



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Amanda Tavares

Desenvolvimento de metodologia para determinação de 3-alkil-2-metoxipirazinas em amostras de vinho empregando a técnica de microextração em fase sólida pelo modo headspace e cromatógrafo gasoso acoplado com detector de nitrogênio-fósforo

Florianópolis
2020

Amanda Tavares

Desenvolvimento de metodologia para determinação de 3-alkil-2-metoxipirazinas em amostras de vinho empregando a técnica de microextração em fase sólida pelo modo headspace e cromatógrafo gasoso acoplado com detector de nitrogênio-fósforo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Química.
Orientador: Prof. Luciano Vitali, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tavares, Amanda

Desenvolvimento de metodologia para determinação de 3 alquil-2-metoxipirazinas em amostras de vinho empregando a técnica de microextração em fase sólida pelo modo headspace e cromatógrafo gasoso acoplado com detector de nitrogênio fósforo. / Amanda Tavares ; orientador, Luciano Vitali, 2020.

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. 3-alkyl-2-methoxypyridazine. 3. wine. 4. off-flavor. 5. HS/SPME-GC/NPD. I. Vitali, Luciano. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

Amanda Tavares

Desenvolvimento de metodologia para determinação de 3-alkil-2-metoxipirazinas em amostras de vinho empregando a técnica de microextração em fase sólida pelo modo headspace e cromatógrafo gasoso acoplado com detector de nitrogênio-fósforo

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - CFM

Prof. Eduardo Carasek da Rocha, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - CFM

Prof^a. Vivian Maria Burin, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina - CCA

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química.

Prof. Marcus Cesar Mandolesi Sá, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof. Luciano Vitali, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar é aproximar-se de Deus.”

Pitágoras, filósofo e matemático grego nascido em 570 a.C

“Eu sou o caminho, a verdade e a vida; ninguém vem ao Pai, se não por mim.”

Jesus Cristo

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur, cientista francês nascido em 1822 d.C

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à Deus pelo suspiro de vida diário e por ter me dado tantas oportunidades e alegrias como também sabedoria para enfrentar diversas situações!

Ao meu querido Carlos, por me acompanhar durante esta jornada com muito amor e por me dar suporte em muitas situações.

Ao meu professor orientador Luciano Vitali, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela orientação e atenção nos momentos essenciais.

À minha família que estiveram presentes nesta etapa tão importante dando incentivo nos momentos difíceis.

À UFSC, por conceder o espaço físico e as condições necessárias para realização de todas as atividades do mestrado.

Aos professores que me auxiliaram através de apoio e conhecimento durante este período de grande desenvolvimento acadêmico.

RESUMO

Neste trabalho foi proposto a utilização da técnica de microextração em fase sólida pelo modo *headspace* (HS/SPME) para a determinação de 3-alquil-2-metoxipirazinas em vinhos latino-americanos. Os analitos selecionados foram a 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP), 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP), 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP) e a 2-metoxipirazina (2-MP). As otimizações dos principais parâmetros que afetam a eficiência de extração da técnica de preparo de amostra foram realizadas de forma univariada e multivariada. As condições ótimas de extração para o método incluem fibra composta por PDMS/Car/DVB, razão de diluição 1:3, força iônica de 30 % ($m v^{-1}$) de cloreto de sódio, tempo de extração 30 min, temperatura de extração 35 °C, tempo de dessorção 5 min e temperatura de dessorção 250 °C. A extração dos analitos ocorreu em um frasco de 40 mL, sendo 20 mL da amostra, sob temperatura e agitação controlada, e após o período de exposição da fibra no *headspace*, esta foi injetada manualmente em um cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de nitrogênio-fósforo (GC/NPD) para que os analitos fossem separados e identificados. O método desenvolvido foi validado e apresentou coeficientes de determinação superiores a 0,993 para todos os analitos estudados, os valores de limite de detecção (LOD) foram de 6 a 31 $ng L^{-1}$ e os limites de quantificação (LOQ) foram de 20 a 103 $ng L^{-1}$. Os ensaios de recuperação apresentaram valores na faixa de 98 a 116 % e o desvio padrão relativo (RSD) das precisões (intra-dia e inter-dia) variaram entre 0,6 a 15 %. O nível de concentração em $ng L^{-1}$ alcançado para as 3-alquil-2-metoxipirazinas caracterizam o método como eficiente para a determinação deste *off-flavor* no vinho, ou seja, de compostos em quantidades prejudiciais ao aroma. Dos 9 vinhos analisados, em 3 havia ETMP quantificável, e em 6 havia a presença de IBMP quantificável, sendo os valores muito acima do limite de percepção sensorial, gerando assim *off-flavor* no aroma e sabor indicando que a qualidade sensorial desses vinhos é baixa. Os demais vinhos apresentaram valores inferiores aos limites de detecção e quantificação da técnica. Este método desenvolvido pode ser empregado para estudos futuros de vinhos latino-americanos afim de entender por que os níveis de ETMP e IBMP são altos em alguns vinhos e correlacionar com fatores climáticos ou até contaminação de insetos nos vinhos produzidos aqui, principalmente em Santa Catarina - Brasil, a fim de melhorar a qualidade dos mesmos para entrar no mercado com melhor valor agregado.

Palavras-chave: 3-alquil-2-metoxipirazinas. Vinhos. Off-flavor. HS/SPME. GC/NPD.

ABSTRACT

This work proposes the use of the Headspace Solid Phase microextraction (HS/SPME) technique for the determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in Latin American wines. The analytes selected were 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP), 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP), 3-ethyl-2-methoxypyrazine (ETMP) and the 2-methoxypyrazine (2-MP). The optimization of the main parameters that affect the extraction efficiency of the sample preparation technique was performed in a univariate and multivariate way. The optimal extraction conditions for this method include a fiber composed by PDMS/Car/DVB, a dilution ratio of 1:3, ionic strength of 30 % (m v^{-1}) of sodium chloride, extraction time of 30 min, extraction temperature of 35 °C, desorption time of 5 min and desorption temperature of 250 °C. The analytes extraction was performed in a 40 mL flask containing 20 mL of sample, under controlled temperature and stirrer. After the headspace fiber exposition period, it was manually injected into a gas chromatographer coupled to a nitrogen-phosphorus detector (GC/NPD) where the analytes were separated and identified. The developed method was validated and showed determination coefficients higher than 0.993 for all analytes, the limits of detection (LOD) ranged from 6 to 31 ng L^{-1} and the limits of quantification (LOQ) ranged from 20 to 103 ng L^{-1} . The recoveries presented values ranging from 98 to 116 % and the relative standard deviation (RSD) for the precisions (intra-day and inter-day) ranged from 0.6 to 15 %. The achieved concentration level of ng L^{-1} for 3-alkyl-2-methoxypyrazines characterizes an efficient method for this *off-flavor* determination in the wine, that is, compounds in amounts unfavorable to the aroma. From the 9 analyzed wines, in 3 there was a quantifiable ETMP, and in 6 there was the presence of quantifiable IBMP, the values being well above the sensory limit, thus generating *off-flavor* in the aroma and flavor indicating that the sensory quality of these wines is low. The other wines presented values below the limits of detection and quantification of this technique. The method developed can be used for future studies of Latin American wines in order to understand why the levels of ETMP and IBMP are high in some wines and to correlate it with climatic factors or even insect contamination in wine production here, mainly in Santa Catarina State, Brazil, in order to improve their quality to enter the market with better added value.

Keywords: 3-alkyl-2-methoxypyrazines. Wines. Off-flavor. HS/SPME. GC/NPD.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas do processo para elaboração do vinho tinto da EMBRAPA..... 18
- Figura 2.** Estrutura dos compostos 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP), 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP), 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP) e 2-metoxipirazina (2-MP). 23
- Figura 3.** Uso do *holder* de SPME para o processo de extração e dessorção do material extraído para análise por GC. 37
- Figura 4.** Sistema para o preparo de amostra HS/SPME. Legenda da imagem: 1 - Agitador magnético, 2 – Cella de vidro conectada com mangueiras ao banho termostaticado, 3 – Frasco de vidro de SPME com amostra, 4 – *Holder* com a fibra no HS do frasco da amostra, 5 – Termômetro, 6 – Banho termostaticado. 48
- Figura 5.** Separação dos padrões analíticos com a coluna HP-5 (injeção direta de 1 μL de 3 mg L^{-1} de solução das MPs em etanol): 1 – Etanol (3,02 min), 2 – I.S. (5,03 min), 3 – 2-MP (7,13 min), 4 – ETMP (9,19 min), 5 – IPMP (9,60 min), 6 – SBMP (10,54 min) e 7 – IBMP (10,69 min). 54
- Figura 6.** Gráfico com a correlação das áreas normalizadas das MPs com as diferentes fibras comerciais, empregando a razão de diluição 1:1 da amostra de vinho..... 58
- Figura 7.** Gráfico com a correlação das áreas normalizadas da razão MP/I.S. com as diferentes razões de diluições da matriz da amostra de vinho (Sem diluição, 1:1, 1:2, 1:3), mantendo a concentração das MPs constante nas amostras. 60
- Figura 8.** Superfícies de resposta obtidas através do planejamento composto central e das médias geométricas das áreas das 5 MPs. Elaborado no *software Statistica*[®] 13.0 a partir dos dados da otimização para temperatura, tempo de extração e % de NaCl..... 62
- Figura 9.** Cromatograma obtido após a extração pelo método HS/SPME-GC/NPD otimizado do vinho base utilizado na validação do método. (a) Matriz de vinho fortificada com 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ das cinco MPs. (b) Matriz de vinho sem adição de padrões de MPs. Os cromatogramas estão em mesma escala. Legenda: 1 – I.S. (5,1 min), 2 – 2-MP (7,2 min), 3 – ETMP (9,2 min), 4 – IPMP (9,6 min), 5 – SBMP (10,5 min), 6 – IBMP (10,7 min), 7, 8 e 9 – Interferentes (10,23, 12,95 e 13,42 min)..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros vitícolas em relação ao impacto do acúmulo de MP nas uvas.....	26
Tabela 2. Estudos de MPs em vinhos na literatura.	33
Tabela 3. Comparação de parâmetros do método de HS/SPME para análise de vinhos da literatura.....	39
Tabela 4. Planejamento do composto central para a otimização da temperatura de extração, tempo de extração e % de NaCl adicionado a amostra.....	50
Tabela 5. Parâmetros de separação cromatográfica das MPs e I.S. para o método HS/SPME-GC/NPD.	55
Tabela 6. Porcentagem de etanol na amostra em cada razão de diluição.	60
Tabela 7. Figuras de mérito do método otimizado para a determinação de IBMP, SBMP, IPMP, ETMP, 2-MP por HS/SPME-GC/NPD.	65
Tabela 8. Dados experimentais dos vinhos analisados empregando o método HS/SPME-GC/NPD.	68
Tabela 9. Valor de atividade odorífera (OAV) da ETMP e IBMP nos vinhos analisados.....	69
Tabela 10. Comparação de métodos de análise de MPs em vinhos.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2M35DP – 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina

2-MP – 2-metoxipirazina

AOAC – do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

CAR/PDMS – Polidimetilsiloxano/Carboxen

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

DMMP – 2,5-dimetil-3-metoxipirazina

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ETMP – 3-etil-2-metoxipirazina

ETEP – 3-etil-2-etoxipirazina

EUA – Estados Unidos da América

EVA – etileno acetato de vinila, do inglês *Ethylene-Vinyl Acetate*

GC – Cromatografia à gás, do inglês *Gas Chromatography*

GC/MS – Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

GC-MS/MS – Cromatografia à Gás acoplada à espectrometria de massas operando no modo *tandem*, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*

GCxGC-TOF-MS – Cromatografia à gás abrangente bidimensional, acoplada à espectrometria de massa no modo de tempo de voo, do inglês *two-dimensional comprehensive Gas Chromatography, coupled to Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

GC-QTOF-MS/MS – Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massa *tandem* no tempo de voo quadrupolo, do inglês *Gas Chromatography Quadrupole Time-Of-Flight accurate tandem Mass Spectrometry*

GC/NPD – Cromatografia à gás acoplada ao detector de nitrogênio-fósforo, do inglês *Gas Chromatography coupled to Nitrogen-Phosphorus Detector*

HP-5 – Coluna cromatográfica composta por (5%-fenil)-metilpolisiloxano

HS - do inglês *Headspace*

HSSE – Extração sortiva por headspace, do inglês *Headspace Sorptive Extraction*

HS/SPME – Microextração em fase sólida pelo modo headspace, do inglês *Headspace Solid Phase Microextraction*

IBMP – 3-isobutil-2-metoxipirazina

IPEP – 3-isopropil-2-etoxipirazina

IPMP – 3-isopropil-2-metoxipirazina

I.S. – Padrão interno, do inglês *Internal Standard*

LLE – Extração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MDGC–MS – Cromatografia à gás multidimensional acoplada à espectrometria de massa, do inglês *Multidimensional Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*

MIB – 2-metilisborneol

MP – 3-alkil-2-metoxipirazinas

MS – Espectrômetro de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NPD – Detector de nitrogênio-fóforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detector*

OAV – Valor de atividade odorífera, do inglês *Odor Activity Value*

OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho do inglês, do inglês *International Organisation of Vine and Wine*

PAC – carvão ativado em pó, do inglês *Powdered Activated Carbon*

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS/Car/DVB – Polidimetilsiloxano/Carboxen/Divinilbenzeno

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno

pH – Potencial hidrogeniônico

QuEChERS – Método de extração em fase sólida baseado nos conceitos do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*

RR – Recuperação relativa

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

SBMP – 3-sec-butil-2-metoxipirazina

SBSE – Extração sortiva em barra de agitação, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

TCA - 2,4,6-tricloroanisol

VOC – Compostos orgânicos voláteis, do inglês *Volatile Organic Compound*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	VITIVINICULTURA	16
2.1.1	Histórico do consumo do vinho	16
2.1.2	Processo de elaboração do vinho	18
2.1.3	Comércio de vinhos	19
2.2	QUALIDADE DOS VINHOS	21
2.2.1	<i>Off-flavor</i>: 3-alkil-2-metoxipirazinas (MPs).....	23
2.2.1.1	<i>Parâmetros que influenciam o teor de MPs nos vinhos</i>	<i>25</i>
2.2.1.2	<i>Remoção das MPs do vinho</i>	<i>30</i>
2.3	MÉTODOS DE ANÁLISE DAS MPs NO VINHO	32
2.3.1	Preparo de amostra: microextração em fase sólida pelo modo headspace	36
2.3.2	Instrumentação para análise	41
2.3.3	Validação de métodos	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	METODOLOGIA.....	45
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	45
4.2	AMOSTRAS DE VINHO	45
4.3	MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO.....	46
4.3.1	Condições cromatográficas	46
4.4	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO HS/SPME-GC/NPD	47
4.4.1	Otimizações univariadas	48
4.4.1.1	<i>Seleção da fibra.....</i>	<i>48</i>
4.4.1.2	<i>Ensaio de diluição</i>	<i>49</i>
4.4.2	Otimização multivariada	49
4.4.3	Método HS/SPME-GC/NPD otimizado	51

4.5	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DO MÉTODO	51
4.6	PROGRAMAS UTILIZADOS NA ANÁLISE DOS DADOS	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS MP _s POR GC/NPD	53
5.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO HS/SPME-GC/NPD	57
5.2.1	Seleção da fibra	57
5.2.2	Diluição da amostra.....	59
5.2.3	Otimização multivariada	61
5.3	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DO MÉTODO	63
5.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE VINHO.....	67
5.5	COMPARAÇÃO DO MÉTODO COM A LITERATURA	71
6	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A – Dados da otimização multivariada.....	83
	APÊNDICE B – Curva de calibração das MP_s com correção pelo I.S.....	84

1 INTRODUÇÃO

O estudo das 3-alkuil-2-metoxipirazinas (MPs) é muito amplo no contexto da viticultura e enologia devido a sua influência na qualidade dos vinhos. Essa influência provém do fato das MPs serem possíveis causadoras de *off-flavor*; o qual é um defeito organoléptico do vinho devido ao aroma pronunciado de compostos que geram odores indesejáveis e sabor desagradável ao vinho, sendo este um fator que prejudica a qualidade do vinho (ROUJOU DE BOUBÉE et al., 2002).

Quando as MPs estão presentes em níveis acima do limite de percepção sensorial no vinho, estas podem causar rejeição dos produtos pelos consumidores. Muitos estudos já foram feitos a respeito deste tema desde a década de 90 até hoje com diferentes objetivos, desde a investigação de possíveis fontes de causa dos mesmos no vinho, até mesmo estudos de como remover estes compostos do vinho.

A motivação para o presente trabalho foi decorrente de algumas observações feitas por professores da área de fitotecnia da UFSC através de suas experiências olfativas com vinhos brasileiros. O aroma desagradável de certos vinhos pode ser decorrente da presença de MPs, de acordo com a percepção sensorial dos professores. Esta possibilidade existe, já que estudos feitos anteriormente em vinhos de outros países apresentaram resultados reveladores sobre a concentração das MPs, e este assunto ainda vem sendo estudado nos últimos anos (FONTANA; RODRÍGUEZ; CELA, 2017; WEN et al., 2018).

Várias fontes já foram estudadas a respeito da presença das MPs no vinho, como a produção endógena pela uva que depende de variáveis geoclimáticas e de cultivo ou até mesmo pela contaminação por insetos que podem ser inseridos inadvertidamente durante a vinificação do vinho. Nesse contexto, o desenvolvimento de um método de quantificação para o estudo das MPs é o primeiro passo para iniciar a avaliação da qualidade dos vinhos, pois permite identificar estes compostos. Posteriormente, é possível empregar o método para desenvolver estudos acerca de possíveis fatores que podem estar causando este defeito organoléptico nos vinhos estudados como também estudar formas de remover ou diminuir a formação destes compostos, a fim de aperfeiçoar a qualidade do mesmo para que os produtores locais ganhem espaço no mercado mundial do vinho.

Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um método para a determinação das MPs em amostras comerciais de vinhos latino-americanos, que inclui a etapa de preparo de amostra usando microextração em fase sólida pelo modo *headspace*

(HS/SPME). Essa técnica utiliza uma fibra contendo um material sorvente que é capaz de interagir com os analitos voláteis que estão no *headspace*, e com isso os separa de outros compostos da matriz e também protege a fibra extratora devido à alta complexidade da matriz. Além disso, esta técnica tem recebido destaque nos estudos das MPs em vinhos por ser miniaturizada, com alto poder de pré-concentração, que não utiliza solvente e consome um baixo volume de amostra (BOTEZATU; PICKERING, 2015; HJELMELAND; WYLIE; EBELER, 2016; PONS et al., 2018; SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015). Este preparo de amostra permite a inserção direta da fibra com os compostos extraídos da matriz do vinho no injetor do cromatógrafo gasoso, e o uso do detector de nitrogênio e fósforo (NPD) permite uma alta sensibilidade para as MPs, pois estas contêm nitrogênio na sua estrutura. Essa combinação possibilita que o método seja muito eficiente para alcançar níveis de concentração em ng L^{-1} , além da menor manipulação da amostra em relação a outras técnicas de preparo de amostra. No desenvolvimento do método HS/SPME-GC/NPD serão feitas otimizações de alguns parâmetros relativos ao preparo de amostra a fim de obter a melhor condição de extração das MPs de um vinho, como também a validação do método através da avaliação de parâmetros analíticos de mérito que definem sua eficiência na quantificação das MPs. O método validado será empregado para determinar a concentração de: 3-Isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP), 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP), 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP) e 2-metoxipirazina (2-MP) em diferentes amostras de vinho para avaliar a qualidade dos mesmos frente a estes *off-flavors*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VITIVINICULTURA

A vitivinicultura é uma atividade que engloba desde o processo de cultivo da uva nos vinhedos até a vinificação da uva nas vinícolas, onde é realizada a elaboração do vinho pela fermentação do mosto da uva.

O vinho é uma bebida histórica consumida há milênios. Com isso, foram desenvolvidas muitas variedades de cultivares em diferentes regiões geográficas, conferindo características muito específicas para cada vinho produzido. Sendo o mercado mundial de vinhos muito competitivo, a qualidade dos vinhos requer uma grande atenção.

2.1.1 Histórico do consumo do vinho

O hábito do ser humano de consumir o vinho é muito antigo, pois há estudos que indicam que o cultivo de videiras para a produção de vinho teve origem antes de 4000 aC, possivelmente já em 6000 aC na Europa e no Oriente Médio (UNWIN, 1991), logo, a videira é a espécie frutífera considerada mais antiga domesticada, devido ao grande número de registros feitos pelas antigas civilizações mundiais. Em relação ao desenvolvimento da videira, a espécie *Vitis labrusca* se desenvolveu no continente americano e a espécie *Vitis vinifera* desenvolveu-se na Europa, na Ásia e na região entre esses dois continentes (JACKSON, 2008; INGLEZ DE SOUZA, 1996).

Exemplos das cultivares *Vitis labrusca* tintas são a *Isabel* e *Bordô* e brancas são *Niágara* e *Concord*, as quais são utilizadas no Brasil, principalmente, para a fabricação de vinhos de mesa, sucos, geléias e também para consumo *in natura*. As cultivares *Vitis vinifera*, também chamadas de européias, são as mais difundidas em todo o mundo, apresentando grande importância econômica nos principais países produtores. Dentre as cultivares mais conhecidas, podemos citar as tintas *Cabernet Sauvignon*, *Cabernet Franc*, *Merlot*, *Pinot Noir*, *Carmenere*, entre outras. Entre as cultivares brancas, destacam-se a *Chardonnay*, *Chenin Blanc*, *Sauvignon Blanc*, *Riesling*, entre outras (JACKSON, 2008; INGLEZ DE SOUZA, 1996; GUERRA, 2009).

