

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATURAÇÃO E DA  
MACERAÇÃO SOBRE O PERFIL FENÓLICO E VOLÁTIL DO VINHO  
TINTO SYRAH DO VALE DO SÃO FRANCISCO ATRAVÉS DO  
EMPREGO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

JANAINA AITH BARBARÁ

Porto Alegre, 29 de abril de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATURAÇÃO E DA  
MACERAÇÃO SOBRE O PERFIL FENÓLICO E VOLÁTIL DO VINHO  
TINTO SYRAH DO VALE DO SÃO FRANCISCO ATRAVÉS DO  
EMPREGO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
Obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dra. Claudia Alcaraz Zini

Orientadora

Dra. Aline Camarão Biasoto Marques

Coorientadora

Porto Alegre, 29 de abril de 2019

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março de 2013 e março de 2019, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Professora Doutora Cláudia Alcaraz Zini e coorientação da Doutora Aline Camarão Telles Biasoto. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

### **Comissão Examinadora**

Prof. Dr. Roger Wagner

Profa. Dra. Juliane Elisa Welke

Profa. Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba

Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes

Profa. Dra. Claudia Alcaraz Zini

Dra. Coorientadora Aline Telles  
Biasoto Marques

Doutoranda Janaina Aith Barbará

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dra. Claudia Alcaraz Zini, excelente profissional e exemplo de dedicação, pela orientação, confiança e grande incentivo durante todo o projeto.

À pesquisadora Dra. Aline Telles Biasoto Marques pela coorientação, atenção, disponibilidade, incentivo e amizade.

À professora Dra. Juliane Welke pelo grande auxílio, dedicação e amizade

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Semiárido) pelo apoio no que diz respeito às análises realizadas e informações necessárias para a execução deste trabalho.

À professora Dra. Rosângela Jacques (IQ/UFRGS) pelo apoio e incentivo neste grupo de pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica: Mayara Closs, Laura Lago, Eduarda Luz e Karine Ivanovick pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO), especialmente à Karine Nicolli, Érica Souza Silva, Francieli Mayer pela ajuda na parte técnica e pela amizade.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pelo auxílio financeiro.

À minha mãe, Vera Barbará, mulher forte e guerreira, pelo amor, incentivo e apoio em meus estudos, a quem dedico este trabalho com todo amor.

Ao meu namorado Daniel Souza pelo amor, compreensão e auxílio.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA TESE**

1. Barbará, J. A., Silva, E. S., Biasoto, A. C. T., Gomes, A. A., Zini, C. A. Influence of grape maturation, maceration time on the volatile composition of Syrah wines produced in Northeastern of Brazil accessed by GC/MS and ANOVA - PCA. In: 42nd International Symposium on Capillary Chromatography and 15th GC×GC Symposium, Riva Del Garda, Itália, 2018.
2. Barbará, J. A., Biasoto, A. C. T., Silva, E. S., Correa, L. C, Zini, C. A. Evaluation of phenolic and volatile compounds in Syrah wine from Submiddle São Francisco Valley: impact of ripening stage. In: 41nd International Symposium on Capillary Chromatography and 15th GC×GC Symposium, Texas, EUA, 2017.
3. Barbará, J. A., Carvalho, E. S. S., Biasoto, A. C. T., Silva, E. S, Correa, L. C., Zini, C. A. Influence of the grape ripeness stage and maceration time during the winemaking on the composition of Syrah tropical wines. In: 12º Slaca, Campinas, SP, Brasil, 2017.
4. Janaina, A. Barbará, Aline, C. T. Biasoto, Érica, S. Silva, Luis, C. Correa, Claudia, A. Zini. Evaluation of polyphenolic compounds in Syrah wine from Submiddle São Francisco Valley: impact of ripening stage and maceration time. In: “5<sup>th</sup> International Symposium on Tropical Wines – ISTW 2016”, Petrolina, PE, Brasil, 2016.
5. Barbará, J. A., Nicolli, K. P; Marques, A. T. B, Souza-Silva E.A., Correa, L. C., Zini, C. A. Phenolic content, physical-chemical composition and antioxidant activity of Syrah wines elaborated in São Francisco Valley during ripening. In: Congresso Mundial da Vinha e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brasil, 2016.
6. Barbará, J. A.; Souza-Silva E.A.; Marques, A. T. B.; Caramão, E. B.; Zini, C. A. Application of gas chromatography coupled to olfactometry (GC-O), mass spectrometry (GC/qMS) and comprehensive gas chromatography (GC×GC/TOFMS) as complementary tools to access the volatile compounds responsible for the peculiar aroma of Syrah wine produced in the Vale of São Francisco region in Brazil. In: 40th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY and 13th GC×GC SYMPOSIUM, Riva Del Garda, Itália, 2016.
7. Barbará, J. A.; Marques, A. T. B.; Souza-Silva E.A; Correa, L. C.; Caramão E. B; Welke, J. E; Zini, C. A. Liquid chromatography study of the phenolic composition of Syrah wines from submiddle São Francisco River Valley produced from grapes harvested at different stages of ripeness. In: XVI Colacro, Lisboa, Portugal, 2016.

8. Barbará, J. A.; Marques, A. T. B.; Nicolli, K., Souza-Silva E.A.; Caramão, E. B.; Welke, J. E. , Zini, C. A. Evaluating the aroma of red wines produced from grapes harvested at different stages of ripeness employing gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and olfactometry detection (GC-O-OSME). In: XVI Colacro, Lisboa, Portugal, 2016.
9. Barbará, J. A ; Marques, A. T. B ; Nicolli, K. P ; Queiroz, L. B. ; Souza-Silva É.A; Correa, L. C; Welke, J. E; Zini, C. A; Evaluating the typical aroma of wines of ‘Syrah’ variety from the Sub-middle São Francisco Valley employing gas chromatography coupled to olfactometry detection (GC-O). In: XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, RS, Brasil, 2015.
10. Barbará, J. A.; Marques, A. T. B.; Nicolli, K. P.; Natividade, L.; Caramão, E. B.; Mayer, F.; Welke, J. E.; Zini, C. A.; Caracterização preliminar do perfil volátil de vinhos “Syrah” da Região do Vale do São Francisco. In: Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, Campos do Jordão, SP, Brasil, 2014.

#### **ARTIGO PUBLICADO**

1. Janaína A. Barbará, Érica A. Souza Silva, Aline C. T. Biasoto, Adriano de A. Gomes, Luiz C. Correa, Patrícia C. de S. Leão, Cláudia A. Zini. Maturation and Maceration Effects on Tropical Red Wines Assessed by Chromatography and Analysis of Variance - Principal Component Analysis. *Journal of Brazilian Chemical Society*, volume 30, páginas 1357- 1377, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190032>

## SUMÁRIO

INDICE DE TABELAS .....	XI
INDICE DE FIGURAS .....	XIII
ABREVIACÕES .....	XVI
RESUMO .....	XVIII
ABSTRACT .....	XX
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 OBJETIVOS .....	4
1.1.1 Objetivos Gerais.....	4
1.1.2 Objetivos Específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 O VALE DO SÃO FRANCISCO E OS VINHOS SYRAH .....	7
2.2 MUDANÇAS NA UVA DURANTE A MATURAÇÃO.....	8
2.2.1 Aspectos Gerais relacionados à maturação da uva.....	8
2.2.2 Acúmulo de açúcares .....	9
2.2.3 Ácidos orgânicos .....	9
2.2.4 Maturação fenólica.....	10
2.2.5 Maturação do Aroma.....	12
2.2.6 Parâmetros que determinam a colheita.....	13
2.3 INFLUÊNCIA DA MACERAÇÃO NA ELABORAÇÃO DOS VINHOS .....	13
2.4 COMPOSIÇÃO FENÓLICA DAS UVAS E VINHOS .....	14
2.4.1 Antocianinas.....	15
2.4.2 Flavonóis .....	16
2.4.3 Flavanóis .....	18
2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS.....	19
2.6 COMPOSTOS VOLÁTEIS RELACIONADOS AO AROMA DO VINHO.....	20
2.6.1 Compostos originários da uva .....	20
2.6.1.a Terpenos .....	21
2.6.1.b Norisoprenóides .....	21
2.6.1.c Metoxipirazinas .....	22

2.6.2 Compostos voláteis oriundos da fermentação.....	22
2.6.2.a Álcoois.....	23
2.6.2.b Ácidos.....	23
2.6.2.c Ésteres.....	23
2.6.2.d Sulfurados.....	24
2.6.2.e Fenóis Voláteis .....	24
2.6.2.f Compostos Carbonilados .....	25
2.6.2.g Lactonas .....	25
2.6.3 Compostos voláteis oriundos do armazenamento .....	25
2.6.3.a Derivados dos furanos .....	25
2.7 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS .....	26
2.8 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS .....	27
2.8.1 Cromatografia Gasosa Monodimensional (GC/MS) e Cromatografia Gasosa Olfatométrica (GC-O) .....	27
2.8.2 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC).....	29
2.9 PARÂMETROS DE MÉRITO PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL E BIDIMENSIONAL.....	30
2.9.1 Especificidade e seletividade .....	31
2.9.2 Linearidade e Curva de Calibração .....	31
2.9.3 Precisão .....	32
2.9.4 Exatidão e <i>Bias</i> (teste para erro sistemático) .....	32
2.9.5 Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (LDM).....	33
2.10 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS PARA AVALIAR OS COMPOSTOS DOS VINHOS .....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 UVAS E VINHOS.....	38
3.2 ANÁLISES CLÁSSICAS E ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	39
3.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (DAD-FD).....	40

3.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DOS VINHOS .....	42
3.4.1 Reagentes e materiais .....	42
3.4.2 Preparo das amostras e extração dos voláteis.....	43
3.4.3 Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID) e com detector quadrupolar de espectrometria de massas (GC/MS).....	43
3.4.4 Cromatografia gasosa olfatométrica no modo OSME (GC-O-OSME) .....	44
3.4.5 Cromatografia gasosa bidimensional com detector de espectrometria de massas por tempo de voo (GC×GC/TOFMS).....	46
3.4.6 Identificação dos compostos .....	46
3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS VOLÁTEIS DO VINHO SYRAH.....	48
3.5.1 Linearidade e Curva de calibração .....	48
3.5.2 Precisão .....	48
3.5.3 Exatidão e <i>Bias</i> (teste para erro sistemático) .....	49
3.5.4 Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ) .....	49
3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.1 EFEITO DO GRAU DE MATURAÇÃO DA UVA E DO TEMPO DE MACERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, FENÓLICA E VOLÁTIL DOS VINHOS SYRAH .....	52
4.1.1 Detecção de Outliers .....	52
4.1.2 Influência da maturação e da maceração na composição físico-química dos vinhos Syrah.....	54
4.1.3 Efeito da maturação e da maceração na composição fenólica dos vinhos Syrah.....	59
4.1.4 Avaliação do perfil volátil dos vinhos Syrah .....	69
4.1.4.a. Validação do método HS-SPME–GC/MS.....	69
4.1.4.b Avaliação da influência da maturação e da maceração na composição volátil dos vinhos Syrah.....	74
4.2 ANÁLISE DO PERFIL VOLÁTIL DOS VINHOS SYRAR POR MEIO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS COMBINADAS .....	88
4.2.1 Influência das diferentes combinações do grau de maturação e tempo de maceração das uvas no perfil volátil avaliado por GC×GC/TOFMS.....	88

4.2.2 Compostos odoríferos analisados por GC-O-OSME, GC/MS e GC-FID e quantificados por GC×GC/TOFMS .....	109
5. RESUMO DOS RESULTADOS .....	129
6. CONCLUSÃO.....	134
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	137
8 ANEXO .....	150

## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos relacionados com os vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em diferentes fases de maturação e maceradas em períodos distintos durante o processo de vinificação. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias .....	57
<b>Tabela 2:</b> Concentração dos compostos fenólicos nos vinhos Syrah analisados com HPLC-DAD-FD e elaborados com uvas provenientes de diferentes fases de maturação e maceradas em períodos distintos durante a vinificação. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias .....	63
<b>Tabela 3:</b> Resultados para os parâmetros de validação do método para determinação de compostos voláteis em vinhos Syrah por GC/MS .....	70
<b>Tabela 4:</b> Compostos tentativamente identificados no <i>headspace</i> dos vinhos Syrah produzidos a partir de uvas colhidas em 19, 21 e 23 °Brix e macerados por 10, 20 e 30 dias, e seus respectivos limiares de odor, valor de atividade de odor (OAV) e descrição de odor .....	71
<b>Tabela 5:</b> Concentração dos compostos voláteis dos vinhos Syrah analisados por GC/MS e elaborados com uvas provenientes de diferentes estágios de maturação e macerados em períodos distintos durante a vinificação. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias. ....	79
<b>Tabela 6:</b> Área relativa e razão de Fisher dos compostos voláteis dos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três diferentes graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante três períodos diferentes (M1: 10 dias, M2: 20 dias e M3: 30 dias), resultando nas combinações T1M1, T1M2, T2M1, T2M2, T2M3, T3M1, T3M2 e T3M3. As condições HS-SPME-GC×GC/TOFMS estão descritas nos itens 3.4.2 e 3.4.5. Os índices de retenção experimentais e da literatura são definidos na <b>Tabela A1</b> .....	90
<b>Tabela 7:</b> Parâmetros de validação obtidos para o método de microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> e cromatografia gasosa bidimensional abrangente com espectrometria de massa por tempo de voo (HS-SPME-GC×GC/TOFMS) usado para a determinação da concentração de compostos voláteis em vinhos Syrah. As condições experimentais são descritas na seção 3.4.2 e 3.4.5.....	98

<b>Tabela 8:</b> Concentração dos 29 compostos indicados pela razão de Fisher como os mais importantes para diferenciar os vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três graus de maturação [T1:19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante três períodos diferentes (M1: 10 dias, M2: 20 dias e M3: 30 dias). As condições empregadas na GC×GC/TOFMS estão descritas na seção 3.4.5 .....	100
<b>Tabela 9:</b> Compostos odoríferos encontrados nos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três diferentes graus de maturação [T1: 19° Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante 10 dias (M1), resultando nas combinações T1M1, T2M1 e T3M1 e avaliados por cromatografia gasosa com diferentes detectores: olfatometria, espectrometria de massa e ionização de chama. Os compostos identificados somente após as análises por GC×GC/TOFMS estão sombreados em cinza e em negrito. As condições experimentais são descritas na seção 3.4.4 .....	113
<b>Tabela 10:</b> Concentrações dos compostos odoríferos detectados por GC-O-OSME e suas respectivas coeluições resolvidas através da GC×GC/TOFMS dos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas com graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante 10 dias (M1). As condições experimentais GC-O-OSME e GC×GC/TOFMS estão descritas nas seções 3.4.4 e 3.4.5.....	119

