuperação
área integrada					
346244,66	0,1610	0,7993	0,9603	0,9693	101
451261,22	0,1610	1,4989	1,6599	1,2633	76,1
529412,45	0,1610	1,9986	2,1596	1,4821	68,6
734487,88	0,1610	2,5696	2,7306	2,0562	75,3
982145,67	0,1610	2,9979	3,1589	2,7495	87,0
1144657,66	0,1610	3,9972	4,1582	3,2044	77,1
1343664,31	0,1610	4,9964	5,1574	3,7615	72,9
				média	79,7
ACETALDEÍDO					
área integrada					
1491918,51	9,2861	0,9825	10,2686	6,8858	67,1
1436834,05	9,2861	1,4737	10,7598	6,6316	61,6
1549742,37	9,2861	1,9650	11,2511	7,1527	63,6
1975599,43	9,2861	2,5545	11,8406	9,1182	77,0
2527740,83	9,2861	2,9475	12,2336	11,6666	95,4
2191599,64	9,2861	3,9300	13,2161	10,1152	76,5
2722082,88	9,2861	4,9125	14,1986	12,5636	88,5
				média	75,7
FURFURAL					
área integrada					
45444,78	1,3567	1,0020	2,3587	1,5847	67,2
58831,43	1,3567	1,5029	2,8596	2,0515	71,7
76599,5	1,3567	2,0039	3,3606	2,6711	79,5
105295,15	1,3567	2,5049	3,8616	3,6718	95,1
98502,62	1,3567	3,1058	4,4625	3,4349	77,0
134324,76	1,3567	4,0078	5,3645	4,6841	87,3
185190,52	1,3567	5,0097	6,3664	6,4579	101
				média	82,7
E-PENT-2-EN-1-AL					
área integrada					
88623,15	0,0451	0,9867	1,0318	0,6471	62,7
141654,71	0,0451	1,4998	1,5449	1,0343	66,9
190338,73	0,0451	1,9735	2,0186	1,3898	68,8
245634,28	0,0451	2,5655	2,6106	1,7935	68,7
335395,74	0,0451	2,9996	3,0447	2,4489	80,4
515915,2	0,0451	3,9469	3,9920	3,7670	94,4
634432,82	0,0451	4,9336	4,9787	4,6323	93,0
				média	76,4

Tabela 21. Recuperações dos CCs adicionados em determinada amostra de vinho e em diferentes concentrações (Concentração mg L⁻¹, n = 7). (Continuação).

CC	Quantidade (mg L ⁻¹)				
PROPANONA	amostra	adicionada	total esperada	total obtida	% recuperação
51043,5	0,3054	0,1492	0,4546	0,3060	67,3
72966,14	0,3054	0,1989	0,5043	0,4374	86,7
93960,75	0,3054	0,2925	0,5979	0,5632	94,2
133356,4	0,3054	0,4096	0,7150	0,7994	112
131630,31	0,3054	0,4973	0,8027	0,7891	98,3
175532,86	0,3054	0,6144	0,9198	1,0523	114
210169,61	0,3054	0,7021	1,0075	1,2599	125
				média	99,6
BUTANAL	amostra	adicionada	total esperada	total obtida	% recuperação
8592,54	0,016	2,5176	2,5336	2,2272	87,9
12400,75	0,016	3,5723	3,5883	3,2144	89,6
18425,69	0,016	4,4229	4,4389	4,7761	107,6
18987,66	0,016	5,4435	5,4595	4,9217	90,1
23363,49	0,016	6,4642	6,4802	6,0560	93,4
26881,93	0,016	7,4849	7,5009	6,9680	92,9
30503,76	0,016	8,5055	8,5215	7,9068	92,8
				média	93,5
HEXANAL	amostra	adicionada	total esperada	total obtida	% recuperação
3535,69	0,0573	0,2052	0,2625	0,3384	129
9418,85	0,0573	0,9813	1,0386	0,9014	86,8
16300,17	0,0573	1,5165	1,5738	1,5599	99,1
17560,69	0,0573	2,1518	2,2091	1,6806	76,1
28438,93	0,0573	3,0222	3,0795	2,7217	88,4
31795,04	0,0573	3,5683	3,6256	3,0429	83,9
39454,93	0,0573	4,0143	4,0716	3,7760	92,7
				média	93,7
2-ETIL-HEXANAL	amostra	adicionada	total esperada	total obtida	% recuperação
3129,91	0,1136	0,2002	0,3138	0,4519	144
3674,36	0,1136	0,4004	0,5140	0,5306	103
4037,88	0,1136	0,6229	0,7365	0,5831	79,2
10267,26	0,1136	1,4127	1,5263	1,4826	97,1
20526,99	0,1136	3,1143	3,2279	2,9641	91,8
25758,8	0,1136	4,0041	4,1177	3,7196	90,3
35588,61	0,1136	4,8940	5,0076	5,1391	102,6
				média	101

Para este teste foram preparadas sete soluções contendo, cada uma, uma mistura de formaldeído, acetaldeído, furfural, propanona, butanal, E-pent-2-en-1-al, hexanal e 2-etil-hexanal, em concentrações diferentes. Alíquotas de 100 μL dessas soluções foram misturadas a mesmo volume da amostra derivatizada e em seguida analisadas por CLAE.

Os valores de recuperação foram calculados pela equação (7)¹¹¹.

$$\% \text{recuperação} = (C_{\text{total obtida}} - C_{\text{amostra}}) / C_{\text{adicionada}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: $C_{\text{total obtida}}$ = concentração obtida na amostra adicionada (mg L^{-1})

C_{amostra} = concentração obtida na amostra pura (mg L^{-1})

$C_{\text{adicionada}}$ = concentração adicionada (mg L^{-1})

Os intervalos aceitáveis de recuperação para alguns tipos de análise estão geralmente compreendidos entre 70,0 e 120%. Porém, em amostras mais complexas como o vinho esta faixa pode ser ampliada para 50,0 a 120%⁸⁵. Com base nesta informação pode-se concluir que o método apresenta boa recuperação para os CCs formaldeído (79,7%), acetaldeído (75,7%), furfural (82,7%), E-pent-2-en-1-al (76,4%), propanona (99,6%), butanal (93,5%), hexanal (93,7%) e 2-etil-hexanal (101%), cujos valores médios de recuperação se incluíam nos limites aceitáveis.

6.6. ANÁLISE DE CCs EM SOLUÇÃO MODELO

A opção por avaliar os CCs em condições simuladas (solução modelo) deve-se à necessidade de serem excluídos os interferentes naturais que dificultariam o entendimento do comportamento destes compostos em presença do bissulfito, que é um conservante encontrado na bebida como resultado da adição intencional, cuja finalidade é manter a qualidade do vinho por um período prolongado.

A interação CC-S(IV) produz adutos (AHAS) que deverão ser dissociados no momento da quantificação dos CCs na bebida. Diante deste fato, o estudo em solução modelo foi realizado visando o esclarecimento dos seguintes aspectos:

1. A interação CC-S(IV) pode estar condicionada à estrutura química dos CCs, por isso, é importante que estas estruturas sejam avaliadas para que seja conhecida a sua influência sobre a formação de adutos e, assim, prever de que forma eles iriam predominar no vinho. Por este motivo, foi realizado o estudo com vinte e dois CCs, entre eles, aldeídos e cetonas cíclicas, alifáticas e na forma de isômeros trans (trans-alcenais).

2. Para que a dissociação do aduto seja completa é preciso que o pH da amostra seja ajustado na faixa alcalina. Torna-se necessário, portanto, caracterizar o melhor pH, ou faixa de pH, no qual seja possível a quantificação segura dos CCs totais presentes na amostra.

3. Ao serem estudados isoladamente, os CCs podem apresentar determinado comportamento em relação à interação com o bissulfito, mas em mistura, este comportamento pode ser alterado devido à influência dos CCs mais reativos. Por este motivo, o estudo do comportamento dos CCs na presença de bissulfito deve envolver a avaliação da formação dos AHAS em soluções individuais de cada CC na solução modelo, posteriormente, em mistura contendo todos os CCs juntos.

A solução modelo foi então preparada de forma que permitisse reproduzir principalmente alguns parâmetros de interesse para o estudo, como: teor alcoólico (11%), pH (3,5) e concentração de bissulfito (50 mg L^{-1}). A esta solução foram adicionados os 22 CCs isoladamente e depois em mistura (ver esquema de obtenção da solução modelo no item 5.6.5.1). Em seguida as

amostras foram submetidas à análise dos CCs na forma livre e total, de acordo com o método descrito.

Os valores das frações de CCL (livre), CCLig (ligado) e CCT (total) obtidos na solução modelo foram inicialmente tratados através da Análise de Componentes Principais (ACP). A execução da ACP neste estudo revelou que as duas primeiras componentes principais são capazes de explicar 99,6% da variância total do conjunto de dados. A primeira componente principal (PC1) explica 89,99% da variância, enquanto a segunda componente (PC2) explica 9,61%. Após a execução da análise ACP, três parâmetros foram selecionados e nenhuma amostra anômala foi detectada.

O diagrama de *scores* (Figura 26) indica que as amostras foram agrupadas em três categorias: aldeídos, cetonas e trans-alcenais. Em ACP, os *scores* localizados próximos entre si apresentam correlação estatística significativa¹³¹. O diagrama de *Scores* revela não somente que as amostras foram separadas em três grupos, mas também que os derivados insaturados (trans-alcenais) estão separados dos demais CCs estudados.

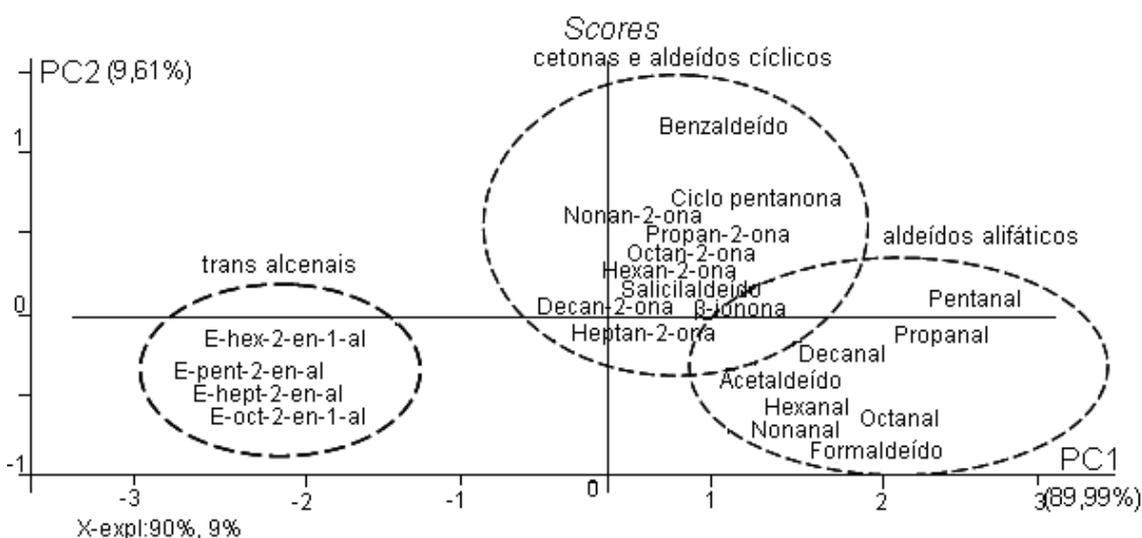


Figura 26. Diagrama de *Scores* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), indicando o agrupamento das amostras em três subgrupos: aldeídos, cetonas e trans-alcenais.

Ao serem confrontados os diagramas de *Scores* (Figura 26) e *Loadings* (Figura 27), eles revelam também que as variáveis CCLig-pH10 e CCLig-pH11 contribuem positivamente para PC1, justificando então que em pH10 e pH11 o conjunto de amostras de trans-alcenais é discriminado do conjunto de amostras

dos demais compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas), visto que as amostras destes aldeídos insaturados se agruparam no quadrante esquerdo com menor contribuição para PC1. As amostras de aldeídos e cetonas apresentam uma maior tendência em se apresentarem sob a forma ligada nos pHs 10 e 11, quando comparados aos trans-alcenais. Analisando a matriz de dados, pode-se notar que no pH 11 estes CCs estão praticamente na forma livre, o que é coerente com a análise estatística.

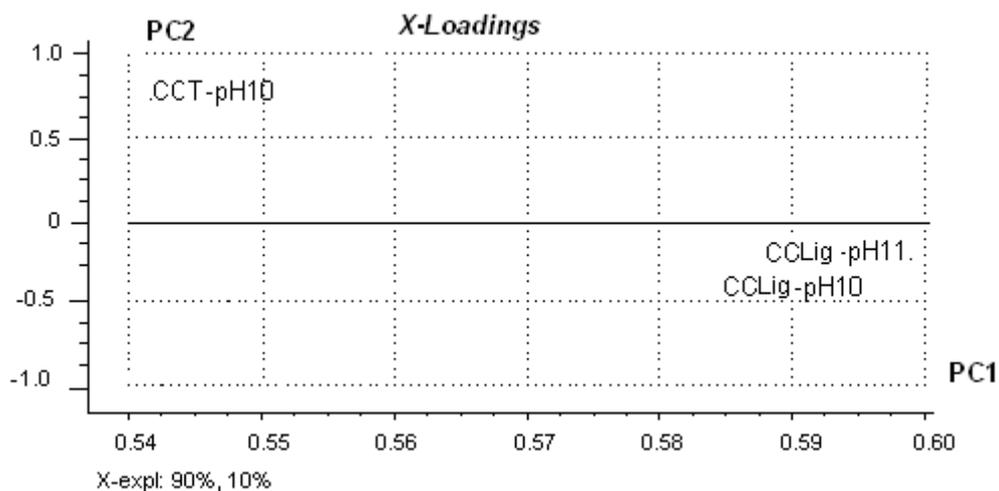


Figura 27. Diagrama de *Loadings* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), revelando as variáveis responsáveis pelo agrupamento das amostras em subgrupos (CCLig-ligado e CCT-total).

O pH alcalino foi objeto de estudo nesta etapa da pesquisa, uma vez que ele é necessário para garantir a completa dissociação do CCLig, permitindo a quantificação segura do CCT presente na amostra. Através do diagrama de *Loading* é possível perceber que os valores de pH 10 e 11 foram considerados os mais significantes para se obter a melhor resposta em termos de concentração de CCT, uma vez que as variáveis CCT-pH10, CCLig-pH10 e CCLig-pH11 foram selecionadas pelo método. Esta faixa de pH foi definida após verificação dos resultados da análise de ACP e regressão.

A análise de ACP revelou que os demais pHs (9, 12 e 13), por apresentarem autovalores mais baixos do que aqueles das variáveis pHs 10 e 11, não foram selecionados e, portanto, não apresentam relevância significativa na determinação das concentrações e na discriminação dos CCs estudados.

Através da análise de regressão (Figura 28), é possível perceber que estes valores de pH são considerados pontos críticos para as curvas, ou seja, antes do pH 10 e após o pH 11 existe uma diversidade de comportamento das curvas (a resposta aumenta ou diminui) e isso não é desejado quando pretende-se analisar os CCs simultaneamente em uma amostra real de vinho. Contrariamente, ao serem usados os modelos quadráticos para estimar o comportamento da resposta no intervalo de pH entre 10 e 11 foi possível observar que não havia diferença significativa entre os resultados. Portanto, esta faixa de pH poderá garantir uma boa dissociação do aduto e assegurar a confiabilidade dos resultados na análise de CCT para uma grande quantidade de CCs.

A variação da concentração em função do pH, mostrada na Figura 28, se ajusta ao modelo quadrático para a maioria dos CCs, como foi verificado em 91% dos casos estudados. Na Tabela 22 são apresentados os modelos matemáticos obtidos na regressão e utilizados para construção das curvas mostradas na Figura 28. As expressões matemáticas confirmam que a resposta analítica é influenciada pela variação do pH. Isto pode ser comprovado se forem analisados os valores de b nas referidas expressões, pois, o coeficiente do segundo termo da equação (b) representa a taxa de incremento da concentração do CC em função de cada unidade de pH e, como pode-se perceber, estes valores variaram bastante entre os CCs, sendo mais elevados principalmente entre os aldeídos alifáticos, tanto nas formas cis quanto nas formas trans.