Entre as bebidas fermentadas, o vinho é a que apresenta maior valor cultural, além de ser a que mais valoriza a origem geográfica, isto é, o local onde é produzida a uva e elaborado

o vinho (RIZZON e DALL'AGNOL, 2007). Além de seu valor cultural, o seu valor também é pessoal, havendo vários motivos diferentes para se beber o vinho, desde celebrar um momento feliz da vida ou para obter os benefícios a saúde associados ao consumo regular.

Na Bíblia há várias menções a respeito do vinho, indicando a alegria que este pode proporcionar: “o vinho, que alegra o coração do homem” (BÍBLIA SAGRADA. Salmos 104:15) ou sobre o prejuízo relacionado ao vício, advertindo que aquele que o consome seja equilibrado e que não se deixe viciar por ele: “O vinho é zombador e a bebida fermentada provoca brigas; não é sábio deixar-se dominar por eles.” (BÍBLIA SAGRADA. Provérbios 20:1). Também foi mencionado como um elemento confortante: “Dê bebida fermentada aos que estão prestes a morrer, vinho aos que estão angustiados” (BÍBLIA SAGRADA. Provérbios 31:6), como elemento que representa abundância: “Honre o Senhor com todos os seus recursos e com os primeiros frutos de todas as suas plantações; os seus celeiros ficarão plenamente cheios, e os seus barris transbordarão de vinho.” (BÍBLIA SAGRADA. Provérbios 3:9-10) e até curativo, devido ao seu teor alcoólico antisséptico: “Não continue a beber somente água; tome também um pouco de vinho, por causa do seu estômago e das suas frequentes enfermidades.” (BÍBLIA SAGRADA. 1 Timóteo 5:23).

Como visto, o vinho pode trazer alegria quando consumido moderadamente, e este também pode trazer atributos relacionados à saúde, o que pode justificar o alto consumo desta bebida até os dias de hoje.

Batlouni (2006), relaciona os baixos índices de doenças cardiovasculares ao consumo moderado e regular de vinho tinto. Há muitos compostos presentes no vinho que são relacionados a benefícios ao corpo humano, como os compostos fenólicos encontrados no vinho, a exemplo o resveratrol (WEISKIRCHEN, S e WEISKIRCHEN, R., 2016), e os flavonóides, os quais têm ação anti-inflamatória, antialérgica e anticancerígena, e inibem a síntese do colesterol endógeno, diminuindo a agregação plaquetária e reduzindo os problemas trombóticos (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

Devido a estas características positivas relacionadas ao consumo do vinho, o mesmo atingiu um alto *status* na indústria alimentícia, sendo produzido mundialmente. Por ser uma bebida milenar, muitas evoluções ocorreram em seu processo de vinificação. A exemplo, na etapa de esmagamento da uva para obtenção do mosto de uva, a qual era feita com os pés, passou a ser executada com equipamentos que somente esmagavam a uva e não separavam a

ráquis¹. Depois, a operação passou a ser feita com máquinas que esmagavam a uva antes e depois separavam a ráquis. Entretanto, a ráquis interfere negativamente na composição química do mosto, pois em geral participa com gostos amargos. Com isso, a separação da ráquis é uma etapa importante para a elaboração de um vinho tinto, e atualmente é possível empregar máquinas que separam a ráquis e somente depois esmagam a uva para obtenção do mosto para então obter o vinho final (RIZZON e DALL'AGNOL, 2007).

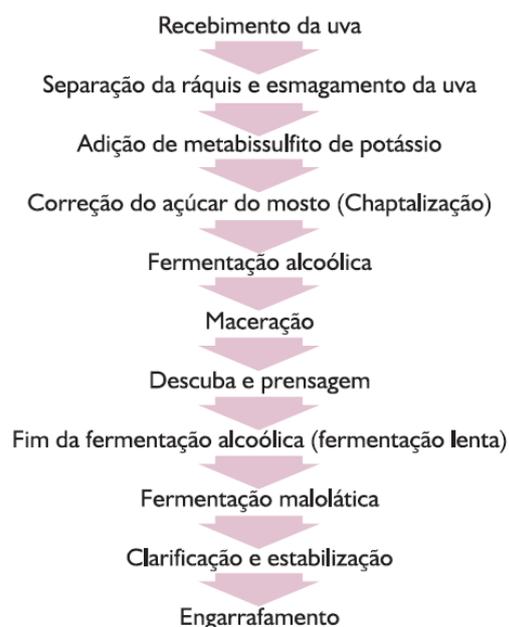
Tendo em vista que o processo de obtenção do vinho está relacionado com a sua qualidade, a seguir será descrita as etapas envolvidas no processo de obtenção do vinho.

2.1.2 Processo de elaboração do vinho

O vinho é uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto de uva madura e sã, e o processo de fermentação é a etapa essencial para a transformação dos açúcares do mosto em etanol através das leveduras, sendo as do gênero *Saccharomyces* as mais comuns associadas ao processo de vinificação (LIMA et al., 2001).

O processo de vinificação descrito por Rizzon e Dall'Agnol (2007), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), indica como o vinho tinto é obtido (Figura 1).

Figura 1. Etapas do processo para elaboração do vinho tinto da EMBRAPA.



Fonte: Rizzon e Dall'Agnol (2007).

¹ Ráquis é a parte da uva onde há a ramificação que lhe confere a sua forma típica (em cacho).

O processo se inicia com a uva colhida do vinhedo. Em seguida ocorre a separação da ráquis e esmagamento da uva com máquinas conhecidas como desengaçadeira-esmagadeira para obtenção do mosto, que permanece em contato com a casca da uva. Algumas correções são feitas no mosto antes da fermentação alcoólica, como adição de metabissulfito de potássio e adição de açúcar do mosto, também chamada Chaptalização, sendo esta última adição opcional e permitida em apenas alguns locais do mundo. Em seguida ocorre a fermentação alcoólica do mosto preparado da uva, que é a responsável pela transformação do açúcar do mosto em etanol pela ação das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Esta etapa de fermentação alcoólica possui uma fase inicial tumultuosa, seguida da descuba e prensagem, que consiste na separação do mosto do restante da parte sólida. Após a descuba, ocorre o fim da fermentação alcoólica, agora lenta, onde ocorre a transformação dos últimos gramas de açúcar em etanol pelas leveduras. Em seguida, ocorre a fermentação malolática, a qual também é opcional do enólogo na elaboração do vinho tinto, e acontece com a participação de bactérias lácticas, que transformam o ácido málico em láctico, reduzindo a acidez total do vinho tinto. Após a etapa das fermentações, ocorre a clarificação e estabilização do vinho. Por fim, o engarrafamento é feito para os vinhos que não são submetidos ao envelhecimento em barris de carvalho, sendo as garrafas empilhadas na horizontal (deitadas), para manter a rolha úmida. O local deve ser limpo, bem higienizado, ventilado, com pouca incidência de luz, umidade moderada de temperatura baixa e constante (RIZZON e DALL'AGNOL, 2007).

Após a elaboração dos vinhos, o mesmo segue para a etapa de comercialização, afim de atender a demanda de consumo.

2.1.3 Comércio de vinhos

A OIV (Organização Internacional da Vinha e do Vinho) é uma organização intergovernamental de natureza científica e técnica de reconhecida competência por seus trabalhos em videiras, vinhos, bebidas à base de vinho, uvas de mesa, uvas passas e outros produtos à base de videira. Em seu *site* (www.oiv.int) é possível avaliar um *ranking* entre os países que produzem, vendem e consomem vinho, além de informações gerais sobre a indústria de vinhos mundiais.

Segundo reportagem publicada no *site* G1 (2018), na qual avaliou dados obtidos da OIV, a produção mundial de vinhos caiu para o nível mais baixo em 60 anos em 2017 devido

às condições climáticas adversas na União Europeia que reduziram a produção no bloco. Apesar da queda no panorama global, o Brasil registrou um salto de 169 % em sua produção, passando de 1,3 milhão de hectolitros² em 2016 para 3,4 milhões de hectolitros em 2017 (Reportagem G1, 2018).

No comunicado técnico 207 da EMBRAPA, observa-se que a produção de uvas no Brasil, em 2017, foi a maior já registrada, destacando-se os estados do Rio Grande do Sul e Pernambuco, os quais apresentaram uma produção recorde. A produção de vinhos, sucos e derivados no Rio Grande do Sul foi de 605,96 milhões de litros, em 2017, sendo 147,41 % acima da verificada em 2016 e 3,94 % superior à de 2015 (MELLO, 2018).

Por se tratar de um produto que envolve a agricultura, observa-se que mesmo os países mais desenvolvidos, e que estão na liderança do mercado, precisam lidar com imprevistos climáticos que afetam a produção de uvas. E, mesmo o Brasil sendo favorecido com o aumento de sua produção, ainda ocupou a 14ª posição no *ranking* dos maiores produtores do mundo em 2017.

Em reportagem publicada no *site* El País (2018), avaliou-se o *ranking* de produtores, vendedores e consumidores de vinho no mundo pelos dados da OIV de 2017. Os principais consumidores são: Itália, França, EUA, Alemanha e a China, ficando o Brasil em 17º lugar segundo dados da OIV. Entre eles, os EUA é o país que mais consome vinho no total, com 32,6 milhões de hectolitros. A liderança de produção mundial está entre a Itália, a França, os EUA, e a Espanha. Considerando o valor das exportações de vinho, a Itália e a França ganham em receita, entretanto a Espanha lidera as vendas ao avaliar-se o volume exportado, com 22,1 milhões de hectolitros em 2017. Apesar de vender muito, o vinho espanhol é muito barato. Avaliando estes dados, foi concluído na reportagem que a Itália é o país que mais produz, a Espanha o que mais vende e os EUA, onde mais bebem (Reportagem El País, 2018).

Esta diferença na receita em relação à produção do vinho vai de encontro com a qualidade deste produto. Pode ser ponderada aqui a tendência de se perder a qualidade de um produto quando se aumenta a escala de produção e diminui o seu preço, como também o possível aumento do preço do produto devido ao valor cultural associado ao ponto geográfico em que o vinho foi produzido.

Acredita-se que o custo de um vinho no mercado está ligado diretamente à qualidade deste produto. Tendo em vista a importância da qualidade dos vinhos no comércio, há uma

² Um hectolitro representa 100 litros, ou o equivalente a pouco mais de 133 garrafas padrão de 750ml.

ampla área de pesquisa acerca deste tema em vários países, a fim de aprimorar a qualidade do vinho, satisfazer os consumidores, e, querendo ou não, ampliar as vendas e ganhar espaço neste segmento industrial mundial.

2.2 QUALIDADE DOS VINHOS

Vários fatores durante o cultivo da uva e a elaboração do vinho afetam a sua qualidade e causam variações na sua composição química. De forma geral, a constituição do vinho é formada por açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos, substâncias nitrogenadas, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos (ésteres, aldeídos e cetonas), vitaminas, sais e anidrido sulfuroso (SOUZA et al., 2006; ALI et al., 2010).

Muitos destes compostos, pertencentes a grupos químicos diversos e com concentrações variáveis de mg L^{-1} a ng L^{-1} , são provenientes tanto das uvas utilizadas na vinificação, como dos compostos formados durante o processo de fermentação e envelhecimento dos vinhos. Vários compostos possuem intensa capacidade odorífera, desempenhando importante papel na formação do aroma de um vinho, servindo como parâmetro de qualidade e de identidade pelo mercado consumidor (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Somente uma pequena fração dos compostos voláteis do vinho participa da formação do seu aroma final, e isso depende do limiar de percepção de cada componente, pois a maioria destes compostos voláteis encontra-se muito próxima do limite de percepção sensorial. Além disso, a composição e intensidade desses compostos dependem de vários fatores, como: as características do local de cultivo da uva (características do solo, clima, altitude do vinhedo, etc), a variedade e grau de maturação da uva, fatores viticulturais empregados na produção e manejo do vinhedo, técnicas enológicas empregadas durante a elaboração do vinho, leveduras utilizadas no processo de vinificação, e as condições de armazenamento dos vinhos engarrafados (SPILLMAN et al., 2004; DUBOURDIEU et al., 2006; ESTI et al., 2006; GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007; FALCÃO et al., 2007).

Durante o processo de elaboração do vinho, várias situações podem gerar contaminações, causando o chamado *off-flavor*, o qual é um defeito organoléptico do vinho devido ao aroma pronunciado de compostos que geram odores indesejáveis e sabor

desagradável ao vinho, sendo este um fator que prejudica a qualidade do vinho (ROUJOU DE BOUBÉE et al., 2002).

Através de um levantamento feito por Boutou e Chatonnet (2007) sobre os estudos feitos a respeito de moléculas responsáveis pelos principais defeitos organolépticos do vinho, observa-se uma variedade de origens para geração de moléculas que causam diferentes odores desagradáveis no vinho. Eles retratam os compostos gerados pela existência de flora fúngica na uva, como 1-Octen-3-ol e 1-Octen-3-ona, que dão sabor de fungo como também o 2-Metilisoborneol, o geosmin, (+)-Fenchona e o (+)-Fencol que dão um sabor terroso. Os compostos que dão um sabor farmacêutico ao vinho são relacionados ao vinil-4-guaiacol e Vinil-4-fenol, os quais são formados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Já a levedura *Brettanomyces Dekkera* causa um sabor fenólico ao vinho, atribuído pelos compostos etil-4-fenol, etil-4-guaiacol e etil-4-catecol. Eles também citam a 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (2M35DP), a qual causa um sabor picante devido a uma contaminação da cortiça por bactérias ou fungos. O etil-acetato, que é responsável pelo sabor azedo, é formado pelas bactérias acéticas. O sabor de fumaça no vinho pode ser proveniente pela transformação bacteriana ou térmica da vanilina em guaiacol. Boutou e Chatonnet (2007) também faz referência aos haloanisóis como: 2,4,6-Tricloroanisol, 2,3,4,6-Tetracloroanisol, 2,4,6-Tribromoanisol que dão o sabor de mofo ao vinho, sendo estes gerados pela biometilação do fenol correspondente, e a fonte de poluição é variável.

No caso, a contaminação por haloanisóis ocorre através da cortiça, usada nas rolhas, e é um problema sério da indústria do vinho, pois pode levar a alterações indesejáveis nas propriedades organolépticas do vinho devido ao odor característico e desagradável (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015).

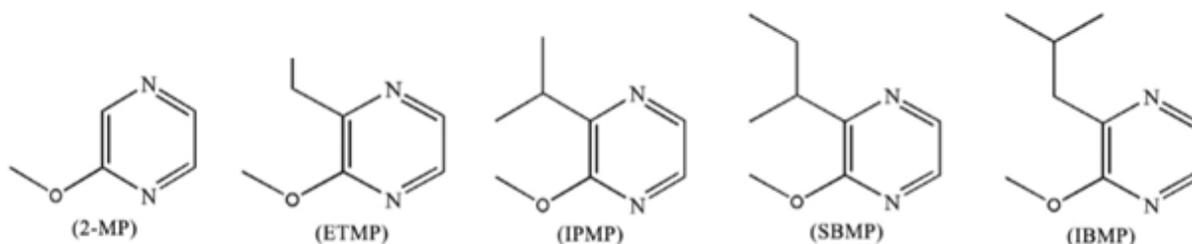
Boutou e Chatonnet (2007) faz referência em seu trabalho da 2-isopropil-3-metoxipirazina (IPMP), que confere sabor terroso ao vinho, e a 2-isobutil-3-metoxipirazina (IBMP), que confere um aroma vegetal de pimentão verde, e estes compostos estão presentes na uva pela forma endógena, ou seja formados internamente na uva.

Entre os compostos listados acima, o *off-flavor* mais comum é relacionado as 3-alquil-2-metoxipirazinias (MPs), compostos naturalmente presentes nas uvas que são transferidos ao vinho durante o processo de vinificação. Muitos estudos já foram feitos sobre estes compostos em vinhos, pois estes podem afetar a qualidade do vinho.

2.2.1 Off-flavor: 3-alkil-2-metoxipirazinas (MPs)

Os analitos estudados no presente trabalho foram as 3-alkil-2-metoxipirazinas (MPs). As MPs (Figura 2) são moléculas heterocíclicas contendo 2 nitrogênios no anel e atuam como potentes odorantes, comumente encontradas no mundo natural, sendo amplamente distribuídas em plantas, insetos, fungos e bactérias.

Figura 2. Estrutura dos compostos 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP), 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP), 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP) e 2-metoxipirazina (2-MP).



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

As MPs atuam como um sinal de odor para deter potenciais predadores para impedir que os tecidos vegetais ou frutas verdes sejam comidas, e são de ocorrência natural envolvidas na comunicação química de insetos como feromônios e aleloquímicos (MOORE; BROWN; ROTHSCHILD, 1990; MAIA et al., 2018).

Como as MPs são compostos ativos encontrados no aroma de muitas variedades de vinho, estes compostos podem ser derivados da uva ou introduzidos em vinhos através de microrganismos associados à uva, ou insetos como as joaninhas *Coccinellidae* introduzidos inadvertidamente durante o processamento do vinho (BOTEZATU; KEMP; PICKERING, 2016; FONTANA; BOTTINI, 2016; LEI et al., 2018).

As MPs podem contribuir para a especificidade de certas variedades de vinho, como *Cabernet Sauvignon*, *Cabernet Franc*, *Merlot noir*, *Carmeneré*, *Sauvignon Blanc*, *Chardonnay*, sendo benéficas para a sua qualidade desde que estejam presentes em concentrações muito baixas (ng L^{-1}) entre os componentes aromáticos. Neste caso, elas contribuem com notas aromáticas verdes, herbáceas e vegetais associadas a odores específicos

de pimentão verde, ervilhas, beterrabas, batatas e aspargos, agregando aroma e sabor ao *bouquet*³ aromático do vinho (FONTANA; BOTTINI, 2016; SALA et al., 2002).

As MPs mais estudadas em vinhos são 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP), 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP), 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP), as quais podem influenciar o aroma do vinho em concentrações muito baixas, tendo em vista que os seus limites de percepção sensorial são entre 1-2 ng L⁻¹ (em água), e seus descritores de odor são: pimentão verde, pimentão/ervilha verde e ervilhas verdes, respectivamente. Para a IBMP, o limite de percepção sensorial em vinhos tintos é um pouco maior, cerca de 10-16 ng L⁻¹. A 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP), a qual é menos estudada em vinhos, possui limite de percepção sensorial em água de 425 ng L⁻¹, sendo seu descritor sensorial a batata crua (ALBERTS et al., 2013; SALA et al., 2002)

A níveis de concentração mais elevados, acima do limite de percepção sensorial, o aroma das MPs se sobressaem diante dos outros compostos aromáticos presentes e geram aromas desarmônicos e conseqüentemente apresentam papel prejudicial, resultando em notas verdes, imaturas e herbáceas dominantes e com isso afetam negativamente a sua qualidade (FONTANA; BOTTINI, 2016; GODELMANN; LIMMERT; KUBALLA, 2008).

Como as MPs podem ser compostos prejudiciais ao sabor e odor em níveis excessivos, tornando-se indesejáveis para o consumidor e para a indústria do vinho, elas têm sido extensivamente estudadas no contexto da viticultura e enologia (LEI et al., 2018).

A IBMP é a MP predominante no vinho tinto, representando aproximadamente 80 % dos 5 a 50 ng L⁻¹ encontrados em alguns vinhos. Neste sentido, devido ao relevante impacto organoléptico das MPs sobre a qualidade e autenticidade do vinho a níveis de concentração muito baixos, o desenvolvimento de metodologias analíticas para a sua determinação em amostras de vinho é um assunto de interesse crescente (FONTANA; BOTTINI, 2016).

Avaliando-se a questão da origem das MPs no vinho, a seguir serão vistos fatores que influenciam ou estão relacionados com possíveis fontes de *off-flavors*, além de discorrer sobre estudos empregados na tentativa de remoção destes compostos do vinho a fim de melhorar a qualidade dos mesmos.

³ *Bouquet* é um conjunto de aromas que se desenvolvem durante a fermentação alcoólica e que resultam do processo e métodos de envelhecimento.

2.2.1.1 Parâmetros que influenciam o teor de MPs nos vinhos

Segundo Lei et al. (2018), o conteúdo das MPs nos vinhos depende principalmente da sua concentração nas uvas, das quais eles são feitos, e são apenas marginalmente afetadas pelas técnicas de vinificação, sendo que apenas alguns estudos se concentraram nas vias do metabolismo das MPs.

Embora citado como marginalmente afetada por Lei et al. (2018), o teor das MPs no vinho sofre a influência de muitos fatores, como variações de concentração devido a mudanças nas condições climáticas e geográficas em que o vinhedo se encontra e as práticas de cultivo para a produção da uva (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros vitícolas em relação ao impacto do acúmulo de MP nas uvas.