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais antocianinas encontradas nas uvas <i>Vitis vinifera</i> .....	16
<b>Figura 2:</b> Biossíntese de formação dos flavonóis. <sup>44</sup> .....	17
<b>Figura 3:</b> Estrutura dos flavanóis. <sup>53</sup> .....	19
<b>Figura 4:</b> Julgador avaliando o eluente cromatográfico utilizando a escala de 10 cm alocada no monitor do computador e o software SCDTI. <sup>136</sup> Detalhes da Figura: 1: 1 - julgador treinado; 2 - tubo de vidro silanizado para condução dos eluentes ao nariz do julgador; 3 - sistema de umidificação do ar utilizado nas análises de GC-O-OSME; 4 - escala de 10 cm alocada no monitor do computador. ....	45
<b>Figura 5:</b> Área de aceitação para detecção de <i>outliers</i> baseada no DD-SIMCA dos três principais componentes relacionando as amostras de vinho derivadas de diferentes tempos de maturação e maceração (A) dos parâmetros físico-químicos, (B) dos compostos fenólicos, (C) dos compostos voláteis. As linhas sólidas em verde e vermelho são a fronteira (com 95% de confiança) de amostras regulares e extremas, respectivamente. A posição de uma amostra particular é definida por <i>v</i> (distância ortogonal) e <i>h</i> (distância das pontuações). Os termos <i>h</i> <sub>0</sub> e <i>v</i> <sub>0</sub> são fatores de escala. ....	53
<b>Figura 6:</b> Biplot para parâmetros físico-químicos dos vinhos Syrah obtidos por meio da ANOVA - PCA para (A) diferentes graus de maturação da uva (fator T) e (B) para distintos tempos de maceração (fator M). T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias. Os pesos que excedem as linhas pontilhadas horizontais e verticais são estatisticamente significativos. A ausência das linhas pontilhadas horizontais e verticais revela que os pesos não foram significativos. Os números de 1 a 8 representam os parâmetros físico-químicos mostrados na Tabela 1. ....	56
<b>Figura 7:</b> Biplot para compostos fenólicos dos vinhos Syrah obtidos por meio da ANOVA - PCA para (A) diferentes graus de maturação da uva (fator T) e (B) para tempos distintos de maceração (fator M). T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias. Os pesos que excedem as linhas pontilhadas horizontais e verticais são estatisticamente significativos. ....	62
<b>Figura 8:</b> Biplot para os compostos voláteis dos vinhos Syrah por meio da ANOVA - PCA para (A) diferentes graus de maturação da uva (fator T) e (B) para diferentes tempos de maceração (fator M). T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 (21 °Brix) e T3 - 127 DAP	

(23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias. Os pesos que excedem as linhas pontilhadas horizontais e verticais são estatisticamente significativos.....	78
<b>Figura 9:</b> Biplot para os compostos voláteis dos vinhos Syrah por meio da ANOVA - PCA para a interação entre os fatores maturação (T) e maceração (M). Os pesos que excedem as linhas pontilhadas horizontais e verticais são estatisticamente significativos.....	87
<b>Figura 10:</b> Gráfico das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) obtidas na análise de componentes principais com base nos 21 compostos voláteis mais discriminantes dos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três diferentes graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante três períodos diferentes (M1: 10 dias, M2: 20 dias e M3: 30 dias), resultando nas combinações T1M1, T1M2, T2M1, T2M2, T2M3, T3M1, T3M2 e T3M3. As amostras (A) e os compostos voláteis (B) foram numerados de acordo com a <b>Tabela 6</b> . ....	108
<b>Figura 11:</b> Cromatograma obtido com detector de ionização em chama (FID) (a) e respectivo aromagrama proveniente da cromatografia associada à olfatometria (GC-O-OSME) (b) do vinho Syrah elaborado a partir de uvas colhidas a 19 °Brix. A numeração dos picos está em acordo com a <b>Tabela 9</b> .....	110
<b>Figura 12:</b> Cromatograma obtido com detector de ionização em chama (FID) (a) e respectivo aromagrama proveniente da cromatografia associada à olfatometria (GC-O-OSME) (b) do vinho Syrah elaborado a partir de uvas colhidas a 21 °Brix. A numeração dos picos está em acordo com a <b>Tabela 9</b> .....	111
<b>Figura 13:</b> Cromatograma obtido com detector de ionização em chama (FID) (a) e respectivo aromagrama proveniente da cromatografia associada à olfatometria (GC-O-OSME) (b) do vinho Syrah elaborado a partir de uvas colhidas a 23 °Brix. A numeração dos picos está em acordo com a <b>Tabela 9</b> .....	112
<b>Figura 14:</b> Mapa de calor obtido pela (A) intensidade e (B) persistência do odor mencionado nos vinhos Syrah analisados por GC-O-OSME elaborados com três diferentes graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante 10 dias (M1), resultando nas combinações T1M1, T2M1 e T3M1. ....	117
<b>Figura 15:</b> Separação dos compostos voláteis do <i>headspace</i> dos vinhos Syrah (A) Diagrama de cores obtido por GC×GC/TOFMS. O gradiente de cor reflete a intensidade do sinal TOFMS sendo que o azul representa os sinais baixos e o vermelho os sinais altos. A região expandida do gráfico colorido mostra detalhadamente os picos coeluídos na primeira dimensão, os picos modulados das coeluições e os espectros de massa deconvoluídos dos compostos identificados	

nas seguintes regiões de coeluição: (B) Co 10: 2-undecanol #LIV e 3-(metiltio)-1-propanol #45;  
(C) Co 11: acetato de 2-fenil etanol #9 e  $\beta$ -damascenona #LXX; (D) Co 13: 2-fenil etanol #30  
e  $\gamma$ -octalactona # XCV..... 127

## ABREVIACOES

AA - Atividade antioxidante

AnT - Antocianinas totais

ANOVA - PCA – Análise de Variância - Análise de Componentes Principais

AT - Acidez total

ATi - Acidez titulável

AV - Acidez volátil

CAR - PDMS - Carboxen-polidimetilsiloxano

CW - Carbowax

DAD - Detector de arranjo de diodos, do inglês “*diodo array detector*”

DAP - dias aps a poda

D - Densidade

<sup>1</sup>D - Primeira dimensão

<sup>2</sup>D - Segunda dimensão

DAP - dias aps a poda

DVB - CAR - PDMS - Divinil benzeno- carboxen-polidimetilsiloxano

FD - Detector de fluorescência, do inglês “*fluorescence detector*”

IC - Intensidade de cor

IUPAC - do inglês “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”

IPT - ndice de polifenis totais

GC-FID - Cromatografia gasosa monodimensional com detector de ionizao em chama, do ingls “*gas chromatography with flame ionization detector*”

GC/MS - Cromatografia gasosa monodimensional com detector de espectrometria de massas, do ingls “*gas chromatography with mass spectrometric detector*”

GC-O - Cromatografia gasosa acoplada  olfatometria

GC-O-OSME - Cromatografia gasosa acoplada  olfatometria empregando a técnica OSME, do ingls “*gas chromatography with OSME olfactometry*”

GCGC - Cromatografia gasosa bidimensional abrangente, do inglês “*comprehensive two-dimensional gas chromatography*”

GCGC/TOFMS - Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada ao detector de espectrometria de massas por tempo de voo, do inglês “*comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detector*”

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “*high performance liquid chromatography*”

HS-SPME - Microextração em fase sólida no modo *headspace*, do inglês “*headspace solid phase microextraction*”

LLE - Extração líquido- líquido, do inglês “*liquid liquid extraction*”

LTPRI - Índice de retenção com programação linear de temperatura, do inglês “*linear temperature programmed retention index*”

MDL - do inglês, “*Method Detection Limit*”

MS - Detector de espectrometria de massas, do inglês “*mass spectrometric detector or mass spectrometry*”

m/z - Razão massa carga

OCC - do inglês “*one-class classifiers*”

PA - Poliacrilato

PCA - Análise de Componentes Principais, do inglês “*Principal Componentes Analysis*”

PDMS - Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB - Polidimetilsiloxano divinilbenzeno

PEG - Polietilenoglicol

qMS - Detector de espectrometria de massas do tipo quadrupolar, do inglês “*quadrupole mass spectrometric detector or quadrupole massa spectrometry*”

RSD - do inglês “*relative standard deviation*”

SBSE - Extração sortiva em barra de agitação, do inglês “*stir bar sortive extraction*”

SDV - do inglês “*standard deviation of validation*”

SIMCA - do inglês “*Soft Independent Modeling by Class Analogy*”

SPE - Extração em fase sólida, do inglês “*solid phase extraction*”

SPME - Microextração em fase sólida, do inglês “*solid phase microextraction*”

SS - Sólidos solúveis

T - Tonalidade

TIC - Cromatograma de corrente iônica total, do inglês “*total ion current chromatogram*”

TOFMS - Detector de espectrometria de massas por tempo de voo ou espectrometria de massas por tempo de voo, do inglês “*time-of-flight mass spectrometric detector or time-of-flight mass spectrometry*”

<sup>1</sup>t<sub>R</sub> - Tempo de retenção na primeira dimensão

<sup>2</sup>t<sub>R</sub> - Tempo de retenção na segunda dimensão

## RESUMO

O Vale do São Francisco, localizado no nordeste do Brasil, apresenta condições ambientais adequadas para produzir vinhos finos de uvas *Vitis vinifera*. A produção de vinhos nesta região é recente, classificada como tropical semiárida e por esta razão, as investigações sobre as práticas vinícolas para esta região são de extrema importância. Os compostos fenólicos são responsáveis por importantes propriedades sensoriais dos vinhos tintos, incluindo cor, adstringência e estabilidade. Enquanto os compostos voláteis são responsáveis pelas características sensoriais de sabor e aroma da bebida, que estão intimamente relacionadas com a aceitação dos vinhos pelos consumidores. A escolha da data de colheita é um parâmetro crítico para a produção de vinhos tintos de qualidade, assim como o período de duração da maceração durante a etapa de vinificação. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi identificar o perfil físico-químico, de compostos fenólicos e voláteis dos vinhos de uvas colhidas em diferentes estádios de maturação e avaliar a influência do tempo de duração da maceração durante a elaboração dessas bebidas. Os vinhos experimentais foram elaborados a partir de uvas colhidas em três diferentes estádios de maturação. São eles, T1 (113 DAP - 19 °Brix), (DAP: dias após poda), T2 (120 DAP - 21 °Brix), e T3 (127 - DAP 23 °Brix) e macerados por períodos distintos (10, 20 e 30 dias). Um método de microextração em fase sólida no modo *headspace* juntamente com a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS) foi validado para a análise de 41 voláteis. A análise de variância acoplada à inspeção de pesos estatisticamente significativos (ANOVA - PCA) foi importante para elucidar os efeitos da maturação da uva e do tempo da maceração na composição do vinho. Vinhos de uvas mais maduras (21 - 23 °Brix) destacaram-se em relação à intensidade de cor, compostos fenólicos totais e apresentaram altos níveis de antocianinas monoméricas, flavonóis, procianidina A2 e linalol (nota “floral”). Trinta dias de maceração foram associados a níveis mais elevados de alguns flavanóis, ácido gálico, alguns ésteres e álcoois, do terpeno (*E*)-nerolidol, enquanto o ácido nonanóico (odor “desagradável”) reduziu sua concentração com maceração prolongada. A influência no perfil volátil e potencial odorífero das diferentes combinações entre o grau de maturação da uva Syrah e tempo de maceração foi também avaliada através da combinação de técnicas cromatográficas (GC×GC/TOFMS, GC-O-OSME, GC-FID e GC/MS). As análises de GC×GC/TOFMS resultaram em 145 compostos identificados. Dentre eles, 29 compostos foram indicados pela razão de Fisher como os mais importantes para a diferenciação dos vinhos, sendo por isso, utilizados em uma análise de componentes principais (PCA). Eles permitiram a discriminação dos vinhos Syrah feitos com uvas maceradas por um período mais curto (10 dias)

dos demais vinhos, devido aos níveis mais elevados de compostos voláteis. A avaliação destes vinhos através da olfatometria aliada as análises por GC-FID e GC/MS resultou na designação de 19 °Brix como o grau de maturação mais adequado para obter um maior número de voláteis com maior intensidade e persistência de notas odoríferas positivas. Além disso, a GC×GC/TOFMS permitiu resolver coeluições envolvendo compostos importantes para diferenciar os vinhos de acordo com o perfil volátil e odorífero.

### **PALAVRAS-CHAVE**

Vinho tinto brasileiro, *Vitis vinifera* Syrah, compostos voláteis, compostos fenólicos, GC×GC/TOFMS, GC-O-OSME, aroma.

## ABSTRACT

The São Francisco Valley, located in northeastern Brazil, presents adequate environmental conditions to produce fine wines of *Vitis vinifera* grapes. The production of wines in this region is recent, classified as semi-arid tropical, and for this reason the investigations on the viticultural practices for this region are of extreme importance. Phenolic compounds are responsible for important sensory properties of red wines, including color, astringency and stability, while volatile compounds are responsible for the sensory characteristics of the flavor and aroma of the beverage, which are closely related to the acceptance of the wines by the consumers. The choice of the harvesting date is a critical parameter for the production of quality red wines, as well as the duration of maceration during the vinification stage. In this context, the objective of this study was to identify the physico-chemical profile of phenolic and volatile compounds of the wines of grapes harvested at different maturation stages and to evaluate the influence of the duration of maceration during the elaboration of these beverages. The experimental wines were made from grapes harvested at three different maturation stages counted as days after pruning (DAP): T1 (113 DAP - 19 °Brix), T2 (120 DAP - 21 °Brix), and T3 (127 DAP - 23 °Brix) and macerated for distinct periods - 10, 20 and 30 days. A headspace solid phase microextraction method coupled with gas chromatography coupled to mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was validated for the analysis of 41 volatiles. The analysis of variance coupled with the inspection of statistically significant weights (ANOVA - PCA) was important to elucidate the effects of grape maturation and maceration time on wine composition. More mature grape wines (21-23 °Brix) were distinguished in terms of color intensity, total phenolic compounds and showed high levels of monomeric anthocyanins, flavonols, procyanidin A2 and linalool (floral note). Thirty days of maceration were associated with higher levels of some flavanols, gallic acid, some esters, alcohols and the terpene (E)-nerolidol, while nonanoic acid ("unpleasant" odor) reduced its concentration with prolonged maceration. The influence on the volatile profile and odor potential of the different combinations between the maturation degree of the Syrah grape and the maceration time was also evaluated by the combination of chromatographic techniques (GC×GC/TOFMS, GC-O-OSME, GC-FID and GC/MS). GC×GC/TOFMS analyzes resulted in 145 identified compounds. Among them, 29 compounds were indicated by the Fisher ratio as the most important for wine differentiation and were therefore used in a Principal Component Analysis (PCA). They allowed the discrimination of Syrah wines made with grapes macerated for a shorter period (10 days) of the other wines, due to the higher levels of volatile compounds. The evaluation of these wines through olfactometry combined with GC-

FID and GC/MS analyzes resulted in the designation of 19 °Brix as the most suitable degree of maturation to obtain a higher number of volatiles with greater intensity and persistence of positive odor notes. In addition, the GC×GC/TOFMS allowed to resolve coelutions involving important compounds to differentiate the wines according to the volatile and odoriferous profile.

## **KEYWORDS**

Red Brazilian wine, *Vitis vinifera* Syrah, volatile compounds, phenolic compounds, GC×GC/TOFMS, GC-O-OSME, aroma.