Os valores dos pH's críticos (pontos de inflexão) mostrados na Tabela 22, para cada expressão, representam pontos sobre o gráfico da função nos quais o sentido da curva muda^{132,140}. Neste caso, os pontos de inflexão indicarão o intervalo de pH a partir do qual haverá aumento ou diminuição do sinal analítico, representando um comportamento não desejado para a análise, uma vez que se pretende definir um intervalo no qual não haja variação da resposta (concentração) para os CCs presentes no vinho. Portanto, no momento do preparo da amostra para análise de CCT este intervalo deverá ser obedecido.

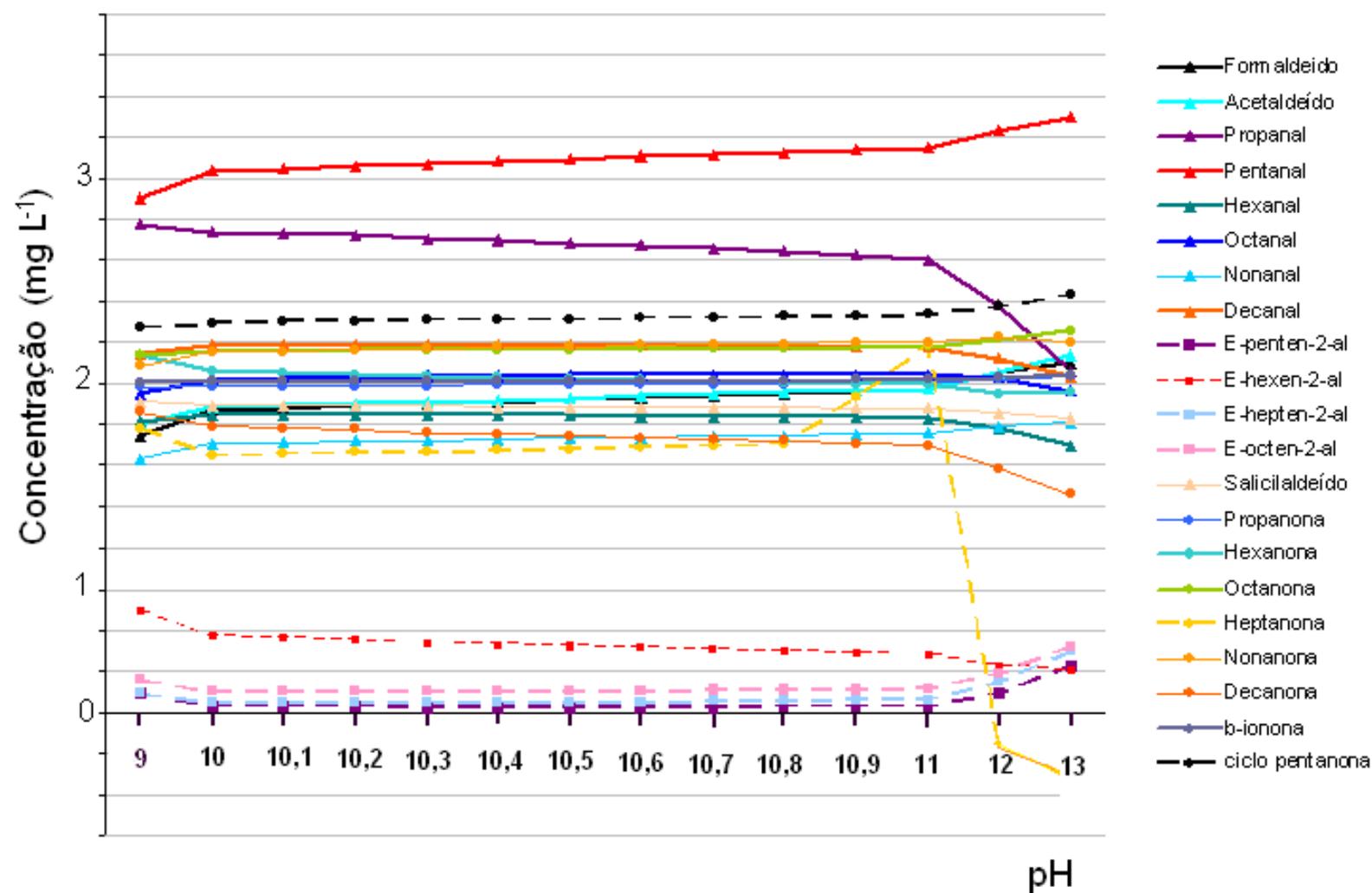


Figura 28. Variação da concentração de CCs em função do pH em solução modelo, usando as equações quadráticas obtidas na regressão.

Tabela 22. Equações de regressão relacionando a concentração de CCs em função do pH e respectivos coeficientes de determinação.

CC	Equação de regressão	Modelo	R ²	pH's críticos
Formaldeído	$\hat{y} = -0,8560 + 0,3515\text{pH} - 0,0119\text{pH}^2$	Quadrático	0,9567	10,0 - 10,9
Acetaldeído	$\hat{y} = 0,6777 + 0,0801\text{pH} + 0,0001\text{pH}^2$	Quadrático	0,7849	10,0 - 10,9
Propanal	$\hat{y} = -1,5203 + 0,8558\text{pH} - 0,0470\text{pH}^2$	Quadrático	0,9040	10,0 - 10,9
Pentanal	$\hat{y} = 0,3027 + 0,3463\text{pH} - 0,0113\text{pH}^2$	Quadrático	0,9800	10,0 - 10,9
Hexanal	$\hat{y} = -0,5229 + 0,3858\text{pH} - 0,0189\text{pH}^2$	Quadrático	0,9435	10,2 - 10,9
Octanal	$\hat{y} = -1,0900 + 0,4942\text{pH} - 0,0223\text{pH}^2$	Quadrático	0,9735	10,0 - 10,9
Nonanal	$\hat{y} = -0,1969 + 0,2403\text{pH} - 0,0090\text{pH}^2$	Quadrático	0,9822	10,0 - 10,9
Decanal	$\hat{y} = -0,4813 + 0,4396\text{pH} - 0,0213\text{pH}^2$	Quadrático	0,9400	10,3 - 10,9
<i>E</i> -Pent-2-en-1-al	$\hat{y} = 3,5626 - 0,6741\text{pH} + 0,0321\text{pH}^2$	Quadrático	0,9961	10,5 - 10,9
<i>E</i> -Hex-2-en-1-al	$\hat{y} = 3,0666 - 0,4337\text{pH} + 0,0164\text{pH}^2$	Quadrático	0,9966	10,0 - 10,9
<i>E</i> -Hept-2-en-1-al	$\hat{y} = 3,4901 - 0,6734\text{pH} + 0,0329\text{pH}^2$	Quadrático	0,9951	10,2 - 10,9
<i>E</i> -Oct-2-en-1-al	$\hat{y} = 3,2804 - 0,6166\text{pH} + 0,0299\text{pH}^2$	Quadrático	0,9973	10,3 - 10,9
Benzaldeído	$\hat{y} = 2,8032 - 0,0091\text{pH} + 0,0308\text{pH}^2$	Quadrático	0,0308	10,0 - 10,9
Salicilaldeído	$\hat{y} = 1,4102 + 0,0316\text{pH} - 0,0023\text{pH}^2$	Quadrático	0,2260	10,0 - 10,9
Propanona	$\hat{y} = 1,6455 - 0,0227\text{pH} + 0,0017\text{pH}^2$	Quadrático	0,6387	10,0 - 10,9
Hexanona	$\hat{y} = 0,1656 + 0,6424\text{pH} - 0,0763\text{pH}^2 + 0,0027\text{pH}^3$	Cúbico	0,8590	10,0 - 10,9
Heptanona	$\hat{y} = 1,7051 - 0,1557\text{pH} + 0,0106\text{pH}^2$	Quadrático	0,6611	10,0 - 10,9
Octanona	$\hat{y} = 2,0228 - 0,0738\text{pH} + 0,0047\text{pH}^2$	Quadrático	0,3301	10,0 - 10,9
Nonanona	$\hat{y} = 3,4801 - 0,7089\text{pH} + 0,0836\text{pH}^2 - 0,0030\text{pH}^3$	Cúbico	0,9029	10,0 - 10,9
Decanona	$\hat{y} = 1,2510 + 0,1078\text{pH} - 0,0094\text{pH}^2$	Quadrático	0,3104	10,0 - 10,9
B-Ionona	$\hat{y} = 1,6019 - 0,0074\text{pH} + 0,0081\text{pH}^2$	Quadrático	0,5030	10,0 - 10,9
Ciclo pentanona	$\hat{y} = 2,1229 - 0,0734\text{pH} + 0,0051\text{pH}^2$	Quadrático	0,0478	10,0 - 10,9

Retomando a discussão relacionada com os resultados da ACP, é possível interpretar os dados experimentais através da análise conjunta dos diagramas de *Scores* e *Loadings*, sob um novo prisma. Observa-se que o grupo dos aldeídos se agrupa no quadrante inferior (*Scores*), sendo assim, a variável CCLig-pH11 será responsável por explicar o comportamento desses aldeídos. Portanto, a forma ligada em pH 11 é a que melhor explica o agrupamento dos aldeídos estudados. Os derivados cetônicos, por outro lado, foram agrupados na região superior do diagrama de scores, que pode ser explicado analisando o diagrama de *Loadings*, já que a variável CCT-pH10 explica esta categoria de derivados.

A Tabela 23 mostra os autovalores das variáveis selecionadas e as respectivas contribuições nas PC1 e PC2.

Tabela 23. Contribuição dos autovalores das variáveis para PC1 e PC2.

Variável	PC1	PC2
CCLig-pH11	0.599	- 0.298
CCLig-pH10	0.588	- 0.467
CCT-pH10	0.544	0.832

De acordo com a Tabela 23, as components PC1 e PC2 podem ser expressas pelas seguintes equações:

$$PC1 = + 0,599 [CCLig-pH11] + 0,588 [CCLig-pH10] + 0,544 [CCT-pH10] \quad (\text{Eq.8})$$

$$PC2 = - 0,298 [CCLig-pH11] - 0,467 [CCLig-pH10] + 0,832 [CCT-pH10] \quad (\text{Eq.9})$$

Em (8), as variáveis CCLig-pH11 e CCLig-pH10 são as que mais contribuem para separar os carbonílicos saturados (aldeídos e cetonas) dos derivados insaturados (alcenais). Entre as três variáveis selecionadas, o parâmetro CCLig-pH11 é o que possui maior contribuição para PC1. De fato, pode ser observado pelo diagrama de *Loadings* na Figura 27 que todas as variáveis contribuem positivamente para PC1. Analisando a equação (9), observa-se que as variáveis CCLig-pH11 e CCLig-pH10 são as que mais

contribuem para o agrupamento dos aldeídos, enquanto a variável CCT-pH10 contribui para o agrupamento das cetonas.

A Tabela 24 indica o percentual de variância acumulativo da calibração e da validação para PC1 e PC2 e o quanto cada variável contribui para cada componente principal. O modelo proposto possui %Var_{acumulada} para calibração e validação igual a 99.60% e 98.46%, respectivamente. A %Var_{acumulada} para calibração indica a capacidade do modelo em explicar os dados originais, revelando também seu poder de ajuste, enquanto %Var_{acumulada} para validação indica a capacidade de predição do modelo proposto.

Tabela 24. Percentual de variância acumulativo para PC1 e PC2.

Variáveis	PC1		PC2	
	calibração	validação	calibração	Validação
Análise PCA	90.00	83.30	99.60	98.46
CCLig-pH11	96.78	94.62	99.34	97.50
CCLig-pH10	93.20	88.65	99.48	97.98
CCT-pH10	80.01	66.05	99.98	99.95

Os resultados da Tabela 24 revelam que a variável CCLig-pH11 é a que melhor se ajusta e a que possui maior grau de previsibilidade no modelo, ou seja, é capaz de explicar 96,78% dos dados originais e validar 94,62% com apenas a primeira componente principal. A segunda componente principal é necessária, pois complementa a análise indicando uma separação entre as cetonas e os aldeídos. Isto pode ser comprovado observando também a Tabela 24, onde as variáveis CCLig-pH10 e CCT-pH10, também devem aparecer no modelo, pois apresentam elevada contribuição em termos de validação para PC2. Deste modo, a variável CCLig-pH11 é a que melhor explica os dados originais, a que melhor separa os grupos amostrais e a que melhor discrimina as categorias, enquanto as variáveis CCLig-pH10 e CCT-pH10 são as que contribuem melhor para discriminação das categorias em grupos funcionais, ou seja, em aldeídos e cetonas. Desta forma, a análise detalhada do diagrama de *Scores* e *Loadings* revela que a forma ligada em pH 11 é a que mais interessa para aldeídos e a forma total em pH 10 é a que mais interessa para as cetonas.

Uma vez definida a faixa de pH para o estudo dos CCs na forma total, o próximo passo seria conhecer a influência do tamanho ou arranjo das suas cadeias carbônicas sobre a interação com o bissulfito presente no meio para formação do aduto AHAS.

As Tabelas 25 e 26 listam os valores de concentração dos CCs na forma livre, ligada e total na solução modelo, analisados individualmente (Tabela 25) e em mistura (Tabela 26). Os valores de CCL equivalem aos resultados encontrados na amostra contida no balão B1 (Figura 17), enquanto os valores de CCT-pH 9 a 13 são equivalentes aos resultados encontrados nos balões C1 a C5. Os valores de concentração das amostras contidas no frasco A1 (branco de bissulfito-BB) serviram de referência para o cálculo de CCL e CCT. Considerando que, no preparo de A1, 1mL da solução contendo 10 mg L^{-1} do CC era diluída em 5 mL de 2,4-DNPH para que ocorresse a derivatização, então, em todos os casos, o valor de concentração do CC em A1 foi de $1,67 \text{ mg L}^{-1}$.

Os dados indicam que a formação dos adutos não parece estar condicionada somente à presença da carbonila nas estruturas orgânicas estudadas. Os valores das concentrações de CCL e CCLig demonstraram que a posição da carbonila, o tamanho da cadeia e a estrutura trans dos estereoisômeros de CCs podem influenciar na formação de CCLig (aduto).

Os gráficos apresentados nas Figuras 29 e 30 mostram as frações livre e ligada dos CCs após a reação com bissulfito, em solução modelo. Os valores, expressos em %, foram calculados com base no valor de CCT, assumindo como 100%, exceto para os trans-alcenais, cujos valores de CCL foram calculados com base no valor do branco (A1), uma vez que a determinação na forma total apresentou problemas e será discutido na seqüência.

Todos os valores de CCLig se referem à análise na qual foi utilizado o pH 11 na dissociação do aduto, já que este mostrou ser o mais apropriado. A Figura 29 representa o comportamento dos CCs estudados individualmente e a Figura 30 representa o comportamento simultâneo dos vinte e dois CCs em mistura.

Tabela 25. Concentração (mg L⁻¹) de CCs livres, ligados e totais em solução modelo, estudados individualmente.