Parâmetro	Efeito	Referência
Exposição solar	Menos exposição à luz resultou em vinhos com menor conteúdo de IBMP.	SALA et al., 2004
	A pré-avaliação da exposição à luz solar reduz os níveis de MP na colheita.	ROUJOU DE BOUBÉE et al., 2002
Temperatura	Os frutos das regiões mais frias tendem a ter mais odor vegetativo e contêm teor de MPs mais altos em vinhos, principalmente a IBMP.	HASHIZUME; UMEDA, 1996 KOTSERIDIS et al., 1998
Umidade	A pré-avaliação de altos níveis de umidade pode causar níveis mais altos de IBMP.	KOTSERIDIS et al., 1999 ALLEN, 1995 ROUJOU DE BOUBÉE; VAN LEEUWEN; DUBOURDIEU, 2000
Tipo de solo	Vinhos altamente vegetativos estão associados a solos profundos e ricos em argila, ricos em nutrientes e com alta capacidade de retenção de água.	ROUJOU DE BOUBÉE; VAN LEEUWEN; DUBOURDIEU, 2000
Duração de amadurecimento	Uvas bem maduras contêm concentrações mais baixas de IBMP. Conteúdo de MP diminuiu durante o amadurecimento.	HASHIZUME; UMEDA, 1996 SALA et al., 2000
Irrigação	Videiras irrigadas apresentaram teores maiores de IBMP do que nas amostras de plantas não irrigadas.	SALA et al., 2005
	Maior quantidade de precipitação na frutificação causa uma concentração maior de IBMP.	BRILLANTE; MARTÍNEZ-LÜSCHER; KURTURAL, 2018
Densidade de plantação	Os níveis médios de IBMP foram maiores nas amostras de videiras com maior densidade de plantio.	SALA et al., 2005
Altitude do vinhedo	Vinhos originários de vinhedos situados na altitude mais alta foram estritamente associados ao atributo sensorial aroma de pimentão.	FALCÃO et al., 2007

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Os parâmetros listados na Tabela 1 são imprescindíveis para gerar as características sensoriais do vinho, que geralmente estão relacionadas à região onde este foi produzido.

Além do que foi exposto na Tabela 1, considerando a questão do amadurecimento e até mesmo pós-colheita, em que a uva começa a “passar do ponto”, Pons et al. (2018) realizou estudos na identificação de compostos voláteis envolvidos no aroma particular e atípico detectados nos vinhos *Vitis vinifera Merlot e Cabernet Sauvignon* feitos com uvas infectadas e murchas por podridão parda (*Plasmopara viticola*). As notas de aromas herbáceos e verdes foram identificados por Pons et al. (2018) como IBMP.

A genética de cultivares também é um fator que pode influenciar diferentes propriedades do vinho, como características morfológicas, vigor, produção potencial (fertilidade, peso da fruta, etc) aptidão tecnológica (acidez total, compostos fenólicos) (KOTSERIDIS et al., 1998).

Em relação à análise entre diferentes cultivares, Romero et al. (2006) analisou os teores de ETMP e IBMP em 4 variedades de uva cultivadas em Castilla-La Mancha, e os resultados indicaram a presença das duas MPs nas quatro variedades. Ele também encontrou diferenças significativas no conteúdo de IBMP entre as diferentes variedades: *Cabernet Sauvignon* > *Merlot* > *Syrah* > *Cencibel*.

Em outro estudo de diferentes variedades de uva, Koch et al. (2010) analisou o teor de IBMP em uvas de videiras obtidas pelo enxerto de cachos de *Vitis vinifera L cvs Cabernet Sauvignon e Muscat blanc* uns sobre os outros. Como resultado, a IBMP não foi detectada em bagas de cachos de *Muscat blanc* enxertadas em videiras *Cabernet Sauvignon* quando amostradas na maturidade da fruta, mas detectada em todas as bagas de *Cabernet Sauvignon* independentemente da configuração do enxerto. O resultado obtido por Koch et al. (2010) indica que a IBMP ou seus precursores são originários da baga e sua formação depende do genótipo da uva.

Lei et al. (2018) avaliou a biossíntese interna das MPs nas uvas, a qual difere para cada variedade de uva, e observou que embora existam duas vias para a biossíntese de MPs propostas na literatura, apenas a etapa final e as enzimas que a catalisam foram confirmadas na uva, e os intermediários metabólicos e enzimas-chave envolvidos em outras etapas ainda são desconhecidos. Com isso, Lei et al. (2018) conclui que a limitada compreensão do metabolismo das MPs restringiu a pesquisa sobre esses compostos, e alguns resultados empíricos não podem ser explicados pelo conhecimento atual do metabolismo das MPs.

Considerando a questão de formação da MP e localização no cacho de uva, Boubeé et al. (2002) definiu a localização precisa de IBMP em cachos de uva *Cabernet Sauvignon*. Ele observou que, independentemente da maturação, o composto estava localizado principalmente em caules, depois na casca e sementes, sendo que a uva madura continha IBMP predominantemente nas cascas (95 %), com uma pequena fração nas sementes (4 %), enquanto que a poupa continha muito pouco. Outra observação feita durante o amadurecimento indicou que a proporção de IBMP nos caules e sementes diminuiu, enquanto aumentou nas cascas (ROUJOU DE BOUBÉE et al., 2002).

Uma observação feita por Sala et al. (2000) em seus experimentos também aponta para o que Boubeé et al. (2002) definiu, em que a maceração da uva aumenta os níveis da MP, sugerindo que as MPs podem estar presentes na casca da uva.

Em seus estudos, Allen (1995) chegou a uma questão importante: a IPMP pode ocorrer no vinho a partir de outras fontes que não das bagas de uva e processos normais de vinificação. Há estudos que indicam outra fonte destes compostos no vinho que não do próprio metabolismo da uva.

Um besouro da Classe *Insecta* e da Ordem *Coleoptera*, popularmente denominado de joaninha pela sua pigmentação vermelha com bolinhas pretas, da Família *Coccinellidae* com nome científico: *Harmonia axyridis* é uma espécie asiática utilizada em controle biológico de pulgões (*Hemiptera*, *Aphididae*) de pecan, de alfafa, algodão, tabaco e plantas ornamentais. Alimenta-se principalmente de pulgões, cochonilhas e psilídeos e é considerado um excelente agente de controle biológico na Ásia (ALMEIDA, SILVA, 2002).

Nos EUA este inseto predador trouxe sérios problemas, pois tem a capacidade de desalojar as espécies nativas, além de causar desconforto aos habitantes do local já que nas estações mais frias do ano (outono e inverno) invadem em grande número as casas para se proteger e acabam pousando nos alimentos e importunando as pessoas (ALMEIDA, SILVA, 2002). Vale salientar que uma tendência de invernos mais quentes que permitem que joaninhas *Harmonia axyridis* sobrevivam em maior número tem sido evidente em Ontário, Canadá, e em outras regiões vinícolas do norte (PICKERING et al., 2012).

Este inseto tem sido assunto em muitos estudos na área de vinhos devido a sua contaminação, que causa o *off-flavor* relacionado a algumas MPs. No Canadá, Botezatu, Kemp, Pickering (2016) descrevem que as MPs são constituintes contaminantes de joaninhas (*Harmonia axyridis* e *Coccinella septempunctata*) presentes durante o processamento do vinho. Neste caso, quando as uvas são colhidas, as joaninhas residentes em cachos de uvas

também podem ser inadvertidamente colhidas e introduzidas durante o processamento do vinho.

A extração de MPs dessas joaninhas durante os procedimentos de vinificação pode levar a aroma e sabor desagradáveis e indesejáveis em altos níveis conhecidos coletivamente como “contaminação por joaninha” (BOTEZATU; PICKERING, 2015; PICKERING et al., 2004). O IPMP, o SBMP e o IBMP foram todos ligados à contaminação por joaninhas, sendo o IPMP o principal contribuinte. Nos estudos sobre a contaminação, pouco é necessário para comprometer a qualidade do vinho, criando assim desafios para os esforços destinados a remediar o suco e o vinho afetados (BOTEZATU et al., 2013; KÖGEL et al., 2014; PICKERING et al., 2007).

Galvan, Kells, Hutchison (2008) em estudos nos EUA, também quantificaram IPMP, SBMP e IBMP em vinhos *Frontenac* e *Leon Millot* feitos a partir de uvas que foram naturalmente ou artificialmente infestadas com *Harmonia axyridis*. As concentrações de IPMP no vinho não foram significativamente diferentes entre os níveis de infestações naturais ou artificiais de *Harmonia axyridis*, e a SBMP e a IBMP foram encontradas apenas em vinho artificialmente infestado com a *Harmonia axyridis*. O pesquisador relata que em futuras pesquisas deve-se primeiramente focar na determinação dos componentes primários que poderiam ser responsáveis pela mancha relacionada à *Harmonia axyridis* no vinho. Além das MPs, numerosos compostos adicionais, tais como alcalóides ou terpenos, também estão presentes em joaninhas e também podem contribuir para o sabor do vinho. O segundo foco da pesquisa sobre a contaminação, mencionado pelo pesquisador, seria a quantificação ou possível remediação de MPs.

Cai, Koziel, O’neal (2007) também realizaram estudos acerca deste inseto nos EUA, em relação à preocupação de proprietários de casas, pequenos produtores de frutas e produtores de vinho voltada aos compostos nocivos liberados pela *Harmonia axyridis*. Em seus estudos foram identificadas a IPMP, SBMP e IBMP e a 2,5-dimetil-3-metoxipirazina (DMMP) em voláteis do *headspace in vivo* da *Harmonia axyridis* como responsáveis pelo odor característico.

Em uma correlação geral, a mudança climática provavelmente contribuiu para níveis excessivos de MPs em muitos vinhos, quando estas estão relacionadas à produção endógena da uva. Além de ter visto que muitos parâmetros afetam o teor de MPs no vinho, a contaminação por insetos também é um fator que vem sendo estudado, principalmente em grupos de pesquisa no Canadá e EUA, na América do Norte.

2.2.1.2 Remoção das MPs do vinho

Independente da forma em que a MP se torna presente no vinho, seja pelo metabolismo da uva, pela contaminação por insetos ou variações climáticas durante o cultivo, entre outros, existem estudos que abordam a remoção das MPs do vinho a fim de melhorar a qualidade dos mesmos. Na literatura há diferentes modos para remover MPs de vinhos, seja por adsorção em materiais sólidos como polímeros, carvão ativado, bentonita, etc, ou por degradação através da ozonização, que poderiam ser empregados durante o processo de vinificação, além de outros processos físicos durante a viticultura como remoção das folhas antes e após o florescimento e aquecimento do mosto antes da fermentação.

Pickering et al. (2006) avaliou a eficácia de bentonita, carvão ativado, lascas de carvalho, lascas de carvalho desodorizadas e luz ultravioleta (vinho tinto) ou visível (vinho branco) na redução da concentração de IPMP. Os seus resultados indicam que as concentrações de IPMP foram reduzidas por carvão ativado em vinho branco e carvalho desodorizado em vinho tinto.

Entretanto, Ryona, Reinhardt, Sacks (2012) já haviam avaliado que abordagens anteriores para a remoção de MPs com carvões ativados carecem de seletividade, em parte por causa da natureza não-polar similar de MPs e outros voláteis de vinho. Em seus estudos, o tratamento de pré-fermentação de mosto ou suco com silicone, um sorvente polimérico não-polar, demonstrou que pode efetivamente reduzir a concentração de MP sem afetar a produção ou liberação de voláteis durante a fermentação.

Botezatu e Pickering (2015) investigaram a capacidade de polímeros plásticos para reduzir as concentrações de IPMP, SBMP e IBMP em vinhos. Após ensaios do vinho tinto contaminado com as MPs com os polímeros plásticos: silicone, etileno acetato de vinila (EVA) e um polímero biodegradável à base de ácido polilático, o silicone apresentou uma redução maior de IPMP e IBMP do que os demais polímeros.

Botezatu, Kemp, Pickering (2016) continuaram os estudos com o silicone e o polímero à base de ácido polilático para reduzir as concentrações das mesmas MPs em um vinho *Merlot* e também o impacto destes tratamentos sobre as características sensoriais do vinho. Os seus resultados mostraram reduções substanciais para as MPs envolvidas, principalmente usando o polímero de ácido polilático, sendo que os polímeros não apresentaram efeito significativo nos compostos orgânicos voláteis (VOCs).

Outro método, que difere dos métodos adsortivos citados anteriormente, estudado por Zhu et al. (2016), descreve o emprego da ozonização para a degradação da IBMP em água potável, e em seu trabalho ele avaliou os fatores de influência incluindo a concentração inicial de IBMP, taxa de adição de O₃, pH inicial, dosagem de H₂O₂ e diferentes qualidades de água na degradação de IBMP no processo de ozonização.

Sivilotti et al. (2016) investigou um método que dispensa aditivos, o qual emprega a remoção de folhas do florescimento. Ele estudou a remoção antes e depois do florescimento, e observou que ambos os tratamentos reduziram os níveis de IBMP nas uvas e nos vinhos derivados, concluindo assim que esta técnica pode ser empregada para reduzir a concentração de IBMP da uva e do vinho.

Outra técnica que dispensa aditivos no vinho para remoção das MPs foi desenvolvido por Kögel et al. (2014), que avaliou a eficácia do aquecimento do mosto de uva *Riesling e Pinot noir* antes da fermentação. Em seu estudo as uvas foram infestadas com os insetos *H. axyridis* ou *C. septempunctata*, tendo em vista que já haviam estudos de seu grupo de pesquisa que comprovaram que a contaminação de insetos desta classe geravam altos teores de MPs nos vinhos (BOTEZATU; PICKERING, 2015; PICKERING et al., 2004). Como resultado de seu estudo, o aquecimento das uvas *Pinot noir* antes da fermentação resultou em diminuição moderada de IPMP, SBMP e IBMP. Este estudo aponta que os viticultores não precisam diferenciar entre *H. axyridis* e *C. septempunctata* para tomar decisões no vinhedo ou adega (KÖGEL et al., 2014).

Li et al. (2015) realizou estudos que compararam dois métodos para remoção de *off-flavors*, a adsorção e oxidação de carvão ativado em pó (PAC) e oxidação por permanganato de cloro e potássio para os compostos IPMP, IBMP, além de outros compostos como geosmina e 2-metilisoborneol (MIB), e 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Os resultados de seu estudo indicam que a oxidação de permanganato de cloro e potássio era inviável, enquanto a adsorção de PAC era eficaz. Quanto à adsorção, o TCA, seguido pelo IBMP e IPMP, foi mais facilmente removido pelo PAC. De forma geral seu resultado pode ser usado para prever o desempenho de adsorção de odorantes emergentes. Embora seu estudo tenha sido realizado em água, este poderia ser testado em vinhos a fim de avaliar a remoção das MPs e se o processo afetaria a qualidade dos vinhos.

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DAS MPS NO VINHO

Diferentes matrizes alimentares já foram estudadas frente à determinação de MPs entre 1998 e 2018, desde alimentos como água, café, palmeira, queijos, batata frita, pimenta, até animais como joaninhas e pererecas, com diferentes justificativas de estudo.⁴ Contudo, a maior parte dos estudos das MPs é voltada à análise de vinhos, principalmente da espécie *Vitis Vinifera*, como será visto mais à frente, devido à influência que as MPs podem causar no sabor dos vinhos atuando como *off-flavor*, e a consequência disso para os consumidores e para a indústria do vinho.

Na Tabela 2, há uma seleção de métodos empregados na literatura acerca de estudos voltados as MPs no vinho, dando ênfase aos diferentes métodos empregados, como o preparo de amostra e a instrumentação de análise para análises de MPs em vinhos, bem como o objetivo de cada estudo.

⁴ Outras matrizes analisadas acerca das MPs:

Wagner, Grosch (1998) estudou potentes odorantes de batatas fritas preparadas em óleo de palma e concluiu que a IBMP e outros voláteis são os odores chave.

Jagella, Grosch (1999) detectaram IPMP como importante odorante de uma amostra de pimenta preta com um sabor mofado.

Cudjoe, Wiederkehr, Brindle (2005) identificaram a presença de SBMP, IBMP e IPMP em três diferentes espécies de joaninhas da família *Coccinellidae* (*Coccinella septempunctata*, *Harmony axyridis* e *Hippodemia convergens*).

Neta et al. (2008) identificou a SBMP e a IPMP como as principais fontes de sabor de terra e pimentão nos queijos *Cheddar*.

Ma et al. (2012) analisaram traços de IBMP, IPMP e outros odorantes de terra e mofo em água.

Jackels et al. (2014) investigou a presença de IPMP no café verde afetado pelo defeito chamado “sabor da batata” associado à alimentação de *Antestiopsis orbitalis*.

Brunetti et al. (2015) caracterizou compostos voláteis da secreção da pele de duas espécies de pererecas, sendo a IBMP encontrada frequentemente em amostras de pele.

Lu, Wills, Chris Wilson (2016) analisaram traços de compostos *off-flavor*, como IBMP e IPMP e outros voláteis, em água doce e salgada.

Jo et al. (2018) identificou a IBMP e IPMP no estudo de queijos *Gouda*.

Maia et al. (2018) identificou IPMP, IBMP e SBMP em amostras florais de *Acrocomia aculeata*, *Acr. intumescens*, *Attalea butyracea* e *Att. Insignis* no estudo acerca do sinal de odor para polinização de palmeiras.

Tabela 2. Estudos de MPs em vinhos na literatura.

Preparo de amostra	Objetivo	Separação -Detecção	Analitos	Local	REFERÊNCIA
LLE	Determinação de componentes voláteis para o estudo de <i>Merlot noir</i> produzidos em 1993 e 1994.	GC-MS	IBMP e outros voláteis	França e Grécia	KOTSERIDIS et al., 1998
LLE	Determinação de IBMP em <i>Merlot</i> , <i>Cabernet Franc</i> e <i>Cabernet Sauvignon</i> .	GC-MS	IBMP	França	KOTSERIDIS et al., 1999
HS/SPME	Investigação da influência de diferentes parâmetros na extração das MPs em vinho modelo.	GC-NPD	IPMP, ETMP, SBMP e IBMP	EUA	HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002
HS/SPME	Monitoramento das MPs durante processo de vinificação.	GC-NPD	2-MP, ETMP, IBMP, SBMP e IPMP	Espanha	SALA et al., 2002
HS/SPME	Avaliação da influência da exposição à luz solar sobre o conteúdo de MPs.	GC-NPD	2-MP, ETMP, IBMP, SBMP e IPMP	Espanha	SALA et al., 2004
HS/SPME	Quantificação de IBMP em vinhos <i>Cabernet Sauvignon</i> produzidos a partir de seis tratamentos de poda de inverno em duas safras.	GC-MS	IBMP	EUA	CHAPMAN et al., 2004
HS/SPME	Otimização de parâmetros que afetam a extração da IBMP e aplicação do método a vinhos experimentais <i>Fer servadou</i> .	GC-NPD GC-MS/MS	IBMP	França	PROUTEAU et al., 2004
HS/SPME	Avaliação da influência da irrigação e densidade de plantação sobre o conteúdo das MPs.	GC-NPD	2-MP, ETMP, IBMP, SBMP e IPMP	Espanha	SALA et al., 2005
HS/SPME	Desenvolvimento do método, otimização de parâmetros e aplicação em análise de voláteis em vinhos.	GC-MS	IBMP e IPMP e outros voláteis	França	BOUTOU; CHATONNET, 2007
LLE	Pesquisa sobre temperaturas sazonais e a influência da altitude das vinhas no conteúdo de IBMP.	GC-MS	IBMP e outros voláteis	Brasil	FALCÃO et al., 2007

(Continua)

Tabela 2. Estudos de MPs em vinhos na literatura.

Preparo de amostra	Objetivo	Separação -Detecção	Analitos	Local	REFERÊNCIA
HS/SPME	Desenvolvimento de método e aplicação para análise do impacto da <i>Harmonia axyridis</i> em vinhos.	GC-MS	IBMP, SBMP e IPMP	Canadá	KOTSERIDIS et al., 2008
HS/SPME	Desenvolvimento de método, otimização de parâmetros e aplicação em análise de vinhos.	GC-MS/MS	IBMP, IPMP, SBMP e ETMP	Alemanha	GODELMANN; LIMMERT; KUBALLA, 2008
HS/SPME	Desenvolvimento de método, otimização de parâmetros e correlação de IBMP das bagas inteiras ao vinho.	GCxGC-TOF-MS	IBMP e IPMP	EUA	RYONA; PAN; SACKS, 2009
SPE e HS SPE	Comparação dos métodos de extração em fase sólida e extração em fase sólida na determinação de MPs.	MDGC-MS	IBMP, SBMP e IPMP	Espanha	CULLERÉ et al., 2009
HS/SPME	Estudo da aplicação de polímeros plásticos na remediação de vinhos com níveis elevados de MPs.	MDGC-MS	IBMP, SBMP e IPMP	Canadá	BOTEZATU; PICKERING, 2015
QuEChERS	Desenvolvimento de método, otimização de parâmetros e aplicação na análise de vinhos comerciais.	GC-MS	IPMP, SBMP e IBMP	Argentina	FONTANA; BOTTINI, 2016
HS/SPME, SBSE e HSSE	Otimização de parâmetros na extração de MPs e comparação de técnicas de extração por sorção.	GC-MS/MS	IPMP, ETMP, SBMP e IBMP e outros voláteis	EUA	HJELMELAND; WYLIE; EBELER, 2016
Combinação de SPE com DLLME	Desenvolvimento de método, otimização de parâmetros e aplicação na análise de vinhos comerciais.	GC-QTOF-MS/MS	IBMP, ETMP, IPMP e SBMP	Argentina e Espanha	FONTANA; RODRÍGUEZ; CELA, 2017
SBSE	Desenvolvimento de método, otimização de parâmetros e aplicação na análise de vinhos comerciais.	GC-MS	IPMP, SBMP e IBMP	Espanha	WEN et al., 2018
HS/SPME e LLE	Identificação de compostos voláteis em vinhos feitos com uvas infectadas e murchas por podridão parda (<i>Plasmopara viticola</i>).	GC-MS	IBMP e outros voláteis	França	PONS et al., 2018

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Há uma infinidade de estudos acerca deste assunto, logo foram selecionados alguns estudos a fim de observar algumas características gerais e elucidar os diversos estudos que já vem sendo feitos nesta área de análise de MPs em vinhos.

Independente do método de preparo de amostra e instrumentação de análise, observa-se que os grupos de pesquisas com o mesmo interesse na análise das MPs ocorre em vários lugares do mundo (Canadá, Espanha, Alemanha, EUA, Argentina, França, Grécia e Brasil) com diferentes objetivos, demonstrando a importância deste tema.