# *1. INTRODUÇÃO*

# 1. INTRODUÇÃO

A região do Vale do São Francisco é a terceira maior produtora do país, com uma produção em 2017 de aproximadamente 4 milhões de litros de vinhos finos e espumantes de uvas *Vitis vinifera*, destacando-se a produção do cultivar Syrah, de expressiva importância regional e mundial, que nas condições tropicais semiáridas do nordeste brasileiro tem demonstrado ótimo desempenho.<sup>1,2</sup>

O clima tropical semiárido existente do Vale do São Francisco permite às videiras ter ciclo contínuo, sendo possível a colheita de pelo menos duas safras por ano e o escalonamento da produção em qualquer época do ano, uma vez que os invernos com temperaturas frias são inexistentes, a radiação solar é intensa e há água em abundância para irrigação.<sup>3,4</sup>

Apesar da região do Vale do São Francisco apresentar boas condições climáticas para a elaboração de vinhos de qualidade, pouco se conhece sobre as práticas adequadas para o manejo e a vinificação de uvas cultivadas em condições tropicais. Sendo assim, os vinhos elaborados na referida região, são geralmente indicados para o consumo nos primeiros dois anos após sua produção, uma vez que depois desse período, alterações podem ser visualmente notadas.<sup>5</sup> A alteração da cor dos vinhos, é uma das modificações mais recorrentes, sendo também um indício da ocorrência de mudanças em seu aroma e, conseqüentemente, sabor, e estão associadas às reações de oxidação dos compostos fenólicos. Essas reações originam uma série de voláteis, que podem aprimorar a complexidade de aroma da bebida, ou depreciá-la. Diante disso, o aroma varietal do vinho pode ser perdido, assim como as notas frutadas e florais, ao mesmo tempo em que são formadas, além de notas de aroma típicas de vinho envelhecido, aquelas características de deterioração do vinho.<sup>6</sup>

A obtenção de maior qualidade e estabilidade dos vinhos Syrah produzidos na região do Vale do São Francisco depende de diversos fatores, dentre eles, a determinação do ponto de colheita ideal da uva. O acompanhamento da maturação e a colheita em época adequada são etapas fundamentais para a elaboração de um vinho de qualidade, tendo em vista que é neste momento que a uva apresentará maior acúmulo de açúcares, água e de outras substâncias de reserva, com decorrente diminuição da acidez, alcançando a maturação fenólica e de aroma ideais.<sup>7</sup> A maturação fenólica ideal é alcançada quando o teor de antocianinas e taninos na casca é máximo, e simultaneamente, o teor de taninos da semente decai tornando-se posteriormente constante.<sup>7</sup> A maturação do aroma do vinho é caracterizada como o período no qual a uva perde os compostos de odor vegetal e herbáceo, adquirindo juntamente, compostos odoríferos frutados.<sup>8</sup> Sendo assim, o vinho produzido a partir de uvas colhidas antes da maturação fenólica

ideal, irá apresentar, provavelmente, menor intensidade de cor e um perfil mais acentuado de taninos da semente, conferindo assim elevada adstringência e sensação de “secura” após sua ingestão.<sup>7</sup> Ao mesmo tempo, será rico em odores indesejáveis, tendo em vista que a uva não atingiu a maturação do aroma adequada.<sup>8</sup>

Além da maturação ideal, o processo de maceração é uma etapa crítica para a definição do estilo do vinho, sendo determinante para a elaboração de vinhos de alta qualidade, pois aumenta a estabilidade da cor, o corpo, bem como os aromas destas bebidas.<sup>9</sup> Períodos de maceração mais longos podem ser convenientes quando os vinhos são destinados ao envelhecimento ou quando é necessário contornar a maturação fenólica insuficiente das uvas colhidas.<sup>10</sup> Durante a maceração há um aumento considerável no teor de compostos voláteis devido ao tempo de contato das películas das uvas com o mosto do vinho. Taninos, antocianinas e outros compostos fenólicos, bem como compostos nitrogenados, minerais, açúcares e polissacarídeos também são extraídos das uvas durante esta etapa.<sup>7</sup> A maceração prolongada proporciona maiores concentrações de taninos do vinho e, conseqüentemente, de antocianinas condensadas com taninos, formando complexos que conferem maior estabilidade de cor, em comparação àqueles formados apenas pelas antocianinas monoméricas.<sup>11</sup>

Os voláteis são encontrados nos vinhos em concentrações que variam de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\text{mg L}^{-1}$ , sendo por isso, fundamental uma técnica adequada para o isolamento e concentração desses compostos. Neste contexto, se insere a técnica de HS-SPME, que une em etapa única a amostragem, extração e concentração. A mesma apresenta vantagens como não empregar solventes orgânicos e ser facilmente automatizada, reprodutível e sensível, sendo uma das técnicas mais empregadas e adequadas para a extração de voláteis em vinhos.<sup>12,13</sup>

A cromatografia gasosa monodimensional associada ao detector de ionização em chama (GC-FID - do inglês “*gas chromatography with flame ionization detector*”), e acoplada à espectrometria de massas (MS - do inglês “*mass spectrometry*”) são as mais comumente utilizadas para a identificação e quantificação de voláteis em vinhos.<sup>14</sup> Além disso, a técnica de GC-Olfatométrica ou GC-O (do inglês “*olfactometry*”) vem sendo bastante utilizada, já que combinada com a GC/MS proporciona identificação dos voláteis importantes para o aroma dos alimentos.<sup>15</sup> Por sua vez, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC, do inglês “*comprehensive two-dimensional gas chromatography*”) acoplada ao detector de espectrometria de massas por tempo de voo (TOFMS - do inglês “*time-of-flight*”) oferece superior capacidade de pico, seletividade e sensibilidade, quando comparada a GC/MS, e isso se deve ao fato da amostra inserida no sistema passar por dois mecanismos de separação

cromatográfico, em duas colunas distintas. Sendo assim, a técnica permite a identificação de um número maior de compostos, minimizando também o número de coeluições.<sup>16</sup>

Comumente, as investigações científicas se concentram mais no uso da GC-O e GC/MS para elucidação dos compostos voláteis que são importantes para o aroma ou ainda se focam na identificação e/ou quantificação de compostos voláteis por GC×GC/TOFMS ou GC×GC/qMS, raramente ocorrendo o uso conjugado de todas estas técnicas. Desse modo, este trabalho propõe o uso dessas técnicas de forma combinada, com a finalidade de trazer um maior esclarecimento sobre os compostos responsáveis pelo aroma do vinho. Por outro lado, a pesquisa relacionada a compostos fenólicos, comumente se restringe aos mesmos, sem abranger também os compostos voláteis, de forma que este trabalho agrega o conhecimento relativo a compostos fenólicos e voláteis de forma conjunta.

Tendo em vista que o Vale do São Francisco está inserido em uma região de clima tropical semiárido, que difere das demais regiões tradicionais produtoras vitivinícolas do mundo, onde atipicamente consegue-se colher uvas em qualquer época e obter pelo menos duas safras ao ano, torna-se evidente a importância de se estudar estratégias agronômicas e/ou enológicas, para melhorar a qualidade e estabilidade dos vinhos elaborados na referida região. O impacto dessas intervenções deve ser avaliado no que se refere à composição físico-química, bem como relativamente às modificações no perfil fenólico, volátil e de aroma dos vinhos elaborados a partir de uvas colhidas em diferentes graus de maturação e macerados por distintos períodos. O emprego conjugado das técnicas analíticas se reveste de especial importância no estudo de vinhos, dada a complexidade dessas bebidas.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivos Gerais**

Avaliar o impacto do estágio de maturação da uva e dos diferentes tempos de maceração sob a qualidade dos vinhos tintos tropicais Syrah da região do Vale do São Francisco através do emprego de técnicas cromatográficas combinadas e ferramentas quimiométricas.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o perfil volátil dos vinhos Syrah elaborados a partir de uvas colhidas em diferentes graus de maturação e maceradas por distintos períodos através do

emprego das técnicas de HS-SPME, GC/MS e GC×GC/TOFMS e ferramentas quimiométricas.

- Avaliar, através da GC-O-OSME, os vinhos destacados pela análise de GC×GC/TOFMS e ferramentas quimiométricas como os mais promissores em termos de composição volátil.
- Definir o período de maceração mais adequado à elaboração de vinhos de boa qualidade.
- Definir o melhor grau de maturação para a colheita da uva, visando a elaboração de vinhos ricos em compostos fenólicos e voláteis que tenham uma contribuição positiva para o aroma destas bebidas.

## ***2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O VALE DO SÃO FRANCISCO E OS VINHOS SYRAH

A videira foi introduzida no nordeste brasileiro no século XVI, avançando do litoral para o sertão, onde a mesma encontrou ambiente propício para seu desenvolvimento. Na década de 90, observou-se grande expansão das áreas cultivadas e um maior aporte tecnológico no setor, colocando a região do Vale do São Francisco, entre as mais importantes regiões vitivinícola do país.<sup>17</sup>

A região do Vale do São Francisco possui clima tropical semiárido, com cerca de 400 mil hectares de vinhedos, que produziram em 2017 aproximadamente 4 milhões de litros de vinhos finos e espumantes de uvas *Vitis vinifera*.<sup>1</sup> Situada entre os paralelos 8° e 9° de latitude Sul, é a mais próxima do equador dentre todas as regiões vitivinícolas existentes<sup>4</sup>, representando uma nova fronteira a ser desbravada, com imenso potencial para a produção de uva e seus derivados.<sup>18</sup> A região apresenta características edafoclimáticas distintas onde as videiras demonstram ciclo contínuo, devido à ausência de frio, já que a temperatura média anual é de 26 °C, o que permite colher a uva em qualquer época do ano.<sup>3</sup> Sendo assim, é possível realizar o escalonamento da produção ao longo do ano, o que reduz os investimentos em termos de infraestrutura para a elaboração dos vinhos. Além disso, a irrigação a partir da água do Rio São Francisco, de excelente qualidade, é o fator principal que permite com que as videiras se desenvolvam o ano todo, possibilitando decidir quando iniciar uma nova safra e prever a data da colheita.<sup>4</sup>

O vinho é definido, segundo a legislação brasileira como sendo uma bebida proveniente exclusivamente da fermentação alcóolica da uva madura e fresca ou do suco da uva fresca. Ele é resultante da transformação dos açúcares do suco da uva em álcool etílico, gás carbônico e centenas de outros compostos.<sup>19</sup> Os vinhos produzidos na região do Vale do São Francisco apresentam características próprias e são conhecidos como “vinhos do sol”, caracterizados como jovens e frutados.<sup>20</sup>

A uva Syrah é uma das mais produzidas em todo o mundo e destaca-se como o principal cultivar para vinhos tintos no Vale do São Francisco, a exemplo do que ocorre na Austrália, que também tem na Syrah, a sua mais importante uva vinífera tinta.<sup>2</sup> Seus cachos são medianos, cilíndricos e compactos, com bagas de pequenas a medianas, ovaladas e de coloração negro-azulada.<sup>21</sup>

## 2.2 MUDANÇAS NA UVA DURANTE A MATURAÇÃO

### 2.2.1 Aspectos Gerais relacionados à maturação da uva

A maturação da uva está associada ao amolecimento dos tecidos, à diminuição da acidez, ao acúmulo de açúcares, à síntese de antocianinas (em variedades tintas) e à síntese de compostos voláteis. Caracteriza-se como um período fisiológico que tem início no pintor (mudança de cor das bagas) e é finalizado com a uva madura, durando cerca de 40 dias, a depender do cultivar da uva, condições ambientais, bem como das práticas agrícolas empregadas. Este é um período muito importante, pois influencia significativamente na composição das uvas, permitindo que as mesmas desenvolvam suas características varietais, e consequentemente, na composição dos vinhos.<sup>22</sup>

O estágio de maturação da uva compreende quatro fases, são elas: a) herbáceo: abrange desde a formação do grão até a mudança de cor da película e textura da baga, sendo que os teores de açúcar não ultrapassam 20 gramas por quilograma de uva. b) mudança de cor (pintor): período em que a baga começa a pintar, ou seja, há um acúmulo da coloração da uva devido à síntese de polifenóis. c) maturação: período que se inicia com a mudança de cor da uva e termina na colheita. Durante a maturação as bagas amolecem, e há um aumento pronunciado dos pigmentos antociânicos (variedades tintas) e do teor de açúcares (glicose e frutose), bem como uma redução da acidez. d) sobrematuração: começa a partir da maturação tecnológica, e é neste período que as bagas começam a murchar, tendo os teores de açúcares e ácidos reduzidos (teores de frutose passam a ser maiores que os de glicose).<sup>23</sup>

De modo geral, os estádios de maturação podem ser classificados em maturação fisiológica (germinação), industrial (quando a baga atinge maior peso e concentração em açúcar) e tecnológica (quando atinge as características ideais para o seu destino final, tendo em vista o tipo de vinho que se deseja produzir, ou ainda quando os teores dos açúcares glicose/frutose se equivalem, com redução da acidez).<sup>24</sup> Durante o amadurecimento da uva ocorre o acúmulo de açúcares, água e de outras substâncias de reserva<sup>25</sup>, com decorrente diminuição da acidez,<sup>26</sup> sendo nesta etapa alcançada, geralmente, a maturação fenólica e de aromas ideais. Diante disso, tradicionalmente, a data da colheita é determinada através dos critérios peso da baga, densidade do mosto, e conteúdo e relação entre açúcares e acidez.<sup>27</sup>

### **2.2.2 Acúmulo de açúcares**

O fenômeno biológico mais espetacular da maturação é certamente o rápido acúmulo de açúcares na uva a partir da fase de pintor. Durante toda a fase de crescimento herbáceo, a concentração de açúcar nas uvas verdes não excede 20 gramas por quilograma de uva. Os açúcares sintetizados diariamente são metabolizados em alta intensidade para o desenvolvimento dos frutos, mas em particular para o crescimento e maturação das sementes. A demanda de substâncias nutritivas para a uva é ainda mais considerável nos dias que precedem a fase de pintor.<sup>8</sup>

A sacarose é o composto orgânico mais significativo translocado para o fruto. Não surpreendentemente, é também o principal composto orgânico transportado no floema. Ao atingir a baga, a maior parte da sacarose transportada no floema é hidrolisada para glicose e frutose. Embora sejam geradas quantidades iguais de glicose e frutose da sacarose, os níveis dos dois açúcares raramente são iguais no fruto. Em bagas jovens, a proporção de glicose é geralmente maior. Durante o amadurecimento, a taxa de glicose/frutose muitas vezes cai, ocorrendo o acúmulo ou a retenção de frutose, tornando-a ligeiramente superior ao da glicose. No estágio de maturação, a frutose está presente em maiores concentrações que a glicose.<sup>28</sup> As razões para este desequilíbrio são desconhecidas, mas podem originar-se de taxas diferenciais de glicose e de frutose, ou a partir da síntese seletiva de frutose a partir de ácido málico.