CC	CCT							CCLig				
	BB	CCL	pH9	pH10	pH11	pH12	pH13	pH9	pH10	pH11	pH12	pH13
Formaldeído	1.67	0.21	1.22	1.51	1.56	1.83	1.56	1.01	1.30	1.35	1.62	1.34
Acetaldeído	1.67	0.96	1.30	1.54	1.78	1.44	1.79	0.34	0.58	0.82	0.48	0.83
Propanal	1.67	0.57	1.54	1.51	1.66	1.12	1.09	0.96	0.93	1.08	0.54	0.76
Pentanal	1.67	0,78	1.46	1.46	1.67	1.62	1.67	0.68	0.68	1.04	0.84	1.53
Hexanal	1.67	0.56	1.47	1.48	1.36	1.26	1.39	0.91	0.92	0.80	0.70	0.83
Octanal	1.67	0.34	1.46	1.65	1.80	1.55	1.56	1.12	1.31	1.46	1.21	1.22
Nonanal	1.67	0.52	1.20	1.33	1.33	1.47	1.36	0.68	0.81	0.81	0.95	0.84
Decanal	1.67	0.75	1.85	1.80	1.59	1.72	1.69	1.10	1.04	0.83	0.97	0.94
<i>E</i> -pent-2-em-1-al	1.67	1.65	0.04	0.06	0.08	0.12	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>E</i> -hex-2-en-1-al	1.67	1.78	0.54	0.38	0.24	0.20	0.24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>E</i> -hept-2-en-1-al	1.67	1.59	0.04	0.06	0.12	0.18	0.26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>E</i> -oct-2-en-1-al	1.67	1.53	0.13	0.09	0.16	0.22	0.29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzaldeído	1.67	1.66	1.55	1.39	1.67	1.59	1.61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salicilaldeído	1.67	1.50	1.43	1.58	1.50	1.46	1.41	n.d.	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
Propanona	1.67	1.59	1.60	1.59	1.59	1.60	1.66	0.01	n.d.	n.d.	0.01	0.07
Hexan-2-ona	1.67	1.57	1.70	1.70	1.57	1.50	1.54	0.12	0.12	n.d.	n.d.	n.d.
Heptan-2-ona	1.67	1.30	1.24	1.11	1.23	1.48	1.44	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	0.14
Octan-2-ona	1.67	1.83	1.67	1.77	1.89	1.77	1.84	n.d.	n.d.	0.06	n.d.	0.01
Nonan-2-ona	1.67	1.92	1.67	1.67	1.79	1.73	1.71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Decan-2-ona	1.67	1.49	1.56	1.35	1.46	0.73	1.32	0.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-ionona	1.67	1.58	1.63	1.60	1.60	1.60	1.67	0.04	0.02	0.02	0.02	0.08
Ciclopentanona	1.67	1.39	1.10	1.41	1.67	1.36	1.35	n.d.	n.d.	0.28	n.d.	n.d.

n.d. = não detectado; BB-branco de bissulfito; CCL – livre; CCT – total; CCLig – ligado.

Tabela 26. Concentração (mg L⁻¹) de CC livres, ligados e totais em solução modelo, estudados em mistura.

CC	CCT							CCLig				
	BB	CCL	pH9	pH10	pH11	pH12	pH13	pH9	pH10	pH11	pH12	pH13
Formaldeído	1.67	1.09	1.44	1.79	1.91	1.55	1.53	0.35	0.70	0.82	0.46	0.44
Acetaldeído	1.67	0.81	1.20	1.53	1.67	1.56	1.72	0.40	0.74	0.88	0.76	1.32
Propanal	1.67	0.70	1.45	1.74	1.72	1.74	1.72	0.75	1.04	1.02	1.04	1.02
Pentanal	1.67	0.43	0.31	1.48	1.67	1.65	1.64	nd	1.04	1.23	1.22	1.52
Hexanal	1.67	0.68	1.51	1.80	1.88	1.50	1.46	0.83	1.11	1.19	0.81	0.77
Octanal	1.67	0.81	1.70	1.91	1.98	1.70	1.70	0.89	1.10	1.17	0.89	0.89
Nonanal	1.67	0.92	1.16	1.62	1.67	1.49	1.49	0.26	0.71	0.74	0.58	1.76
Decanal	1.67	1.33	1.00	1.55	1.67	1.33	1.33	nd	0.22	0.33	nd	nd
<i>E</i> -pent-2-en-1-al	1.67	1.53	0.17	0.24	0.12	0.12	0.24	nd	nd	nd	nd	nd
<i>E</i> -hex-2-en-1-al	1.67	1.42	0.23	0.34	0.15	0.15	0.34	nd	nd	nd	nd	nd
Benzaldeído	1.67	1.32	1.37	1.80	1.80	1.72	1.59	0.05	0.48	0.48	0.40	0.28
Salicilaldeído	1.67	1.42	1.40	1.43	1.43	1.40	1.50	nd	0.02	0.02	nd	0.08
Propanona	1.67	1.55	1.59	1.54	1.61	1.61	1.67	0.04	nd	0.06	0.06	0.11
Hexan-2-ona + <i>E</i> -hept-2-en-1-al	1.67	1.47	1.55	1.50	1.55	1.55	1.61	0.08	0.03	0.08	0.08	0.14
Heptan-2-ona + <i>E</i> -oct-2-en-1-al	1.67	1.67	1.52	1.59	1.49	1.49	1.49	nd	nd	nd	nd	nd
Octan-2-ona	1.67	1.25	1.25	1.19	1.37	1.31	1.31	nd	nd	0.12	0.06	0.06
Nonan-2-ona	1.67	1.09	1.14	1.14	1.25	1.25	1.15	0.05	0.05	0.16	0.16	0.05
Decan-2-ona	1.67	0.96	1.03	0.90	1.03	1.03	0.90	0.06	nd	0.06	0.06	nd
β-ionona	1.67	0.81	0.86	0.81	0.97	0.86	0.86	0.05	nd	0.16	0.05	0.05
Ciclopentanona	1.67	1.16	0.89	1.39	1.67	1.48	1.45	nd	0.23	0.92	0.34	0.43

n.d. = não detectado; BB-branco de bissulfito; CCL – livre; CCT – total; CCLig – ligado.

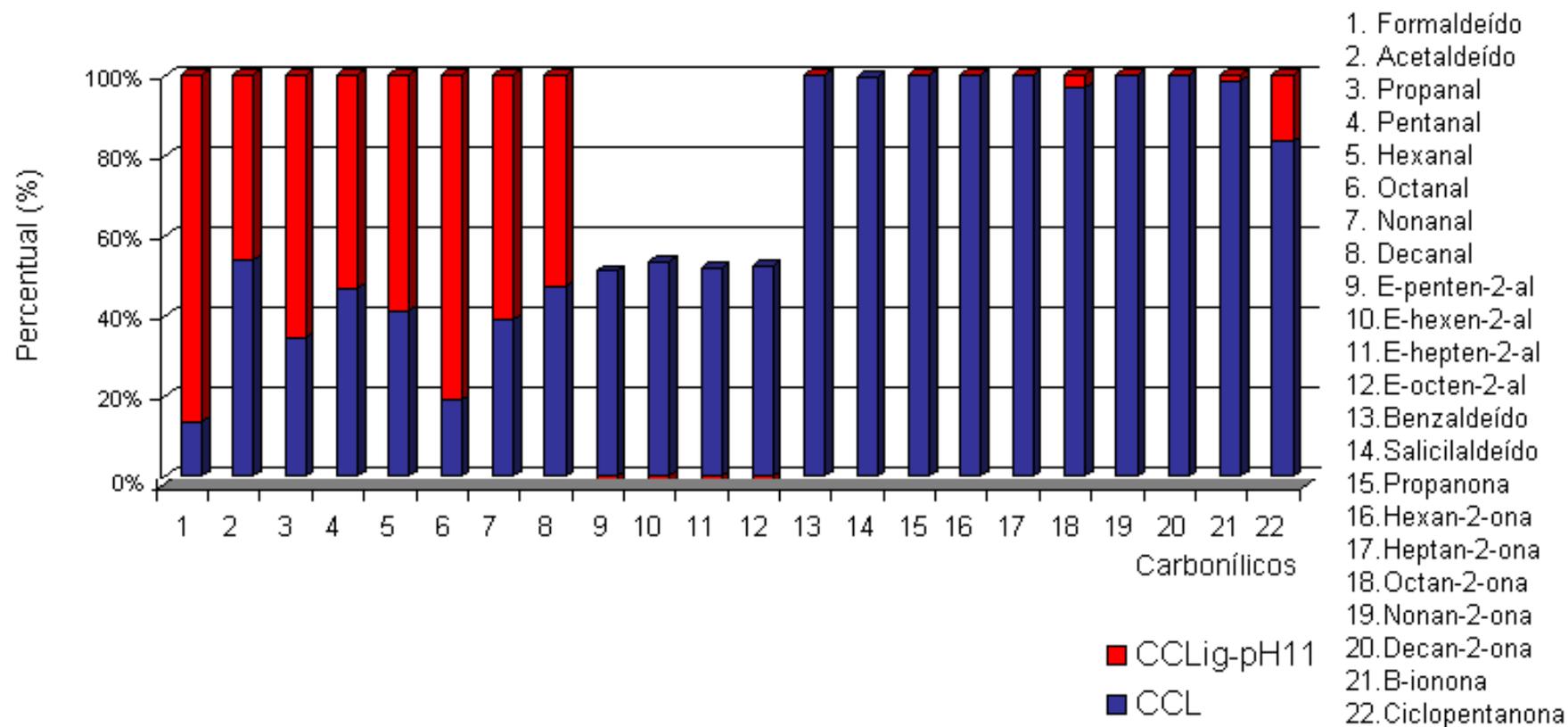


Figura 29. Percentual de CC livre e CC ligado em amostras de solução modelo (pH 11), analisados individualmente.

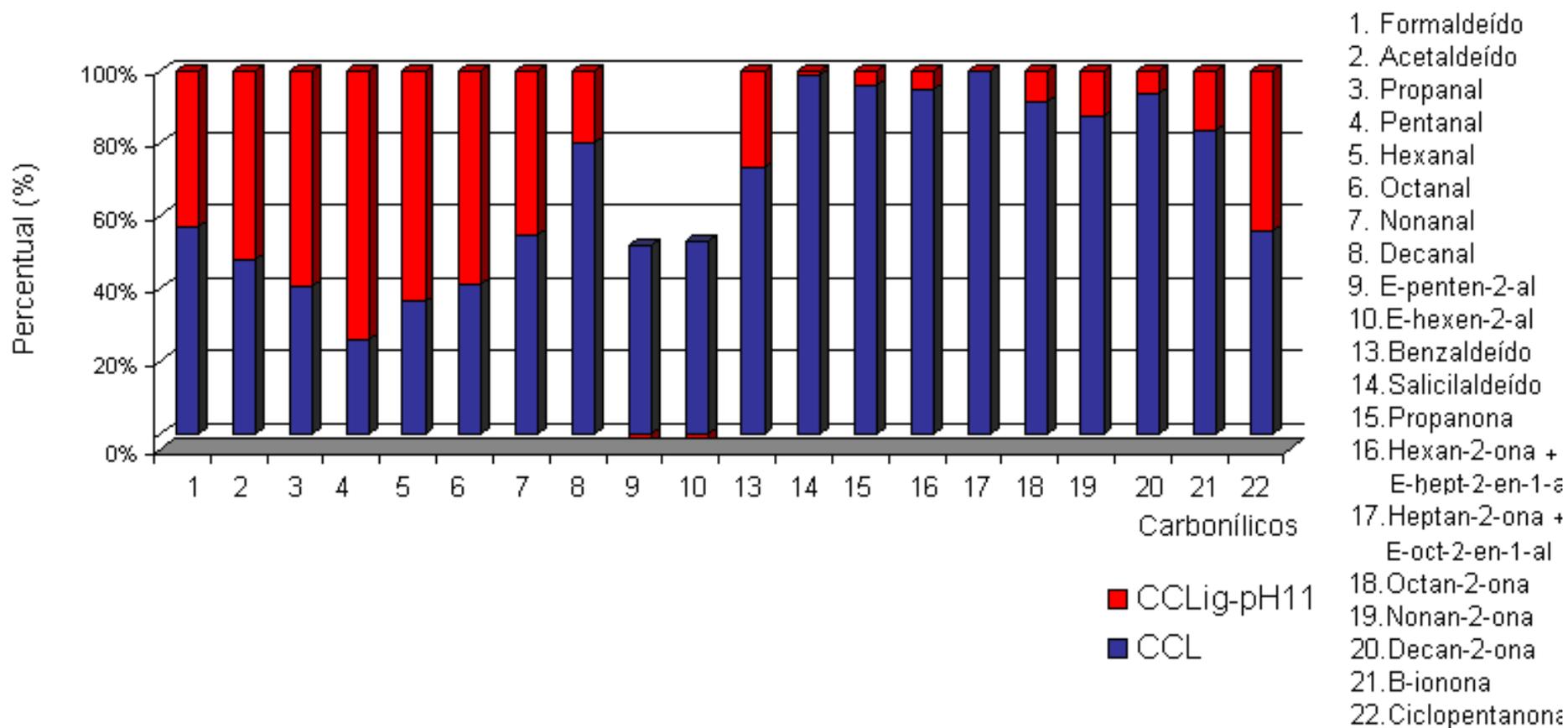
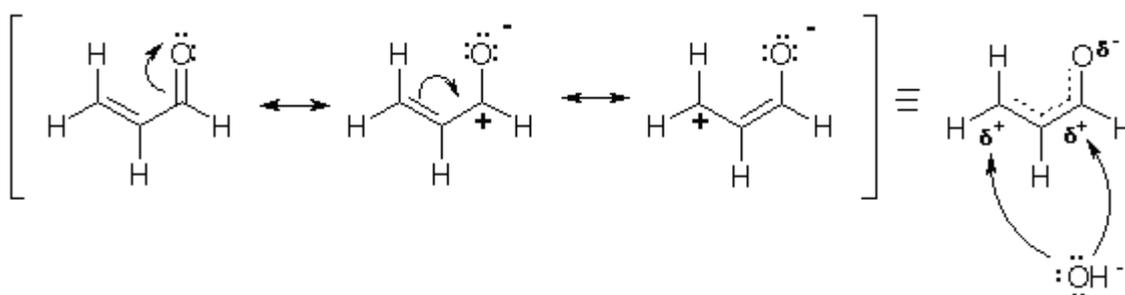


Figura 30. Percentual de CC livre e CC ligado em amostras de solução modelo (pH 11), analisados em mistura.

Os gráficos indicam que a estabilidade do CCLig é maior para os compostos carbonílicos alifáticos saturados (formaldeído, acetaldeído, propanal, pentanal, hexanal, octanal, nonanal e decanal) e que, na maioria dos casos, mais de 50% da concentração desses compostos está representada na forma ligada. No estudo individualizado destes compostos, os valores de CCLig são ainda maiores. Entre eles, o que apresenta interação mais forte com o bissulfito é o formaldeído, aldeído com uma cadeia muito curta, contendo somente um átomo de carbono. Aproximadamente 90% do formaldeído estava na forma ligada. Por outro lado, os aldeídos benzóicos (benzaldeído e salicilaldeído) não formam aduto em quantidades significativas.

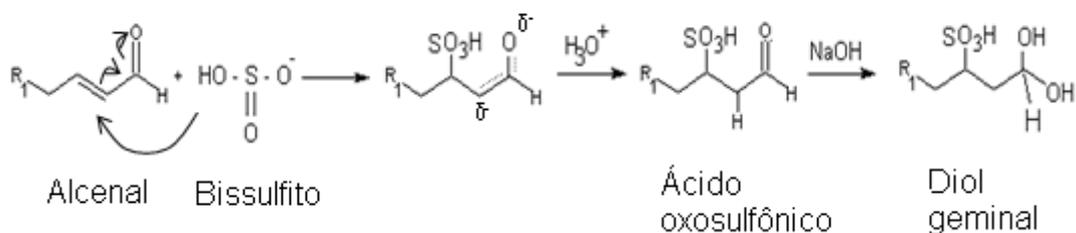
Quando estudadas separadamente, as cetonas também não apresentaram grande afinidade pelo íon bissulfito, uma vez que não foram identificados teores significativos do aduto AHAS formado a partir deste grupo, com exceção da ciclo pentanona, com 20% de sua concentração na forma combinada. Supreendentemente, ao serem avaliadas em mistura, as cetonas se apresentaram, em média, 10% combinadas, na forma de aduto.

Para os trans-alcenais, a ausência da representação gráfica associada aos valores de CCLig, mostrados nas Figuras 32 e 33, está relacionada com a dificuldade em analisar os conteúdos totais destes componentes pelo método proposto no presente trabalho. Dois mecanismos são sugeridos para explicar este fenômeno. No primeiro deles a alcalinização da amostra, realizada na quantificação dos CCT, favorece as reações de adição simples, reação bastante comum entre aldeídos e cetonas α e β -insaturados e espécies nucleofílicas fortes como o íon hidróxido¹³³. Desta forma, a hidroxila será adicionada ao CC insaturado através da dupla ligação do grupo carbonila, conforme ilustrado no Esquema 10, resultando em um álcool ou outro composto não identificado pelo método.



Esquema 10. Estruturas de ressonância e híbrido de ressonância de aldeídos α e β -insaturados para reação de adição simples (adaptado de ref. 111).

O outro mecanismo envolvido poderia estar relacionado com a reação de adição conjugada entre ânions e os CCs α e β -insaturados, conhecida também por “adições de Michael” (Esquema 11). Neste caso, o bissulfito seria adicionado na posição 1,4 em relação ao grupo carbonílico, removendo a dupla ligação da cadeia carbônica sem modificar a carbonila, o novo composto será atacado pelo íon hidróxido, formando um aduto diferente do desejado (diferente do AHAS). O aduto formado não conseguiria reagir com a 2,4-DNPH para formar a hidrazona e, por este motivo, o sinal analítico não pode ser obtido.