Os estudos das MPs ao redor do mundo vistos na Tabela 2 estão relacionados com a qualidade do vinho e, conseqüentemente, com a indústria mundial do vinho. Há uma correlação entre os países que estudam o efeito deste *off-flavor* no vinho com os países que lideram o *ranking* de produção, venda e consumo obtido pela OIV como visto no tópico 2.1.3 sobre o comércio de vinhos (Espanha, EUA, França, Alemanha). Logo, observa-se que os países que têm interesse econômico nos vinhos, têm também preocupações acerca da qualidade do vinho em relação a *off-flavors*.

Em relação ao preparo de amostra, no passado os voláteis de vinhos eram isolados usando destilação ou técnicas de extração por uso de solventes (PAWLISZYN; ARTHUR, 1990). No caso do isolamento das MPs dos vinhos, o preparo de amostras de vinho empregado nos primeiros estudos, era necessário realizar uma destilação, seguida de extração em uma resina de troca iônica, eluição com tampão alcalino, e por fim uma extração líquido-líquido (LLE), levando até 2 dias de preparação por amostra (ALLEN; LACEY; BOYD, 1994; HASHIZUME; UMEDA, 1996; ROUJOU DE BOUBÉE et al., 2002; ROUJOU DE BOUBÉE; VAN LEEUWEN; DUBOURDIEU, 2000).

Os estudos em que se utilizavam métodos semelhantes ao descrito acima não foram incluídos na Tabela 2 pois estão em desuso, como visto pela novas tecnologias empregadas atualmente de outros preparos de amostras mais eficientes e menos laboriosos.

De modo geral, observa-se uma evolução nos preparos de amostra empregados para o vinho, desde o método laborioso multi-etapas citado anteriormente, como também extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida pelo modo *headspace* (HS/SPME), até outros preparos de amostras mais recentes como extração sortiva em barra de agitação (SBSE), extração sortiva por *headspace* (HSSE) e o método QuEChERS.

Atualmente, há uma ampla disponibilidade de ferramentas analíticas para a extração de MPs envolvendo diferentes preparos de amostra, no entanto observa-se que a HS/SPME é muito empregada. Entre os estudos selecionados na Tabela 2 a HS/SPME está em 70 % deles,

e as principais vantagens dela sobre as outras técnicas são: sua fácil miniaturização, automação de dispositivos e sua conveniência no acoplamento com instrumentos cromatográficos, além de ser livre de solventes e utilizar pequenos volumes de amostras (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015).

Outros estudos que realizaram análises de MPs em outras matrizes, como uva e mosto⁵, água⁶ e *Harmonia axyridis*⁷, também empregaram a técnica HS/SPME, corroborando com o fato de que este é um método bastante difundido para análise de MPs no vinho e em outras matrizes.

De acordo com as vantagens vistas acima do HS/SPME, Kotseridis et al. se adaptou às mudanças saindo do emprego do método de LLE em 1999 e indo para o método HS/SPME em 2008 (KOTSERIDIS et al., 1999, 2008). Mas nos últimos anos, observa-se na Tabela 2 a tentativa de inovar na área de preparo de amostras novamente, abrindo espaço para novos métodos de preparo de amostras, como SBSE, HSSE, QuEChERS, entre outros.

A seguir, será discutido mais acerca do preparo de amostra HS/SPME e da instrumentação de análise empregados no presente trabalho.

2.3.1 Preparo de amostra: microextração em fase sólida pelo modo headspace

A técnica de preparo de amostra denominada microextração em fase sólida (SPME) foi desenvolvida por Pawliszyn no início da década de 1990 (PAWLISZYN; ARTHUR, 1990), e vem sendo amplamente empregada pois não utiliza solvente, tem alto poder de concentração (o que proporciona adequação com as sensibilidades dos detectores de GC), é aplicável a muitos tipos de analitos, além de facilitar o transporte do material extraído para o cromatógrafo (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015).

Em contraste aos métodos de extração exaustivos convencionais, como a SPE, a SPME é uma técnica não exaustiva baseada no equilíbrio de partição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase extratora. Na SPME, a fase extratora pode ser exposta diretamente na amostra (imersão direta, DI) ou em seu *headspace* (HS) e então ocorre uma partição dos analitos entre a amostra e a fase extratora da fibra por determinado período, em seguida ela é

⁵ Galvan, Kells, Hutchison (2008); Koch et al. (2010); Sala et al. (2000); Sivilotti et al. (2016).

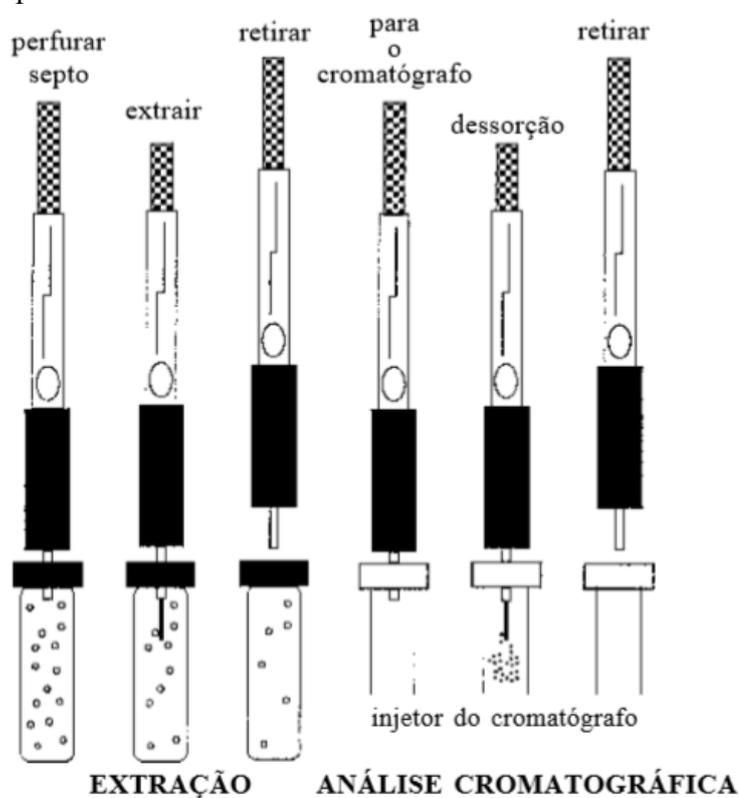
⁶ Li et al. (2015); Ma et al. (2012).

⁷ Cai, Koziel, O'neal (2007).

recolhida e exposta no injetor de um cromatógrafo para liberar os analitos por dessorção térmica, no caso do GC (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015).

A fibra de SPME disponível comercialmente consiste de um suporte de sílica fundida com diâmetros na faixa próxima de 50 a 100 μm e comprimentos geralmente de 1 cm, podendo ser de 2 cm também, com revestimento de filme polimérico que torna a fibra mais flexível. O filme polimérico da fibra, que atua como fase extratora, pode ser composto por diversos tipos, sendo os estudados no presente trabalho o PDMS (polidimetilsiloxano), PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), PDMS/Car/DVB (polidimetilsiloxano/Carboxen/divinilbenzeno), que diferem de acordo com a sua polaridade para serem seletivos na extração de analitos com diferentes polaridades. A fibra composta de PDMS/Car/DVB possui maior afinidade com compostos mais polares do que as outras duas fibras, e o PDMS é o menos polar. Para melhor manuseio, a fibra é conectada ao *holder* (Figura 3), o qual permite que a fase extratora seja exposta ao meio ou recolhida para dentro da agulha de aço inoxidável, dependendo da etapa da análise, pois ao perfurar a tampa do frasco ou septo do injetor do GC, a fibra precisa ser retraída para não ser danificada, devido a sua fragilidade (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Figura 3. Uso do *holder* de SPME para o processo de extração e dessorção do material extraído para análise por GC.



Quando a SPME é empregada para extração a partir do *headspace* (HS/SPME), a amostra aquosa é acondicionada em um frasco selado em temperatura constante para atingir o equilíbrio dos analitos entre a matriz aquosa e o *headspace*. A fibra de SPME é, então, exposta à fase gasosa acima da amostra. Logo, o emprego do HS/SPME é indicado para os casos em que os analitos são voláteis como também nos casos em que a matriz contém particulados que poderiam danificar a fibra (VALENTE, AUGUSTO, 2000; PROSEN, ZUPANCIC-KRAJL, 1999).

A complexidade da matriz da amostra também pode afetar a extração dos compostos de interesse, como no caso dos vinhos, em que a presença de etanol dificulta a transferência das MPs da amostra aquosa para o *headspace* devido ao aumento da solubilidade das mesmas na fase aquosa, sendo uma alternativa à diluição da amostra para reduzir o efeito de matriz na extração (HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002).

Acerca da matriz de vinho estudada, que é complexa, algumas condições experimentais influenciam a eficiência de extração da fibra em SPME, e geralmente são otimizadas, tais como o tipo e espessura do recobrimento da fibra, a temperatura, o tempo de extração, a força iônica do meio, pH, grau de agitação e volume da amostra (VALENTE, AUGUSTO, 2000; PROSEN, ZUPANCIC-KRAJL, 1999; LORD, PAWLISZYN, 2000).

Na Tabela 3 a seguir há alguns parâmetros do método de HS/SPME para análise de vinhos da literatura.

Tabela 3. Comparação de parâmetros do método de HS/SPME para análise de vinhos da literatura.

NaCl (%)	Volume de headspace (mL)	Tempo de extração (min)	I.S.	Fibra	Temperatura de extração (°C)	Referência
30	20	30	ETEP IPEP	DVB/CAR/PDMS	50	HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002
30	10	240	IPEP	PDMS/DVB	30	SALA et al., 2002
30	10	30	[² H ₃] IBMP	DVB/CAR/PDMS	40	CHAPMAN et al., 2004
30	10	165	[² H ₂]-IBMP	PDMS/DVB	27	PROUTEAU et al., 2004
30	10	60	[² H ₃]2M35DP	DVB/CAR/PDMS	45	BOUTOU; CHATONNET, 2007
30	10	30	([² H ₃]-IBMP [² H ₃]-SBMP [² H ₃]-IPMP	DVB/CAR/PDMS	37	KOTSERIDIS et al., 2008
16	7,5	40	[² H ₂]-IBMP [² H ₂]-ETMP	CAR/PDMS	40	GODELMANN; LIMMERT; KUBALLA, 2008
20	10	30	[² H ₃]-IBMP [² H ₃]-IPMP	PDMS/DVB	40	HJELMELAND; WYLIE; EBELER, 2016
30	10	30	[² H ₂]-IBMP	DVB/CAR/PDMS	40	RYONA; PAN; SACKS, 2009

ETEP – 3-etil-2-etoxipirazina

IPEP – 3-isopropil-2-etoxipirazina

[²H₃] IBMP, [²H₂]-IBMP, [²H₃]-SBMP, [²H₃]-IPMP, [²H₂]-ETMP – 3-alkuil-2-metoxipirazinas deuteradas.

[²H₃]2M35DP – 2-Metoxi-3,5-dimetilpirazina deuterada

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Observa-se na Tabela 3 que há um consenso no uso de 30 % de NaCl, ou seja, uma solução saturada tem sido amplamente empregada devido ao efeito *Salting Out*, que descreve a transferência dos compostos orgânicos da solução devido ao aumento da força iônica. Esse efeito é mais favorecido pela adição de NaCl do que Na_2CO_3 , por exemplo, conforme estudos de otimização deste parâmetro por Godelmann, Limmert, Kuballa (2008) e Hjelmeland, Wylie, Ebeler (2016).

Ao avaliar as fibras utilizadas nos estudos da Tabela 3, observa-se que elas são variadas, mas há uma tendência ao uso de uma composição múltipla, seja de duas ou três fases poliméricas envolvidas, principalmente a fibra tripla, DVB/CAR/PDMS.

Também na Tabela 3 observa-se que o uso do padrão interno (I.S.) ocorre em todos os estudos, sendo usado principalmente as MPs deuteradas, quando o detector é o Espectrômetro de Massas. Na literatura é descrito a síntese de MPs deuteradas (KOTSERIDIS et al., 1998). No caso do emprego do detector NPD, utilizou-se variantes das MPs, as 3-alkil-2-etoxipirazinas.

Na Tabela 3 observa-se que o volume do HS tende a ser mantido fixo em 10 mL, o tempo de extração varia entre 30 a 240 min e a temperatura de extração varia entre 27 a 50 °C.

Outros parâmetros empregados no método HS/SPME dos estudos são omitidos ou têm grande variedade entre os métodos como: tempo de equilíbrio do HS antes da extração, velocidade de agitação da amostra durante a extração, diluição da amostra, tempo de desorção da fibra no GC, pH, etc. Kotseridis et al. (2008) também observou um desacordo quanto ao tipo de fibra, ao pH do meio e à diluição da concentração alcoólica da amostra comparando alguns estudos.

De modo geral, cada parâmetro do método pode ser otimizado univariadamente, ou seja, cada parâmetro é analisado mantendo-se os outros constantes. Entretanto, é possível otimizar vários parâmetros simultaneamente através da análise multivariada, ou seja, planejar uma sequência de experimentos que permitam analisar vários parâmetros em determinadas faixas de trabalho, e com o resultado é possível gerar uma superfície de resposta que indica o efeito de cada parâmetro sobre a extração dos analitos.

Pelo motivo de não haver um consenso das melhores condições do método HS/SPME empregado a vinhos, será desenvolvido no presente trabalho a otimização de alguns parâmetros da técnica, como também a validação do método e aplicação do mesmo em vinhos comerciais latino-americanos.

2.3.2 Instrumentação para análise

Após feito o isolamento das MPs da matriz complexa do vinho, que no HS/SPME são pré-concentradas na fibra para alcançar níveis de concentrações detectáveis, a amostra está apta para ser analisada no instrumento que separa, detecta e quantifica as MPs. Como visto na Tabela 2, todos os estudos empregam a técnica Cromatografia à Gás (GC), uma técnica muito empregada na área de alimentos pois em seu escopo está a análise de voláteis.

A GC baseia-se na diferente distribuição entre a fase estacionária e a fase móvel dos compostos presentes em um extrato injetado. Na GC a fase móvel é um gás inerte e a fase estacionária pode ser líquida ou sólida a fim de interagir com os analitos de acordo com sua polaridade. Outro fator que promove a separação dos compostos pela GC é o ponto de ebulição dos analitos, devido à rampa de temperatura empregada no forno onde a coluna cromatográfica é instalada. As substâncias presentes na amostra passam através da coluna cromatográfica, onde são separadas de acordo com as interações com a fase estacionária da coluna e com a rampa de temperatura, e chegam ao sistema de detecção (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Diferentes detectores podem ser acoplados à GC e suas características de sensibilidade, seletividade, linearidade e quantidade mínima detectável diferem significativamente. Como visto na Tabela 2, a maioria dos estudos empregam detectores Espectrômetros de massa (MS), pois é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, bem como da estrutura do analito (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Observa-se na Tabela 2 que há uma preferência por detectores de massas multidimensionais, o que aumenta a sensibilidade do método para alcançar baixos limites de detecção. Porém, há também o uso do detector de nitrogênio-fósforo (NPD), que é seletivo aos compostos que contêm nitrogênio e fósforo, sendo utilizado em alguns dos estudos das MPs em vinhos. A presença de dois nitrogênios nos anéis aromáticos das MPs tornam-as detectáveis, e com isto o NPD é muito seletivo para as MPs, e este foi utilizado no presente trabalho devido à disponibilidade no laboratório de pesquisa para avaliar o potencial deste detector no método de análise das MPs em vinhos.

O cromatógrafo gasoso acoplado com detector NPD é uma configuração instrumental usada para analisar compostos orgânicos contendo nitrogênio ou fósforo e é comumente usado em análises ambientais e alimentares para a determinação de pesticidas e em análises biomédicas para determinação de fármacos contendo átomos de nitrogênio e

fósforo. O NPD é um detector por ionização, processo no qual se utilizam sais de metais alcalinos (brometo de cézio ou sulfato de rubídio) na forma de pérola, a qual é colocada entre o queimador e o eletrodo coletor e é aquecida eletricamente por uma bobina, sendo passado um plasma gerado pela aplicação de um potencial elétrico adequado em um fluxo de ar e hidrogênio. A fonte é mantida em um potencial negativo para evitar a perda dos íons do metal alcalino e para anular a resposta do detector no modo de ionização de chama. Na região da pérola, existe uma chama, ou um plasma, suportados pelo fluxo de ar e hidrogênio. A ação catalítica do metal alcalino em compostos contendo nitrogênio ou fósforo forma íons com carga negativa, que são coletados no ânodo (eletrodo coletor) para produzir uma corrente. A especificidade e a detectabilidade são dependentes de variáveis experimentais, principalmente corrente de aquecimento da pérola, potencial do queimador, escolha do gás de arraste, vazão de ar e hidrogênio e posição da pérola (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Após a seleção do instrumento cromatográfico e do detector, GC/NPD, é necessário realizar a otimização de cada uma das condições do sistema de separação cromatográfica para a separação dos analitos de interesse, como, por exemplo, a temperatura no injetor para volatilização dos compostos, volume de amostra injetada, a composição da fase estacionária e da fase móvel, vazão da fase móvel, temperatura de separação, dimensões da coluna, temperatura do detector, etc. Ao otimizar o método cromatográfico, estabelecem-se condições ótimas para a separação dos analitos de interesse, no caso, a obtenção de uma resolução mínima entre as bandas cromatográficas, boa seletividade, eficiência de separação e detectabilidade dos compostos, isso tudo no menor tempo de separação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.3.3 Validação de métodos

Após otimizar o método de separação e de preparo de amostra, HS/SPME-GC/NPD, é necessário avaliar o potencial deste método através de parâmetros analíticos de mérito relacionados à quantificação das MPs nos vinhos. Para garantir que este método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

No processo de validação de um método analítico é importante seguir um guia para o procedimento. De acordo com a AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) alguns requisitos de desempenho são avaliados no método analítico quantitativo para analitos em

nível traço, como os seguintes parâmetros: Faixa aplicável, precisão, recuperação e limite de quantificação (LOQ) (AOAC, 2016).

A faixa aplicável corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior de concentração do analito estudado. A precisão consiste na proximidade entre resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas, e é geralmente expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD) dos resultados do teste. A recuperação é definida como a razão entre o resultado médio observado do teste e o valor verdadeiro. O LOQ é o nível acima do qual resultados quantitativos podem ser obtidos com um grau de confiança declarado. (AOAC, 2016).

Como visto, cada parâmetro avalia questões diferentes do método, e são importantes para avaliar a aplicação do mesmo na análise proposta.

Vários estudos na literatura realizaram a validação do método para a análise de MPs em vinhos, embora cada estudo tenha priorizado alguns parâmetros. De fato, o LOD é o parâmetro mais determinado em todas as validações, visto que as concentrações de MPs são baixas no vinho (ng L^{-1}), muitas vezes próximas ao limite de percepção sensorial, no caso da IBMP em vinhos tintos, de 10-16 ng L^{-1} . A determinação do LOD pela razão sinal/ruído é o mais empregado entre os métodos avaliados, e para diferentes MPs já foram alcançados limites de detecção entre 0,3 a 4 ng L^{-1} (BOTEZATU; PICKERING; KOTSERIDIS, 2014; CHAPMAN et al., 2004; GODELMANN; LIMMERT; KUBALLA, 2008; HJELMELAND; WYLIE; EBELER, 2016; KOTSERIDIS et al., 2008; PROUTEAU et al., 2004; SALA et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para a determinação de 3-alkuil-2-metoxipirazinas em amostras comerciais de vinhos latino-americanos empregando a microextração em fase sólida pelo modo *headspace* (HS/SPME) e cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo (GC/NPD) como técnica de separação e detecção dos compostos de interesse.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Otimizar a separação e detecção das 3-alkuil-2-metoxipirazinas no GC/NPD selecionando a coluna cromatográfica, o programa de temperatura para eluição, entre outros parâmetros cromatográficos;

(ii) Otimizar os parâmetros da técnica de HS/SPME na análise das 3-alkuil-2-metoxipirazinas selecionando a composição da fibra, diluição da amostra, força iônica (NaCl), temperatura e tempo de extração;

(iii) Determinar os parâmetros de validação da metodologia desenvolvida, como a faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, limites de detecção e quantificação, precisão intra-dia e inter-dia e exatidão;

(iv) Aplicar o método validado em amostras de vinhos latino-americanos comerciais.

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram utilizados os padrões analíticos: 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP, 99 %), 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP, 99 %), 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP, 97 %), 3-etil-2-metoxipirazina (ETMP, 99 %) e 2-metoxipirazina (2-MP, 95 %) e a pirazina (padrão interno, I.S.) obtidos da *Sigma-Aldrich*[®] (EUA). Com estes padrões foram preparadas soluções estoque padrão individuais com concentração de 1000 mg L⁻¹ em etanol e armazenada a -23°C até o uso (conforme disposto por SALA et al., 2000). Soluções intermediárias de 70 mg L⁻¹ e 15 mg L⁻¹ de cada MP foram preparadas pela diluição das soluções estoque em água. Destas soluções intermediárias foram preparadas soluções trabalho com a mistura das 5 MPs e do I.S. pela diluição adequada em água a fim de fortificar as soluções de amostra de vinho isento de MPs para as otimizações do preparo de amostra e para a validação do método.

O álcool etílico 95 % grau UV/HPLC empregado no preparo das soluções estoque foi adquirido da Vetec (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) utilizado para ajustar a força iônica das amostras foi obtido da Fisher Scientific. A água ultrapura (18,2 MΩ cm) utilizada nos experimentos foi purificada em um sistema de filtração de água Milli-Q (*Millipore*[®], USA).