### **2.2.3 Ácidos orgânicos**

Ao lado do acúmulo de açúcar, a redução da acidez é quantitativamente a modificação química mais acentuada durante o amadurecimento. Os ácidos tartárico e málico representam cerca de 70 - 90% do teor de ácido presente na baga da uva. O restante consiste em quantidades variáveis de outros ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido succínico), ácidos fenólicos, aminoácidos e ácidos graxos. Apesar de estruturalmente semelhantes, os ácidos tartárico e málico são sintetizados e metabolizados de forma diferente.<sup>11</sup>

O ácido tartárico é derivado de uma transformação complexa da vitamina C (ácido ascórbico), enquanto, o ácido málico é um intermediário importante no ciclo do ácido tricarboxílico. O teor de ácido málico presente nas bagas é alterado mais rapidamente do que o ácido tartárico. O grau e a natureza das conversões desses ácidos podem variar amplamente, dependendo do cultivar e dos fatores ambientais, no entanto, são normalmente observadas algumas tendências. Após uma síntese inicial intensa de ácido tartárico, ambos ácidos têm seus

teores aumentados lentamente até a fase de pintor. Subsequentemente, a quantidade de ácido tartárico tende a estabilizar, enquanto que a do ácido málico diminui. Acredita-se que o acúmulo inicial de ácido málico atue como uma reserva de nutrientes, em substituição à glicose, sendo o principal substrato após a fase de pintor. Isto explicaria a rápida redução no teor de ácido málico durante os estádios posteriores de amadurecimento. O ácido tartárico tende a acumular-se principalmente nas películas, com quantidades mais baixas distribuídas uniformemente por toda a polpa da uva, sendo esta diferença reduzida durante a maturação. Em contraste, a deposição de ácido málico é elevada na polpa e baixa nas películas, e à medida que a maturação avança, essas diferenças tornam-se menos marcadas, sendo possível observar no período de maturação, uma concentração de ácido málico na película superior a observada na polpa.<sup>11</sup>

#### **2.2.4 Maturação fenólica**

Os compostos fenólicos da uva são responsáveis pela cor, sabor, corpo e estrutura dos vinhos tintos, e não evoluem durante a maturação da uva da mesma forma que os açúcares, ou seja, sua concentração máxima não necessariamente coincide com o máximo acúmulo de açúcares.<sup>29</sup> De forma geral, o teor dos compostos fenólicos aumenta ao longo da maturação, no entanto a evolução se dá de modo diferente com relação às distintas famílias fenólicas, sendo fortemente influenciada por aspectos intrínsecos da uva, como seu cultivar, igualmente por fatores externos, tais como clima, região e solo.<sup>30</sup>

A síntese dos compostos fenólicos começa logo após o início do desenvolvimento das bagas, sendo que algumas antocianinas são sintetizadas precocemente, no entanto, a maior parte da produção desses compostos, envolve outros fenólicos, flavonóides ou não flavonóides. Sendo assim, a síntese das antocianinas torna-se pronunciada somente após a fase de pintor. O momento e o grau de síntese das antocianinas dependem de uma série de fatores, tais como temperatura, exposição à luz, disponibilidade de água, acúmulo de açúcar e fatores genéticos. Embora o teor de antocianinas nas uvas tintas aumente durante a maturação, a proporção das várias antocianinas e de seus derivados, presentes nas uvas, podem mudar acentuadamente. Após atingir um máximo (geralmente na maturação da uva), a concentração das antocianinas tende a diminuir ligeiramente.<sup>30</sup>

As condições precisas que dão início à síntese das antocianinas durante a fase de pintor são desconhecidas. Uma hipótese sugere que o acúmulo de açúcar fornece o substrato necessário para a síntese dos referidos compostos, além de suprir as necessidades imediatas do tecido.<sup>31</sup> De forma distinta, a síntese das antocianinas pode também ser ativada por alterações

nos conteúdos de potássio e cálcio nas células das películas. O potássio se acumula nas películas após o início da fase de pintor, sendo a sua distribuição celular bastante heterogênea. Por outro lado, o declínio no teor de cálcio é inversamente relacionado à síntese das antocianinas.<sup>11</sup>

Durante o desenvolvimento das bagas, ocorrem alterações na concentração e na composição dos flavanóis presentes nas películas.<sup>32</sup> Após um aumento acentuado no início do desenvolvimento das bagas, o conteúdo de flavanóis individuais diminui à medida que se polimerizam em procianidinas e taninos condensados.<sup>33</sup> O grau de polimerização aumenta com a maturação, assim como a proporção de subunidades de epigallocatequina e a inclusão de monômeros de antocianinas em polímeros de procianidina. As subunidades principais são (-)-epicatequina e (-)-epigallocatequina galato, sendo que as unidades terminais, são principalmente as (+)-catequinas. As epicatequinas são biossintetizadas a partir de antocianidinas, enquanto que a catequina é derivada das leucocianidinas (flavan-3,4-dióis).<sup>34</sup>

A síntese dos compostos fenólicos não-flavonóides tende a diminuir e pode cessar após a fase de pintor. No entanto, alguns compostos fenólicos de baixo peso molecular, isto é, os derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, podem aumentar durante a maturação.<sup>35</sup>

Os estilbenos, compostos sintetizados predominantemente em resposta ao estresse localizado (a exemplo tem-se a infecção por patógenos), tem como principal representante o resveratrol. A síntese dos estilbenos geralmente reduz após a fase de pintor, coincidindo com a síntese de antocianinas em uvas tintas.

De modo geral, pode-se dizer que a uva atinge a maturação fenólica ideal quando o teor de antocianinas e taninos na casca é máximo, ao mesmo tempo que o teor de taninos da semente começa a decair e se torna relativamente constante. Neste ponto, ocorre o equilíbrio entre os taninos da casca e da semente, caracterizando um vinho “harmônico” ao paladar, que apresenta adstringência e amargor equilibrados. Após este momento, o teor de antocianinas da casca decai, e observa-se um equilíbrio e constância do teor de taninos da casca e da semente. Com isso, se a uva for colhida antes da maturação fenólica ideal, provavelmente o vinho originado terá menor intensidade de cor, já que as antocianinas se acumulam em decorrência da maturação, além do mais, o vinho será rico em taninos da semente, muito reativos à ligações com glicoproteínas da saliva e proteínas da cavidade bucal, conferindo elevada adstringência ao vinho e “sensação de secura” após a sua ingestão.<sup>7</sup> A adstringência é uma sensação descrita como resultante da precipitação de proteínas salivares após a complexação com os taninos. Estando, portanto, associada à redução das propriedades lubrificantes da saliva, o que reduz a sua viscosidade, aumentando a sensação de adstringência.<sup>7</sup>

### 2.2.5 Maturação do Aroma

O odor é definido como as substâncias voláteis percebidas pelos receptores olfativos da cavidade nasal. Por outro lado, o aroma são aquelas substâncias voláteis percebidas pelos receptores olfativos da cavidade nasal (detecção ortonasal) e através da garganta após entrarem em contato com a boca (detecção retronasal).<sup>36</sup>

No entanto, dentre os diversos voláteis identificados em uma matriz alimentícia, vários não possuem odor, e apenas uma pequena fração apresenta impacto significativo sobre o aroma. Desse modo, a área do pico no cromatograma não é indicativa da contribuição efetiva do composto para o aroma, já que compostos presentes em baixas concentrações possuem alto poder odorífero.<sup>37</sup>

É durante a maturação da uva, que são formados os voláteis e precursores responsáveis pelo aroma característico da variedade, o chamado varietal. Estes se originam a partir do catabolismo de ácidos graxos, aminoácidos, açúcares, pectina e carotenóides das bagas, gerando compostos de diversas classes químicas, dentre eles, monoterpenos, C13-norisoprenóides, álcoois, ésteres, pirazinas, lactonas, cetonas e compostos sulfurados.<sup>38</sup> Dessa forma, a maturação do aroma caracteriza-se como o estágio onde a uva perde progressivamente seus odores vegetais e herbáceos, ao mesmo tempo que adquire odores frutados, presentes ao final da maturação.<sup>8</sup>

Com o desenvolvimento das técnicas de cromatografia a gás, tornou-se possível o estudo dos constituintes do aroma presentes nas uvas, bem como a compreensão de como alguns desses compostos variam no decorrer da maturação da uva. Grande parte das pesquisas sobre o aroma nas uvas, envolveu cultivares de Muscat, cujo aroma baseia-se principalmente em monoterpenos. Em geral, os monoterpenos se acumulam no decorrer da maturação, no entanto durante sua síntese, podem ser convertidos em formas não voláteis, podendo existir na forma de glicosídeos, derivados oxidados ou polímeros do composto original.<sup>39</sup>

As bagas jovens possuem elevada concentração do terpeno geraniol, que decai rapidamente, com o aumento correspondente da sua forma ligada glicosidicamente. Após o pintor, a concentração de outro importante terpeno, o linalol, aumenta, no entanto, a proporção da sua forma ligada glicosidicamente também aumenta. Após atingir máxima concentração na maturação da uva, as frações livres e ligadas tendem a diminuir. A maioria dos terpenos se acumula nas películas, no entanto, existem aqueles que se acumulam em maior quantidade na polpa. Além disso, a proporção dos terpenos livres e ligados glicosidicamente podem diferir entre a película e a polpa da uva.<sup>11</sup>

Em contraste, os norisoprenóides, como a  $\beta$ -damascenona, estão localizados predominantemente na polpa das uvas. Assim como ocorre com os monoterpênos, as suas concentrações aumentam durante a maturação.<sup>40</sup>

Além das classes supracitadas, outros compostos estão presentes em formas não voláteis, ou seja, conjugadas (ligadas glicosidicamente). Um desses grupos, consiste em fenóis aromáticos de baixo peso molecular. Exemplos em uvas do varietal Riesling incluem a vanilina e o vanilato de metila. Até mesmo os álcoois fenólicos 2-fenil etanol e álcool benzílico, podem tornar-se glicosilados durante a maturação.<sup>41</sup>

Outro grupo de precursores não voláteis são os conjugados de S-cisteína. Eles são metabolizados por leveduras durante a fermentação, liberando suas unidades de tióis voláteis. Estes compostos desempenham papéis significativos no aroma de muitas variedades da família Cabernet, sendo restritos às película.<sup>42</sup>

### **2.2.6 Parâmetros que determinam a colheita**

No Brasil, o parâmetro mais utilizado para a determinação da época da colheita da uva é o teor de açúcares, já que de forma geral o vinho é definido como o produto da transformação dos açúcares da uva em álcool e produtos secundários.<sup>19</sup> Os açúcares são medidos em escala de graus babo (porcentagem de açúcar existente no mosto da uva) ou em escala de graus Brix (teor de sólidos solúveis na uva)<sup>43</sup>, sendo recomendado para a colheita um teor de sólidos solúveis em torno de 22 °Brix e acidez titulável de 6 - 8 g L<sup>-1</sup>. Outro critério bastante empregado é o teor de ácidos, que é avaliado juntamente com o teor de açúcares, uma vez que o balanço entre ambos confere ao vinho um equilíbrio gustativo determinante para a sua qualidade geral.<sup>7</sup>

As uvas atingem maturação enológica ideal quando diversos fatores estão em equilíbrio, possibilitando a elaboração de vinhos de alta qualidade. A maturação tecnológica, fenólica e do aroma são variáveis independentes e devem ser consideradas no momento da colheita da uva.<sup>7</sup>

## **2.3 INFLUÊNCIA DA MACERAÇÃO NA ELABORAÇÃO DOS VINHOS**

A etapa de maceração se refere à liberação de constituintes do bagaço da uva (sementes, películas e polpa) após o esmagamento. O processo é facilitado pela liberação e ativação de enzimas hidrolíticas a partir de células esmagadas.<sup>11</sup> É uma fase muito importante na produção de vinhos tintos de alta qualidade, o que leva a uma maior estabilidade de cor, melhor sabor e aroma, bem como uma maior aceitação do vinho pelo consumidor.<sup>9</sup> Assim, a maceração fornece

um dos principais meios pelos quais os produtores podem ajustar a qualidade de seus vinhos. Os principais fatores físicos que influenciam a extração da película e da polpa são a temperatura e a duração da etapa em si, sendo a extração geralmente relacionada a ambos fatores.<sup>9</sup>

Na produção dos vinhos tintos, o processo de maceração se concentra principalmente na extração de pigmentos e taninos. As antocianinas são as primeiras a serem extraídas, por serem mais solúveis que os taninos. À medida que a fermentação se torna ativa, a produção de etanol não apenas aumenta a solubilização, mas também facilita a fuga de antocianinas aumentando a porosidade da membrana. A extração dos taninos é muito mais dependente do aumento do teor de etanol para sua solubilização.<sup>11</sup>

A fase de maceração tem duração de 3 a 5 dias quando o vinho tinto é elaborado para o consumo a curto prazo. Isso proporciona boa coloração, no entanto evita a extração de taninos duros (verdes) das sementes, mas extrai taninos suaves (maduros) das películas para promover a estabilidade da cor. A maioria dos flavonóides atinge um pico temporário na solubilização em aproximadamente 5 dias, no entanto pode haver uma segunda fase de extração que começa após 15 dias de maceração. Períodos de maceração mais longos estão correlacionados com concentrações maiores de taninos de elevado peso molecular.<sup>11,44</sup> Vinhos destinados ao consumo a longo prazo são macerados nas sementes e películas por até 3 semanas, apresentando como resultado um declínio no conteúdo de antocianinas livres, entretanto aumentam a estabilidade de cor, através da sua polimerização precoce com as procianidinas.<sup>11</sup>

É também durante a maceração que o teor de voláteis aumenta, devido à extração desses componentes das películas da uva. Por outro lado, ao longo da maceração, a fermentação alcoólica é realizada pelas leveduras gerando uma fração crescente desses compostos que conferem aroma ao vinho. No início da fermentação, durante os primeiros 2 a 3 dias, leveduras não *Saccharomyces cerevisiae*, com menor sensibilidade ao álcool, estão presentes no mosto, no entanto decaem rapidamente, sendo substituídas pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, dominantes até o final da fermentação. Essa espécie de levedura gera uma ampla gama de compostos voláteis e não voláteis que determinam a qualidade do aromas do vinho.<sup>7</sup>

## **2.4 COMPOSIÇÃO FENÓLICA DAS UVAS E VINHOS**

Os compostos fenólicos estabelecem um dos mais importantes parâmetros de qualidade dos vinhos, visto que estes, têm grande impacto sobre as características sensoriais, especialmente cor e sabor dessas bebidas. Além disso, o interesse nos polifenóis vem aumentando devido a sua ação protetora em humanos contra doenças cardiovasculares e

degenerativas.<sup>45</sup> Adicionalmente, os referidos compostos apresentam propriedades anti-inflamatória e antioxidante, inibem o efeito de células cancerígenas e evitam a aglomeração de plaquetas.<sup>45</sup>

Os compostos fenólicos presentes nos vinhos podem ser divididos de acordo com sua estrutura química em dois grandes grupos: os não-flavonóides e os flavonóides. Os principais não flavonóides incluem os ácidos derivados do ácido cinâmico (ex. cafeico, *p*-cumárico e ferrúlico), do ácido benzóico (ex. gálico, vanílico e siríngico) e os estilbenos (ex. trans-resveratrol).<sup>46</sup>

Os flavonóides são representados por várias subclasses, sendo as mais importantes para os vinhos as antocianinas (ex. malvidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo), os flavonóis (ex. quercetina, rutina, miricetina e caempferol-3-O-glicosídeo), e os flavanóis (ex. (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato e (-)-epigallocatequina galato).<sup>46</sup> A qualidade organoléptica dos vinhos depende das antocianinas, compostos responsáveis pela cor, e dos flavonóis, responsáveis pela cor, sabor, adstringência, corpo e amargor, ambos presentes nas películas<sup>7</sup>, enquanto os flavanóis, também influenciam na cor, estando presentes nas películas, assim como nas sementes das uvas.<sup>7</sup>

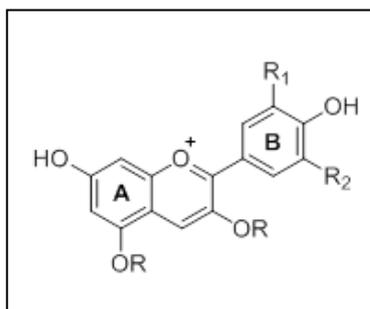
#### **2.4.1 Antocianinas**

As antocianinas estão entre os corantes vegetais mais utilizados na indústria de alimentos, sendo possível extraí-las a partir de uvas, morangos, maçãs, rabanetes, entre outros. Elas são constituídas basicamente por estruturas de antocianidinas ou também denominadas de agliconas, que são formadas por um anel benzênico, ligado a um anel heterocíclico que contém oxigênio [cátion flavílio (2-fenil-benzo pirilo) ], que por sua vez, está ligado a um terceiro anel aromático. Quando as antocianidinas são encontradas na forma glicosilada (ligadas à moléculas de açúcares, mais comumente de glicose, na posição 3 do anel aromático) elas são chamadas de antocianinas.<sup>47</sup> Além disso, são moléculas que apresentam diferentes funções biológicas nos tecidos vegetais, tais como a proteção contra exposição solar e radiação UV, ataques de patógenos, bem como contra os danos oxidativos.<sup>48</sup> São também compostos que apresentam atividade antioxidante, desempenhando uma importante função na prevenção de doenças cardiovasculares, neurais, entre outras.<sup>47</sup>