Esquema 11. Adição conjugada, através da via de adição de “Michael”, entre um ânion e compostos carbonílicos α,β -insaturados.

Novos estudos serão necessários no intuito de solucionar a dificuldade de quantificação dos CCT dos trans-alcenais. No entanto, através da avaliação das concentrações destes compostos na forma livre (Tabelas 25 e 26) e comparação com o “branco de bissulfito”, é possível concluir que eles se encontram sem se combinar ao bissulfito.

6.7. ANÁLISE DE ESPÉCIES DE S(IV) LIVRES EM SOLUÇÃO MODELO

Em complemento ao estudo das concentrações de CCL, CCLig e CCT, feito na solução modelo com a intenção de avaliar a interação entre os CCs e espécies de S(IV), foi realizada também a análise titulométrica dos teores de bissulfito livre na mesma amostra (solução modelo) visando a obtenção de dados que permitissem calcular os valores individuais da constante de dissociação (K_d).

Burroughs e colaboradores¹¹⁹ estudaram intensivamente a estabilidade dos adutos CC-S(IV), focalizando a discussão nas constantes de equilíbrio para a dissociação de alguns adutos de compostos carbonílicos presentes no suco de maçã, nas cidras e nos vinhos^{119,134-136}. Os CCs avaliados por estes autores foram: acetaldeído, ácido pirúvico, ácido 2-cetoglutarico, L-xilose, ácido D-treo-2,5-hexodiolose, 2,5-dicetoglucônico, ácido 2-cetoglucônico e ácido galacturônico. De acordo com os autores, as constantes de equilíbrio permaneceram quase inalteradas na faixa de pH entre 3 e 4 para cada CC, sendo a variação observada entre os diferentes CCs estudados, pois foi encontrada uma variação de $1,5 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-2}$ nos valores das constantes. O acetaldeído formou o aduto mais estável entre os compostos carbonílicos avaliados [K_d (pH 3) = $1,5 \times 10^{-6}$ e K_d (pH 4) = $1,4 \times 10^{-6}$], cujo valor da constante de dissociação é demasiadamente pequena para permitir que este composto esteja na forma livre em solução. De acordo com Burroughs¹³⁴, em uma solução contendo uma concentração de $6,4 \text{ mg L}^{-1}$ de SO_2 livre, 98% do acetaldeído presente na solução estaria na forma ligada. O ácido galacturônico, no entanto, apresentou menor estabilidade [K_d (pH 3) = $1,6 \times 10^{-2}$ e K_d (pH 4) = $2,1 \times 10^{-2}$].

As constantes de dissociação (K_d) para vários adutos avaliados no presente estudo foram calculados de acordo com a equação (10), usando os valores das concentrações de espécies de S(IV) livres determinados por titulação volumétrica com solução de iodo, concentração em quantidade de matéria de compostos carbonílicos livres determinados pelo método cromatográfico e concentração em quantidade molar de CCs ligados obtida pela diferença entre CCT e CCL.

$$K_d = \frac{[S][X - x]}{[x]} \quad (\text{Eq.10})$$

Onde: [S] = concentração (mol/L) de S(IV) livre em qualquer forma;

[X] = concentração (mol/L) de CC total (livre + ligado)

[x] = concentração (mol/L) de CC ligado.

Os valores de K_d obtidos para cada CC a pH 3,5 são mostrados na Tabela 27. Os dados estão coerentes com a literatura para os valores de formaldeído¹⁰⁶ e acetaldeído^{119,136} e com a tendência da estabilidade prevista pela análise dos componentes principais (PCA), isto é, os valores de K_d para adutos de aldeídos alifáticos são menores do que para as cetonas, aldeídos cíclicos e trans-alcenais.

Tabela 27. Constantes de dissociação (K_d) de adutos CC-S(IV) em pH 3,5.

CC	HSO_3^- livre (mol L ⁻¹)	K_d	K_d (literatura)
Formaldeído	$7,58 \times 10^{-4}$	1.09×10^{-7}	$2,8 \times 10^{-7}$ *
Acetaldeído	$1,52 \times 10^{-3}$	2.06×10^{-6}	$8,3 \times 10^{-6}$ *; $1,4 \times 10^{-6}$ **
Propanal	$7,58 \times 10^{-3}$	7.70×10^{-6}	-
Pentanal	$9,10 \times 10^{-3}$	8.00×10^{-6}	-
Hexanal	$6,82 \times 10^{-3}$	3.45×10^{-6}	-
Octanal	$9,85 \times 10^{-3}$	2.52×10^{-6}	-
Nonanal	$9,09 \times 10^{-3}$	4.12×10^{-6}	-
Decanal	$5,45 \times 10^{-3}$	4.46×10^{-6}	-
<i>E</i> -pent-2-en-1-al	$8,33 \times 10^{-3}$	8.25×10^{-4}	-
<i>E</i> -hept-2-en-1-al	$7,58 \times 10^{-3}$	1.57×10^{-4}	-
<i>E</i> -oct-2-en-1-al	$7,58 \times 10^{-3}$	8.48×10^{-4}	-
Benzaldeído	$1,14 \times 10^{-2}$	2.83×10^{-3}	$2,1 \times 10^{-4}$ *
Hexan-2-ona	$6,97 \times 10^{-3}$	1.13×10^{-4}	-
Heptan-2-ona	$1,21 \times 10^{-2}$	4.30×10^{-4}	-
Decan-2-ona	$9,85 \times 10^{-3}$	8.30×10^{-5}	-
β -ionona	$1,36 \times 10^{-2}$	2.07×10^{-4}	-

* ref 142; ** ref 136

6.8. ANÁLISE DE CCs EM VINHOS COMERCIAIS

6.7.1. Quantificação de CCs em vinhos brancos

Para a análise dos teores de CCs em vinhos brancos foram adquiridas no mercado local cinco garrafas de vinhos produzidos no Vale do São Francisco, por diferentes vinícolas. Para cada garrafa foram feitas três repetições.

As garrafas foram codificadas para facilitar a interpretação dos resultados, mas suas identificações estão descritas na Tabela 28.

Tabela 28. Caracterização das amostras de vinho branco analisadas.

CÓDIGO	MARCA	TIPO	UVA	SAFRA
VINHO 1	Botticelli	Branco suave	<i>Moscato Canelli</i>	2004
VINHO 2	Adega do Vale	Branco seco	<i>Moscato Canelli</i>	2003
VINHO 3	Terra Nova	Branco seco	<i>Muskadel</i>	2002
VINHO 4	Bianchetti	Branco suave	<i>Moscato Canelli</i>	2002
VINHO 5	Garziera	Branco seco	<i>Moscato Itália</i>	2003

Os cromatogramas de cada vinho estão apresentados na Figura 31. Neles, os picos marcados com números representam os CCs identificados nas amostras de vinho branco, sendo os números 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 equivalentes aos respectivos CCs: formaldeído, acetaldeído, furfural, butanal, benzaldeído, hexanal e 2-etil-hexanal. Como é possível perceber, estes CCs aparecem em todas as amostras, indicando que podem ser característicos dos vinhos brancos, provenientes da fermentação alcoólica ou da uva da variedade *Moscato* que lhe deu origem. Os picos marcados com letras estão relacionados com os CCs não identificados e apenas os picos de letras **d** (TR = 7,79') e **f** (TR = 10,16') são comuns a todas as amostras. O pico **f** representa a propanona e não é considerado um constituinte do vinho neste caso, pois é proveniente de contaminação da solução de 2,4-DNPH. Por este motivo não foi identificado com número como os demais. O pico **g** (TR = 30,98') aparece em quatro das amostras, mas não pôde ser identificado.

Os valores médios dos teores de CCs encontrados são mostrados na Tabela 29. Os cálculos de concentração foram feitos com base no fator de

resposta (FR), que é o valor resultante da razão entre a área integrada do pico do CC e a sua concentração na solução padrão.

Os valores apresentados na Tabela 29 mostram que o CC presente em maior concentração nos vinhos brancos estudados foi o acetaldeído e, ainda, que este aldeído predomina na forma ligada, pois foi encontrado nesta forma em níveis médios de $16,75 \text{ mg L}^{-1}$, concentração equivalente a uma quantidade cinco vezes maior do que na forma livre, em média. Segundo Osborne e colaboradores⁴⁴, o acetaldeído é realmente o aldeído mais importante do ponto de vista quantitativo, compreendendo cerca de 90% dos aldeídos totais e sua estrutura química altamente reativa favorece a interação com espécies de S(IV). Segundo os autores, frequentemente são encontrados níveis de 10 até 200 mg L^{-1} deste CC nas bebidas⁴⁴.

Escudero e colaboradores¹¹ analisaram vinte e sete vinhos brancos secos e encontraram teores de acetaldeído próximos aos descritos pelos outros autores ($15,80$ a $194,0 \text{ mg L}^{-1}$)⁽¹¹⁾.

O estudo de nove vinhos brancos do tipo “xerez” revelou que as condições de oxidação nas quais este tipo de vinho é submetido durante o processamento favorecem a produção de acetaldeído, pois os teores obtidos foram maiores ($126,0$ a $545,0 \text{ mg L}^{-1}$)⁽³²⁾.

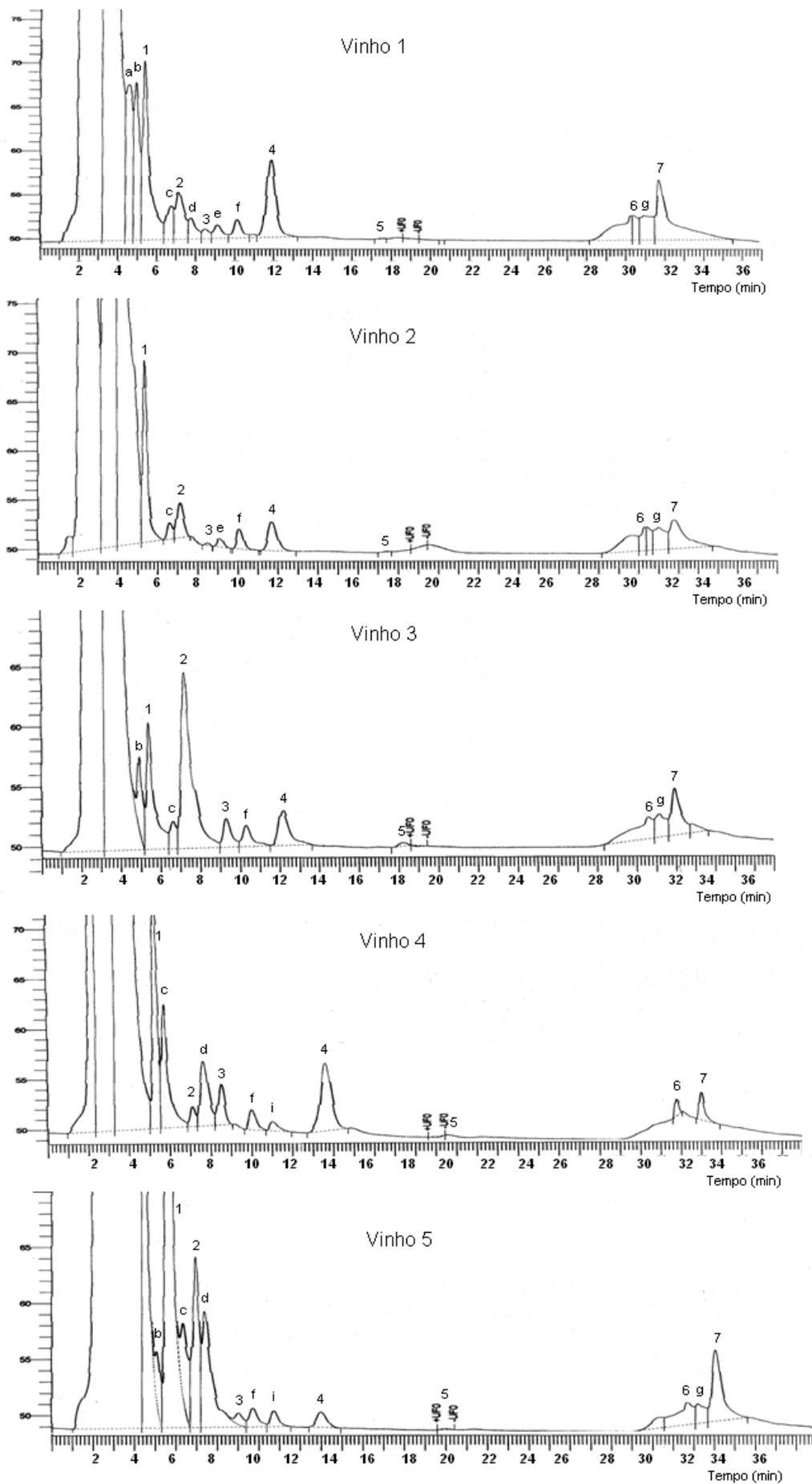


Figura 31. Cromatogramas dos CCs encontrados nos vinhos brancos. 1 - formaldeído, 2 - acetaldeído, 3 - furfural, 4 - butanal, 5 - benzaldeído, 6 - hexanal e 7 - 2-etil-hexanal.

Além do acetaldeído, outros três CCs foram encontrados em concentrações expressivas no vinho branco, são eles: formaldeído, butanal e furfural (respectivos valores da média: 7,10; 6,95 e 7,67 mg L⁻¹). No entanto, ao contrário do acetaldeído, eles são encontrados em maiores concentrações na forma livre, quando apresentam, respectivamente, valores percentuais médios para CCL de 85,54; 61,87 e 59,56%. É importante ressaltar que os teores totais (CCT) de butanal foram maiores nos vinhos suaves (1 e 4), do que nos secos (2, 3 e 5), indicando que os teores mais elevados de açúcares no vinho suave podem influenciar no conteúdo deste aldeído, neste tipo de bebida.

Nos vinhos brancos analisados, a concentração de furfural variou entre 3,51 mg L⁻¹ e 17,70 mg L⁻¹ (respectivamente para os vinhos 5 e 4). No entanto, em alguns artigos pesquisados, observa-se que os níveis de furfural encontrados no vinho branco podem variar desde concentrações traços^{11,60} (0,90 - 26,30 µg L⁻¹) a valores próximos aos encontrados neste trabalho³² (0,179 - 7,34 mg L⁻¹). A presença deste aldeído furânico em vinhos está associada principalmente a quatro fatores: 1. extração do furfural contido na composição da madeira dos barris de estocagem e das rolhas; 2. resultante da reação de maillard entre açúcares e peptídeos³⁶; 3. proveniente da degradação dos açúcares durante o envelhecimento em sistema redutor (na garrafa) ou resultante da degradação do ácido ascórbico²⁷. No caso dos vinhos brancos os dois primeiros fatores não terão muita importância, pois este tipo de vinho não é submetido ao contato com a madeira e a reação de maillard ocorrerá somente durante processos térmicos de destilação, comuns na produção de brandies e não de vinhos brancos⁸⁵. Deve-se levar em conta, portanto, que os níveis de furfural no vinho branco serão influenciados pela degradação dos açúcares e do ácido ascórbico.

Os valores médios de concentração dos aldeídos benzaldeído e hexanal foram encontrados em quantidades equivalentes nas formas livre e ligada. Para o benzaldeído, no entanto, os teores diferiram tanto entre as amostras quanto entre as proporções de CCL e CCLig. Os percentuais deste CC na forma livre, por exemplo, foram de 63,15; 33,48; 85,69; 53,40 e 16,64%, respectivamente nos vinhos 1,2,3,4 e 5.

Tabela 29. Concentração (mg L⁻¹) de CCs identificados em vinhos brancos nas formas livre (CCL), ligada (CCLig) e Total (CCT), (n=3).