Os gases empregados no GC foram o Nitrogênio, Hidrogênio e Ar sintético com pureza acima de 99 % obtidos da White Martins (Brasil).

4.2 AMOSTRAS DE VINHO

O vinho tinto orgânico (pH 2,67) composto de uma mistura de uvas *Vitis Labrusca* (*Isabel* e *bordô*) adquirido em mercado local foi utilizado nas otimizações do método HS/SPME-GC/NPD e na validação do método, sendo considerado como matriz isenta nas curvas de calibração.

Após a validação do método HS/SPME-GC/NPD, este foi empregado na determinação das MPs em 9 amostras de vinhos comerciais, sendo os vinhos tintos: *Cabernet Franc*, *Bonarda*, *Malbec*, *Isabel* e *Bordô*, *Tannat*, *Carmenere*, *Cabernet Sauvignon* e os vinhos brancos: *Sauvignon Blanc* e *Torrontés*. Eles abrangem safras de 2012 a 2018, contendo teor alcoólico entre 10 a 13,5 e pH na faixa de 2,46 e 2,97. Eles foram produzidos em diferentes pontos geográficos da América Latina: Brasil, Argentina, Uruguai e Chile e foram

obtidos no comércio local como também no comércio da Argentina. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em local refrigerado a 4 °C até o momento da análise (SALA et al., 2002).

4.3 MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO

Para manter o aquecimento e agitação das amostras durante as extrações, foi usado um banho termostaticado da Sieger, modelo Stern 6 com controlador de temperatura, acoplado com mangueiras em uma cela de vidro sob chapa de agitação magnética da Velp Scientifica, modelo Arec.

As fibras comerciais de 1cm: Polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μ m, Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 μ m, Polidimetilsiloxano-Carboxen-divinilbenzeno (PDMS/Car/DVB) 50/30 μ m utilizadas como fase extratora e o dispositivo de SPME manual (*holder*) para acoplar e manusear as fibras foram obtidos da Supelco (*Sigma-Aldrich*®). Cada fibra foi condicionada antes do uso, inserindo-a no injetor do GC a 250 °C com *split* 1:100 e imediatamente usada para evitar contaminação.

As análises foram feitas em um Cromatógrafo gasoso (GC) modelo 7890A da marca Agilent Technologies (Alemanha), equipado com injetor *split/splitless* e detector de nitrogênio-fósforo (NPD), presente no laboratório 323 (LABEC) do Departamento de Química – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas (CFM) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As medidas de pH das soluções e amostras foram realizadas utilizando um pHmetro Micronal – modelo B 474, com eletrodo de referência de Ag/AgCl.

4.3.1 Condições cromatográficas

Para a realização de todos os ensaios as condições empregadas no injetor do GC/NPD, incluíram o uso de um *liner* de SPME com diâmetro interno de 0,75mm e temperatura de operação de 250 °C. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna da Agilent J&W – Modelo HP-5, composta por (5%-fenil)-metilpolisiloxano (30 m x 0,320 mm x 0,25 μ m de espessura de filme), sendo o limite de temperatura de 325 °C. O fluxo de gás de arraste foi de 1 mL min⁻¹ composto por nitrogênio de alta pureza (*head pressure* 5,39 psi, *purge flow* 15 mL min⁻¹). A separação dos analitos ocorreu usando o seguinte programa de temperatura: temperatura inicial da coluna foi 70 °C mantida por 5 min, depois a

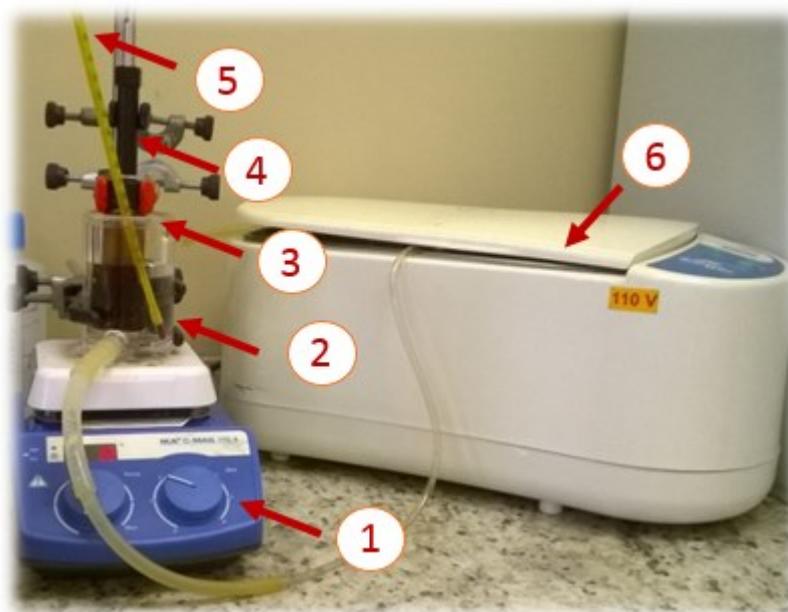
temperatura foi aumentada até 120 °C na taxa de 25 °C min⁻¹ e após atingida essa temperatura foi aumentada novamente até 230 °C na taxa de 10 °C min⁻¹, permanecendo por 5 min, totalizando 23 min de corrida cromatográfica. Na performance do detector de NPD o gás auxiliar (*make up*) foi nitrogênio a 10 mL min⁻¹, fluxo de hidrogênio de 3 mL min⁻¹, fluxo de ar de 60 mL min⁻¹ e temperatura de operação de 280 °C.

A identificação dos analitos foi confirmada com a injeção dos padrões analíticos que geraram um incremento no sinal cromatográfico de cada um exatamente nos seus respectivos tempos de retenção. A quantificação dos analitos foi realizada pela integração da área cromatográfica das MPs e do I.S, sendo empregado a razão da área da MP pela área do I.S. O controle e aquisição dos dados foram realizados utilizando o *software Chemstation*[®].

4.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO HS/SPME-GC/NPD

De modo geral, as extrações dos analitos da amostra pelo método do HS/SPME foram realizadas em um frasco de vidro de SPME de 40 mL com tampa rosqueável, sendo 20 mL de *headspace* (HS) e 20 mL da solução da amostra, a qual continha um vinho isento de MPs sem tratamento prévio diluído em água Milli-Q com a adição das 5 MPs e o I.S. Neste frasco de vidro para SPME, foi adicionado uma pequena barra magnética de agitação e então foi tampado, colocado em banho termostaticado para controle da temperatura e agitação de 200 rpm, mantido por 10 min para alcançar o equilíbrio termodinâmico e, em seguida, a fibra foi exposta no HS para extração dos analitos. Após este período de extração, a fibra foi transferida e inserida manualmente para o injetor do GC/NPD no modo *splitless* para dessorção térmica dos analitos à 250 °C. Após 5 min de dessorção, a fibra foi retirada do GC para ser utilizada na extração dos analitos da amostra seguinte. Na Figura 4 observa-se o sistema montado para controle da agitação e temperatura durante a extração das MPs na amostra no qual há o auxílio do suporte universal e garras para fixar o *holder* e a fibra no HS do frasco durante a extração das MPs. As determinações analíticas foram realizadas em triplicata. A barra de agitação e os demais frascos foram lavados com água deionizada e etanol 70 % após as extrações.

Figura 4. Sistema para o preparo de amostra HS/SPME. Legenda da imagem: 1 - Agitador magnético, 2 – Cella de vidro conectada com mangueiras ao banho termostaticado, 3 – Frasco de vidro de SPME com amostra, 4 – *Holder* com a fibra no HS do frasco da amostra, 5 – Termômetro, 6 – Banho termostaticado.



Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

4.4.1 Otimizações univariadas

4.4.1.1 Seleção da fibra

Foi realizado o ensaio de extração das MPs presentes em amostra fortificada de vinho em triplicata para cada fibra comercial (PDMS, PDMS/DVB e PDMS/Car/DVB) pelo método HS/SPME-GC/NPD, a fim de avaliar o potencial de extração das fibras frente às MPs. Conforme as condições experimentais descritas no tópico 4.4, o ensaio para seleção da fibra ocorreu utilizando-se uma solução da amostra com 10 mL de vinho isento e 10 mL de água Milli-Q contendo as 5 MPs (IBMP, SBMP, IPMP, ETMP e 2-MP) a uma concentração final de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ e o I.S. 21 mg L^{-1} . A extração das MPs do HS da amostra com cada fibra ocorreu a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação durante 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada fibra. Foi realizada a normalização das áreas obtidas das MPs sem a correção do I.S. a fim de obter um gráfico de barras.

4.4.1.2 Ensaio de diluição

Após a seleção da fibra (PDMS/Car/DVB) com melhor potencial de extração das MPs, foi realizado o estudo da influência da diluição da matriz das amostras na extração. Para isso foram fixados os parâmetros de extração descritos no tópico 4.4, porém foram realizadas diferentes razões de diluição (1, 1:1, 1:2, 1:3) da amostra de vinho, mas mantendo o volume final da amostra e a concentração final de MP de $70 \mu\text{g L}^{-1}$ e I.S. $467 \mu\text{g L}^{-1}$. A extração das MPs do HS da solução com cada diluição ocorreu a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação durante 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada diluição. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada fibra. Foi realizada a normalização das áreas obtidas das MPs com a correção do I.S. a fim de obter um gráfico de barras.

4.4.2 Otimização multivariada

As variáveis força iônica pela adição de NaCl na amostra (0 a 30 %, m v⁻¹), temperatura de extração (20 – 60 °C) e tempo de extração (30 – 120 min) foram otimizadas através de um planejamento multivariado do composto central, totalizando 17 experimentos. O planejamento está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento do composto central para a otimização da temperatura de extração, tempo de extração e % de NaCl adicionado a amostra.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Força iônica (%)
1	28	48	6
2	28	102	24
3	52	48	24
4	52	102	6
5 (C)	40	75	15
6	28	48	24
7	28	102	6
8	52	48	6
9	52	102	24
10 (C)	40	75	15
11	20	75	15
12	60	75	15
13	40	30	15
14	40	120	15
15	40	75	0
16	40	75	30
17 (C)	40	75	15

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Cada ensaio do planejamento do composto central foi feito mantendo-se fixo os parâmetros do procedimento citado no tópico 4.4, adicionando-se o NaCl na amostra, com a concentração final de $70 \mu\text{g L}^{-1}$ das MPs e o I.S. $467 \mu\text{g L}^{-1}$, e variando o tempo e a temperatura de extração para cada experimento, utilizando a fibra PDMS/Car/DVB e a razão de diluição 1:3. As superfícies de resposta para as três variáveis foram obtidas através do tratamento da média geométrica das razões de área das MPs pelo I.S. pelo *software Statistica*[®] 13.0.

4.4.3 Método HS/SPME-GC/NPD otimizado

A técnica otimizada de HS/SPME-GC/NPD para determinação de 3-alkil-2-metoxipirazinas em amostras de vinho consiste em adicionar uma pequena barra de agitação e 6 g de NaCl (30 %) em um frasco de vidro de SPME de 40 mL, sendo 20 mL de *headspace* (HS) e 20 mL de amostra com razão de diluição 1:3 (5 mL de vinho com I.S. na concentração final de $190 \mu\text{g L}^{-1}$ e 15 mL de água Milli Q). O frasco foi tampado e colocado em um banho termostatizado a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 200 rpm, onde a solução da amostra foi mantida por 10 min, depois a fibra PDMS/Car/DVB foi exposta no HS do frasco por 30 min. Após esse período de exposição da fibra, esta foi submetida à análise GC/NPD. Após 5 min de dessorção, a fibra foi removida do GC para ser introduzida na próxima amostra. O método otimizado descrito acima foi utilizado para os ensaios de validação e aplicação nas amostras comerciais para determinação das MPs.

4.5 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DO MÉTODO

A fim de realizar a validação do método HS/SPME-GC/NPD, foram avaliados alguns parâmetros analíticos. Cinco curvas de calibração para 2-MP, IPMP, ETMP, SBMP e IBMP foram feitas usando uma matriz de vinho isenta de MPs. Um conjunto de nove concentrações em uma faixa de $0,14 - 61,36 \mu\text{g L}^{-1}$ foi analisada em triplicata para cada composto, juntamente com a triplicata do branco. Não foram encontrados níveis detectáveis de analitos no branco. A razão da área do pico do analito dividida pela área do pico do I.S. foi plotada em função da concentração do analito e usada para gerar regressões lineares. O pH da curva de calibração foi medido após as análises e permaneceu 2,67.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram obtidos pela razão sinal/ruído com base na altura do pico.

Foi avaliada a exatidão através da recuperação relativa (RR) em três níveis de concentração da curva ($0,14, 27,27$ e $61,36 \mu\text{g L}^{-1}$) e calculadas as porcentagens entre os valores estimados e o obtido experimentalmente, sendo este último obtido aplicando-se a razão da área da MP pelo I.S na equação de reta da regressão linear obtida da curva de calibração do método.

Foi avaliada a precisão intra-dia em três pontos da curva ($0,14, 27,27$ e $61,36 \mu\text{g L}^{-1}$) sendo a extração realizada três vezes em cada ponto ($n = 3$). Para estudos de precisão inter-dia, a concentração de $27,27 \mu\text{g L}^{-1}$ foi selecionada para realizar três repetições em três dias

diferentes ($n = 9$). O desvio padrão relativo (RSD) foi utilizado para avaliar a reprodutibilidade das precisões (intra-dia e inter-dia) e da RR.

4.6 PROGRAMAS UTILIZADOS NA ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise dos dados gerados nos experimentos de otimização e validação do método HS/SPME-GC/NPD desenvolvido nesse trabalho foram utilizados os programas *Microsoft Excel*[®] 2016 e *Statistica*[®] 13.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

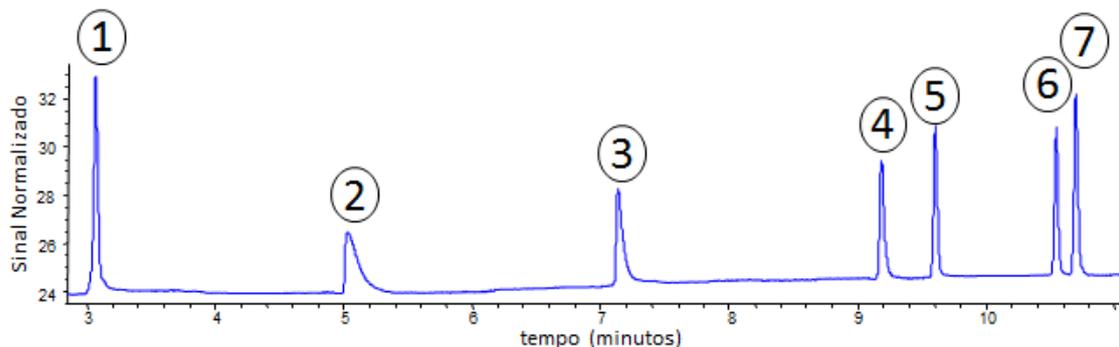
5.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS MPS POR GC/NPD

Na primeira etapa dos ensaios foi realizada a separação cromatográfica dos analitos que serão estudados, avaliando as condições cromatográficas, principalmente a coluna e o programa de temperatura selecionados.

De modo geral, foram testadas duas colunas: DB-WAX (Polietilenoglicol) e HP-5 (5% fenil-polidimetilsiloxano) no GC/NPD. A DB-WAX apresentou coeluição entre IPMP e ETMP, e mesmo com diferentes programas de temperatura, o IPMP e o ETMP continuaram a coeluir. Este problema também foi observado por Sala et al. (2000), a qual também indicou este mesmo efeito ocorrido por Augustyn, Rapp, Van Wyk (1982). Devido a isso, conforme estudado por Hartmann, Mcnair, Zoecklein (2002) que também analisou 4 dos 5 analitos neste trabalho (IBMP, SBMP, IPMP e ETMP), eles empregaram a coluna HP-5MS (5% fenil-polidimetilsiloxano) no GC/NPD. Assim, a coluna HP-5 foi testada para a separação cromatográfica das 5 MPs e o I.S apresentando a separação de todos os compostos.

Para observar a separação cromatográfica dos compostos, foram empregados padrões analíticos individuais e misturados dos compostos IBMP, SBMP, IPMP, ETMP, 2-MP e I.S., realizando a injeção direta das soluções alcoólicas. Primeiramente, observou-se o tempo de retenção de cada composto individualmente e posteriormente observou-se a separação obtida pela mistura dos compostos na solução injetada. A separação cromatográfica típica obtida com a coluna de HP-5 pode ser observada no cromatograma (Figura 5).

Figura 5. Separação dos padrões analíticos com a coluna HP-5 (injeção direta de 1 μL de 3 mg L^{-1} de solução das MPs em etanol): 1 – Etanol (3,02 min), 2 – I.S. (5,03 min), 3 – 2-MP (7,13 min), 4 – ETMP (9,19 min), 5 – IPMP (9,60 min), 6 – SBMP (10,54 min) e 7 – IBMP (10,69 min).



Fonte: Dados obtidos no *software Chemstation*[®] (2018).

Observa-se na Figura 5 o sinal das MPs e do I.S. e os tempos de retenção de cada composto de acordo com as condições cromatográficas finais utilizadas (Descrito em 4.3.1). Os mesmos tempos de retenção foram obtidos na injeção direta da solução alcoólica dos analitos e na injeção direta da fibra após as extrações via HS/SPME. Foram testadas diferentes rampas de aquecimento do forno do GC, sendo a condição ideal para separação das MPs de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ entre $120\text{ e }230\text{ }^{\circ}\text{C}$, pois neste intervalo ocorre uma melhor separação pelos pontos de ebulição dos compostos e com isso foi possível separar os compostos IBMP e SBMP. Os ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$) na ordem crescente dos compostos são:

Pirazina (115) < 2-MP (153,6) < ETMP (174,9) < IPMP (210,8) = IBMP (210,8) < SBMP (230,5). Mesmo que na teoria o ponto de ebulição dos compostos IPMP e IBMP sejam $210,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, na condição cromatográfica empregada há uma boa separação dos compostos, pois a separação ocorre também devido à geometria das moléculas, ou seja, a IBMP tem um tempo de retenção maior, e isso ocorre porque a geometria favorece o contato da molécula com a fase estacionária, fazendo-a ficar mais retida e saindo da coluna após a IPMP, além do fato da IBMP ser um pouco mais apolar que a IPMP, também interagindo mais com a coluna. No caso, a coluna utilizada foi a HP-5 (5%-fenil-metilpolisiloxano), a qual é apolar, e a polaridade dos compostos pode ser observada com os dados de coeficiente de partição octanol/água (Log P, o/w) à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo o valor de Log P maior indicando a menor polaridade. Segue a seguinte ordem crescente de polaridade:

SBMP (2.924) < IBMP (2.547) < IPMP (2.414) < ETMP (1.684) < 2-MP (0.848)

O padrão interno (I.S.) utilizado, pirazina, possui Log P de 0,002, sendo o primeiro composto a eluir na coluna, pois é bem polar. Em sequência, na eluição ocorre a saída dos

compostos mais apolares da coluna para o detector. O SBMP e o IBMP eluíram muito próximos por questões de geometria, pois são isômeros estruturais.

Na Tabela 5 segue alguns parâmetros que evidenciam a eficiência da separação cromatográfica das MPs e do I.S. com as condições cromatográficas estabelecidas para o método HS/SPME-GC/NPD.

Tabela 5. Parâmetros de separação cromatográfica das MPs e I.S. para o método HS/SPME-GC/NPD.

Parâmetro de eficiência	Analito					
	I.S.	2-MP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
Fator de retenção (k') ^a	0,64	1,32	2,00	2,13	2,43	2,48
Simetria de pico ^b	0,221	0,331	0,585	0,839	0,803	0,722
Número de pratos ($N\ m^{-1}$) ^c	94	678	3126	4914	5929	6098
Resolução ^d	7,24 (I.S. e 2-MP)	12,84 (2-MP e ETMP)	3,75 (ETMP e IPMP)	9,45 (IPMP e SBMP)	1,50 (SBMP e IBMP)	-

^a Fator de retenção calculado de acordo com a equação $k' = (t_R - t_M) / t_M$, em que t_R é o tempo morto fornecido em min e t_M é o tempo de retenção do analito fornecido em min.

^b Simetria de pico obtida no *software Chemstation*[®]. Concentração de analitos 3 mg L⁻¹.

^c Número de pratos calculados de acordo com a equação $N = 16 (t_R / w)^2$, em que t_R é o tempo de retenção do analito fornecido em min e w é a largura da linha de base do pico, nas mesmas unidades t_R .

^d Resolução calculada como: $Rs = 2 (t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$, em que t é o tempo de retenção do pico fornecido em min e w é a largura da linha de base do pico, nas mesmas unidades t_R .

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

O fator de retenção avalia quantas vezes mais o componente permanece na fase estacionária, coluna apolar, do que na fase móvel, gás nitrogênio inerte. O valor ideal para esse parâmetro é entre 2 a 20, pois se o $k' < 2$ a eluição é muito rápida e poderia haver sobreposição de picos, e se $k' > 20$ a eluição é muito lenta, o que alargaria os picos. Pelos valores obtidos na Tabela 5 na separação das MPs, os valores de k' são próximos a 2 e indicam que a eluição é rápida, principalmente para o I.S. e a 2-MP que são mais polares que os outros compostos. Estes compostos também não têm uma boa simetria de pico, e, mesmo sendo rápida, a corrida cromatográfica já apresenta essa assimetria de cauda frontal, logo se fosse diminuída a velocidade da rampa de aquecimento da coluna nesse intervalo de separação, possivelmente aumentaria a assimetria do pico, além de aumentar o tempo de corrida total, o que consumiria muito mais gás e não otimizaria o tempo do analista, e poderia comprometer a separação da IBMP e SBMP que já estão muito próximos. Por isso se

manteve a separação cromatográfica nestas condições. O tempo total da corrida foi o menor possível para otimizar o tempo do analista e também gerar a separação dos compostos, sendo um total de 23 min. Os 5 min finais a 230 °C foram necessários para remover possíveis componentes da matriz que ficaram mais retidos na coluna, mesmo que não detectados no detector NPD.