Nas uvas, as antocianinas estão presentes nas películas e desempenham uma importante função na qualidade sensorial dos vinhos tintos,<sup>49</sup> uma vez que ao se condensarem com os taninos dos vinhos formam complexos que conferem estabilidade a essas bebidas.<sup>44</sup> A formação

das antocianinas tem início no pintor, ocorrendo acúmulo no decorrer da maturação da uva<sup>50</sup>, sendo a sua biossíntese influenciada por diversos fatores, tais como o solo, temperatura, luminosidade, práticas de cultivo, bem como maturação da uva.<sup>51</sup> Além disso, a espécie da uva, bem como a variedade em questão, influenciam na composição antociânica presente. Em geral, as uvas *Vitis vinifera* apresentam apenas os derivados 3-O-monoglicosídicos. Logo, todas as antocianinas presentes em *Vitis vinifera* apresentam uma hidroxila livre na posição 5 do anel aromático. Em outras espécies do gênero *Vitis*, é possível encontrar antocianinas 3,5-diglicosídeo, ainda assim, os derivados 3-O-monoglicosídeo são mais intensamente coloridos, quando comparados entre si.<sup>52</sup>

As principais antocianinas encontradas nas uvas *Vitis vinifera*, são a pelargonidina, cianidina, delphinidina, malvidina e a peonidina-3-O-glicosídeo. Suas estruturas diferem entre si, devido aos diferentes substituintes presentes no anel B, como visto na **Figura 1**.<sup>53</sup>



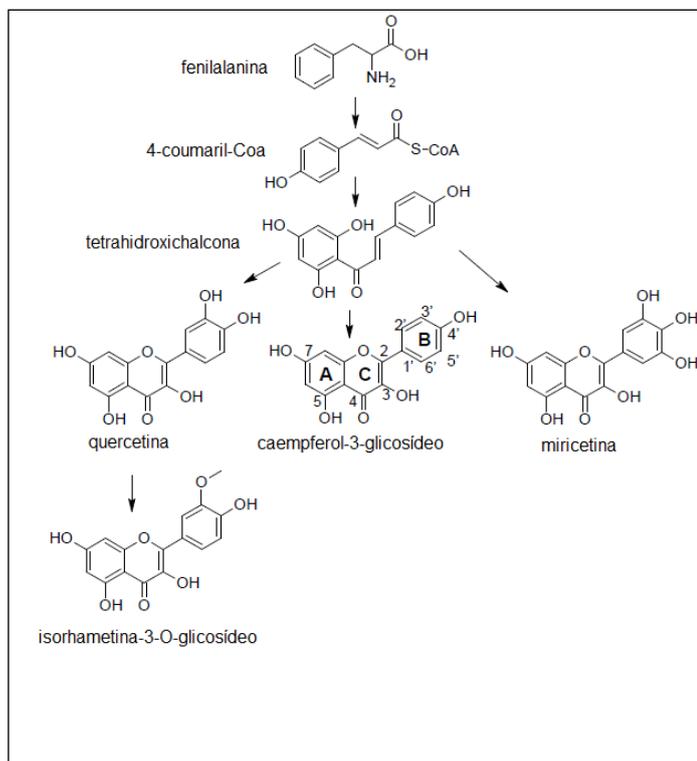
Antocianina	R1	R2
Pelargonidina-3-O-glicosídeo	H	H
Cianidina-3-O-glicosídeo	OH	H
Delfinidina-3-O-glicosídeo	OH	OH
Malvidina-3-O-glicosídeo	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Peonidina-3-O-glicosídeo	OCH <sub>3</sub>	H

**Figura 1:** Principais antocianinas encontradas nas uvas *Vitis vinifera*.

#### 2.4.2 Flavonóis

Os flavonóis são os metabólitos secundários presentes em quase todas as plantas superiores. São compostos que agem como foto protetores, uma vez que absorvem as radiações UVA e UVB. Juntamente com as antocianinas, são importantes na copigmentação dos vinhos, assim como na marcação taxionômicas das uvas. São referidos na literatura científica como compostos de alta importância para a saúde e nutrição humana.<sup>49</sup>

A estrutura dos flavonóis está intimamente relacionada a sua biossíntese. Assim como os demais compostos fenólicos, os flavonóis são um produto da rota biossintética do fenilpropanóide, onde a fenilalanina é convertida em 4-coumaril-CoA, e posteriormente em tetrahidroxichalcona (**Figura 2**).



**Figura 2:** Biossíntese de formação dos flavonóis.<sup>44</sup>

Em geral, os flavonóis são compostos polifenólicos C6-C3-C6, nos quais dois anéis benzênicos hidroxilados, A e B, estão ligados por uma cadeia de três carbonos, que é parte de um anel C heterocíclico com uma estrutura de 3-hidróxilflavona e uma dupla ligação. (**Figura 2**). Os flavonóis diferem entre si, com relação ao número e tipo de substituição que ocorre no anel B. O caempferol-3-O-glicosídeo, por exemplo, é mono hidroxilado na posição 4', a quercetina é di-hidroxilada nas posições 3' e 4', a miricetina é tri-hidroxilada, nas posições 3', 4' e 5' e a isorhametina-3-O-glicosídeo é a forma metilada da quercetina.<sup>54</sup>

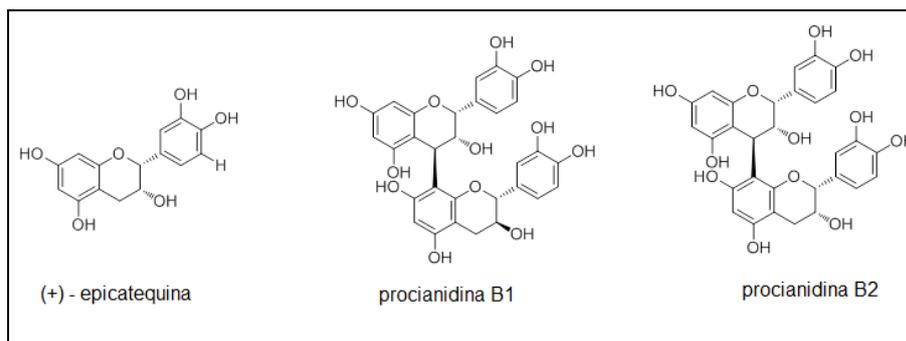
Os flavonóis são os flavonóides mais abundantes em alimentos, sendo a quercetina e o caempferol-3-O-glicosídeo seus principais representantes.<sup>55</sup> Estão geralmente presentes em concentrações baixas, cerca de 15 a 30 mg kg<sup>-1</sup>, sendo as fontes mais abundantes a cebola, couve, alho-poró, brócolis, entre outros.<sup>56</sup>

Nas uvas, os flavonóis estão localizados principalmente nas películas, uma vez que atuam como agentes protetores de raios UV, sendo que maiores concentrações são obtidas algumas semanas após o pintor. Durante o desenvolvimento do fruto há uma estabilização na concentração desses compostos, sendo um decréscimo observado a medida em que as uvas aumentam de tamanho. As castas brancas sintetizam principalmente os derivados do anel B, mono e di-substituído, ou seja, caempferol-3-O-glicosídeo, quercetina e isorhamnetina-3-O-glicosídeo. No caso das uvas tintas, além dos supracitados, ocorre também a síntese do flavonol tri-substituído miricetina.<sup>57</sup>

Nos vinhos tintos os flavonóis estão geralmente presentes na concentração máxima de 45 mg L<sup>-1</sup>, na forma glicosilada, sendo a porção de açúcar associada frequentemente a glicose.<sup>58</sup>

### **2.4.3 Flavanóis**

Os flavanóis existem na forma de monômeros denominados catequinas, assim como na de polímeros, conhecidos como proantocianidinas. As catequinas são encontradas nos vinhos tintos, em concentrações de até 300 mg L<sup>-1</sup>, entretanto as fontes mais abundantes das catequinas são o chá verde e o chocolate.<sup>59</sup> A (+)-catequina e a (-)-epicatequina são os principais flavanóis presentes em frutas, enquanto a (-)-epicatequina galato e a (-)-epigalocatequina galato são encontradas em sementes de leguminosas, em uvas e em chá.<sup>60</sup> As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, são dímeros, oligômeros e até mesmo polímeros de catequinas, e estão entre os principais polifenóis em uvas, localizando-se principalmente nas películas e nas sementes.<sup>61</sup> Os taninos condensados são os responsáveis pelo caráter adstringente de algumas frutas (pêssego, caqui, maçã, entre outros) e bebidas (vinho, sidra, chá, cerveja, etc.),<sup>62</sup> uma vez que formam complexos com as proteínas salivares. Essa adstringência muda ao longo da maturação e muitas vezes desaparece quando o fruto se torna maduro. Estão também relacionados com a cor apresentada pelos vinhos tintos, já que reagem com as antocianinas formando complexos polifenólicos coloridos, quimicamente estáveis, apresentando também, expressiva atividade antioxidante.<sup>63</sup>



**Figura 3:** Estrutura dos flavanóis.<sup>53</sup>

## 2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS

Muitos compostos presentes nas uvas e nos vinhos não podem ser analisados por cromatografia gasosa, por apresentarem baixa volatilidade ou por serem instáveis termicamente. Este é o caso dos compostos fenólicos, onde a identificação é geralmente alcançada através da combinação de técnicas instrumentais, tais como, a espectroscopia do ultravioleta - visível (UV-Vis), espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). A espectroscopia do UV-Vis distingue os grupos fenólicos através dos espectros de absorção. A identificação dos polifenóis por espectrometria de massas se dá através dos diferentes espectros de massas que são obtidos para cada classe de polifenóis. A técnica inclui o uso de uma variedade de instrumentos, que combinam diferentes fontes de ionização (ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI, ionização por eletro spray - ESI, ionização química por pressão atmosférica - APCI) e analisadores de massas (tempo de voo - TOF, quadrupolar - Q, armadilha de íons - IT). A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) baseia-se principalmente na análise dos espectros de RMN de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) dos compostos fenólicos, mas também podem ser proporcionadas informações estruturais importantes a partir dos espectros de carbono ( $^{13}\text{C}$ ).<sup>64</sup>

Nos anos de 1980 a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) surgiu como um método que possibilitou a análise quantitativa de um grande número de compostos fenólicos de forma rápida, ofuscando o uso de técnicas clássicas. Os métodos de HPLC para a análise de uvas e vinhos podem ser divididos em dois tipos: métodos de rotina, onde o objetivo é a obtenção de métodos rotineiros para a análise quantitativa. Neste caso, é desejável um método rápido, simples e robusto, sendo assim, os detectores mais empregados são os de ultravioleta (UV) e os de fluorescência (FD). Por outro lado, para a investigação química mais detalhada

dos constituintes presentes em baixas concentrações, os métodos mais utilizados são os que acoplam a cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas (HPLC-MS).<sup>64</sup> Diversos trabalhos reportados na literatura mostram o uso da técnica de HPLC para a análise de polifenóis em vinhos.<sup>65-68</sup>

## **2.6 COMPOSTOS VOLÁTEIS RELACIONADOS AO AROMA DO VINHO**

Na tentativa de identificar e quantificar os compostos químicos responsáveis pela experiência humana de olfato e paladar os pesquisadores analisam a composição de alimentos e bebidas, tendo grande interesse no estudo de uvas e vinhos, não somente por sua importância econômica, mas também devido à sua complexidade. Apesar dos estudos de composição fornecerem informações sobre os compostos que contribuem para a percepção sensorial dos vinhos, eles não substituem a capacidade do ser humano de traduzir as interações complexas de visão, aroma e sabor que são captados ao ingerir um vinho.<sup>69</sup>

Para ser percebida pelo nariz humano, a concentração de um composto volátil deve ser maior que seu limiar de percepção e, portanto, seu valor de atividade de odor (OAV) deve ser maior que 1. Além disso, o uso de OAV permite uma abordagem quantitativa relacionada à contribuição dos voláteis odoríferos para o aroma dos vinhos, enquanto uma avaliação qualitativa pode ser feita com base nos descritores de cada composto. Um composto com um  $OAV > 1$  deve contribuir para o aroma de um vinho.<sup>70</sup>

Compostos químicos, pertencentes à diferentes classes químicas, e presentes em distintas concentrações, são responsáveis pelo aroma. Tais compostos são oriundos da uva, dos processos fermentativos e de estocagem.<sup>71</sup> Contudo, os compostos mais importantes para o aroma do vinho são aqueles formados durante a fermentação.<sup>38</sup> Dentre as classes de compostos que contribuem para o aroma dos vinhos estão os terpenos, C13-norisoprenóides, derivados dos furanos, ácidos, ésteres, álcoois, metoxipirazinas, compostos sulfurados, fenóis, aldeídos e cetonas.

### **2.6.1 Compostos originários da uva**

O genótipo varietal, que corresponde às características genéticas de cada cultivar de uva, assim como o fenótipo, caracterizado pelas interações genótipo com fatores ambientais, os quais, quando referentes aos vinhos, são agrupados através do conceito de *terroir*, estão intimamente relacionados à composição da uva.<sup>72</sup>

O *terroir* caracteriza-se como um conjunto complexo de fatores, tais como clima, solo, geologia, altitude, latitude, influência humana, dentre outros, que não podem ser facilmente modificados pelo homem e que, em conjunto com decisões de manejo, levarão à obtenção de um produto característico de determinada região.<sup>72</sup> Sendo assim, o aroma do vinho é influenciado por fatores tais como clima, solo, cultivar, grau de maturação da uva, e condições utilizadas para a elaboração do vinho.<sup>73</sup>

Substâncias específicas, inerentes a cada varietal de uva, contribuem para o aroma, são elas: a) substâncias que passam para o vinho sem transformações e que transmitem a sua tipicidade e b) aquelas que sofrem transformações durante a fermentação e conservação, com conseqüente liberação de aroma, conhecidos como precursores de aroma.<sup>74</sup> Os precursores podem ser substâncias não voláteis como glicosídeos, ácidos fenólicos, ácidos graxos e conjugados de cisteína, capazes de originar compostos voláteis pela ação de enzimas específicas. Além disso, podem ser substâncias que colaboram ou não para o aroma do vinho, e que pela sua instabilidade, se transformam em outras substâncias odoríferas.<sup>7</sup>

#### **2.6.1.a Terpenos**

Os terpenos são sintetizados biologicamente a partir de unidades do isopentenil pirofosfato (IPP), unidade estrutural básica que contém cinco átomos de carbono, que por sua vez, são oriundas do ácido mevalônico e do piruvato/gliceraldeído-3-fosfato, presentes na uva.<sup>75</sup> As moléculas formadas por 10 carbonos são chamadas de monoterpenos, com 15 carbonos de sesquiterpenos, com 20, diterpenos, com 25, sesterpenos, com 30, triterpenos e com 40, tetraterpenos. Teores elevados de terpenos não são característicos de uvas tintas, entretanto níveis baixos ( $< 1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) de linalol, citronelol e nerol foram encontrados em uvas Cabernet Sauvignon,<sup>76</sup> e são responsáveis por conferirem aromas florais e cítricos aos vinhos.<sup>77</sup>

#### **2.6.1.b Norisoprenóides**

Os norisoprenóides são compostos derivados dos carotenóides, e assim como os terpenos, são metabólitos secundários das uvas. São formados a partir de glicosídeos não voláteis, sendo liberados pela ação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>78</sup> Os compostos que apresentam 13 átomos de carbono são denominados C13-norisoprenóides, sendo estes os que mais exercem influência no aroma do vinho. Estão presentes em diversos cultivares de uva, incluindo as brancas e tintas, e a sua abundância é influenciada por diversos fatores, tais

como varietal da uva, clima e tipo de solo.<sup>79</sup> A importância desses compostos para o vinho foi demonstrada em trabalho publicado por Nevajas *et al.*<sup>80</sup>, no qual ressalta-se uma correlação positiva entre as elevadas concentrações desses compostos com aroma de frutas vermelhas.