CC \ VINHO	Vinho 1			Vinho 2			Vinho 3			Vinho 4			Vinho 5		
	CCL	CCLig	CCT	CCL	CCLig	CCT									
Formaldeído	3,50	1,49	4,99	5,23	0,29	5,52	2,56	0,20	2,76	5,61	2,10	7,71	14,1	0,40	14,5
Acetaldeído	1,68	18,2	19,9	2,14	18,8	20,9	5,68	12,2	17,9	1,12	19,0	20,17	5,26	15,5	20,7
Furfural	1,87	1,75	3,62	4,25	2,22	6,45	5,80	1,25	7,05	4,67	13,0	17,7	2,52	0,99	3,51
Butanal	8,14	3,25	11,4	2,32	2,67	4,99	1,62	1,78	3,40	7,23	5,62	12,8	1,84	0,27	2,11
Benzaldeído	1,72	1,00	2,72	1,79	3,56	5,35	8,59	1,43	10,0	3,04	2,65	5,69	0,51	2,55	3,06
Hexanal	1,44	0,90	2,34	0,40	1,60	2,0	0,25	1,30	1,55	1,18	0,59	1,77	1,24	0,41	1,65
2-etil-hexanal	0,67	1,05	1,72	0,23	0,66	0,89	0,06	1,55	1,61	0,11	1,26	1,37	0,26	2,70	2,96

A presença do anel aromático na estrutura química do benzaldeído não favorece a sua interação com o bissulfito, por isso, era de se esperar que este composto se apresentasse exclusivamente na forma livre, ou seja, que os valores percentuais se aproximassem de 100%, como pode ser observado na Figura 29, que revela o comportamento individual deste aldeído aromático em solução modelo, na presença do bissulfito. Por outro lado, ao ser estudado em mistura (Figura 30), a interação benzaldeído-bissulfito sofre a influência da presença de outros CCs, fazendo com que aproximadamente 70% deste CC esteja na forma livre e 30% na forma de aduto. Esta proporção foi observada nos vinhos 1, 3 e 5.

O hexanal e o 2-etil-hexanal foram encontrados em baixas concentrações, se comparados aos demais. Para o hexanal os teores médios de CCL e CCT foram respectivamente 0,90 e 1,86 mg L⁻¹ e para o 2-etil-hexanal foram de 0,27 e 1,71 mg L⁻¹.

Em resumo, nos vinhos brancos, o acetaldeído e o 2-etil hexanal predominam na forma ligada, enquanto o formaldeído, furfural e butanal são encontrados predominantemente na forma livre, apresentando menor afinidade pelo bissulfito. Os teores de benzaldeído e hexanal, por sua vez, são encontrados nas duas formas, equivalentemente.

Entre os sete CCs identificados nos vinhos brancos estudados, seis deles haviam sido citados por outros autores. O 2-etil-hexanal, no entanto, não foi mencionado em nenhum dos estudos relacionados com a composição química do aroma de vinhos.

6.8.2. Quantificação de CCs em vinhos tintos

A análise dos teores de CCs em vinhos tintos também foi realizada com vinhos produzidos no Vale do São Francisco, com exceção do vinho Chalise. Enquanto nas amostras de vinho branco predominou uma variedade de uva, entre as amostras de tinto optou-se por variar as uvas de origem. A codificação e identificação das garrafas estão descritas na Tabela 30.

Os cromatogramas de cada vinho estão apresentados na Figura 32, na qual foram utilizadas as mesmas marcações (números e letras) usadas nos cromatogramas das amostras de vinhos brancos.

Tabela 30. Caracterização das amostras de vinho tinto analisadas.

CÓDIGO	MARCA	TIPO	UVA	SAFRA
VINHO 1	Botticelli	Tinto seco	<i>Petite syrah</i>	2002
VINHO 2	Garziera	Tinto seco	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2003
VINHO 3	Terra Nova	Tinto seco	<i>Shyraz</i>	2003
VINHO 4	Botticelli	Tinto seco	<i>Tannat</i>	2004
VINHO 5	Chalise	Tinto suave	-	-

Do ponto de vista qualitativo não foi observada diferença entre os tipos de CCs encontrados em vinhos brancos e tintos, pois em ambos os casos foram identificados o formaldeído, acetaldeído, furfural, butanal, benzaldeído, hexanal e 2-etil-hexanal. Da mesma forma, os picos não identificados nos cromatogramas dos vinhos brancos aparecem também nos cromatogramas de alguns dos vinhos tintos nos mesmos tempos de retenção.

As concentrações de CCs determinados no vinho tinto estão na Tabela 31. A maior diferença entre vinhos tintos e brancos é percebida nos teores de acetaldeído total, cuja média para os tintos foi de $4,60 \text{ mg L}^{-1}$ e para os brancos de $19,9 \text{ mg L}^{-1}$. Valores de concentrações próximos foram obtidos por Girard e colaboradores⁷² ao estudarem vinhos da uva tinta *Pinot Noir* ($6,97$ a $14,2 \text{ mg L}^{-1}$). Os teores de furfural obtidos nos vinhos tintos também foram inferiores àqueles encontrados nos brancos (Tabela 31). Para os tintos o valor médio de CCT foi de $3,09 \text{ mg L}^{-1}$ e para os brancos $7,67 \text{ mg L}^{-1}$, apesar dos primeiros permanecerem por um período mais longo em contato com a madeira. De acordo com Cérdan e colaboradores¹³⁷ os compostos furânicos extraídos da madeira podem sofrer transformações químicas e bioquímicas, sendo reduzido ao seu álcool correspondente (furfuril álcool) e, como consequência, sua concentração pode ser diminuída¹³⁷. Segundo os autores, graduações alcoólicas maiores e valores de pH mais baixos irão favorecer uma maior extração dos aldeídos furânicos da madeira. Levando-se em conta que os vinhos brancos analisados são mais ácidos que os tintos (pH = 3,49 e 3,63, respectivamente) é possível justificar a diferença entre os valores médios de furfural obtidos para os dois grupos de vinhos. Em outras bebidas envelhecidas em barricas de madeira os valores médios de furfural também foram semelhantes aos encontrados neste trabalho, sendo de $5,12 \text{ mg L}^{-1}$ para aguardente de cana e de $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ para brandies^{29,58}.

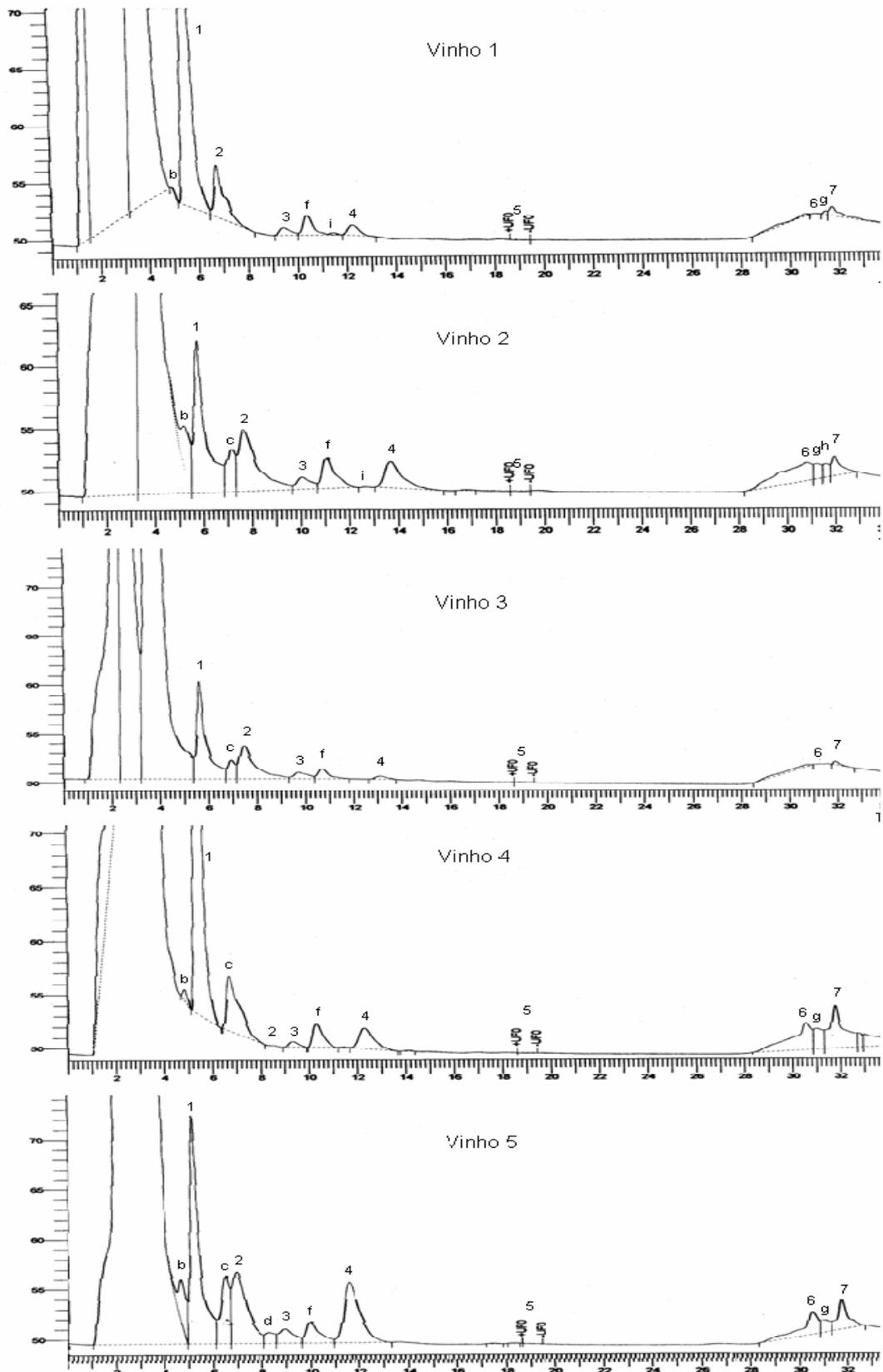


Figura 32. Cromatogramas dos CCs encontrados nos vinhos tintos. 1 - formaldeído, 2 - acetaldeído, 3 - furfural, 4 - butanal, 5 - benzaldeído, 6 - hexanal e 7 - 2-etil-hexanal.

Estudo realizado em alguns vinhos franceses que continham o defeito “amêndoa amarga” revelou teores de benzaldeído que variaram de 11,1 a 37,1 mg L⁻¹, sendo associados à migração deste composto de resinas epóxi utilizadas no revestimento interno de cubas utilizadas na estocagem dos vinhos²⁷.

Neste estudo o benzaldeído foi encontrado em teores de CCT variando de 0,22 a 1,88 mg L⁻¹ (Tabela 31). Alguns autores se referem a valores próximos encontrados em vinhos de uva *Pinot Noir*⁷² (2,42 mg L⁻¹) e valores bem menores encontrados nos vinhos de uvas *Monastrell* (11,3 µg L⁻¹), *Tempranillo* (5,79 µg L⁻¹), *Cabernet Sauvignon* (13,2 µg L⁻¹) e *Dyer Grenache*²⁶ (4,59 µg L⁻¹). De acordo com Baumes e colaboradores (citado por referência 27), os conteúdos habituais de benzaldeído no vinho não ultrapassam 0,5 mg L⁻¹. Apesar de não ser tóxico ele confere um aroma pronunciado de amêndoa amarga à bebida, quando encontrado em concentrações acima do seu limiar de percepção olfativa (LPO), que é de 2,00 a 3,00 mg L⁻¹. Em todas as amostras de vinho tinto os valores de benzaldeído encontravam-se abaixo do LPO, portanto, não afeta o aroma de forma negativa.

Os valores médios de CCT para formaldeído, butanal, hexanal e 2-etil-hexanal foram respectivamente 8,01; 3,17; 0,83 e 0,67 mg L⁻¹ (Tabela 31).

Tabela 31. Concentração (mg L⁻¹) de CCs identificados em vinhos tintos nas formas livre (CCL), ligada (CCLig) e Total (CCT), (n=3).

CC \ VINHO	Vinho 1			Vinho 2			Vinho 3			Vinho 4			Vinho 5		
	FCC	BCC	TCC												
Formaldeído	12,8	0,81	13,6	2,76	0,51	3,27	2,61	0,91	3,52	13,91	0,53	14,4	4,20	0,98	5,18
Acetaldeído	1,55	1,35	2,90	1,99	2,78	4,77	1,45	0,94	2,39	0,00	5,25	5,25	2,25	5,44	7,69
Furfural	1,97	1,15	3,12	2,69	0,62	3,31	1,95	0,84	2,79	1,67	1,08	2,75	1,69	1,78	3,47
Butanal	0,90	0,49	1,39	1,81	1,08	2,89	0,83	0,91	1,74	1,39	1,10	2,49	1,52	5,81	7,33
Benzaldeído	0,65	0,60	1,25	0,42	0,09	0,51	0,49	1,38	1,87	0,15	0,07	0,22	0,50	0,81	1,31
Hexanal	0,16	0,08	0,24	0,25	0,14	0,39	0,09	0,04	0,13	1,54	0,36	1,90	0,15	1,35	1,50
2-etil-hexanal	0,14	0,11	0,25	0,14	0,13	0,27	0,06	0,14	0,20	0,19	1,13	1,32	0,17	1,13	1,30

6.9. ANÁLISE DE CCs EM UVAS VINÍFERAS

Os componentes de aroma das uvas são sintetizados nas bagas, apesar de seus precursores serem produzidos nas folhas da videira. De maneira geral, a formação e evolução desses aromas ocorre durante a maturação, seguindo a evolução dos açúcares²⁷. A caracterização desses compostos é complexa devido à diversidade e baixa concentração na qual são encontrados. Eles estão localizados principalmente na casca da fruta e, por esse motivo, as uvas analisadas foram desengaçadas e maceradas por inteiro, tendo-se o cuidado de não triturar a semente. O extrato obtido foi filtrado e em seguida realizou-se o mesmo procedimento de preparo de amostra utilizado para as amostras de vinho. Os valores das concentrações de CCs foram expressos em μg de CC/g de uva, usando como referência os valores médios da massa da uma baga (1,5 g) e o volume de extrato contido na baga (1,0 mL). A quantificação de CCs em uvas viníferas foi feita com a intenção de identificar CC responsáveis pelo aroma varietal (primário) do vinho. Para estas análises foram selecionadas dez variedades de uva vinífera, quatro brancas (*Chenin Blanc*, *Moscato Canelli*, *Riesling Itálico* e *Schomburger*) e seis tintas (*Cabernet Sauvignon*, *Alicante Bouschet*, *Alfrocheiro*, *Ruby Cabernet*, *Syrah* e *Pinot Noir*).

Os valores de concentração dos CCs encontrados na uva *Schomburger* foram descartados porque o brix da fruta se apresentou muito baixo (15,33 °brix), indicando que não se encontrava no seu estágio de amadurecimento completo e, portanto, os resultados poderiam induzir a valores subestimados dos CCs. Apesar de não ser considerado o principal indicador de “maturação tecnológica” da uva, o valor de brix reporta o percentual de sólidos solúveis presentes, particularmente representados pelos açúcares acumulados na maturação, que constituem a maior fração dos sólidos solúveis totais na análise de brix¹³⁸. Este parâmetro é utilizado para definição da maturidade “industrial” ou “tecnológica”, que corresponde ao momento no qual a uva possui o máximo conteúdo de açúcar¹³⁸.

Os valores das concentrações dos CCs encontrados nas demais uvas estão apresentados na Tabela 32.

Os compostos carbonílicos alifáticos formaldeído, acetaldeído, butanal e hexanal foram encontrados em todas as variedades de uva estudadas, assim como nos vinhos.

Tabela 32. Concentração (μg de CC/ g de uva) de CCs identificados em uvas de algumas cultivares de videiras (*Vitis vinífera*).

CC	Uvas brancas			Uvas tintas					
	<i>Chenin Blanc</i>	<i>Riesling Itálico</i>	<i>Moscato Canelli</i>	<i>Cabernet Sauvignon</i>	<i>Alicante Bouschet</i>	<i>Alfrocheiro</i>	<i>Pinot noir</i>	<i>Ruby Carbernet</i>	<i>SYrah</i>
Formaldeído	0,061	0,038	0,046	0,405	0,103	0,539	0,688	0,052	0,031
Acetaldeído	0,502	0,554	0,874	3,07	1,97	3,28	2,98	1,01	0,890
Furfural	-	-	-	-	0,297	-	-	-	-
Propanona	-	0,344	0,294	-	-	-	-	-	0,201
Butanal	1,81	0,596	1,18	5,38	1,31	2,51	1,48	0,669	0,558
E-penten-2-al	-	0,002	0,007	0,064	0,017	0,008	0,012	0,060	-
Ciclo hexanona	0,001	0,0004	0,002	-	0,005	-	-	0,004	0,411
Hexanal	0,070	0,743	0,232	0,369	0,136	0,276	1,72	0,889	2,18
2-etil-hexanal	0,082	0,042	0,034	0,489	0,157	0,010	-	-	-

A formação de compostos contendo seis carbonos, em especial do aldeído hexanal, varia em função do estágio de maturação da uva. Dois sistemas enzimáticos estão relacionados com a formação desse aldeído a partir dos ácidos graxos polinsaturados. Por um lado, a lipoxigenase que possui um máximo de atividade antes da maturação completa e, por outro lado, a enzima de ruptura membranar que possui uma atividade mais elevada na maturação²⁷. Um ou outro sistema enzimático irá influenciar nos teores de hexanal encontrados na uva e esses teores poderão ser usados para avaliar o estágio de maturação da fruta através da associação com o “potencial de aroma herbáceo” produzido pelo hexanal, sendo este potencial mais elevado em uvas semi-maduras²⁷.