A simetria de pico calculada pelo *software Chemstation*[®] indica que há uma assimetria, devido aos valores menores do que 1 em todos os picos, embora isso seja muito mais evidente nos compostos o I.S. e a 2-MP pela cauda frontal dos picos (Figura 5). Mesmo com este problema é possível realizar a integração dos picos a fim de realizar os ensaios posteriores.

O número de pratos, calculados considerando picos gaussianos na Tabela 5, aumenta com o tipo de composto separado, ou seja, quanto mais apolar este composto, mais este interage com a coluna, e há maior número de pratos envolvidos na separação destes compostos. Esse parâmetro está relacionado com a eficiência da coluna na separação cromatográfica, e quanto maior o número de pratos, mais eficiente a coluna, pois tem mais estágios de equilíbrios do composto entre a coluna e a fase estacionária e maior o tempo de retenção e menor a largura da base do pico, obtendo picos mais finos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A resolução (R_s) é um parâmetro que descreve a habilidade de uma coluna em separar 2 componentes, embora a simetria e o número de pratos para a I.S. e a 2-MP sejam inferiores aos outros compostos, estes têm maior resolução entre si e com o ETMP, indicando que foram bem separados. Já a SBMP e IBMP têm menor resolução do que comparando com os outros compostos, pois estão muito próximas entre si, entretanto não há coeluição no mesmo tempo de retenção pois o R_s é igual a 1,5, que indica que há separação dos picos na linha de base, sendo possível integrar os picos para realizar os ensaios posteriores (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A separação cromatográfica observada no cromatograma da Figura 5 e dos parâmetros na Tabela 5, na qual foi empregada a coluna HP-5 no GC acoplado com o detector NPD, indica que é viável o uso deste sistema no método deste trabalho. Além disso, há relatos na literatura com combinação instrumental semelhante ao selecionado (HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002; SALA et al., 2000, 2002, 2004, 2005).

5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO HS/SPME-GC/NPD

Após obter as condições de separação cromatográfica, é necessário obter as melhores condições de extração das MPs das amostras de vinho por HS/SPME. Logo foi feito o estudo da otimização dos parâmetros: seleção da fibra, diluição, força iônica, tempo e temperatura de extração.

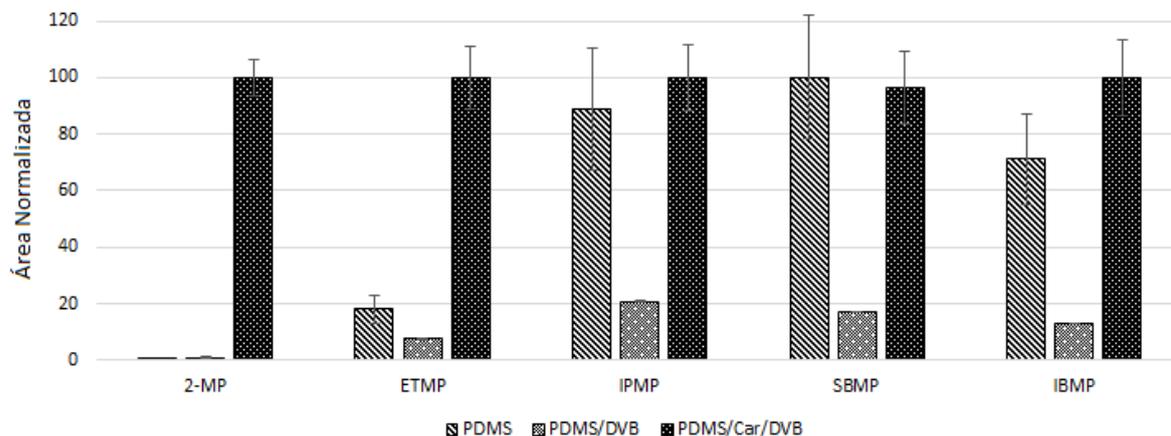
5.2.1 Seleção da fibra

A seleção da fibra foi realizada univariadamente, e essa etapa de seleção das fibras é muito importante para avaliar a afinidade dos compostos analisados com as características de revestimento das fibras estudadas. Neste estudo, foram realizados testes de extração de MPs presentes em um vinho isento, porém fortificado com padrões das MPs em quantidades conhecidas, pelo método HS/SPME-GC/NPD empregando-se três diferentes fibras comerciais: PDMS, PDMS/DVB e PDMS/Car/DVB.

O processo de extração em função dos diferentes tipos de recobrimentos das fibras empregadas ocorre predominantemente pelo mecanismo de partição para o PDMS, e para fibras mistas (PDMS-DVB, PDMS/Car/DVB) o mecanismo de extração se faz preferencialmente por adsorção, onde essas moléculas são retidas por sítios ativos na superfície do recobrimento ou no interior dos seus poros, onde penetram por difusão. (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015)

Abaixo segue o resultado obtido nesta etapa avaliando-se a área normalizada de cada MP para cada fibra (Figura 6).

Figura 6. Gráfico com a correlação das áreas normalizadas das MPs com as diferentes fibras comerciais, empregando a razão de diluição 1:1 da amostra de vinho.



Fonte: Elaborado pelo autor no *software Microsoft Excel*[®] 2016 (2018).

Na Figura 6 observa-se que a 2-MP e a ETMP possuem maior afinidade com a fibra PDMS/Car/DVB do que com as outras duas fibras, por serem mais polares do que as outras MPs e tendo em vista o aumento da polaridade das fibras:

$$\text{PDMS} < \text{PDMS/DVB} < \text{PDMS/Car/DVB}$$

Pelo perfil gráfico entre as fibras para cada MP na Figura 6, observa-se que a fibra PDMS/DVB apresentou sinal baixo, mesmo tendo polaridade intermediária, e isso pode ter ocorrido devido ao fato desta fibra estar saturada com outros compostos de análises feitas anteriormente, tendo em vista que estas fibras empregadas já haviam sido utilizadas anteriormente a este trabalho. Isso pode ter afetado a eficiência na extração da fibra PDMS/DVB, mas de modo geral foi selecionada a fibra tripla, PDMS/Car/DVB, para continuar com os experimentos devido a sua alta eficiência na extração de todas as MPs em relação as demais fibras.

A concentração usada do I.S., o qual é polar, neste ensaio de seleção da fibra foi de 21 mg L⁻¹, sendo este valor alto devido ao fato deste composto ser pouco extraído pela fibra PDMS, a qual é mais apolar e foi a primeira fibra a ser testada. Esta concentração de I.S. foi usada para todas as fibras e esta escolha foi feita baseada na fibra que extrai menos, ou seja a PDMS.

Como o sinal de I.S nas extrações variou, devido a diferença de polaridade, o gráfico da Figura 6 não possui correção com o I.S.

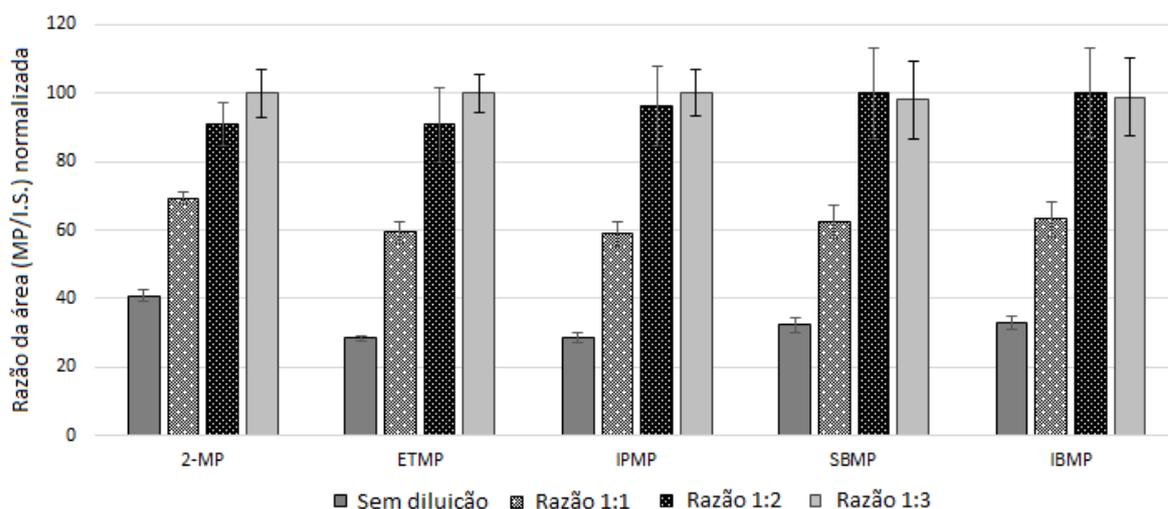
Após selecionar a fibra PDMS/Car/DVB, que extrai melhor o I.S. por ser mais polar, a concentração do I.S. foi reduzida para $467 \mu\text{g L}^{-1}$ no ensaio posterior de diluição. Com isso, os ensaios posteriores foram realizados com concentrações no mesmo nível ($\mu\text{g L}^{-1}$) para as MPs e o I.S.

5.2.2 Diluição da amostra

A complexidade da própria matriz do vinho também pode afetar a extração dos compostos de interesse, em que a presença de etanol dificulta a transferência das MPs da amostra aquosa para o HS, pois o mesmo tem maior interação com as MPs do que a água devido à baixa polaridade. Estudos de otimização relacionados à concentração do etanol foram realizados por Godelmann, Limmert, Kuballa (2008) e Hartmann, Mcnair, Zoecklein (2002) de modo univariado, os quais concluíram que há um efeito de matriz relacionado a este parâmetro, onde um teor mais alto de etanol diminui o rendimento na recuperação das MPs, sendo necessário diluir a amostra a fim de melhorar a transferência das MPs da solução para o HS e conseqüentemente a extração das MPs pela fibra.

A diluição da amostra é uma variável importante a ser estudada devido ao efeito da matriz do vinho na extração de MPs. Nos ensaios de diluição feitos univariadamente para a extração, foi obtido o gráfico que relaciona o sinal de extração de cada uma das cinco MPs para cada razão de diluição, e foi possível avaliar qual a razão de diluição da matriz tem o maior potencial de extração das MPs selecionadas (Figura 7).

Figura 7. Gráfico com a correlação das áreas normalizadas da razão MP/I.S. com as diferentes razões de diluições da matriz da amostra de vinho (Sem diluição, 1:1, 1:2, 1:3), mantendo a concentração das MPs constante nas amostras.



Fonte: Elaborado pelo autor no *software Microsoft Excel*[®] 2016 (2018).

Observa-se no gráfico da Figura 7 que ao aumentar a razão da diluição, o efeito da matriz se reduz bastante devido à diminuição do teor de álcool presente, o que torna a transferência dos analitos da solução mais eficiente, pois o meio se torna mais polar, transferindo assim as MPs para o HS. Observa-se para o caso da 2-MP que a percentagem de extração aumentou 60 %, fazendo-se a razão de diluição de 1:3, ao comparar com o sinal obtido sem diluição.

Segundo Godelmann, Limmert, Kuballa (2008), o etanol aumenta a solubilidade das MPs na amostra devido à diminuição da polaridade do meio, resultando em menor concentração dos analitos no HS, além do fato do etanol também competir com os analitos pela adsorção na fibra.

Na Tabela 6 tem-se os valores da concentração de etanol presente na amostra nas diferentes diluições, ao utilizar o vinho tinto isento com 10,5 % de álcool como matriz fortificada para os ensaios.

Tabela 6. Porcentagem de etanol na amostra em cada razão de diluição.

Etanol (%)	Razão de diluição
10,5	1
5,5	1:1
3,8	1:2
3,0	1:3

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

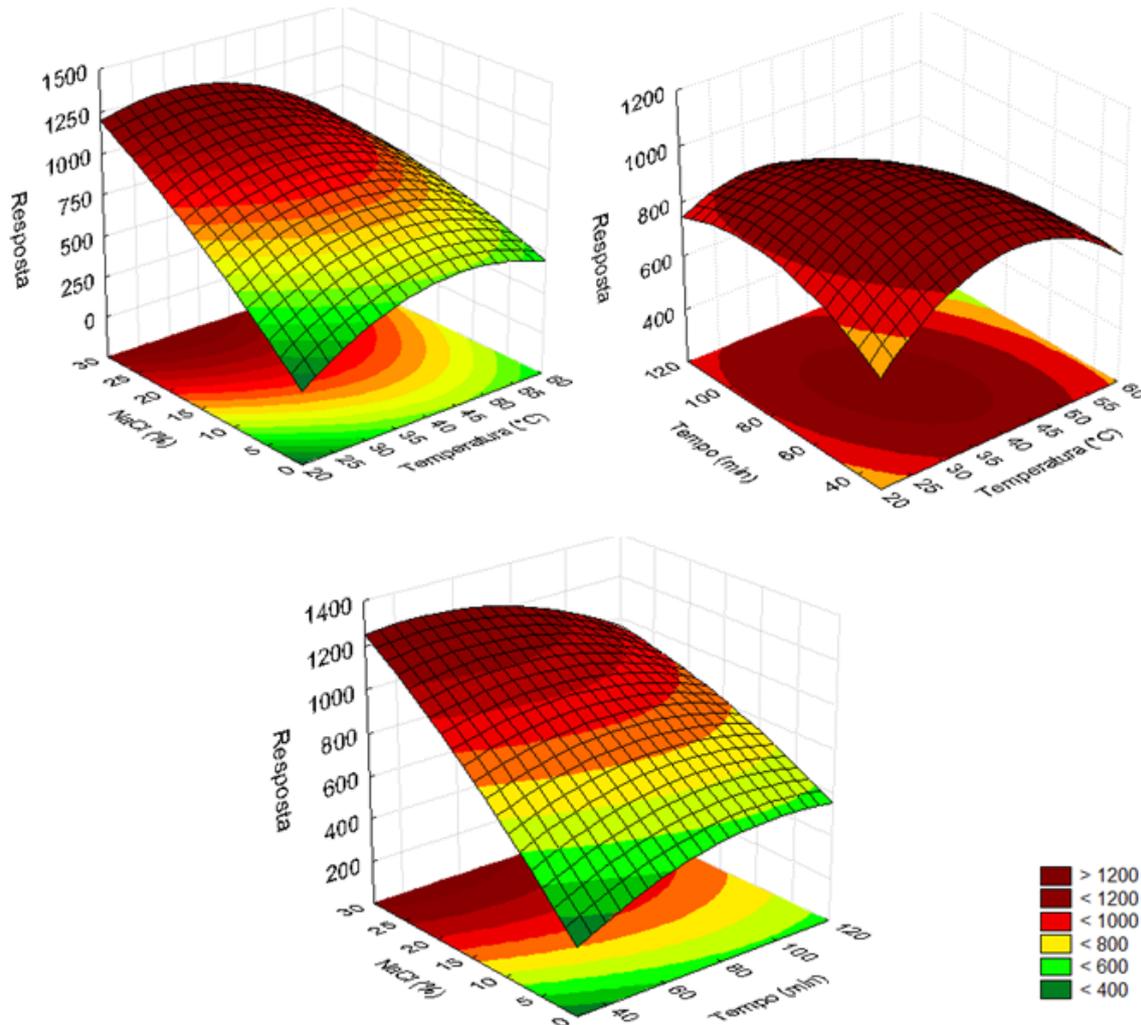
Como a variação do teor alcoólico entre as razões 1:2 e 1:3 foi baixa, e há uma diferença de extração entre estas razões de diluição em algumas MPs, foi selecionada a razão de diluição 1:3 para os ensaios de otimização multivariada a seguir.

5.2.3 Otimização multivariada

Embora existam na literatura⁸ estudos que avaliaram o efeito das variáveis força iônica, temperatura e tempo de extração de modo univariado, ou seja, um parâmetro por vez, no método HS/SPME para vinhos, estas variáveis foram estudadas neste trabalho simultaneamente através da aplicação do método de análise multivariada com o planejamento composto central a fim de observar qual condição que promove uma maior extração das MPs do vinho fortificado. Os parâmetros avaliados interferem diretamente na extração dos compostos, e uma vez otimizados promovem a melhor condição de extração das MPs para o método HS/SPME-GC/NPD empregado. Através desse planejamento foram obtidas as superfícies de resposta apresentadas na Figura 8.

⁸ Boutou e Chatonnet (2007); Godelmann, Limmert, Kuballa (2008); Hartmann, Mcnair, Zoecklein (2002); Hjelmeland, Wylie, Ebeler (2016).

Figura 8. Superfícies de resposta obtidas através do planejamento composto central e das médias geométricas das áreas das 5 MPs. Elaborado no *software Statistica*® 13.0 a partir dos dados da otimização para temperatura, tempo de extração e % de NaCl.



Fonte: Dados obtidos no *software Statistica*® 13.0 (2018).

Em relação ao ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático linear, observa-se que o coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,912, obtido pela Tabela ANOVA (APÊNDICE A) indica que o modelo matemático linear empregado é preditivo para este experimento. Isso também é observado no gráfico dos valores previstos pelos valores observados (APÊNDICE A).

Conforme os valores de p na Tabela da ANOVA (APÊNDICE A), observa-se a significância de cada parâmetro avaliado. Embora os três parâmetros estudados tenham sido significativos tanto no modelo quadrático quanto no linear, pelo modelo linear o parâmetro do teor de cloreto de sódio (NaCl) foi expressivamente mais significativo, com valor de p igual a 0,000376. Isso também é observado no perfil gráfico das superfícies de resposta, Figura 8,

onde a força iônica exerce uma influência considerável na extração de MPs da matriz do vinho e, portanto, a condição ideal para a extração é uma concentração de 30 % de NaCl adicionado, ou seja uma solução saturada, devido ao favorecimento do efeito *salting out*, que aumenta a partição dos analitos orgânicos da amostra aquosa no HS (HARTMANN; MCNAIR; ZOECKLEIN, 2002). Isso justifica o uso de 30 % de NaCl também por outros grupos de pesquisa na literatura (Vide Tabela 3).

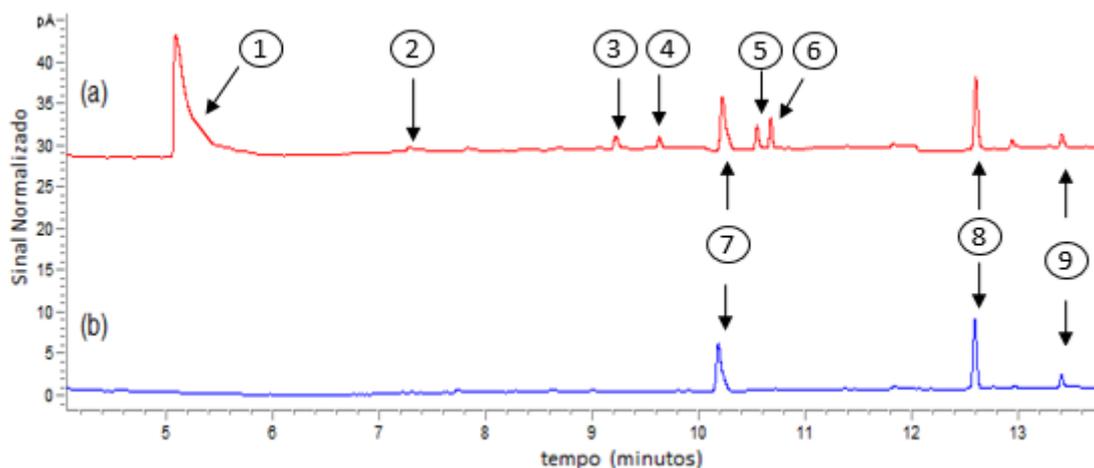
Os parâmetros tempo e temperatura, pelo modelo linear na Tabela ANOVA (APÊNDICE A), apresentam valores de p iguais a 0,0213 e 0,00613, respectivamente. Estes valores indicam que estes parâmetros são menos significativos do que o teor de NaCl nas extrações das MPs do vinho. Os valores ótimos destes parâmetros foram estimados pelo gráfico de superfície de resposta, Figura 8, baseando-se no maior teor de NaCl e maior resposta destes dois parâmetros, sendo selecionado o tempo de 30 min a uma temperatura de 35°C para a validação do método de acordo com o perfil da superfície de resposta obtido.

5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DO MÉTODO

Após otimizar as variáveis envolvidas no método, selecionando as condições experimentais que geram maior eficiência de extração das MPs do vinho, o método HS/SPME-GC/NPD otimizado foi validado para determinar as MPs, utilizando-se de atributos de quantificação da técnica de GC. Os parâmetros analíticos estudados neste método foram: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção (LOD); limite de quantificação (LOQ).

A aplicação qualitativa do GC em análises já foi utilizada no estudo da separação cromatográfica, onde foi feita a determinação da identidade das MPs pelos tempos de retenção, mas também pode ser usada para identificação individual das MPs contidas em amostras. Em todos os estudos foi utilizada uma amostra de vinho com matriz isenta, ou seja, que não continha os analitos ao se realizar a extração nas condições iniciais de estudo. Mas após realizar as otimizações, foi reavaliado se a matriz é realmente isenta, pois ao mudar os parâmetros do HS/SPME, as MPs presentes no vinho base podem ter ganhado evidência no cromatograma devido à melhora das condições de extração obtidas. Assim, a verificação da seletividade foi o primeiro passo na análise, sendo feita através da comparação do cromatograma da matriz adicionada com os padrões das MPs (Figura 9 – a) com o da matriz isenta das MPs (Figura 9 – b).