### **2.6.1.c Metoxipirazinas**

As metoxipirazinas são compostos heterocíclicos formados a partir do metabolismo dos aminoácidos e estão presentes nas películas das uvas,<sup>7</sup> sendo seus teores dependentes do grau de maturação da uva.<sup>81</sup> Nos vinhos a metoxipirazina mais recorrente é a 2-metóxi-3-isobutilpirazina (IBMP), que em concentrações baixas contribui para o caráter varietal de vinhos das variedades Sauvignon Blanc e Cabernet Sauvignon, porém em teores elevados é considerada indesejável. Alguns fatores contribuem para o aumento nos níveis de IBMP em vinhos brancos, como exemplo, pode-se citar os níveis baixos de exposição solar do vinhedo e o clima frio da região de cultivo das uvas. Tais fatores, resultam em compostos de contribuição odorífera caracterizada como vegetal, bastante intensa nas uvas e que se mantém no vinho.<sup>82</sup>

### **2.6.2 Compostos voláteis oriundos da fermentação**

A conversão do mosto da uva em vinho se dá através de dois importantes processos, denominados: fermentação alcoólica e fermentação malolática. Na primeira, comum a todos os vinhos, o etanol, assim como outros produtos secundários, é formado a partir dos açúcares do mosto, pela ação das leveduras. A fermentação malolática consiste na transformação do ácido málico em ácido lático pela ação de bactérias lácticas, e tem seu início ao final da fermentação alcoólica, quando a autólise das leveduras se intensifica. Este tipo de fermentação pode ocorrer de duas formas: espontânea ou através da inoculação de bactérias lácticas no vinho. O vinho tinto adquire maior complexidade de aromas, bem como suavidade gustativa quando sofre o processo de fermentação malolática.<sup>74</sup> Além do etanol, outros compostos podem contribuir de forma significativa para o aroma do vinho, são eles: álcoois superiores, ácidos voláteis, ésteres e em menor proporção, os aldeídos e cetonas. Para os vinhos são considerados álcoois superiores aqueles que possuem uma função álcool e mais de dois átomos de carbono.<sup>77</sup>

### **2.6.2.a Álcoois**

Os álcoois superiores são produzidos a partir do metabolismo das leveduras durante a fermentação alcoólica. Suas concentrações são influenciadas por diversos fatores, tais como condições de fermentação, composição físico-química do mosto e da uva.<sup>9</sup> Os álcoois superiores de cadeia ramificada, incluindo o 3-metil, 1-butanol e o 2-metil, 1-propanol, são produzidos a partir do metabolismo dos aminoácidos e são descritos com aroma de uísque, malte, queimado e vinho, solvente e pungente, respectivamente.<sup>83</sup> O álcool aromático, 2-fenil etanol, que possui aromas descritos como especiarias, rosa e mel é considerado um dos mais importantes para a qualidade sensorial do vinho, uma vez que é tipicamente encontrado acima de seu limiar de percepção ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ).<sup>84</sup>

### **2.6.2.b Ácidos**

As leveduras produzem ácidos de cadeia curta, ou seja, com menos de 6 átomos de carbono ( $< C6$ ), média (de  $C6$  a  $C12$ ), e em maior parte, os de cadeia longa ( $> C12$ ). No entanto, tais ácidos de cadeia longa, como o palmítico ( $C16$ ) e o esteárico ( $C18$ ) não são voláteis, e por isso não contribuem para o aroma dos vinhos.<sup>85</sup> Os de cadeia curta, ( $< C6$ ), que incluem o ácido 2-metil propanóico e o ácido 3-metil butanóico, e os lineares, propanóico e butanóico, contribuem de forma negativa, sendo o odor dos mesmos associado aos descritores de suor e queijo.<sup>86</sup> Já os ácidos de cadeia média, hexanóico ( $C6$ ), octanóico ( $C8$ ) e decanóico ( $C10$ ) possuem concentrações dependentes de fatores tais como: as condições de crescimento anaeróbias, composição do mosto, cepa de levedura, cultivar da uva, temperatura de fermentação e práticas de vinificação, sendo também, de odor desagradável.<sup>87</sup> O ácido acético, é um dos mais importantes ácidos presentes no vinho, uma vez que contribui para cerca de 90% da acidez volátil. O referido ácido está presente em todos os vinhos, já que pequenas quantidades são produzidas pelas leveduras, em torno de  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ , de forma que sua presença em concentrações elevadas é um indício de deterioração microbiana.<sup>88</sup>

### **2.6.2.c Ésteres**

Os ésteres são formados nos processos fermentativos e de envelhecimento dos vinhos, a partir de reações entre álcoois e ácidos. Eles representam a maior concentração de compostos

voláteis em bebidas alcóolicas,<sup>89</sup> contribuindo de forma significativa para o aumento e qualidade do aroma do vinho, com descritores odoríferos de frutado e floral.<sup>9</sup> Estes compostos podem estar presentes no vinho na forma de acetato, onde o grupo funcional é derivado do ácido acético incluindo compostos importantes para o aroma, como o acetato de etila. Ou ainda, na forma de ésteres etílicos, que resultam da combinação do grupo ácido, oriundo de um ácido graxo, com o grupo funcional álcool do etanol.<sup>89</sup> A concentração desses compostos, em alguns casos, é reduzida no momento da fermentação, devido a presença de oxigênio dissolvido e ácidos graxos insaturados.<sup>89</sup> Há perdas, também, do aroma frutado e floral nos vinhos jovens, durante a maturação e armazenamento, em decorrência de perdas hidrolíticas dos acetatos e ésteres. Essas perdas podem ser reduzidas com o emprego de temperaturas mais baixas (de 0 a 10 °C) no armazenamento dos vinhos.<sup>90</sup>

#### **2.6.2.d Sulfurados**

Os compostos sulfurados presentes nos vinhos, se originam a partir do metabolismo das leveduras, estando associados à redução do sulfato e conseqüentemente à produção de aminoácidos de enxofre (metionina e cisteína). Esses voláteis presentes nos vinhos podem ser classificados em dois grupos. Aqueles que contribuem negativamente para o aroma, com descritor odorífero de ovo podre, e que se originam a partir da formação do H<sub>2</sub>S, que é um produto da fermentação.<sup>91</sup> Entretanto, existem os que contribuem de forma positiva, conferindo odores desejáveis aos vinhos. Esses compostos são conhecidos como tióis e são considerados de grande impacto odorífero em vinhos brancos. Um exemplo, é o vinho branco Sauvignon Blanc, que apresenta notas de maracujá atribuídas ao tiol 4-mercapto-4-metil-pentan-2-ona.<sup>92</sup>

#### **2.6.2.e Fenóis Voláteis**

Os fenóis são compostos produzidos pelas leveduras por meio da descarboxilação enzimática dos ácidos cinâmicos oriundos da uva. Dentre os principais compostos fenólicos encontrados nos vinhos está o 4-etil, guaiacol, relatado com odor de fenólico e picante e o guaiacol, com descritor odorífero de pungente e fenólico contribuindo negativamente com o aroma do vinho.<sup>93</sup>

### **2.6.2.f Compostos Carbonilados**

Compostos carbonilados, tais como aldeídos e cetonas, podem ser formados a partir da ação das leveduras através de reações de descarboxilação dos ácidos  $\alpha$ -cetônicos.<sup>72</sup> Dentre os aldeídos presentes em vinhos, o acetaldeído destaca-se por ser formado em grande quantidade e por possuir odor descrito como pungente.<sup>77</sup> O benzaldeído é outro composto pertencente a esta classe, e se destaca por apresentar odor de amêndoas.<sup>94</sup> Já dentre as cetonas, a 2,3 - butanodiona, quando presente em concentrações elevadas, na faixa de 5 - 7 mg L<sup>-1</sup>, confere odor desagradável aos vinhos. No entanto, em baixos teores, 1 - 4 mg L<sup>-1</sup> contribui de forma positiva, com odor amanteigado.<sup>95</sup>

### **2.6.2.g Lactonas**

As lactonas são formadas a partir de reações de esterificação. Tais reações ocorrem na presença de grupos hidroxílicos e carboxílicos para formação do éster cíclico, que na maioria das vezes é composto por 4 átomos de carbono, sendo denominados  $\gamma$ -lactonas. As lactonas podem ter origem na uva, nos processos de transformação que ocorrem durante a fermentação ou ainda podem ser extraídas das madeiras utilizadas para o armazenamento dos vinhos que passam por processo de envelhecimento.<sup>72</sup>

## **2.6.3 Compostos voláteis oriundos do armazenamento**

O amadurecimento de alguns vinhos tintos em barris de madeira antes do engarrafamento, ocorre devido aos benefícios que esta prática tem sobre estas bebidas. Estes efeitos incluem maior estabilidade de cor, clarificação espontânea e um aroma mais complexo. A complexidade do aroma é aumentada devido à extração de certos compostos presentes na madeira, que são transferidos para o vinho durante o período de maturação. No entanto, reações que envolvam apenas compostos do vinho e a evaporação de compostos voláteis também podem ocorrer durante a maturação no carvalho.<sup>96</sup>

### **2.6.3.a Derivados dos furanos**

Os compostos derivados dos furanos, incluindo o furfural e o 5-metil-furfural, são formados durante o armazenamento dos vinhos em barris de carvalho<sup>97</sup> ou ainda através de

reações de Maillard<sup>98</sup> que ocorrem com o aquecimento das uvas, bem como dos vinhos. Esses compostos contribuem para o aroma de tostado e caramelo percebido nos vinhos, e sua concentração, quando proveniente do carvalho, depende do grau de tostagem da barrica, assim como do tipo de carvalho empregado em sua fabricação.<sup>71</sup>

## 2.7 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS

Na avaliação dos voláteis em vinhos, o preparo da amostra representa uma etapa extremamente importante no processo analítico, sendo a extração e a pré-concentração desses compostos, essencial para a sua análise qualitativa e quantitativa. A escolha da técnica analítica a ser empregada para a extração dos voláteis e semi-voláteis irá depender do objetivo da análise, sendo as mais utilizadas a extração líquido-líquido (LLE - do inglês “*liquid-liquid extraction*”), a extração em fase sólida (SPE - do inglês “*solid phase extraction*”), a extração sortiva em barras de agitação (SBSE - do inglês “*stir bar sortive extraction*”) e a microextração em fase sólida (SPME - do inglês “*solid phase microextraction*”).

A LLE é uma técnica amplamente empregada quando se deseja analisar os principais compostos voláteis de um vinho, devido ao seu baixo custo e simplicidade. Entretanto, algumas desvantagens estão relacionadas ao uso desta técnica, tais como o emprego de solventes tóxicos, degradação de alguns componentes e formação de outros, durante a evaporação do solvente, assim como a produção de emulsão.<sup>99</sup>

Com a finalidade de reduzir a quantidade de solvente empregada na LLE, foi criada a SPE, que se baseia na extração dos compostos voláteis de soluções aquosas, usando uma fase estacionária adsorvente adequada. A SPE já foi empregada como técnica alternativa à SPME por Weldegergis *et al.*<sup>100</sup> para a extração de compostos semi-voláteis e voláteis em vinhos da África do Sul.

A SBSE, desenvolvida por Baltussen *et al.*,<sup>101</sup> envolve a utilização de uma barra de agitação magnética, recoberta com um polímero sorvente, que pode ser mergulhada na amostra líquida ou, exposta ao *headspace*, no caso da extração de compostos voláteis.

Na SPME emprega-se o uso de uma fibra de sílica recoberta com a fase estacionária sorvente, que está em acordo com os analitos que se deseja extrair da amostra. A técnica está baseada em dois processos: na sorção dos compostos voláteis da amostra no filme que recobre a fibra e na dessorção térmica dos mesmos no injetor do cromatógrafo. Por não usar solventes, ser rápida, facilmente acoplada à cromatografia gasosa, apropriada para a análise direta de matrizes complexas, e proporcionar baixos limites de detecção, com relação a LLE e SPE, esta

vem sendo largamente utilizada no estudo de bebidas alcóolicas.<sup>12</sup> A fase estacionária sorvente empregada na extração por SPME, está intimamente relacionada à natureza do analito que se deseja extrair. Existem vários tipos de fases estacionárias disponíveis comercialmente com diferentes espessuras e polaridades. A vantagem de utilizar fibras com diferentes polaridades, está em alcançar melhor seletividade, possibilidade de maior recuperação dos analitos específicos e redução da extração de compostos interferentes.<sup>13</sup> Sendo assim, a SPME se insere como uma das técnicas mais utilizadas e adequadas para a extração de compostos voláteis em vinhos.

## **2.8 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS**

### **2.8.1 Cromatografia Gasosa Monodimensional (GC/MS) e Cromatografia Gasosa Olfatométrica (GC-O)**

Cerca de 800 compostos voláteis, pertencentes a distintas classes químicas e presentes em diversificadas concentrações, já foram identificados em vinhos, sendo a técnica de cromatografia gasosa, acoplada aos detectores FID ou MS, a mais comumente utilizadas para tal estudo.<sup>102</sup>

A cromatografia é uma técnica que se baseia na distribuição dos componentes de uma amostra a ser separada, em duas fases, uma estacionária e a outra, móvel. A cromatografia gasosa (GC), é o resultado de repetidos processos de sorção e desorção dos componentes da amostra ao longo da fase móvel, que é um gás inerte, cuja função é transportar a amostra ao longo do processo, sendo geralmente empregados os gases hélio, nitrogênio ou hidrogênio.<sup>14</sup>

Embora a GC seja uma técnica que visa separar, identificar e quantificar de forma rápida e eficiente os constituintes de uma mistura, ela sozinha, não é capaz de analisar compostos odoríferos presentes nos vinhos. Sendo assim, complementarmente à identificação dos voláteis por técnicas de GC, torna-se necessária a utilização de técnicas que associem a cromatografia à olfatometria, conhecidas como GC-Olfatométrica ou GC-O.<sup>15</sup> Os métodos de GC-O consistem na avaliação sensorial dos compostos voláteis presentes no eluente cromatográfico assim que os mesmos deixam a coluna, e são comumente classificados em quatro categorias: diluição, tempo-intensidade, frequência de detecção e intensidade a posterior.