Entre as variedades de uva estudadas, excluindo-se a *Schomburguer*, apenas a cv. *Syrah* apresentava-se em estágio de semi-maturação, indicado pelo valor de brix (17,75 °brix) muito próximo do valor mínimo considerado ideal para colheita da fruta, que é de 18 °brix¹²⁶. As demais variedades apresentaram valores de brix entre 19,77 e 23,05. O valor médio de concentração de hexanal na cv. *Syrah* foi de 2,18 mg L⁻¹, maior entre todas as amostras de uva cujos teores variaram entre 0,07 e 1,72 mg L⁻¹, confirmando a influência da maturação sobre a produção desse aldeído. A ciclo hexanona foi detectada nas variedades *Chenin Blanc*, *Riesling Itália*, *Moscato Canelli* e *Alicante Bouschet*, em concentrações muito baixas, respectivamente de: 0,001; 0,0004; 0,002 e 0,005 mg L⁻¹.

O furfural, frequentemente associado ao aroma terciário do vinho, foi identificado apenas na variedade *Alicante Bouschet* (0,297 mg L⁻¹) e a propanona apenas nas variedades *Riesling Itália*, *Moscato Canelli* e *Syrah*, em concentrações semelhantes, respectivamente 0,344; 0,294 e 0,201 mg L⁻¹. A presença da propanona na uva está relacionada com o metabolismo dos açúcares, quando o ácido pirúvico formado na glicólise é condensado com uma molécula de ácido acético para formar ácido citramálico e, em seguida a propanona e o propanal⁹.

Os compostos carbonílicos *E*-pent-2-en-1-al e ciclo hexanona aparecem em algumas das variedades, sendo identificados nas uvas e não nos vinhos, talvez pelo fato de serem degradados durante a fermentação. O 2-etil-hexanal é outro aldeído encontrado tanto nos vinhos quanto em algumas variedades de uva,

nestas em concentrações de 0,010 a 0,489 mg L⁻¹, sendo os maiores teores encontrados nos vinhos (0,06 a 2,25 mg L⁻¹).

Em resumo, os CCs identificados nas uvas e considerados aromas primários do vinho são o formaldeído, acetaldeído, butanal e hexanal. Os demais CCs também fazem parte da fração de aroma das uvas, mas são degradados ou transformados durante o processamento, não sendo identificados nos seus respectivos vinhos.

A comparação entre os cromatogramas das uvas *Syrah*, *Moscato canelli* e *Cabernet Sauvignon* e dos vinhos elaborados com estas uvas (Figura 33) comprovam que o formaldeído, acetaldeído, butanal e hexanal fazem parte do aroma varietal, pois são provenientes da uva e permanecem no vinho engarrafado. Apesar destes quatro aldeídos estarem presentes nas uvas e na maioria das amostras de vinho estudadas (Tabelas 29, 31 e 32), a concentração nos vinhos é maior do que na uva indicando que estes são formados predominantemente no processo de fermentação, excetuando-se apenas o hexanal, pois como já foi mencionado, ele é degradado durante a maturação da uva.

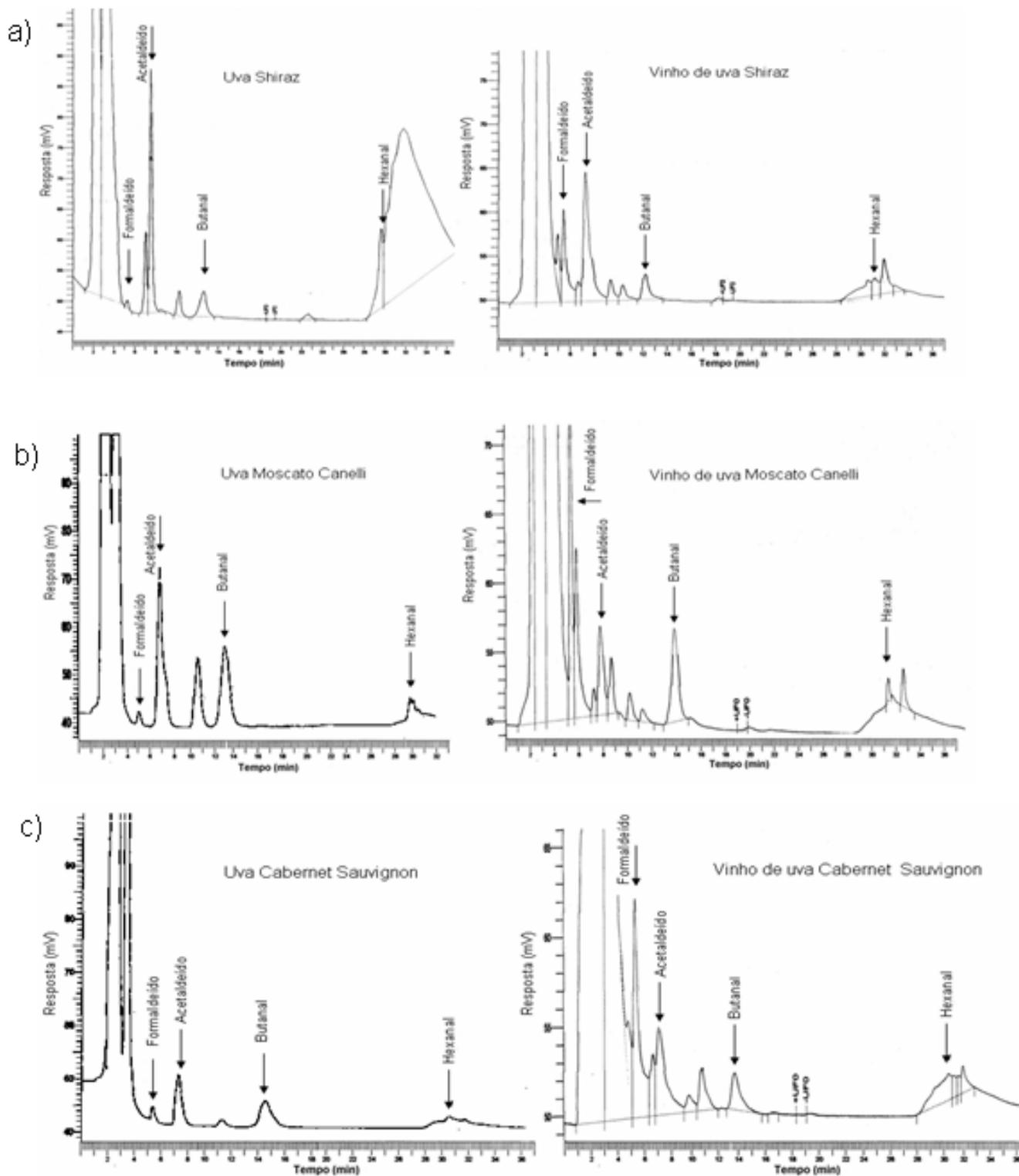


Figura 33. Cromatogramas das amostras de uvas: a) *Syrah*, b) *Moscato canelli* e c) *Cabernet Sauvignon*, e dos seus respectivos vinhos.

6.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CC NO VINHO

A avaliação da estabilidade de CC nos vinhos branco e tinto, ambos produzidos no ano de 2006, foi feita por um período de 42 dias, no qual as garrafas abertas permaneceram estocadas sob refrigeração. O objetivo era avaliar a estabilidade da amostra em relação ao comportamento das concentrações de CCs presentes e, dessa forma, prever o período máximo para a análise das amostras, sem que esses componentes sejam modificados ou produzidos como resultado da oxidação.

Foram avaliados os teores totais de formaldeído, acetaldeído, furfural, butanal, hexanal e 2-etil hexanal, em intervalos de uma semana entre uma análise e outra. Para cada tipo de vinho (branco e tinto) foi selecionada uma garrafa, sendo cada amostra analisada em triplicata e os valores obtidos tratados estatisticamente através de regressão linear, gerando modelos matemáticos que simulam o comportamento dos teores dos compostos estudados, dia a dia.

A Figura 34 mostra as curvas obtidas neste estudo e na Tabela 33 estão representadas as equações de regressão que relacionam a concentração dos CCs em função dos dias de estocagem do vinho. Analisando estas equações é possível concluir que a resposta analítica é influenciada pelo tempo de estocagem das garrafas abertas. Os valores dos coeficientes do segundo termo da equação (b) comprovam esta afirmação e revelam que, apesar da variação não ser muito brusca, pode ser significativa do ponto de vista analítico, principalmente para o formaldeído. O modelo quadrático foi o que melhor se ajustou ao comportamento da maioria dos CCs estudados. Apenas o acetaldeído apresentou comportamento linear durante o período de estudo. Em todos os casos os modelos apresentaram boa capacidade de predição ($R^2 > 70\%$).

Ao ser analisado cada CC nos dois tipos de vinho, observa-se que o comportamento individual deles é o mesmo, com exceção do hexanal, que no vinho branco teve sua concentração reduzida a níveis não detectáveis, após dezesseis dias de estocagem. Percebe-se também que, após a abertura das garrafas, os teores de alguns CCs como o furfural, formaldeído e hexanal tendem a reduzir, enquanto para o acetaldeído, o butanal e o 2-etil hexanal o

comportamento foi contrário. Ambos os eventos estão relacionados com a presença do oxigênio no interior da garrafa. Avaliando-se de maneira generalizada, é possível afirmar que mudanças significativas em torno de 5% nesses teores são observadas após as primeiras 60 horas de abertura das garrafas. Portanto, para utilização do método proposto neste trabalho, as amostras de vinhos devem ser analisadas dentro de um período de 48 horas, para que os dados obtidos reproduzam os teores reais de CCs presentes.

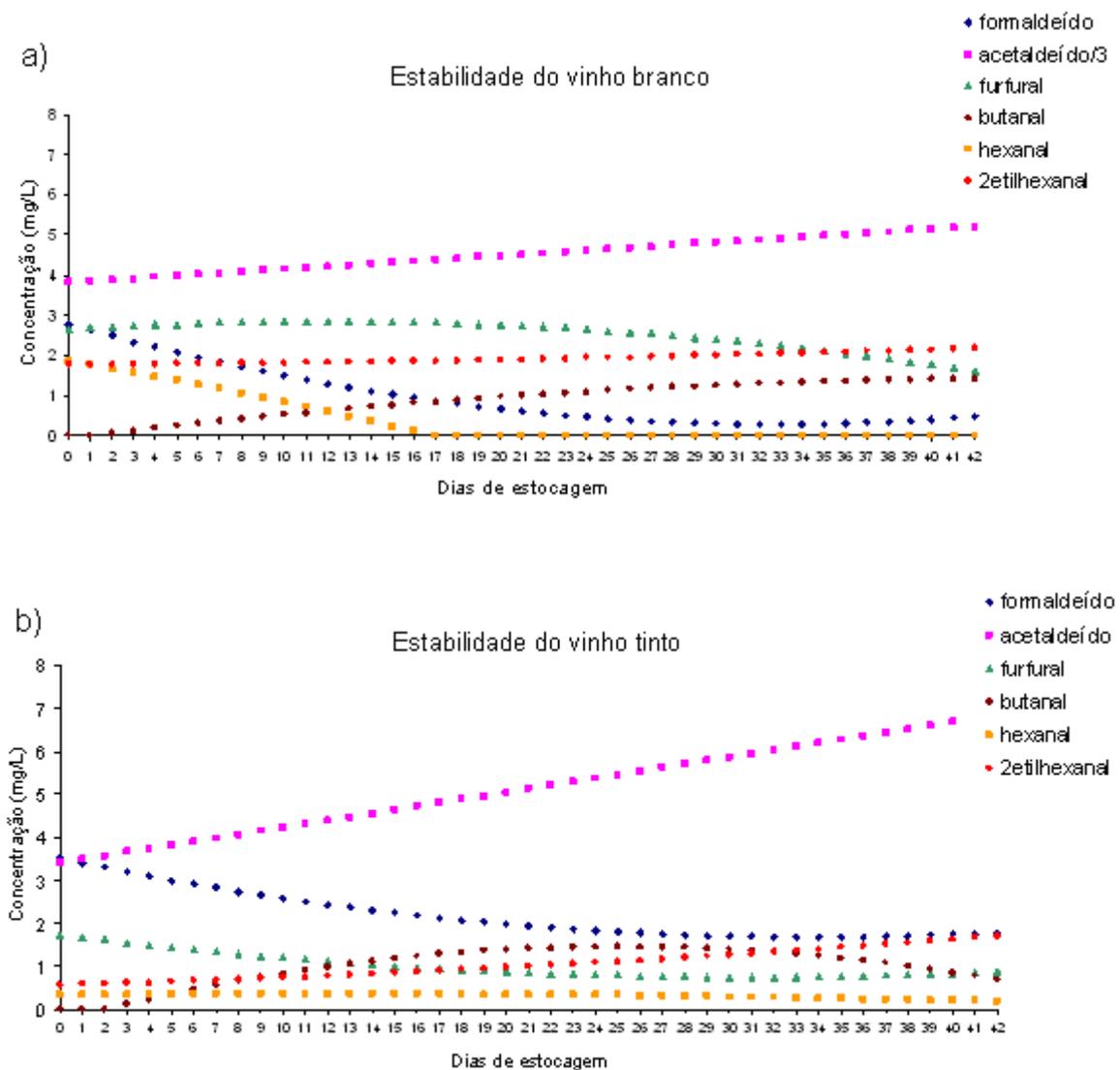


Figura 34. Curvas de acompanhamento da concentração de CCs nos vinhos branco (a) e tinto (b), em garrafas abertas.

Tabela 33. Equações de regressão relacionando a concentração de CCs em função dos dias de estocagem do vinho aberto, sob refrigeração, e respectivos coeficientes de correlação.

Carbonílico	Vinho branco		Vinho tinto	
	Equação de regressão	R ²	Equação de regressão	R ²
Formaldeído	$y=2,7721-0,1516x+0,0023x^2$	0,7629	$y=3,5087-0,1087x+0,0016x^2$	0,7122
Acetaldeído	$y=11,4363+0,0999x$	0,7095	$y=3,4106+0,0817x$	0,8819
Furfural	$y=2,6534+0,0325x-0,0014x^2$	0,9462	$y=1,7365-0,0633x+0,0010x^2$	0,9915
Butanal	$y=-0,0697+0,0656x-0,0007x^2$	0,7561	$y=-0,2605+0,1366x-0,0027x^2$	0,6903
Hexanal	$y=1,8620-0,0913x+0,0011x^2$	0,8239	$y=0,3309+0,0044x-0,0002x^2$	0,6971
2-etil-hexanal	$y=1,7742+0,0018x+0,0002x^2$	0,6270	$y=0,5707+0,0134x+0,0003x^2$	0,9636

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O papel dos aldeídos e cetonas no aroma dos vinhos ainda não é totalmente conhecido, pois faltam dados analíticos que relacionem a presença de muitos destes compostos com a característica olfativa “impressa” por eles ao aroma das bebidas. No entanto, sabe-se que estão amplamente distribuídos nestas matrizes e, por isso, devem ser identificados e quantificados para servirem de subsídio para a pesquisa sensorial⁶³.

Atualmente o sistema de avaliação da qualidade sensorial de vinhos utiliza uma terminologia descritiva cujos termos podem ser demasiadamente subjetivos, não representando aquela utilizada pelo consumidor ou pelo pesquisador em seu cotidiano, salvo algumas exceções¹³⁹. Por este motivo, novas metodologias analíticas são necessárias para permitir o isolamento, identificação e quantificação de analitos ou grupos de analitos dando suporte científico à metodologia descritiva de análise sensorial, uma vez que os descritores de aroma poderão ser associados a compostos químicos conhecidos¹³⁹.