Figura 9. Cromatograma obtido após a extração pelo método HS/SPME-GC/NPD otimizado do vinho base utilizado na validação do método. (a) Matriz de vinho fortificada com $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ das cinco MPs. (b) Matriz de vinho sem adição de padrões de MPs. Os cromatogramas estão em mesma escala. Legenda: 1 – I.S. (5,1 min), 2 – 2-MP (7,2 min), 3 – ETMP (9,2 min), 4 – IPMP (9,6 min), 5 – SBMP (10,5 min), 6 – IBMP (10,7 min), 7, 8 e 9 – Interferentes (10,23, 12,95 e 13,42 min).



Fonte: Dados obtidos no *software Chemstation*[®] (2018).

De fato, nesta concentração adicionada dos padrões, o 2-MP não é detectável, no entanto, observa-se que no cromatograma (Figura 9 – a) há a ETMP (9,19 min), a IPMP (9,60 min), a SBMP (10,54 min) e a IBMP (10,69 min) e além destes padrões adicionados há três interferentes que foram seletivos pelo detector NPD, nos tempos 10,23 min e 12,95 min com maior intensidade e em 13,42 min com menor intensidade, mas de modo geral a linha de base do cromatograma é pouco ruidosa, indicando que realmente o NPD é bem específico, pois detecta substâncias que possuem determinado elemento ou grupo estrutural, sendo altamente seletivo para compostos orgânicos nitrogenados ou fosforados. Em termos de seletividade, nenhum interferente elui nos tempos de retenção das MPs (Figura 9 – b). Segundo Ribani et al. (2004), a resolução (R_s) tem que ser maior que 2 entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo. Logo, foi calculada a R_s dos interferentes em relação às MPs, sendo de 5,16 entre IPMP e o 1º interferente, 2,82 entre o SBMP e o 1º interferente, e de 24,06 entre IBMP e o 2º interferente, indicando que não há coeluição de compostos interferentes.

Os demais parâmetros analíticos de mérito, linearidade e precisão feita pelos modos intra-dia e inter-dia, que estão relacionados à repetitividade de análises no mesmo dia e à precisão intermediária pelas análises feitas em dias diferentes, respectivamente, exatidão pela recuperação relativa e os limites de detecção e quantificação, estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Figuras de mérito do método otimizado para a determinação de IBMP, SBMP, IPMP, ETMP, 2-MP por HS/SPME-GC/NPD.

Figuras de mérito	n	Analito				
		2-MP	ETMP	IPMP	SBMP	IBMP
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	9	0,14–61,4	0,03–61,4 ^e	0,14–61,4	0,14– 61,4	0,03–61,4 ^e
Coefficiente Angular ^a	9	0,133	0,060	0,081	0,148	0,173
Coefficiente Linear ^a	9	0,026	0,0675	0,066	0,092	0,1294
Coefficiente de determinação (R^2) ^a	9	0,998	0,993	0,997	0,996	0,996
LOD^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)		0,031	0,011	0,018	0,009	0,006
LOQ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)		0,103	0,038	0,060	0,029	0,020
RR % (RSD %)^c 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	102 (18,5)	116 (11,1)	110 (14,7)	108 (13,3)	98 (11,8)
RR % (RSD %)^c 27,27 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	102 (0,6)	116 (6,5)	113 (3,8)	109 (4,7)	113 (6,5)
RR % (RSD %)^c 61,36 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	106 (13,7)	104 (11,1)	111 (13,9)	114 (19,1)	111(18,0)
Precisão Intra-dia^d 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	4,0	11,6	5,2	12,7	7,5
Precisão Intra-dia^d 27,27 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	0,6	6,5	3,8	4,7	6,5
Precisão Intra-dia^d 61,36 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	14,7	11,4	9,9	8,9	9,7
Precisão Inter-dia^d 27,27 $\mu\text{g L}^{-1}$	9	2,9	5,9	5,1	7,5	6,9

^a Curva de calibração preparada e medida em triplicata com correção do I.S. Coeficientes obtidos pela regressão linear feita no *Microsoft Excel*[®] 2016.

^b Limites calculados através da razão sinal/ruído.

^c Recuperação relativa (RR (%)) e desvio padrão relativo (RSD (%)) em triplicata como descrito no tópico 4.5.

^d Valores de desvio padrão relativo (RSD (%)) para os ensaios de precisão inter-dia e intra-dia como descrito no tópico 4.5.

^e Para a ETMP e IBMP foram inseridos mais 3 pontos na curva de calibração a fim de alcançar a quantificação das amostras posteriormente, sendo n = 12.

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Como visto na Tabela 7, a linearidade abrange uma ampla faixa de concentração devido à verificação da amplitude da faixa linear alcançada pelas MPs. O menor ponto da curva foi selecionado considerando os limites de quantificação obtidos pelo sinal/ruído, como

também levando em conta a melhor integração dos sinais cromatográficos, não tão próximo ao ruído da linha de base. Para obtenção dos coeficientes lineares e angulares e também do coeficiente de determinação (R^2), foi obtida a regressão linear (APÊNDICE B) da faixa linear de calibração da Tabela 7, sendo possível avaliar o R^2 , que apresentou valores acima de 0,993 para as cinco MPs, indicando uma boa linearidade na faixa de concentração empregada nos estudos.

Os valores de LOD entre as MPs apresentaram a seguinte ordem crescente:

IBMP (6 ng L^{-1}) < SBMP (9 ng L^{-1}) < ETMP (11 ng L^{-1}) < IPMP (18 ng L^{-1}) < 2-MP (31 ng L^{-1})

A IBMP possui menor LOD e a 2-MP possui o maior, devido à diferente sensibilidade do detector NPD para cada MP.

Observa-se que o método HS/SPME-GC/NPD desenvolvido não alcança limites tão baixos, próximos ao limite de percepção sensorial de $1\text{-}2 \text{ ng L}^{-1}$ para IBMP, IPMP, SBMP, sendo possível quantificar estes compostos em vinhos se os níveis dessas MPs estiverem acima deste limite. Mas, observa-se que foi alcançado limite de detecção e quantificação abaixo do limite de percepção sensorial da ETMP, 425 ng L^{-1} , sendo possível quantificá-la também mesmo se este composto estiver presente abaixo deste limite de percepção sensorial (ALBERTS et al., 2013).

O LOD para as MPs é o parâmetro mais determinado em todas as validações feitas na literatura para os métodos HS/SPME-GC em vinhos, visto que as concentrações de MPs são baixas no vinho (ng L^{-1}). No presente trabalho, o LOD alcançado foi de $6\text{--}31 \text{ ng L}^{-1}$ para o método HS/SPME-GC/NPD pela razão sinal/ruído, sendo superior aos valores encontrados na literatura, entre $1\text{ a }3 \text{ ng L}^{-1}$ (BOTEZATU; PICKERING; KOTSERIDIS, 2014; HJELMELAND; WYLIE; EBELER, 2016; KOTSERIDIS et al., 2008; PROUTEAU et al., 2004).

Outro pesquisador que determinou os limites por sinal/ruído foi Hartmann, Mcnair, Zoecklein (2002), que em seu estudo, empregando a mesma combinação HS/SPME-GG/NPD, indicou que seu limite de detecção não foi baixo o suficiente para detectar MPs em vinhos, sugerindo que o mesmo é mais indicado para mostos, ou seja, matrizes sem teor alcoólico o qual afeta a extração das MPs, como estudado por Sala et al. (2000).

Outro parâmetro avaliado foi a exatidão do método, empregando a recuperação relativa (Tabela 7). Observa-se que os valores estão na faixa de $98\text{ a }116\%$ nos três níveis de concentração analisados ($0,14, 27,27\text{ e }61,36 \mu\text{g L}^{-1}$). Segundo a AOAC (2016), são aceitáveis intervalos de recuperação para análise de resíduos entre $40\text{ e }120\%$. Os valores de RSD na

recuperação relativa indicam uma boa precisão, pois os valores são menores que 30 % devido ao nível de concentração empregado nos ensaios em $\mu\text{g L}^{-1}$.

A precisão inter-dia e intra-dia foram avaliadas em termos de RSD no presente trabalho, no qual foram realizados três ensaios para avaliar a proximidade dos resultados entre si. Os valores variaram entre 0,6 a 14,7 % para todos os ensaios de precisão nos níveis de 0,14, 27,27 e 61,36 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como no método o nível de concentração é $\mu\text{g L}^{-1}$, são aceitos RSD de até 30 % (AOAC, 2016). O analito mais crítico foi o SBMP que possui o maior valor de RSD, 7,5 % na precisão inter-dia, e se manteve alto nos ensaios de precisão intra-dia. Com isso, o método apresenta uma precisão dentro do limite aceitável para o tipo de determinação feita, sendo confiável a obtenção dos resultados em diferentes condições no laboratório.

Com os dados obtidos de validação, o método desenvolvido HS/SPME-GG/NPD no presente trabalho está adequado para ser empregado em amostras reais a fim de verificar a presença de MPs em vinhos latino-americanos.

5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE VINHO

No presente trabalho foram analisados vinhos latino-americanos, utilizando o método HS/SPME-GC/NPD previamente validado. Foram analisadas 9 amostras comerciais de vinhos da América Latina, de diferentes variedades de uvas e diferentes regiões, a fim de avaliar a presença das MPs, considerando a possibilidade delas estarem presentes. Todos os vinhos empregados nos ensaios como amostras tiveram o custo na faixa de R\$ 19,00 a 46,00, devido à tendência dos vinhos mais baratos terem menor qualidade sensorial do que os vinhos mais caros.

O primeiro ensaio de cada amostra foi previamente qualitativo, a fim de identificar individualmente as MPs contidas nas amostras comerciais, e, para confirmação dos sinais dos analitos, foi realizada a comparação de t_R usando dopagem (“*spiking*”) da amostra com as MPs, a fim de aumentar a confiabilidade de identificação. Além disso, nos casos de haverem sinais interferentes na matriz, estes foram avaliados quanto a resolução frente às MPs detectadas.

Na Tabela 8 estão os resultados obtidos das análises em triplicata de cada vinho comercial selecionado para o estudo.

Tabela 8. Dados experimentais dos vinhos analisados empregando o método HS/SPME-GC/NPD.

Código ^a	Dados obtidos do rótulo da amostra					Concentração das MPs em ng L ⁻¹				
	Variedade da uva ^b	Origem ^b	Álcool (%) ^b	Ano ^b	pH ^c	[2-MP] ^d	[ETMP] ^e	[IPMP] ^d	[SBMP] ^e	[IBMP] ^e
T1	<i>Cabernet Franc</i>	Serra Gaúcha, Brasil	12	2017	2,85	< 31 ^d	< 38 ^e	< 18 ^d	< 9 ^d	< 20 ^e
T2	<i>Bonarda</i>	Mendoza, Argentina	13	2015	2,94	< 31 ^d	735 ± 96	< 18 ^d	< 29 ^e	799 ± 133
T3	<i>Malbec</i>	Buenos Aires, Argentina	12,5	2017	2,97	< 31 ^d	< 11 ^d	< 18 ^d	< 29 ^e	307 ± 36
T4	<i>Isabel e Bordô</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	10	-	2,67	< 31 ^d	< 38 ^e	< 18 ^d	< 9 ^d	< 20 ^e
T5	<i>Tannat</i>	Montevideú, Uruguai	12,5	2016	2,91	< 31 ^d	563 ± 58	< 18 ^d	< 9 ^d	194 ± 30
T6	<i>Carmenere</i>	Chile	12	2017	2,74	< 103 ^e	< 38 ^e	< 18 ^d	< 29 ^e	358 ± 83
T7	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Santa Catarina, Brasil	13,1	2018	2,61	< 31 ^d	< 11 ^d	< 18 ^d	< 9 ^d	323 ± 57
B1	<i>Sauvignon Blanc</i>	Buenos Aires, Argentina	12,5	2017	2,46	< 31 ^d	< 38 ^e	< 18 ^d	< 9 ^d	< 20 ^e
B2	<i>Torrontés</i>	Salta, Argentina	13,5	2012	2,71	< 31 ^d	377 ± 77	< 18 ^d	< 29 ^e	409 ± 111

^a Tipo de vinho: tinto (T) e branco (B)

^b Informações obtidas no rótulo do vinho comercial.

^c pH foi medido após a análise das MPs pelo método HS/SPME-GC/NPD.

^d LOD obtido pela razão sinal/ruído.

^e LOQ obtido pela razão sinal/ruído.

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Na Tabela 8 observa-se que a 2-MP, IPMP e SBMP não foram quantificadas em nenhuma amostra, sendo sua concentração indicada como menor do que os limites da técnica (LOD e LOQ). Devido à interpretação do cromatograma de cada extração das amostras, em alguns casos foi detectado o composto, porém, sendo um pico muito pequeno, não foi possível quantificar, logo foi indicado como menor do que o LOQ.

A ETMP foi quantificada em três vinhos (T2, T5 e B2), os quais são da Argentina e do Uruguai. Das MPs quantificadas, a ETMP é a mais rara de todas as MPs estudadas, e seu odor é terroso e parecido com a batata. O limite de percepção sensorial é muito maior do que todas as outras pirazinas, 425 ng L^{-1} , e sua ocorrência já havia sido confirmada por Allen e Lacey (1998) onde relataram níveis de ETMP tão altos quanto 1000 ng L^{-1} em um vinho *Cabernet Sauvignon*, bem como mais de 100 ng L^{-1} em um vinho *Pinot noir* (ALBERTS et al., 2013, ALLEN E LACEY, 1998). Considerando o limite de percepção sensorial da ETMP, os vinhos T2 e T5 ficaram acima de 425 ng L^{-1} , logo este aroma é perceptível ao degustar o vinho, afetando a sua qualidade.

Nas mesmas amostras de vinho que continham a ETMP, também foi quantificada a IBMP, que confere aroma de pimentão verde. Esta MP também estava presente em mais 3 outros vinhos analisados (T3, T6, T7), demonstrando assim que é a mais comum das MPs a se encontrar nos vinhos, confirmando essa informação da literatura (ALBERTS et al., 2013). Os valores obtidos foram muito altos, com concentrações muito superiores ao limite de percepção sensorial de $10\text{-}16 \text{ ng L}^{-1}$, e isso está associado a aromas desarmônicos.

O impacto odorífero da IBMP e ETMP nos vinhos analisados pode ser avaliado pelo Valor de atividade odorífera (OAV) de cada uma delas. Este parâmetro é obtido pela razão entre o valor experimental obtido da concentração dos compostos e o valor de limite de percepção sensorial teórico (Tabela 9).

Tabela 9. Valor de atividade odorífera (OAV) da ETMP e IBMP nos vinhos analisados.

Variedade da uva do vinho	OAV	
	ETMP	IBMP
<i>Bonarda</i>	1,7	49,9
<i>Malbec</i>	-	19,2
<i>Tannat</i>	1,3	12,1
<i>Carmenere</i>	-	22,4
<i>Cabernet Sauvignon</i>	-	20,2
<i>Torrontés</i>	0,9	25,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na Tabela 9 observa-se que o impacto odorífero da IBMP é muito mais pronunciado do que a ETMP, com valores muito altos de OAV, logo a IBMP está contribuindo olfativamente com maior intensidade ao *off-flavor* do vinho.

Considerando que a concentração da IBMP próxima ao limite de percepção sensorial de 10-16 ng L⁻¹ está associada ao potencial aromático do vinho, há um incentivo para manipular o vinho adicionando a MP a fim de aperfeiçoar o *bouquet* aromático do vinho. Na primavera de 2004, por exemplo, houve uma fraude na África do Sul, onde o vinho *Sauvignon Blanc* foi manipulado com IBMP (GODELMANN; LIMMERT; KUBALLA, 2008).

Em seus estudos, Godelmann, Limmert, Kuballa (2008) quantificaram 173 ng L⁻¹ de IBMP em um vinho *Sauvignon Blanc* manipulado da África do Sul, sendo este composto também detectado em mais 15 de 65 vinhos analisados de diferentes países, porém entre 10 a 19,5 ng L⁻¹ nos vinhos da África do Sul e Nova Zelândia. A SBMP, IPMP e ETMP que também foram analisadas em seus vinhos não foram quantificadas, ficando abaixo dos limites da técnica empregada por ele (HS/SPME-GC-MS/MS).

Observa-se que a presença de ETMP e IBMP nos vinhos analisados estão em valores muito altos em relação aos valores geralmente encontrados na literatura, como no caso de Godelmann, Limmert, Kuballa (2008). Isso pode ser decorrente a vários fatores, devido ao genótipo da uva ou contaminação por insetos, além dos problemas já descritos na literatura, como o risco de manipulação de vinhos e fatores vitivinícolas na elaboração do vinho. Nas uvas, as concentrações de MPs são fortemente influenciadas pelo *terroir* (influências climáticas, climáticas e vinivícolas) (ALLEN; LACEY, 1998; ROUJOU DE BOUBEE; VAN LEEUWEN; DUBOURDIEU, 2000; SALA et al., 2004, 2005).

Cada uva possui um genótipo diferente, e cada lugar no mundo possui condições geoclimáticas diferentes, que de modo geral dão características específicas e até valor agregado dependendo do favorecimento de formação de certos compostos em quantidades ótimas na composição do aroma (vide Tabela 8 as diferentes variedades e regiões). Mas também há a possibilidade de contaminações de insetos, por exemplo, que podem afetar o teor de algumas MPs, se estes forem adicionados inadvertidamente no processo de vinificação (PICKERING et al., 2006). Logo, o alto teor de IBMP e ETMP pode estar associado a diversos fatores e isso poderia ampliar o estudo futuramente para avaliar quais poderiam ser as possíveis fontes do teor alto das MPs nestes vinhos, mas principalmente nos brasileiros, a fim de melhorar a qualidade dos mesmos.

O teor alto da IBMP determinado instrumentalmente indica que a qualidade sensorial desses vinhos é baixa, pois ultrapassa o limite de percepção sensorial, gerando assim *off-*

flavor no aroma e sabor do vinho. É possível que haja a possibilidade de contaminação de algum inseto específico aqui da América Latina que cause a presença de ETMP ou IBMP nos vinhos analisados, quando se leva em consideração que a IBMP é ligada à contaminação por joaninha (*Harmonia axyridis*), pois quando as uvas são colhidas, as joaninhas residentes em cachos de uvas também podem ser inadvertidamente colhidas e, após operações de esmagamento e prensagem na vinícola, conferem ao suco e ao vinho resultantes um aroma e um sabor desagradável de IPMP e IBMP, e, nos estudos sobre a contaminação, poucos insetos são necessários para comprometer a qualidade do vinho, criando assim desafios para os esforços destinados a remediar o suco e o vinho afetados (BOTEZATU et al., 2013; KÖGEL et al., 2014; PICKERING et al., 2007).

Esta justificativa da presença das MPs no vinho poderia ser atribuída a um inseto presente no Brasil, o qual é popularmente chamado de maria-fedida ou fede-fede (*Nezara viridula*). Este percevejo exala um odor desagradável quando se sentem ameaçados, e este odor possivelmente contém MPs devido à semelhança sensorial. Como já foi reportado contaminações de *Harmonia axyridis* em outros países como EUA e Canadá, uma hipótese seria que este inseto, *Nezara viridula*, também poderia estar causando problemas por aqui.

5.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO COM A LITERATURA

Na Tabela 10 há alguns métodos da literatura para análise de MPs em vinhos com o mesmo preparo de amostra que o presente trabalho, a fim de comparação.

Tabela 10. Comparação de métodos de análise de MPs em vinhos.

Método ^a	Parâmetros HS-SPME ^b	Analito (MPs)	Limite de detecção (ng L⁻¹) ^c	Exatidão (%) ^d	Precisão (%) ^e	Referência
HS/SPME-GC-NPD	PDMS/DVB; 10 mL; 30 %; 30 °C; 240 min	2-MP, ETMP, IPMP, IBMP, SBMP	0,3 a 4	36,2 a 104,7	--	SALA et al., 2002
HS/SPME-GC-MS	PDMS/Car/DVB; 10 mL; 30 %; 40 °C; 30 min	IBMP	2,0	95,2 e 96,0	<5 e 11,6	CHAPMAN et al., 2004
HS/SPME-GC-MS/MS	PDMS/Car; 7,5 mL; 16 %; 40 °C; 40 min	ETMP, IPMP, IBMP, SBMP	7,9 a 42,0*	--	--	GODELMANN et al., 2008
HS-SPME-GC-MS	PDMS/Car/DVB; 10 mL; 30 %; 37 °C; 30 min	IPMP, IBMP, SBMP	1,0 a 2,0	99,0 e 102	5,0 e 8,0	KOTSERIDIS et al., 2008
HS/SPME-GC-MS/MS	PDMS/DVB; 10 mL; 20 %; 40 °C; 30 min	ETMP, IPMP, IBMP, SBMP	0,25 e 0,50	90,0 a 112	1,3 e 12,0	HJELMELAND et al., 2016
HS/SPME-GC-NPD	PDMS/Car/DVB; 20 mL; 30 %; 35 °C; 30 min	2-MP, ETMP, IPMP, IBMP, SBMP	6 a 31	98 a 116	0,6 a 14,7	Presente trabalho

^a Preparo de amostra – Separação - Detecção empregados para análise das MPs.

^b Fibra; Volume HS (mL); [NaCl] (%), Temperatura de extração (°C) e Tempo de extração (min).

^c Limite de detecção calculado pelo sinal/ruído. (* regressão linear: 7 a 70ng L⁻¹)

^d Exatidão obtida pela recuperação relativa.

^e Precisão em termos de RSD.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na Tabela 10, somente Sala et al. (2002) realizou ensaios com as 5 MPs e empregou o mesmo detector NPD, quando o detector mais usual é o espectrômetro de massas (MS).