As análises de diluição se baseiam em diluições sucessivas do isolado até o odor não ser mais percebido pelos membros do painel olfativo. Este método utiliza geralmente um pequeno

número de julgadores treinados e é representado por CHARM<sup>103</sup> e AEDA.<sup>104</sup> Na AEDA as amostras são avaliadas em ordem crescente de diluição e o impacto de um composto odorífero é dado pelo fator de diluição (FD), que representa a maior diluição do isolado na qual o composto volátil ainda pode ser detectado. Uma das maneiras de apresentar os dados é na forma de um aromagrama, de FD versus tempo de retenção. Na CHARM as diluições são apresentadas de forma aleatória, evitando possíveis tendências nos resultados, introduzidas pelo conhecimento das diluições. Os membros do painel registram o início e o fim de cada odor detectado e assim é gerado um aromagrama para cada julgador, através da representação gráfica da duração da sensação do odor em relação ao valor de diluição. Os métodos de diluição apresentam como desvantagens longos tempos de análise, de modo que participam dessas análises um pequeno número de avaliadores, aumentando a probabilidade de obtenção de resultados de baixa precisão. Além disso, os resultados dependem do limiar de detecção sensorial dos analitos, e não da intensidade real do odor do analito em uma dada amostra.<sup>105</sup>

A técnica de OSME<sup>106</sup>, empregada neste trabalho, se baseia no método tempo-intensidade, no qual cada julgador avalia o eluente cromatográfico e registra em uma escala associada a um computador, a intensidade e o tempo de duração de cada estímulo olfativo percebido. Os dados gerados são analisados por um software que gera um aromagrama, no qual cada um dos picos representa um estímulo olfativo sentido pelos julgadores no decorrer da análise. Picos altos e com áreas maiores representam compostos de maior importância para o aroma e sabor do produto analisado. Apresenta como desvantagem a necessidade de uma equipe treinada para a realização das análises.<sup>105</sup>

Por outro lado, as técnicas de Análise Olfatométrica Global (OGA)<sup>107</sup> e de Frequência de Impacto Nasal (NIF/SNIF), estão baseadas na frequência com que os julgadores detectam a presença dos voláteis no eluente cromatográfico, ou seja, quanto maior o número de detecções de um determinado composto, maior será sua importância para o aroma de uma determinada amostra. Um dos benefícios dos métodos de frequência de detecção é a sua simplicidade, não sendo necessário o preparo de avaliadores para realizar as análises. Esses métodos são os que consomem menos tempo e os mais fáceis de conduzir, no entanto o resultado obtido relaciona-se apenas com a intensidade do odor detectado a uma determinada concentração do analito na amostra, que é a principal limitação deste grupo de métodos.<sup>105</sup>

Os métodos de intensidade posterior se baseiam na avaliação da intensidade de um composto volátil após seu aroma ser totalmente percebido por uma equipe de julgadores. Neste

método, após sentir o composto, o julgador associa a sua percepção a uma escala numérica, previamente memorizada, e ao mesmo tempo, descreve a qualidade do odor sentido.<sup>108</sup>

### 2.8.2 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC)

A GC×GC é uma técnica que consiste da combinação de duas colunas capilares de diferentes mecanismos de retenção, conectadas em série, sendo a coluna da primeira dimensão (<sup>1</sup>D) de tamanho convencional, ou seja, comumente de 30 m. A coluna da segunda dimensão (<sup>2</sup>D), deve ser mais curta, do tipo empregado em cromatografia rápida (*fast GC*), para que o perfil de separação alcançado na <sup>1</sup>D seja mantido.<sup>109</sup> Entre as duas colunas existe um modulador, considerado uma das partes mais importantes do sistema, que é responsável por amostrar a banda cromatográfica que elui da <sup>1</sup>D, redirecionando-a periodicamente para a <sup>2</sup>D. O modulador, ao focalizar o eluente proveniente da primeira coluna e introduzi-lo na segunda dimensão, deve fazê-lo em uma frequência adequada de amostragem para que a resolução cromatográfica obtida na primeira separação seja mantida. O ideal é que a amostragem proveniente da <sup>1</sup>D seja de 3 a 4 fatias por pico, permitindo assim, manter a separação obtida na primeira coluna. O período de amostragem corresponde ao período de modulação (*PM*), que é a duração de um ciclo completo de separação. Sendo assim, o tempo de separação na segunda coluna, que dura em torno de 2 a 10 segundos, é essencialmente isotérmico.<sup>110</sup>

O termo “abrangente” relaciona-se ao fato de que todo eluente da primeira dimensão, ou parte representativa do mesmo, seja introduzido na segunda dimensão, sem perder as características da separação obtida na <sup>1</sup>D. Na separação abrangente, alguns fatores devem ser verificados, tais como: (a) se todos os constituintes da amostra estão sujeitos a duas separações de mecanismos distintos; (b) se os constituintes da amostra separados na <sup>1</sup>D seguirão separados na <sup>2</sup>D; e (c) se o perfil de eluição de ambas colunas é mantido.<sup>111</sup>

Um sistema é considerado ortogonal quando os mecanismos de separação que ocorrem em ambas as colunas são independentes, ou seja, as mesmas devem ter fases estacionárias diferentes. Sendo assim, se a coluna empregada na <sup>1</sup>D for apolar, a separação ocorrerá em função da volatilidade, tornando necessária a escolha de uma coluna de fase estacionária de média ou elevada polaridade para uso na <sup>2</sup>D, onde a separação se dará por polaridade. A eficiência de uma separação cromatográfica bidimensional depende do tipo de amostra, assim como do conjunto de colunas empregado na primeira e segunda dimensão, e não, necessariamente, da ortogonalidade do sistema. No entanto, nota-se na prática, uma relação da ortogonalidade do sistema com o aumento da capacidade de pico, que é o número máximo de

compostos colocados lado a lado em um espaço de separação com uma dada resolução em um determinado intervalo de tempo.<sup>111</sup>

A GC×GC, assim como a GC/MS, fornece informações qualitativas e quantitativas, no entanto, a representação gráfica se dá de forma diferenciada. Softwares específicos são utilizados para gerar os gráficos tridimensionais, onde o eixo X representa a separação ocorrida na <sup>1</sup>D, o eixo Y a separação na <sup>2</sup>D e um terceiro eixo, o Z, representa a intensidade do sinal gerado por um sistema cromatográfico bidimensional abrangente.

O detector para ser empregado em GC×GC deve apresentar rapidez na velocidade de aquisição dos dados, sendo que esta velocidade se relaciona com a rapidez no processo físico-químico que irá produzir o sinal, assim como a rapidez no processamento eletrônico deste sinal. Desse modo, o detector deve ser pequeno e apresentar taxa de aquisição de dados de pelo menos 50 Hz, evitando o alargamento de pico por volume extra coluna e reconstrução incorreta do pico, respectivamente. Sendo assim, os sistemas de detecção mais utilizados são o detector de ionização em chama (FID) e o detector de espectrometria de massas por tempo de voo (TOFMS).<sup>112</sup>

O uso da GC×GC apresenta algumas vantagens com relação à GC/MS, tais como o aumento da detectabilidade, devido ao estreitamento das bandas cromatográficas decorrente do processo de modulação, aumento da capacidade de pico, a separação da amostra se dá por dois processos distintos, estruturação observada em alguns cromatogramas obtidos por GC×GC auxilia na identificação de compostos desconhecidos.<sup>16</sup>

Essas e outras características fazem da GC×GC uma técnica apropriada para a análise de matrizes complexas, assim como de outras amostras, onde a GC/MS é incapaz de fornecer uma separação razoável. Por consequência, a GC×GC é uma técnica analítica adequada para a análise de compostos responsáveis pelo aroma dos vinhos e espumantes.

## **2.9 PARÂMETROS DE MÉRITO PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL E BIDIMENSIONAL**

A validação de um procedimento analítico tem por objetivo demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos. Sendo assim, a validação garante que um método forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra.<sup>113</sup> Os parâmetros geralmente validados em um processo de validação são: especificidade e seletividade, linearidade e curva

de calibração, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e *bias*.

### 2.9.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade são parâmetros relacionados ao evento de detecção do método.<sup>114</sup> Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Já aquele que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.<sup>114</sup> No entanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente. Desse modo, com o intuito de evitar confusão, a IUPAC (do inglês “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”) recomenda o uso do termo seletividade, já que poucos são os métodos cromatográficos que respondem a apenas um único analito.

### 2.9.2 Linearidade e Curva de Calibração

A linearidade de um método está relacionada a capacidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em um determinado intervalo de concentração.<sup>114</sup> O uso de soluções padrão para a verificação da relação entre a concentração e a resposta analítica, torna-se essencial, uma vez que na prática a linearidade é verificada através da curva de calibração. Através da curva de calibração é gerado um gráfico, com pelo menos cinco pontos, representado por uma reta, que relaciona a resposta do instrumento com as várias concentrações dos analitos em estudo. Dessa forma, a resposta instrumental é linearmente relacionada com a concentração das soluções padrão ou matriz fortificada. A resposta obtida, pode ser verificada matematicamente através da regressão linear, descrita pela equação  $\hat{y} = \mathbf{a}x + \mathbf{b}$ , onde  $\hat{y}$  equivale a variável dependente (sinal analítico obtido para as diferentes concentrações);  $\mathbf{a}$  é o coeficiente angular da reta (inclinação da curva);  $\mathbf{x}$  é a variável independente (relaciona-se às várias concentrações das soluções padrão) e  $\mathbf{b}$  corresponde ao coeficiente linear da reta de calibração. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é utilizado para verificar a linearidade de uma curva analítica, sendo que os valores acima de 0,98 são considerados satisfatórios.<sup>115</sup>

### 2.9.3 Precisão

A precisão é utilizada para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas.<sup>113</sup> É normalmente expressa em termos de coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD, do inglês “*relative standard deviation*”), sendo que para a análise de compostos em nível de traços, são aceitos RSD de até 20%.<sup>114</sup> A precisão analítica é expressa em termos de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade é a concordância entre os resultados de medições sucessivas realizadas em um mesmo laboratório, em curto intervalo de tempo (mesmo dia, mesmo analista). A precisão intermediária é expressa pela variação entre os resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. A reprodutibilidade se refere ao grau de concordância entre os resultados obtidos através da colaboração entre laboratórios, com mudança de operador, local, instrumento, entre outros.<sup>114</sup>

### 2.9.4 Exatidão e *Bias* (teste para erro sistemático)

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio obtido e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Para verificar a exatidão de um método analítico são empregados quatro métodos, sendo eles: uso de material de referência certificado (MRC), comparação de método proposto com método de referência, testes de recuperação com matriz fortificada e estudos colaborativos entre vários laboratórios. Para a determinação de amostras complexas a literatura considera satisfatórias recuperações entre 50% e 120%, com precisão de 20%.<sup>114</sup> A **Equação 1** descreve a porcentagem de recuperação de uma amostra fortificada.

$$R\% = \frac{m}{m_{AD}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

R%: Recuperação percentual dos analitos

m: massa determinada na amostra fortificada

m<sub>AD</sub>: massa de analito adicionada à amostra

Conforme a IUPAC, *bias* é definido como a diferença entre a média populacional e o seu valor verdadeiro. Erros sistemáticos são todas as componentes de erros que não são randômicas,

logo, eles correspondem à parcela fixa do *bias* em uma medida química.<sup>116</sup> A existência desse tipo de erro afeta a precisão, a exatidão e a determinação dos intervalos de confiança. A norma E1655-00 da ASTM<sup>117</sup> sugere um teste t para avaliar se o *bias* incluso no modelo é significativo. O *bias* médio pode ser calculado como:

$$bias = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{nv}$$

**Equação 2**

Em seguida, o desvio padrão dos erros de validação (SDV, do inglês “*standard deviation of validation*”) é estimado por:

$$SDV = \sqrt{\frac{[(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{nv - 1}}$$

**Equação 3**

O valor de t é então obtido:

$$t = \frac{|bias| \sqrt{nv}}{SDV}$$

**Equação 4**

Onde, nas equações 2, 3 e 4

$y_i$  = valores de referência

$\hat{y}_i$  = valores previstos pelo modelo

$nv$  = número de amostras de validação

Caso o valor de t calculado seja menor que o seu valor crítico para  $v$  graus de liberdade com 95% de confiança, o *bias* incluído no modelo pode ser considerado insignificante e desprezado.

### **2.9.5 Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção do Método (LDM)**

O limite de detecção é definido como a concentração mínima de uma substância medida e que pode ser detectada, não sendo quantificada, ou seja, é a menor concentração determinada e que deve ser diferenciada do ruído gerado por equipamentos que produzem linha de base.<sup>118</sup> O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão.<sup>118</sup> Três metodologias são as mais aceitas para a

determinação do LOD e LOQ, sendo elas a do método visual, método da relação sinal-ruído e métodos baseados em parâmetros obtidos via curva analítica. Tanto o LOD quanto o LOQ são expressos em unidades de concentração.<sup>113</sup> O limite de detecção do método, MDL (do inglês, “*Method Detection Limit*”) é a mínima concentração de uma determinada substância que pode ser medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O MDL é determinado através da análise completa de uma dada matriz contendo o analito, e é geralmente maior que o LOD e o LOQ. O MDL descreve a precisão da quantificação, enquanto que o LOD descreve o quão confiável é a detecção instrumental.<sup>118</sup> A metodologia utilizada para o cálculo do LOD e LOQ, está descrita no item 3.5.4.

## **2.10 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS PARA AVALIAR OS COMPOSTOS DOS VINHOS**

A representação gráfica dos dados obtidos por GC×GC/TOFMS é diferente daquela gerada para dados na GC/MS, sendo a quantidade de dados produzida pela técnica bidimensional muito maior em relação à monodimensional. Nestes casos, o uso de ferramentas estatísticas para verificar os compostos que diferenciam um grupo de amostras das demais, assim como para selecionar os compostos que mais discriminam as amostras se faz necessário.

Para a aplicação dessas ferramentas estatísticas os dados devem ser organizados na forma de uma matriz, onde as linhas representam as amostras e as colunas as variáveis. No caso de uma análise cromatográfica, os dados brutos podem apresentar variabilidade oriunda de várias fontes, havendo a necessidade de remoção dessas variações.<sup>119</sup> Sendo assim, antes da aplicação da ferramenta estatística é necessário um pré-processamento dos dados, que serve para ajustar as grandezas em valores equivalentes. Três tipos de pré-processamento podem ser aplicados às variáveis: (i) centralização nas médias, que consiste da subtração dos elementos de cada linha pela média de sua respectiva coluna, (ii) escalonamento, em que cada elemento de uma linha é dividido pelo desvio padrão de sua respectiva variável, fazendo com que cada variável fique com o mesmo peso e (iii) auto escalonamento, que consiste em centralizar os dados na média e efetuar o escalonamento.<sup>120</sup>

Dentre as ferramentas utilizadas pode-se citar a análise de variância (ANOVA) usada para avaliar se existe diferença significativa entre as classes de amostras. No entanto, na análise da composição volátil dos vinhos pode existir uma grande variabilidade em relação aos voláteis de cada classe de amostras. Com o uso da ANOVA, as diferenças existentes dentro de uma

mesma classe e aquelas entre as diferentes classes são consideradas de uma mesma maneira, tornando essa abordagem problemática quando o objetivo é diferenciar grupos de amostras.<sup>121</sup>

A razão de Fisher também pode ser empregada para selecionar as variáveis mais discriminantes que diferenciam grupos de amostras.<sup>122,123</sup> A razão de Fisher é definida como a variação de um parâmetro relacionado a um determinado composto entre as diversas amostras analisadas dividida pela soma da variação deste mesmo parâmetro relacionado a este composto, dentro de uma mesma classe de compostos. Com a utilização deste critério é possível maximizar a variância entre as classes e ao mesmo tempo minimizar a variância entre os compostos das amostras pertencentes a mesma classe, o que não ocorre com o uso da ANOVA.<sup>124</sup>

A PCA é uma ferramenta estatística que visa evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. O conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz, onde as linhas podem ser as amostras e as colunas são as variáveis.<sup>120</sup> Dessa forma, a PCA resulta da construção de um conjunto de novos vetores, ortogonais entre si, chamados de componentes principais (PC). Esses novos componentes são combinações lineares das variáveis originais, construídos em ordem decrescente de variância, resultantes do agrupamento das variáveis altamente correlacionadas. Sendo assim, a PCA reduz a dimensionalidade do conjunto de dados original de forma que as informações mais relevantes ficam concentradas nas primeiras componentes.<sup>119</sup> Em uma análise de componentes principais o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de escores (do inglês “*scores*”) que fornecem a composição das PC em relação às amostras e pesos (do inglês “*loadings*”) que fornecem essa mesma composição em relação às variáveis.<sup>120</sup>

Mapas de calor são representações visuais de dados quantitativos em dois eixos; o eixo x geralmente reflete amostras individuais e o eixo y consiste em grupos de parâmetros medidos. O campo entre os eixos é composto por uma matriz de caixas adjacentes codificadas por cores para refletir a quantificação. Como tal, mapas de calor são uma ferramenta de visualização flexível para agrupar dados e explorar padrões. A estrutura básica de dados subjacente a um mapa de calor é composta por uma variável independente e um conjunto de variáveis dependentes. Os parâmetros dependentes são geralmente variáveis contínuas codificadas por cor para refletir seu valor quantitativo.<sup>125</sup>