A metodologia recomendada pela OIV para análise de aldeídos em bebidas alcoólicas, utilizada atualmente⁴⁷, não possibilita a especificação da amostra, não permitindo o acesso ao teor de cada CC. Além do mais, no método recomendado o metabissulfito de potássio é utilizado para interagir com todos os aldeídos que são quantificados como aldeídos totais sem levar em conta as cetonas presentes. O resultado dos teores obtidos para aldeídos será, portanto, mascarado parcialmente pela presença das cetonas¹⁰⁴. Soma-se a isto o fato de que o método adotado para análise de furfural não pode ser aplicado em amostras coloridas como vinhos tintos e rosé, whiskies, rum, conhaque e aguardentes contendo caramelo, além de apresentar baixa sensibilidade.

No presente trabalho a metodologia para determinação de CC de baixa e alta massas molares foi desenvolvida e otimizada de modo a ser aplicável nas vinícolas e em laboratórios de análise de vinhos, pois possibilita a identificação de aldeídos e cetonas ao mesmo tempo e, além disso, não apresenta dificuldades na análise de furfural em bebidas coloridas.

Com o emprego desse novo método os profissionais da área de enologia terão acesso a informações que lhes permitam oferecer ao consumidor um produto de composição melhor conhecida.

Do ponto de vista analítico, as principais conclusões a serem feitas sobre este procedimento são:

1. O método proposto permitiu a quantificação simultânea de formaldeído, acetaldeído, furfural, butanal, benzaldeído, hexanal, 2-etil hexanal, E-pent-2-en-1-al e ciclo hexanona utilizando apenas 1mL de amostra, em menos de uma hora de análise, envolvendo as etapas de preparação e quantificação.
2. Os aldeídos identificados foram mencionados por outros autores ao serem estudados isoladamente. Para o 2-etil-hexanal, no entanto, não havia nenhuma citação até o presente momento, sendo este o primeiro trabalho que faz referência à sua presença em vinhos.
3. O método possibilita a identificação e quantificação de compostos orgânicos voláteis que podem ser associados a características importantes do vinho, até o momento descritas de forma subjetiva.
4. Os baixos valores dos limites de detecção e quantificação do método permitiram analisar os principais CCs (formaldeído, acetaldeído e furfural) em teores menores que seus Limites de Percepção Olfativa.
5. Soluções de 2,4-DNPH a 0,4% demonstraram derivatizar eficientemente os CCs nas matrizes estudadas, quando aplicadas em proporção de 1:5 (amostra:2,4-DNPH).
6. O uso do sistema gradiente de eluição com passagem das fases móveis A (MetOH/ACN/H₂O 74,5/0,5/25%) e B (MetOH 100%) possibilitou melhor separação dos CCs, principalmente daqueles de maior massa molar.
7. Foi observado que a estrutura molecular dos CCs e a posição do grupo funcional na cadeia possuem importante papel na formação dos ácidos hidroxialquilsulfônicos em vinhos. Constatou-se que os aldeídos alifáticos apresentam maior afinidade pelo bissulfito enquanto as cetonas alifáticas ou cíclicas e trans-alcenais formam adutos menos estáveis, sendo encontradas predominantemente na forma livre. Os resultados estão em concordância com os valores de K_d dos adutos estudados.

8. A dissociação do aduto AHAS para quantificação do CC deve ser feita em pH alcalino. A Análise de Componentes Principais (ACP) feita sobre a matriz de dados obtida com experimentos realizados em pH's 9, 10, 11, 12 e 13 revelou que a faixa de pH 10 a 11 é a mais apropriada para essa dissociação.
9. Entre os CCs identificados, o formaldeído, acetaldeído, butanal e hexanal foram considerados responsáveis pelo aroma primário do vinho por estarem presentes na uva. Eles foram encontrados tanto na uva quanto no vinho, no entanto, as concentrações de formaldeído e acetaldeído são maiores nos vinhos, indicando que eles podem também ser produzidos durante a fermentação ou envelhecimento.
10. O estudo da estabilidade das amostras de vinho branco e tinto revelou que a análise de CCs nestas amostras deve ser realizada em um período máximo de 48 horas após abertura das garrafas. A partir daí, as concentrações dos CCs sofrem modificação influenciada principalmente pela presença do oxigênio.
11. A rapidez, sensibilidade e confiabilidade do método, expressos pelos resultados dos testes empregados na validação, abrem a possibilidade de ser implantado em laboratórios de rotina de controle de qualidade de vinhos.

8. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

1. Identificar e quantificar os CCs desconhecidos encontrados nas amostras de uva e vinho utilizadas neste estudo e estabelecer, entre os CCs analisados, quais poderão ser considerados marcadores positivos ou negativos no aroma do vinho, através da análise olfatométrica.
2. Avaliar a possibilidade de associar determinados CCs à origem varietal de uvas viníferas e, dessa forma, tipificar os vinhos e/ou relacionar a descritores de aroma e processos oxidativos de degradação da bebida.
3. Desenvolver/adaptar metodologia analítica para quantificação dos CCs insaturados (trans-alcenais), importantes na composição aromática dos vinhos.
4. Desenvolver metodologia analítica específica para hexanal, uma vez que este aldeído é considerado indicador de maturação das uvas. A nova metodologia poderia ser adotada pelas vinícolas para garantir o momento correto de coleta dos frutos para vindima.

9. REPERCUSSÃO DO TRABALHO

9.1. ARTIGOS ACEITOS E SUBMETIDOS

Azevedo, L. C.; Reis, M. M.; da Silva, L. A.; de Andrade, J. B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova* (no prelo).

Azevedo, L. C.; Reis, M. M.; Motta, L. F.; Rocha, G. O.; da Silva, L. A.; de Andrade, J. B. Evaluation of the Formation and Stability of Hydroxyalkylsulfonic Acids in Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

9.2. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Azevedo, L. C.; Reis, M. M.; da Silva, L. A.; Rocha, G. O.; de Andrade, J. B.; Identificação de compostos carbonílicos em uvas viníferas. XXXRASBQ 2007.

Vieira, C. S.; Silva, T. F.; Reis, S. F.; Batista, C. S.; Azevedo, L. C.; Ramos, M. E. C.; Motta, L. F. Estudo da influência de alguns parâmetros sobre a percepção dos gostos básicos. XV ENAAL 2007.

Azevedo, L. C.; Reis, M. M.; da Silva, L. A.; de Andrade, J. B.; Motta, L. F. Estudo da interação entre sulfito e compostos carbonílicos em vinhos. XX CBCTA 2006.

Azevedo, L. C.; Santos, M. R.; da Silva G. J. G.; Mascarenhas, R. J.; Cavalcanti, M. E. R. Análise sensorial de produtos derivados do tamarindo (*Tamarindus indica* L.). XX CBCTA 2006.

Azevedo, L. C.; Reis, M. M.; da Silva, L. A.; de Andrade, J. B.; Motta, L. F. Avaliação da estabilidade dos ácidos hidroxialquilsulfônicos em vinhos, em diferentes pH's. XXIX RASBQ 2006.

Reis, M. M.; Azevedo, L. C.; da Silva, L. A.; de Andrade, J. B. Determinação de dez compostos carbonílicos de baixa e alta massas molares em vinho branco. XXVIII RASBQ 2005.

Azevedo, L. C.; Escobar, S. A. C.; Barbosa, A. L.; Lovatti, R. C. C. Determinação de componentes voláteis "não álcool" em aguardentes de frutas produzidas em laboratório. XIV ENAAL 2005.

Reis, M. M.; Azevedo, L. C.; da Silva, L. A.; de Andrade, J. B. Determinação de compostos carbonílicos de baixa e alta massas molares em amostras de vinho branco por CLAE. XXVII RASBQ 2004 e XXVI CLAQ.

Barbosa, J. M. S.; Lovatti, R. C. C.; Azevedo, L. C.; Pereira, P. A. P.; de Andrade, J. B. Determinação de capsaicinóides em pimenta de cheiro por CLAE-UV. XIX CBCTA 2004.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, v.86, p.169-180, 2003.
2. BONINO, M.; SCHELLINO, R.; RIZZI, C.; AIGOTTI, R.; DELFINI, C.; BAIOCCHI, C. Aroma compounds of an italian wine (Ruché) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chemistry*, v.80, p.125-133, 2003.
3. FERREIRA, V.; LOPEZ, R.; ESCUDERO, A.; CACHO, J. F. Quantitative determination of trace and ultratrace flavour active compounds in red wines through gas chromatographic-ion trap mass spectrometric analysis of microextracts. *Journal of Chromatography A*, v.806, p.349-354, 1998.
4. PEREIRA, E. A.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Laser-induced fluorescence and UV detection of derivatized aldehydes in air samples using capillary eletrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v.979, p.409-416, 2002.
5. DEMYTTENAERE, J. C. R.; DAGHER, C.; SANDRA, P.; KALLITHRAKA, S.; VERHÉ, R.; DE KIMPE, N. Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.985, p.233-246, 2003.
6. PEINADO, R. A.; MORENO, J.; BUENO, J. E.; MORENO, J. A.; MAURICIO, J. C. Compositive study of aromatic compounds in two Young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, p.585-590, 2004.
7. FALQUÉ, E.; FERNANDEZ, E.; DUBOURDIEU, D. Differentiation of White wines by their aromatic index. *Talanta*, v.54, p.271-281, 2001.
8. MACNEIL, K. *A Bíblia do Vinho*. 2.ed. Rio de Janeiro: Ediouro, 2003. 800p.
9. TOMASSET, L. U. *Química Enológica*. Madri: Ediciones Mundi-prensa, 1998. 400p.
10. MEISLICH, H.; NECHAMKIN, H.; SHAREFKIN, J. *Química Orgânica*. 2. ed. São Paulo: McGrawhill, 1994. 832p.
11. ESCUDERO, A.; ASENSIO, E.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Sensory and chemical changes of young white wine stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, v.77, p.325-331, 2002.
12. de ANDRADE, M. V. A.; CARVALHO, A. S.; de ANDRADE, J. B. Determinação de compostos carbonílicos atmosféricos, de alta massa molar, por CLAE. In: XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1998, Minas Gerais, Brasil.

13. de OLIVEIRA, A. E. & de ANDRADE, J. B. Determinação simultânea de formaldeído, acetaldeído e os respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos por CLAE. *Química Nova*, v.17, n.4, p.13-16, 1994.

14. MORRISON, R. & BOYD, R. *Química Orgânica*. 11.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gubenkian, 1994. 1638p.

15. SEGUNDO, M. A.; RANGEL, A. O. S. S. A gás diffusion sequential injection system for the determination of sulphur dioxide in wines. *Analytica Chimica Acta*, v. 472, p. 279-286, 2001.

16. NICOLAU, L. P.; REVEL, G.; BERTRAND, A.; MAUJEAN, A. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 9, p. 3761-3766, 2000.

17. PEREIRA, A. J; CAVALCANTE, M. A dose certa, *Revista Super Interessante*, fevereiro, p. 30-36, 2000.

18. REETZ, E. *Anuário Brasileiro da Uva e do Vinho 2004*, Santa Cruz do Sul: Ed Gazeta Santa Cruz, p.136, 2004.

19. WILLIAMS, P. *International Journal of Wine Marketing*, v. 13, n. 3, p. 42-60, 2001.

20. EMBRAPA UVA E VINHO. Produção e comercialização de uvas e vinhos – panorama 2005. Disponível em: <www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos>. Acesso em 05 jan. 2007.

21. ALIXANDRINO, M. Vinhos finos no sertão da Bahia. *Jornal A TARDE*. Salvador/BA, 07 set. 2003.

22. EMBRAPA SEMI-ÁRIDO. Banco de notícias da Embrapa Semi-árido, v.59, 2004.

23. GOVERNO DE PERNAMBUCO. Pólo do São Francisco já é o maior exportador de uva de mesa do país. Disponível em < www.pe.gov.br >. Acesso em: 06 jan. 2007.

24. REVISTA NEGÓCIOS AGRÍCOLAS. Um brinde ao novo pólo. Salvador: SEAGRI, ano VI, n. 25, novembro, p.30-34, 2003.

25. SELDON, P. *O mais completo guia sobre vinhos*. São Paulo: Ed. Mandarim, 2001.

26. ROSILLO, L.; SALINAS, M. R.; GARIJO, J.; ALONSO, G. L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis application to the differentiation of some vitis vinifera varieties. *Journal of chromatography A*, v.847, p.155-159, 1999.

27. FLANZY, C. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 1 ed., Ed. Mundi Prensa & A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid, Espana, 2000. 783p.
28. de ANDRADE, M. V. A. S.; PINHEIRO, H. L. C.; PEREIRA, P. A. P.; de ANDRADE, J. B. Compostos carbonílicos atmosféricos: fontes, reatividade, níveis de concentração e efeitos toxicológicos. *Química Nova*, v.25:6B, p.1117-1131, 2002.
29. NASCIMENTO, R. F.; MARQUES, J. C.; LIMA NETO, B. S.; KEUKELEIRE, D.; FRANCO, D. W. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, v.782, p.13-23, 1997.
30. de ANDRADE, J. B.; BISPO, M. S.; REBOUÇAS, M. V.; CARVALHO, M. L. S. M.; PINHEIRO, H. L. C. Spectrofluorimetric determination of formaldehyde in liquid samples. *American Laboratory*, v.57, 1996.
31. MORENO, M. V. G.; BARROSO, C. G. Comparison of the evolution of low molecular weight phenolic compounds in typical sherry wines: fino, amontilado, and oloroso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.7556-7563, 2002.
32. ZEA, L.; MOYANO, L.; MORENO, J.; CORTES, B.; MEDINA, M. Discrimination of the aroma fraction of sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chemistry*, v.75, p.79-84, 2001.
33. LAWS, D. R. J.; PEPPARD, T. L. The stability of flavour constituents in alcoholic beverages. *Food Chemistry*, v.9, p.131-146, 1982.
34. RIGAUD, D. J.; ISSANCHOU, S.; SARRIS, J.; LANGLOIS, D. Incident des composés volatiles issue du liège sur le goût de bouchon des vins. *Science Alli*. V.4, p.81-93, 1984.
35. LAMIKANRA, O.; GRIMM, C. C.; INYANG, I. D. Formation and occurrence of flavor components in Noble muscadine wine. *Food Chemistry*, v.56, n.4, p.373-376, 1996.
36. LEDAUPHIN, J. ; GUICHARD, H.; SAINT-CLAIR, J. F.; PICOCHÉ, B.; BARILLIER, D. Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.433-442, 2003.
37. MATEO, J. J.; JIMENEZ, M., Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, v.881, p.557-567, 2000.
38. OLIVA-TELES, M. T.; PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M. Determination of free formaldehyde in foundry resins as its 2,4-dinitrophenylhydrazone by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.467, p.97-103, 2002.

39. LEVART, A. & VEBER, M. Determination of aldehydes and ketones in air samples using cryotrapping sampling. *Chemosphere*, 44, 701-708, 2001.
40. CETESB/SP. Manual de produtos químicos perigosos. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/produto_consulta_nome.asp> Acesso em: 12/07/2006.
41. OSBORNE, J. P.; MIRA DE ORDUNA, R.; PILONE, G. J.; LIU, S. Q. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters*, v.191, p.51-55, 2000.
42. NOUGUER, T.; MARTY, J. L. An amperometric bienzyme electrode for acetaldehyde detection. *Enzyme Microbiology Technology*, v.17, p.453-456, 1995.
43. RIBEREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A. *Tratado de enologia. Microbiologia del vino*. Zaragoza, Espanha: MP Ediciones, 2003.
44. OSBORNE, J. P.; DUBÉ MORNEAU, A.; ORDUNA, R. M. Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic acid bacteria in white wine. *Journal of Applied Microbiology*, v.101, p.474-479, 2006.
45. IBRAVIN. Disponível em <<http://www.ibravin.org.br>> Padrões de Identidade e Qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho (de 24/04/1999). Acesso em: 02/11/2006.
46. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Regulamento técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02/11/2006.
47. ZOECKLEIN, B. W. et al. *Análisis y Producción de vino*. Zaragoza, Espanha: Ed. Acríbia, 2001. 613p.
48. ACADEMIA DO VINHO. A química do vinho. Disponível em: <www.academiadovinho.com.br/index.htm>. Acesso em: 14/03/2004.
49. YASUHARA, A.; SHIBAMOTO, T. Determination of volatile aliphatic aldehydes in the headspace of heated food Oliz by derivatization with 2-aminoethanethiol. *Journal of Chromatography A*, v.547, p.291-298, 1991.
50. UNIVERSITY OF AKRON. The chemical database. Disponível em: <<http://www.ull.chemistry.uakron.edu/erd/index.search>>. Acesso em: 14/08/2006.
51. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/idlh/intridl4.html>>. Acesso em: 14/08/2006.
52. ALCÁZAR, A.; JURADO, J. M.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, G.; MARTIM, M. J. HPLC Determination of 2-furfuraldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde in alcoholic beverages. *Microchemical Journal*, v.82, p.22-28, 2006.