Em relação ao preparo de amostra, em que todos os métodos listados empregaram a microextração em fase sólida pelo modo *headspace*, os parâmetros divergem, pois alguns aplicaram a fibra tripla, como o presente trabalho, e há outros que empregaram a fibra dupla. Mas, de modo geral, há uma preferência por fibras mistas, devido à maior gama de compostos com afinidade nos materiais adsorventes da fibra. O volume de HS varia, mas normalmente empregam-se 10 mL. O teor de cloreto de sódio de 30 % demonstra-se como preferencial, tendo em vista que a otimização do presente trabalho indicou esta concentração como a melhor condição na extração. A temperatura, de modo geral, varia entre 30 a 40 °C nos métodos, e como visto na superfície de resposta, a melhor condição selecionada foi 35 °C, que de fato é mediana entre os outros estudos. O tempo varia entre 30 min e 240 min entre os métodos, sendo selecionado 30 min no presente trabalho, conforme a superfície de resposta que indicou que este tempo já é efetivo na extração.

Embora no presente trabalho não tenha sido obtido um limite de detecção tão baixo como nos outros métodos, ele foi suficiente para a proposta de estudo e futuras aplicações. A exatidão e a precisão, de modo geral, são aceitáveis em todos os métodos de acordo com AOAC (2016).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível obter a separação cromatográfica eficiente das cinco MPs estudadas, além de estabelecer algumas condições ótimas para o preparo de amostra HS/SPME como o emprego da fibra PDMS/Car/DVB, da razão de diluição 1:3, da força iônica de 30 % de NaCl, tempo de extração 30 min, temperatura de extração 35 °C, tempo de dessorção 5 min e temperatura de dessorção 250 °C.

Em relação aos parâmetros analíticos do método, foi observado que a técnica obteve bons resultados de exatidão através de ensaios de recuperação com valores de 98 a 116 % e de precisão (intra-dia e inter-dia) com valores de desvio padrão relativo (RSD) entre 0,6 a 15 %, porém o método HS/SPME-GC/NPD alcançou limites altos, sendo o LOD entre 6 a 31 ng L⁻¹ e LOQ entre 20 a 103 ng L⁻¹, mesmo sendo obtido pela razão sinal/ruído, que por outros métodos da literatura são muito baixos. No entanto, devido ao alto teor das MPs presentes nas amostras, foi possível quantificar a ETMP e a IBMP em algumas variedades de uvas vinificadas na América Latina, sendo os níveis acima do limite de percepção sensorial, atribuindo aos vinhos baixa qualidade sensorial.

Uma forma de melhorar a qualidade de um vinho de baixa qualidade sensorial, para ganhar espaço na indústria, é observar os fatores que afetam a qualidade, desde o cultivo da uva até a armazenagem do vinho pronto. Este método que foi desenvolvido e validado é passível de ser aplicado para o estudo da possível contaminação na vinificação como também da possibilidade de remoção destes compostos do vinho antes da comercialização, como visto na literatura em que há vários métodos de remoção, desde o aquecimento do mosto antes da fermentação até a adição de silicone para adsorver as MPs do vinho final.

REFERÊNCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Internacional: Maryland. 2016.
- ALBERTS, P. *et al.* Quantitative survey of 3-alkyl-2-methoxypyrazines and first confirmation of 3-ethyl-2-methoxypyrazine in south african sauvignon blanc wines. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 34, n. 1, p. 54–67, 2013.
- ALI, K. *et al.* Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 3, p. 357-378, 2010.
- ALLEN, M. S.; LACEY, M. J.; BOYD, S. Determination of Methoxypyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1734–1738, 1994.
- ALLEN, M. S. What level of methoxypyrazines is desired in red wines? The flavor perspective of the classic red wines of Bordeaux. **Austr. Grapegr. Winem.** v. 381, p. 7–9, 1995.
- ALLEN, M.S., LACEY, M.J. **Chemistry of wine flavor**. Oxford University Press: New York, 1998.
- ALMEIDA, L. M., SILVA, V. Primeiro registro de *Harmonia axyridis* (Palias) (Coleoptera, Coccinellidae): um coccinelídeo originário da região Paleártica. **Revta bras. Zool.** v. 19, n. 3, p. 941–944, 2002.
- AUGUSTYN, O. P. H.; RAPP, A.; VAN WYK, C. J. Some Volatile Aroma Components of *Vitis Vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 3, n. 2, p. 53–60, 1982.
- BATLOUNI, M. Álcool e sistema cardiovascular. **Arquivos Médicos ABC**, s. 2, p. 14-16, 2006.
- BÍBLIA SAGRADA. Sociedade Bíblica do Brasil: São Paulo, 2000 (tradução).
- BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- BOTEZATU, A. *et al.* Occurrence and contribution of alkyl methoxypyrazines in wine tainted by *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 803–810, 2013.
- BOTEZATU, A.; KEMP, B. S.; PICKERING, G. J. Chemical and sensory evaluation of silicone and polylactic acid-based remedial treatments for elevated methoxypyrazine levels in wine. **Molecules**, v. 21, p. 1–13, 2016.

BOTEZATU, A.; PICKERING, G. J. Application of plastic polymers in remediating wine with elevated alkyl-methoxypyrazine levels. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 32, n. 7, p. 1199–1206, 2015.

BOTEZATU, A.; PICKERING, G. J.; KOTSERIDIS, Y. Development of a rapid method for the quantitative analysis of four methoxypyrazines in white and red wine using multi-dimensional Gas Chromatography - Mass Spectrometry. **Food Chemistry**, v. 160, p. 141–147, 2014.

BOUTOU, S.; CHATONNET, P. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 1, p. 1–9, 2007.

BRILLANTE, L.; MARTÍNEZ-LÜSCHER, J.; KURTURAL, S. K. Applied water and mechanical canopy management affect berry and wine phenolic and aroma composition of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Syrah) in Central California. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 261–271, 2018.

BRUNETTI, A. E. *et al.* Frog Volatile Compounds: Application of in vivo SPME for the Characterization of the Odorous Secretions from Two Species of Hypsiboas Treefrogs. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 360–372, 2015.

CAI, L.; KOZIEL, J. A.; O'NEAL, M. E. Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using in vivo solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1147, p. 66–78, 2007.

CHAPMAN, D. M. *et al.* Yield effects on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine concentration in cabernet sauvignon using a solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5431–5435, 2004.

COLLINS, C. H. BRAGA, G. L. BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

CUDJOE, E.; WIEDERKEHR, T. B.; BRINDLE, I. D. Headspace gas chromatography-mass spectrometry: A fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs. **Analyst**, v. 130, p. 152–155, 2005.

CULLERÉ, L. *et al.* Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4040–4045, 2009.

DUBOURDIEU, D. *et al.* The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Exemple of Sauvignon blanc. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 1, n. 57, p. 81–88, 2006.

O vinho no mundo: Itália, o que mais produz, Espanha, o que mais vende e EUA, onde mais bebem. **El País – Economía**, 2018. Disponível em: <https://brasil.elpais.com/brasil/2018/04/26/economia/1524755902_232432.html> Acesso em: 15 jan 2020.

ESTI, M. *et al.* Influence of wine making technique son aroma precursors. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 173 – 179, 2006.

FALCÃO, L. D. *et al.* A survey of seasonal temperatures and vineyard altitude influences on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, C13-norisoprenoids, and the sensory profile of Brazilian Cabernet Sauvignon wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3605–3612, 2007.

FONTANA, A. R.; BOTTINI, R. QuEChERS Method for the Determination of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazines in Wines by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 12, p. 3352–3359, 2016.

FONTANA, A.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Accurate determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines by gas chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry following solid-phase extraction and dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1515, p. 30–36, 2017.

Produção mundial de vinho cai para mínima de 60 anos; Brasil registra salto de 169%. **G1 – Economia**, 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/noticia/producao-mundial-de-vinho-cai-para-minima-de-60-anos-brasil-registra-salto-de-169.ghtml>> Acesso em: 15 jan 2020.

GALVAN, T. L.; KELLS, S.; HUTCHISON, W. D. Determination of 3-Alkyl-2-methoxypyrazines in lady beetle-infested wine by solid-phase microextraction headspace sampling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 1065–1071, 2008.

GODELMANN, R.; LIMMERT, S.; KUBALLA, T. Implementation of headspace solid-phase-microextraction-GC-MS/MS methodology for determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 449–461, 2008.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J. *et al.* Assessment of colour and aroma in White wines vinifications: effects of grape maturity and soil type. **Journal of Food Engineering**, v. 9, p. 758–764, 2007.

GUERRA, C. C. *et al.* Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. **Embrapa Uva e Vinhos**. Bento Gonçalves: 2009.

HARTMANN, P. J.; MCNAIR, H. M.; ZOECKLEIN, B. W. Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 4, p. 285–288, 2002.

HASHIZUME, K.; UMEDA, N. Methoxypyrazine Content of Japanese Red Wines. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 802–805, 1996.

HJELMELAND, A. K.; WYLIE, P. L.; EBELER, S. E. A comparison of sorptive extraction techniques coupled to a new quantitative, sensitive, high throughput GC-MS/MS method for methoxypyrazine analysis in wine. **Talanta**, v. 148, p. 336–345, 2016.

INGLEZ DE SOUZA, J. S. Uvas para o Brasil. 791p. Piracicaba: FEALQ, 1996.

JACKELS, S. C. *et al.* GCMS Investigation of volatile compounds in green coffee affected by potato taste defect and the antestia bug. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 10222–10229, 2014.

JACKSON, R. Chemical Constituents of grapes. In: Wine Science: principles and applications. 3th ed. London: Academic Press, 2008.

JAGELLA, T.; GROSCH, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) II. Odour activity values of desirable and undesirable odorants of black pepper. **European Food Research and Technology**, v. 209, p. 22–26, 1999a.

JAGELLA, T.; GROSCH, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) I. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques. **European Food Research and Technology**, v. 209, p. 16–21, 1999b.

JO, Y. *et al.* Sensory and chemical properties of Gouda cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 1–23, 2018.

KOCH, A. *et al.* 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2190–2198, 2010.

KÖGEL, S. *et al.* Methoxypyrazine composition of Coccinellidae-tainted Riesling and Pinot noir wine from Germany. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. 509–514, 2014.

KOTSERIDIS, Y. *et al.* An analytical method for studying the volatile compounds of Merlot noir clone wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 49, n. 1, p. 44–48, 1998.

KOTSERIDIS, Y. *et al.* Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. **Journal of Chromatography A**, v. 841, p. 229–237, 1999.

KOTSERIDIS, Y., *et al.* Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 33, p. 19–23, 1999.

KOTSERIDIS, Y. S. *et al.* Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in juice and wine using stable isotope labelled internal standard assay. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 294–301, 2008.

LEI, Y. *et al.* Methoxypyrazines biosynthesis and metabolism in grape: A review. **Food Chemistry**, v. 245, p. 1141–1147, 2018.

LI, X. *et al.* Treatment technologies and mechanisms for three odorants at trace level: IPMP, IBMP, and TCA. **Environmental Technology**, p. 1–8, 2015.

LIMA, U. A. *et al.* Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos. Vol 3, 1ª edição, São Paulo – SP. Editora Edgard Blucher, 593 p., 2001.

LORD, H., PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology – A review, **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 153, 2000.

LU, J.; WILLS, P. S.; CHRIS WILSON, P. Trace analysis of off-flavor/odor compounds in water using liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography—positive chemical ionization-tandem mass spectrometry. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 10, n. 3, p. 477–481, 2016.

MA, K. *et al.* Accurate analysis of trace earthy-musty odorants in water by headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 1494–1501, 2012.

MAIA, A. C. D. *et al.* 2-Alkyl-3-methoxypyrazines are potent attractants of florivorous scarabs (Melolonthidae, Cyclocephalini) associated with economically exploitable Neotropical palms (Arecaceae). **Pest Management Science**, v. 74, n. 9, p. 2053–2058, 2018.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2017. **Comunicado técnico 207 - EMBRAPA**. Bento Gonçalves, RS. Outubro, 2018

MOORE, B. P., BROWN, W. V., ROTHSCHILD, M. Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their host plants and mimics. **Chemoecology**, v.1, p. 43–51, 1990.

NETA, E. R. D. *et al.* Characterization of alkylmethoxypyrazines contributing to earthy/bell pepper flavor in farmstead cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 632–638, 2008.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality?. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C. L. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145–2148, 1990.

PICKERING, G. *et al.* Influence of *Harmonia axyridis* on the Sensory Properties of White and Red Wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 55, n. 2, p. 153–159, 2004.

PICKERING, G. *et al.* The evaluation of remedial treatments for wine affected by *Harmonia axyridis*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 77–86, 2006.

PICKERING, G. J. *et al.* Determination of ortho- and retronasal detection thresholds for 2-isopropyl-3-methoxypyrazine in wine. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 7, p. 468–472, 2007.

PICKERING, G., *et al.* Good bugs gone bad: Coccinellidae, sustainability and wine. In: Brebbia CA, editor. Sustainability today. p. 239–251. Southampton: WIT Press, 2012.

PONS, A. *et al.* Impact of *Plasmopara viticola* infection of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes on wine composition and flavor. **Food Chemistry**, v. 239, p. 102–110, 2018.

PROSEN, H.; ZUPANCIC-KRAJL, L. Solid-phase microextraction, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18. p. 272, 1999.

PROUTEAU, C. *et al.* Improving headspace-solid-phase microextraction of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine by experimental design with regard to stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric analysis of wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 223–227, 2004.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* Handbook of Enology. 2^o ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

RIZZON, L. A., DALL'AGNOL, I. Vinho tinto. 45 p. Brasília: Embrapa - Informação Tecnológica, 2007.

ROMERO, R. *et al.* Pyrazine contents in four red grape varieties cultivated in a warm climate. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 40, n. 4, p. 203–207, 2006.

ROUJOU DE BOUBÉE, D. *et al.* Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon grape bunches and its extractability during vinification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 1, p. 1–5, 2002.

ROUJOU DE BOUBEE, D.; VAN LEEUWEN, C. A. DUBOURDIEU, D. Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red Bordeaux and Loire wines. Effect of Environmental Conditions on Concentrations in Grapes during Ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4830–4834, 2000.

RYONA, I.; PAN, B. S.; SACKS, G. L. Rapid measurement of 3-Alkyl-2-methoxypyrazine content of winegrapes to predict levels in resultant wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8250–8257, 2009.

RYONA, I.; REINHARDT, J.; SACKS, G. L. Treatment of grape juice or must with silicone reduces 3-alkyl-2-methoxypyrazine concentrations in resulting wines without altering fermentation volatiles. **Food Research International**, v. 47, p. 70–79, 2012.

SALA, C. *et al.* Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 93–99, 2000.

SALA, C. *et al.* Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 1–6, 2002.

SALA, C. *et al.* Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety Cabernet sauvignon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3492–3497, 2004.

SALA, C. *et al.* Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon: Influence of irrigation and plantation density. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1131–1136, 2005.

SIVILOTTI, P. *et al.* Impact of Leaf Removal, Applied before and after Flowering, on Anthocyanin, Tannin, and Methoxypyrazine Concentrations in Merlot⁹ (*Vitis vinifera* L.) Grapes and Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 4487–4496, 2016.

SOUZA, G. G. *et al.* A uva roxa, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) – seus sucos e vinhos na prevenção de doenças vasculares. **Natureza on-line**, v. 4, n. 2, p. 80-86, 2006.

SOUZA-SILVA, É. A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 236–248, 2015.

SPILLMAN, P. J. *et al.* The contribution of volatile compounds derived during oak barrel maturation to the aroma of a Chardonnay and Cabernet Sauvignon wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, p. 227-235, 2004.

UNWIN, T. *Wine and the Vine*. 2o ed. London e New York: Routledge, 1991.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.

WAGNER, R. K.; GROSCH, W. Key odorants of French fries. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 10, p. 1385–1392, 1998.

WEISKIRCHEN, S; WEISKIRCHEN, R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? **American Society for Nutrition**. v. 7, p. 706–718, 2016.

WEN, Y. *et al.* Determination of ppq-levels of alkylmethoxypyrazines in wine by stirbar sorptive extraction combined with multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 255, p. 235–241, 2018.

ZHU, S. *et al.* Removal of IBMP using ozonation: role of ozone and hydroxyl radical. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 59, p. 28776–28783, 2016.

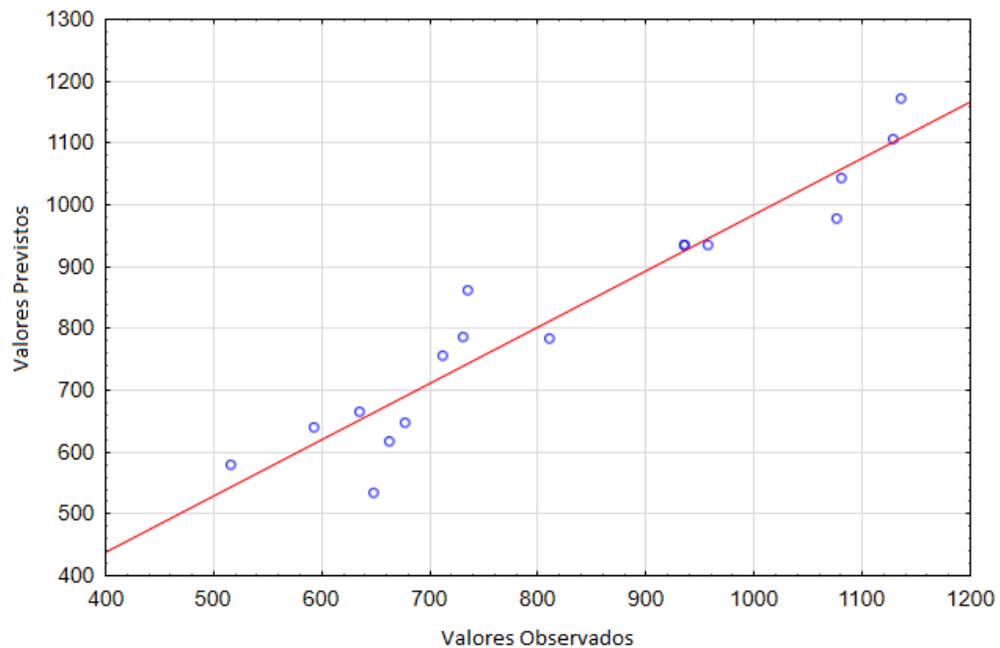
APÊNDICE A – Dados da otimização multivariada

Figura 1. Tabela ANOVA.

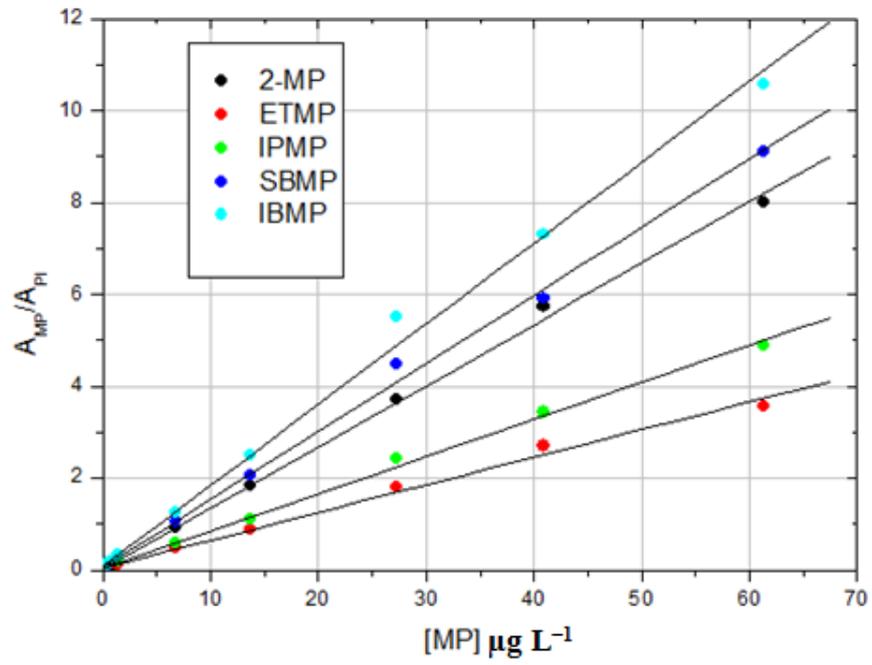
ANOVA; Var.:Resposta; R-sqr=.91175; Adj:.79828 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=161.2351 DV: Resposta					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Temperatura (°C)(L)	26073.2	1	26073.2	161.709	0.006127
Temperatura (°C)(Q)	71326.3	1	71326.3	442.374	0.002253
(2)Tempo (min)(L)	7325.5	1	7325.5	45.434	0.021309
Tempo (min)(Q)	18071.0	1	18071.0	112.079	0.008805
(3)NaCl(%)(L)	428426.8	1	428426.8	2657.156	0.000376
NaCl(%)(Q)	5050.7	1	5050.7	31.325	0.030472
1L by 2L	12651.0	1	12651.0	78.463	0.012506
1L by 3L	28530.4	1	28530.4	176.949	0.005604
2L by 3L	18442.4	1	18442.4	114.382	0.008630
Lack of Fit	57447.0	5	11489.4	71.259	0.013897
Pure Error	322.5	2	161.2		
Total SS	654590.5	16			

Fonte: Dados obtidos no *software Statistica*® 13.0 (2020).

Figura 2. Gráfico dos valores previstos pelo modelo vs os valores experimentais observados.



Fonte: Dados obtidos no *software Statistica*® 13.0 (2020).

APÊNDICE B – Curva de calibração das MPs com correção pelo I.S.

Fonte: Elaborado pelo autor no *software Origin*® 8.0 (2018).