53. LO COCO, F.; VALENTINI, C.; NOVELLI, V.; CECCON, L. Liquid chromatographic determination of 2-furfuraldehyde and 5-hydroxymethyl-furfuraldehyde in beer. *Analytica Chimica Acta*, v.306, p.57-64, 1995.
54. LO COCO, F.; VALENTINI, C.; NOVELLI, V.; CECCON, L. High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-furaldehyde in honey. *Journal of Chromatography A*, v.749, p.95-102, 1996.
55. PORRETTA, S.; SANDEI, L. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in tomato products: proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. *Food Chemistry*, p.51-57, 1991.
56. GRANADOS, J. Q.; VILLALÓN, M.; SERRANA, H. L.; MARTINEZ, M. C. L. The influence of added caramel on furanic aldehyde content of matured brandies. *Food Chemistry*, v.56, n.4, p.415-419, 1996.
57. SCHULTHEISS, J.; JENSEN, D. & GALENSA, R. Determination of aldehyde in food by HPLC with biosensor coupling and micromembrane suppressors. *Journal of Chromatography A*, v.880, p.233-242, 2000.
58. GRANADOS, J. Q.; VILLALÓN, M.; SERRANA, L. G. & MARTINEZ, M. C. L. Comparison of spectrophotometric and chromatographic methods of determination of furanic aldehydes in wine distillates. *Food Chemistry*, v.52, p.203-208, 1995.
59. XEREZ. In: *DICCIONARIO Esencial Lengua Española*. Barcelona, Spain: SPES Editorial, 2001. 870p.
60. LOPEZ, R.; AZNAR, M.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v.966, p.167-177, 2002.
61. SANCHES-SILVA, A.; QUIRÓS, A. R. B.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P. Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1046, p.75-81, 2004.
62. ROWE, D. Aldehydes. Aliphatic, unsaturated, acetals, aromatics and more. *Perfumer & Flavorist*, v.30, n.4, p.20-27, 2005.
63. CULLERÉ, L.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Analyses for wine C5-C8 aldehydes through the determination of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge. *Analytica Chimica Acta*, v.524, p.201-206, 2004.
64. FERREIRA, V.; CULLERE, L.; LOPEZ, R.; CACHO, J. Determination of important odor-active aldehydes of wine through gas chromatography-mass

spectrometry of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge used for selective isolation. *Journal of Chromatography A*, 2003.

65. SPLENDOR, F. *Vinhos, degustação e serviço, saúde, enoturismo. Licores. Coleção hotelaria*. Caxias do Sul/RS: Editora EDUCS, 2003. 387p.

66. FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, v.86, p.11-22, 2003.

67. PRIPIS-NICOLAU, L.; REVEL, G.; BERTRAND, A.; MAUJEAN, A. Formation of flavour components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.9, 2000.

68. SAUVAGEOT, N.; GOUFFI, K.; LAPLACE, J. M.; AUFRAY, Y. Glycerol metabolism in *Lactobacillus colinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology*, v.55, p.167-170, 2000.

69. PEINADO, R. A.; MORENO, J.; BUENO, J. E.; MORENO, J. A.; MAURICIO, J. C. Composite study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, p.585-590, 2004.

70. GARCIA, J. M.; GONZALEZ, M.B.; VIGUERA, A. R. G. Influencia del origen del roble en la modificación de la composición aromática de los vinos durante la crianza. *Enólogos*, v. 40, 2006.

71. PUGLISI, C. J.; ELSEY, G. M.; PRAGER, R. H.; SKOUROUMOUNIS, G. K.; SEFTON, M. A. Identification of a precursor to naturally occurring β -damascenone. *Tetrahedron Letters*, v.42, p.6937-6939, 2001.

72. GIRARD, B.; YUKSEL, D.; CLIFF, M. A.; DELAQUIS, P.; REYNOLDS, A. G. Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Research International*, v.34, p.483-499, 2001.

73. FERREIRA, V.; HERNANDEZ-ORTE, P.; ESCUDERO, A.; LÓPEZ, R.; CACHO, J. Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, v.864, p.77-88, 1999.

74. ESCALONA, H.; BIRKMYRE, L.; PIGGOT, J. R.; PATERSON, A. Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. *Analytica Chimica Acta*, v.458, p.45-54, 2002.

75. CARRETÉ, R.; VIDAL, M. T.; BORDONS, A.; CONSTANTINI, M. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters*, p.155-159, 2002.

76. CANAS, S.; QUARESMA, H.; BELCHIOR, A. P.; SPRANGER, M. I.; BRUNO-DE-SOUZA, R. Evaluation of wine brandies authenticity by the relationships between benzoic and cinnamic aldehydes and between furanic aldehydes. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, v.19, n.1, p.13-27, 2004.
77. . Disponível em: <http://santome.com.br/textos/proc_fabri.pdf> Acesso em: 15/08/2005.
78. CACHO, J. Estudio comparativo del perfil volátil del vino tinto durante su crianza en barricas de roble. *Ace Revista de Enología*. Disponível em: <http://www.acenologia.com/ciencia60_1.htm>. Acesso em: 04/11/2006.
79. VALLY, H.; THOMPSON, P. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Journal Addiction Biology*, v.8, p.3-11. 2003.
80. Disponível em: <www.asma.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfito>. Acesso em: 07/12/2006.
81. ARAÚJO, C. S. T.; de CARVALHO, J. L.; MOTA, D. R.; de ARAÚJO, C. L.; Coelho, N. M. M. Determination of sulphite and acetic acid in foods by gas permeation flow injection analysis. *Food Chemistry*, v. 92, p.765-770. 2005.
82. MARTINS, C. R.; de ANDRADE, J. B. Química atmosférica do enxofre (IV): emissões, reações em fase aquosa e impacto ambiental. *Química Nova*, v. 25, n.2, p.259-272, 2002.
83. BARBE, J. C.; REVEL, G.; JOYEUX, A.; LONVAUD-FUNEL, A.; BERTRAND, A. Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v.48, p.3413-3419. 2000.
84. LEA, A. G. H.; FORD, G. D.; FOWLER, S. Analytical techniques for the estimation of sulphite binding components in cider and wines. *International Journal of Food Science and Technology*, v.35, p.105-112. 2000.
85. ANCIN, C.; GARDE, T.; TORREA, D.; JIMENEZ, N. Extraction of volatile compounds in model wine from different oak woods: effect of SO₂. *Food Research International*, v.37, p.375-383, 2004.
86. MUNGER, J. W.; JACOB, D. J.; HOFFMANN, M. R. The occurrence of bisulfite-aldehyde addition products in fog and cloudwater. *Journal Atmospheric Chemistry*, v.1, p.335-350. 1984.
87. OLTMANN, P.; COPPOCK, R. W.; LILLIE, L. E.; MOORE, J. W. Solid phase extraction of acrolein 2,4-dinitrophenylhydrazone for HPLC analysis. *Water Research*, v.22, n.9, p.1143-1145, 1988.
88. ZUREK, G.; BULDT, A.; KARST, U. Determination of acetaldehyde in tobacco smoke using n-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofuran and liquid

chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.864, n.2, p.191-197, 1999.

89. VELOSO, M. C. C. Determinação de Ácidos Graxos e Compostos Orgânicos Voláteis em Peixes. 2005. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia.

90. de ANDRADE, J.B.; PINHEIRO, H. L. C.; de ANDRADE, M. V. A. S. Atmospheric levels of formaldehyde and acetaldehyde and their relationship with the vehicular fleet composition in Salvador, BA, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.9, n.3, p.219-223. 1998.

91. de ANDRADE, J.B.; PINHEIRO, H. L. C.; de ANDRADE, M. V. A. S. The formaldehyde and acetaldehyde content of atmospheric aerosol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.3, p.287. 1995.

92. de ANDRADE, J. B.; REIS, J. O. N.; REBOUÇAS, M. V.; PINHEIRO, H. L. C.; de ANDRADE, M. V. *Química Analítica*, v. 15, p.144-147. 1996.

93. VELOSO, M.C.C.; SILVA, V.M.; SANTOS, G.V.; de ANDRADE, J.B. Determination of aldehydes in fish by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Chromatography Science*, v.39, p.173-176. 2001.

94. SILVA, V.M.; VELOSO, M.C.C.; SOUSA, E.T.; SANTOS, G.V.; ACCIOLY, M.C.; PEREIRA, P.A.P.; de ANDRADE, J.B. Determination of 11 low-molecular-weight carbonyl compounds in marine algae by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography Science*, v.44, p.233, 2006.

95. LEDAUPHIN, J.; BASSET, B.; COHEN, S.; PAYOT, T.; BARILLIER, D. Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac: carbonyl and sulphur compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, p.28-40. 2006.

96. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Editora Bookman, 5.ed., 2002.

97. ZUREK, G.; KARST, U. Liquid chromatography/ mass spectrometry for the determination of aldehydes derivatized by Hantzsch reaction. *Journal of Analytical Chemistry*, v.366, n.4, p.396-399, 2000.

98. UCHIYAMA, S.; ANDO, M. & AOYAGIO, S. Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, v.1015, p.143-150, 2003.

99. KLEBER, R. J.; MOPPER, K. Determination of picomolar concentrations of carbonyl compounds in natural waters, including seawater, by liquid chromatography. *Environmental Science Technology*, v.24, n.10, p.1477-1481, 1990.

100. GENG, A. C.; CHEN, Z. L.; SIU, G. G. Determination of low-molecular-weight aldehydes in stack gas and automobile exhaust gas by liquid chromatographic. *Analytica Chimica Acta*, v.257, p.99-104, 1992.
101. GROSJEAN, E.; GROSJEAN, D. Liquid chromatographic analysis of C1-C10 carbonyl. *Analytical Chemistry*, v.61, p.47-64, 1995.
102. HO, P.; HOGG, T. A.; SILVA, M. C. M.; Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food Chemistry*, v.64, p.115-122, 1999.
103. de ANDRADE, J. B.; BRAVO, R. V. F. Análise de aldeídos em bebidas alcoólicas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência para cursos de graduação. *Química Nova*, v.12, n.2, p.196-198, 1989.
104. NASCIMENTO, R. F.; CERRONI, J. L.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.3, p.350-355, 1998.
105. de ANDRADE J B ; TANNER, R. L. . Determinação de Formaldeído por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Sob Forma de 2,4 Dinitrofenilhidrazona) após Coleta em Filtros Impregnados com Bissulfito. In: 13a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1990, Caxambu-MG. Proceedings, 1990.
106. de ANDRADE, J. B.; TANNER, R. L. Determination of formaldehyde by HPLC as the DNPH derivative following high-volume air sampling onto bisulfite-coated cellulose filters. *Atmospheric Environmental*, v.26A, p.819-825. 1992.
107. CARVALHO, A. B. *Compostos carbonílicos em ambiente de carvoaria*. 2005. 285 f. Tese (Doutorado em Ciência em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia-UFBA, Salvador, Bahia, Brasil.
108. SILVA, V. M. *Determinação de compostos voláteis em algas e peixes marinhos*. 2006. 130 f. Tese (Doutorado em Ciência em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia-UFBA, Salvador, Bahia, Brasil.
109. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução n. 475. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília, DF. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 27/02/2006.
110. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, J. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

111. INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008, março, 2003.
112. SOARES, M. L. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.60, n.1, p.79-84, 2001.
113. SWARTZ, M. E.; KRUUL, J. S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, p.12-20, 1998.
114. FLAMINI, R. Some advances in the knowledge of grape, wine and distillates chemistry as achieved by mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, v.40, p.705-713. 2005.
115. PERESTRELO, R.; FERNANDES, A.; ALBUQUERQUE, F. F.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: identification of the main odorants compounds. *Analytical Chemistry Acta*, v.563, p.154-164. 2006.
116. CÂMARA, J. S.; ALVES, M. A.; MARQUES, J. C. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta*, v.68, p.1512-1521. 2006.
117. PROGRAMA UNSCRUMBLER VERSION 7.6: CAMO ASA. Oslo, Norway, 1996.
118. UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA SAEG, UFV. *Sistema de análises estatísticas e genéticas* versão 8.1, Viçosa, MG, 2000.
119. BURROUGHS, L. F.; SPARKS, A. H. Sulphite binding power of wines and ciders. I Equilibrium constants for the dissociation of carbonyl-bisulfite compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.24, p.187-198. 1973b.
120. MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e soluções*. Ed. Edgard Blucher LTDA, São Paulo, 1988.
121. VOGEL. *Análise Química Quantitativa*. Ed. LTC, 5.ed., Rio de Janeiro, 1992. 711p.
122. RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C.; MIELE, A. Evolução da acidez durante a vinificação de uvas tintas de três regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.2, Campinas, maio/junho, 1998.
123. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria n. 371, de 18 de setembro de 1974. Complementação de Padrões de Identidade e Qualidade para vinhos. Brasília, DF.
124. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Complementação de Padrões de Identidade e Qualidade para vinhos. Brasília, DF.

125. Disponível em: www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq, acessado em 28/04/2007.

126. FILHO, WALDEMAR, G. V. *Tecnologia de Bebidas*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 484p.

127. LEITE, F. *Validação em análise química*. Campinas: Ed. Átomo, 4.ed., 2002. 278p.

128. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNUS, R. E. *Como fazer experimentos*. Campinas/SP: Ed. Unicamp, 2. ed., 2002.

129. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry*, v.74, n.5, p.835-855, 2002.

130. GARFIELD, F. M. *Quality assurance principles for analytical laboratories*. 3.ed., Arlington. AOAC International, 1991, 196p.

131. BASTOS, D.H.M.; FRANCO, M.R.B.; DA SILVA, M.A.A.P.; JANZANTTI, N.S.; MARQUES, M.O.M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.2, p.122-129, 2002.

132. LEITHOLD, L. *O cálculo com geometria analítica*. Ed. Harbra, 2.ed., v.1, São Paulo, 1982. 526p.

133. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. Ed. LTC, v. 2, 8 ed., 2006. 588p.

134. BURROUGHS, L. F.; SPARKS, A. H. Determining free sulfur dioxide in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 26:25-29. 1975.

135. BURROUGHS, L. F.; SPARKS, A. H. The identification of sulfur dioxide-binding compounds in apple juices and ciders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.15, p.176-185. 1964.

136. BURROUGHS, L. F.; SPARKS, A. H. Sulphite binding power of wines and ciders. III Determination of carbonyl compound in a wine and calculation of its sulphite binding power. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.24, p.207-217. 1973^a.

137. CERDAN, T. G.; GONI, D. T.; AZPILICUETA, C. A.; Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition. *Journal of Food Engineering*, v.65, p.349-356, 2004.

138. HIDALGO, L. *Tratado de viticultura general*. 3.ed., Ed. Mundi Prensa, Madrid, Espana, 2002. 1235p.

139. BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A.; Perfil sensorial de vinhos brancos varietais brasileiros através de análise descritiva qualitativa. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, v.20, n.1, 2000.
140. HOFFMANN, L.D.; BRADLEY, G. L. *Cálculo, um curso moderno e suas aplicações*. LTC Editora, 6.ed., Rio de Janeiro, 1999. 600p.
141. LUBISCO, N.M.L.; VIEIRA, S.C. *Manual de estilo acadêmico. Monografias, Dissertações e Teses*, Salvador: EDUFBA, 2002. 132p.
142. OLSON, T.; HOFFMANN, M. R. Hydroxyalkylsulfonate formation: its role as a S(IV) reservoir in atmospheric water droplets. *Environmental Engineering Science*, 1988.