A ANOVA - PCA combina as vantagens estatísticas da ANOVA com as vantagens da PCA para estudar a covariação entre variáveis. A abordagem pode ser considerada uma implementação multivariada da ANOVA, mas difere da MANOVA na medida em que a divisão pelo erro dentro do grupo é evitada. Em vez disso, uma matriz de dados é decomposta em

matrizes aditivas que caracterizam fatores individuais do planejamento experimental e do erro residual. Todas essas matrizes têm a mesma dimensionalidade e seguem o modelo linear geral. Esse método não possui vínculo com o procedimento amplamente utilizado para seleção de variáveis, ANOVA, que detecta variáveis que não variam significativamente em função dos fatores em estudo, a fim de eliminá-las antes de prosseguir com a análise multivariada do conjunto de dados reduzido resultante, usando a PCA. De maneira semelhante à ANOVA, o método ANOVA - PCA procura as variações nas variáveis associadas a cada fator de um planejamento experimental e depois usa uma análise de componentes principais para avaliar a significância de cada fator, comparando as variações correspondentes ao erro residual.<sup>126</sup>

Os classificadores de uma classe, (do inglês “*one-class classifiers – OCC*”) constituem um conjunto especial de métodos dentro do grupo de ferramentas de reconhecimento de padrões. Um recurso típico do OCC é que esses métodos tentam distinguir objetos de uma classe específica, também chamada de classe de destino, de todos os outros objetos e classes. O modelo OCC é estabelecido usando um conjunto de treinamento que contém apenas objetos de destino. A modelagem suave e independente por analogia de classe (do inglês “*Soft Independent Modeling by Class Analogy – SIMCA*”) é um OCC que foi inicialmente proposto em sua versão mais simples, sofrendo posteriormente, algumas modificações e tornando-se mais robusto. Atualmente, o SIMCA é projetado como uma abordagem que consiste em um desenvolvimento de modelo de análise de componentes principais (robusto), seguido pelo cálculo das distâncias ortogonais e de escores com a subsequente determinação de seus níveis de corte, sendo denominado DD-SIMCA. Uma das características únicas do SIMCA é a capacidade de calcular teoricamente os erros de classificação incorreta.<sup>127</sup>

### ***3.MATERIAL E MÉTODOS***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 UVAS E VINHOS

As uvas utilizadas foram obtidas de área experimental instalada na Fazenda Ouro Verde, pertencente a Miolo Wine Group®, localizada no município de Casa Nova, BA (Latitude: 9°16'S; Longitude: 40°52'O; Altitude: 413,5 m). As videiras da variedade Syrah, clone 100, foram enxertadas sob o porta-enxerto IAC 766, sendo conduzidas em sistema espaldeira com espaçamento de 3,0 m × 1,0 m entre plantas, continham mais de cinco anos de plantio e eram irrigadas por gotejamento. O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados com três repetições por tratamento (estádio de maturação), sendo 48 plantas por repetição, totalizando 432 plantas no experimento. O Anexo (**Figura A1**) mostra um croqui do delineamento experimental feito em campo, onde estão apresentadas as posições relativas das repetições experimentais dos tratamentos, havendo três parcelas para cada tratamento (T1R1, T1R2, T1R3, T2R1, T2R2, T2R3, T3R1, T3R2, T3R3). As uvas provenientes de cada repetição, foram vinificadas separadamente, originando as triplicatas de vinificação.

Para as análises físico-químicas, espectrofotométricas e de compostos fenólicos, as repetições de vinificação (R1, R2 e R3) foram analisadas separadamente em triplicata. Para as análises olfatométricas e de investigação/quantificação da composição volátil (GC/MS e GC×GC/TOFMS), foram empregadas as amostras compostas, ou seja, realizou-se a junção das repetições R1, R2 e R3 em única garrafa, antes da realização das análises, realizadas em quadruplicata e triplicata, respectivamente para GC-O-OSME e análises de perfil volátil (**Figura A2** do Anexo mostra um esquema representativo de toda parte experimental).

A escolha dos dias após a poda (DAP) para a colheita das uvas baseou-se em um estudo realizado na Embrapa Semiárido que incluiu diversos períodos de safra e indicou 119 DAP como recomendação para o ciclo da uva Syrah.<sup>128</sup> As uvas foram colhidas durante três semanas seguidas nos meses de junho e julho de 2013, em intervalos de sete dias, que corresponderam a: 113 dias após a poda (DAP) com teor de sólidos solúveis totais de 19 °Brix (tratamento T1), 120 DAP, com 21 °Brix (tratamento 2, T2) e 127 DAP com 23 °Brix (tratamento 3, T3), sendo estes, os valores médios das três repetições de cada tratamento na área experimental. Posteriormente à colheita, as uvas foram levadas para o laboratório de Enologia da Embrapa Semiárido para a elaboração dos vinhos, em escala experimental.

Após a recepção das uvas e armazenamento em câmara fria a  $10 \pm 2$  °C por 12 h, elas foram inicialmente desengaçadas (remoção do engaço) e levemente esmagadas, para a obtenção

do mosto. A vinificação foi realizada baseando-se no método tradicional para elaboração de vinhos tintos descritos por Peynaud.<sup>10</sup> Os mostos foram colocados em garrações de vidro de 20 litros de capacidade, adaptados com válvula de Muller, onde adicionou-se 0,35 g L<sup>-1</sup> de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae* – Maurivim PDM®, Amazon Group, Monte Belo do Sul, RS, Brasil), 0,20 g L<sup>-1</sup> de ativante de fermentação (Gesferm plus®, Amazon Group, Monte Belo do Sul, RS, Brasil) e 0,10 g L<sup>-1</sup> do conservante metabisulfito de potássio (Synth, São Paulo, SP, Brasil). A fermentação alcoólica foi conduzida em sala climatizada a 25 ± 1 °C. Diferentes períodos de maceração foram testados (10, 20 e 30 dias). Os primeiros 10 dias de maceração coincidiram com a fermentação alcóolica, seguida pela fermentação malolática a 17 ± 1 °C (de 20 a 30 dias de maceração) até que todo ácido málico fosse convertido em láctico.

Oito combinações de tratamentos experimentais foram obtidas, sendo elas o arranjo dos diferentes estádios de maturação das uvas na época da colheita e dos períodos de maceração (M: 10, 20, 30 dias): T1M1, T1M2, T2M1, T2M2, T2M3, T3M1, T3M2 e T3M3. Os vinhos dos experimentos T1M3 (colheita aos 113 DAP e 30 dias de maceração) resultaram em um nível inaceitável de adstringência do vinho, provavelmente devido à alta concentração de taninos das sementes de menor polimerização associada ao longo tempo de maceração, sendo assim, foram removidos do conjunto de dados. A transformação do ácido málico em láctico foi visualizada por cromatografia em papel. Os vinhos foram estabilizados em câmara fria (0 °C) durante um mês. Antes do engarrafamento, o teor de dióxido de enxofre livre foi corrigido para 30 mg L<sup>-1</sup>, sendo os vinhos colocados em garrafas de 750 mL, que foram armazenadas em adega climatizada (17 ± 2 °C), durante 30 dias, para que então fossem realizadas as análises.

### **3.2 ANÁLISES CLÁSSICAS E ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

O potencial hidrogeniônico (pH) foi medido diretamente no vinho utilizando- pHmetro previamente calibrado da marca Tecnal, modelo Tec-3MP (Piracicaba, SP, Brasil). A densidade relativa foi medida em balança hidrostática Densi-Mat (Gibertini, modelo Super Alcomat, Milão, Lombardia, Itália), obtendo-se o valor do parâmetro a partir da leitura de 80 mL de cada amostra, a temperatura de 20 °C. Na mesma balança hidrostática foram determinados o teor alcóolico e o conteúdo de extrato seco. O teor de etanol (% v/v) dos vinhos foi determinado a 20 °C, após a destilação do vinho por destilação simples em destilador Super DEE (Gibertini, Milão, Lombardia, Itália). A leitura do teor de extrato seco (g L<sup>-1</sup>) foi realizada pela diferença entre a leitura da amostra de vinho pura e a leitura do destilado obtido por destilação simples,

utilizando o módulo de leitura AlcoMat-2 da balança hidrostática. Para determinar a acidez volátil - AV (expressa em g L<sup>-1</sup> de ácido acético), utilizou-se uma alíquota de 20 mL dos vinhos, previamente destilada no Super DEE por arraste a vapor e titulação com NaOH 0,1 N, e fenolftaleína como indicador. A acidez titulável (AT) (expressa em g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico) foi determinada pela adição de 5 mL de vinho a 50 mL de água deionizada e titulação com NaOH 0,1 N até um ponto de viragem, determinado em pHmetro (pH 8,2).<sup>129</sup> Os teores de dióxido de enxofre livre e total (mg L<sup>-1</sup>) foram determinados por iodometria, usando amido como o indicador do ponto final. Para estas análises, uma alíquota de 25 mL de vinho foi acidificada com HCl e titulada com uma solução padronizada de 0,02 N de I<sub>2</sub>. Todas as análises descritas acima seguiram a metodologia descrita pela OIV.<sup>129</sup>

O conteúdo de compostos fenólicos totais (expressos em mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico) foi determinado utilizando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10S UV-vis, Waltham, Massachusetts, EUA) e reagente de *Folin - Ciocalteu*.<sup>130</sup> O índice de polifenóis totais (IPT) foi determinado no comprimento de onda de 280 nm pelo método desenvolvido por Harbertson e Spayd,<sup>131</sup> onde 1 mL da amostra é diluído em água destilada em balão volumétrico de 100 mL, e então realiza-se a leitura da absorbância em cubeta de quartzo. O conteúdo de antocianinas monoméricas totais (expressas em mg L<sup>-1</sup> de cianidina-3-O-glicosídeo) foi quantificado seguindo o método que se fundamenta na diferença de pH.<sup>132</sup> Para isso, as amostras foram diluídas separadamente na proporção de 1 para 10 com soluções tampão de pH 3,6 realizando-se posteriormente a leitura nos comprimentos de onda de 520 nm e 700 nm em espectrofotômetro.<sup>132</sup> A intensidade de cor foi obtida pela soma das leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 420 nm (detecta tons amarelos), 520 nm (detecta tons vermelhos) e 620 nm (detecta tons roxos/lilás), e a tonalidade pela razão entre a absorbância nos comprimentos de onda de 420 nm e 520 nm.<sup>129</sup>

### **3.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (DAD-FD)**

Para quantificação dos compostos fenólicos, foi utilizado o método otimizado e validado por Natividade *et al.*<sup>68</sup> Para tal, foi empregado um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2695, equipado com bomba quaternária e injetor automático, acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD, 220, 320, 360 e 520 nm) e de fluorescência (FD) ( $\lambda$  de 320 nm para emissão), sendo utilizada uma coluna Gemini-NX C18 (150 mm x 4,60 mm x 3  $\mu$ m). As fases móveis empregadas na análise foram uma solução aquosa de ácido ortofosfórico 0,85% (Vetec

Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (fase A) e acetonitrila (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (fase B), com a seguinte programação de gradiente: 0 min = 100% da fase A; 10 min = 93% A e 7% B; 20 min = 90% A e 10% B; 30 min = 88% A e 12% B; 40 min = 77% A e 33% B; 45 min = 65% A e 35% B; 55 min = 100% B, mantendo-se a temperatura do forno a 40 °C e fluxo de fase móvel de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. O volume de amostra de vinho injetado no HPLC foi de 10 µL, sem diluição, sendo as amostras filtradas em membrana de nylon de diâmetro de 13 mm e tamanho do poro de 0,45 µm.

Foram quantificados os 23 compostos fenólicos, sendo eles: ácidos cafeico e gálico (Chem Service, West Chester, PA, EUA), ácidos clorogênico, *p*-cumárico e ferrúlico (Sigma Aldrich, Steinheim, Vestfália, Alemanha), malvidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo e pelargonidina-3-O-glicosídeo, quercetina, rutina, miricetina, caempferol-3-O-glicosídeo e isorhamnetina-3-O-glicosídeo, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato, (-)-epigalocatequina galato, procianidinas A2, B1 e B2 e *trans*-resveratrol (Extrasynthese, Genay, Lyon, França). Uma solução estoque de cada um dos padrões foi preparada em metanol (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em concentrações que variaram de 500 a 2500 µg L<sup>-1</sup>. Uma solução de trabalho com os 23 compostos fenólicos estudados foi preparada a partir da diluição da solução estoque, em ácido fosfórico 0,85% (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).<sup>68</sup>

A eficiência do método para a análise dos 23 compostos fenólicos foi estabelecida por meio de ensaios de linearidade, efeito de matriz, recuperação, precisão intermediária, reprodutibilidade, limites de detecção e limites de quantificação. As curvas de calibração empregadas foram: 0,20 - 40 mg L<sup>-1</sup> para o *trans*-resveratrol e quercetina; 0,31 - 40 mg L<sup>-1</sup> para as procianidinas A2, B1 e B2, catequina, epicatequina, ácido gálico, rutina, caempferol-3-O-glicosídeo, isorhamnetina-3-O-glicosídeo, miricetina, cianidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo, pelargonidina-3-O-glicosídeo; 0,62 - 40 mg L<sup>-1</sup> ácido *p*-cumárico; 0,62 - 80 mg L<sup>-1</sup> para o ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cinâmico, (-)-epicatequina galato, (-)-epigalocatequina galato; 0,62 - 100 mg L<sup>-1</sup> malvidina-3-O-glicosídeo. Os comprimentos de onda utilizados foram: 220 nm para o ácido gálico, e os flavanóis (-)-epicatequina galato, (-)-epigalocatequina galato e procianidina B1; 320 nm para o *trans*-resveratrol, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico e ácido clorogênico; 360 nm para todos os flavonóis; e 520 nm para todas as antocianinas. No FD, a emissão de fótons foi realizada a 320 nm para os flavanóis (+)-catequina, procianidina B2, procianidina A2 e (-)-epicatequina.

## 3.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DOS VINHOS

### 3.4.1 Reagentes e materiais

Os padrões butanoato de etila; isopentanoato de etila; acetato de 2-metil propila; hexanoato de etila, acetato de hexila, octanoato de etila, decanoato de etila, succinato de dietila, acetato de 2-fenil etanol, dodecanoato de etila, ácido 2-metil propanóico, ácido 3-metil butanóico, ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido nonanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico, 1-propanol, 3-metil, 1-butanol, 2-hexen-1-ol, 1-nonanol, álcool benzílico, 2-fenil etanol, 1-dodecanol, 1-hexanol,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -damascenona, geraniol, eucaliptol, citrionelol, (*E*)-nerolidol, benzaldeído, 2-heptanona, 2-(5H)-furanona, 3-mercaptohexanol, 2-furan metanol foram obtidos da Sigma Aldrich (Steinheim, Vestfália, Alemanha, pureza superior a 98%) e empregados para a identificação positiva dos compostos. A escolha desses compostos foi feita com base na importância que os mesmos apresentam para as características de sabor e aroma dos vinhos tintos, de acordo com estudos prévios.<sup>133-135</sup> Uma solução de alcanos lineares (de C7 a C24, heptano a tetracosano) - Sigma Aldrich (Steinheim, Vestfália, Alemanha), foi dissolvida em hexano PA (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil) e empregada para auxiliar na identificação tentativa dos compostos voláteis dos vinhos em estudo, através do cálculo dos índices de retenção com programação linear de temperatura.

Uma solução de vinho artificial, utilizada para simular a matriz dos vinhos, foi preparada a partir da mistura de etanol bidestilado (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil) em água deionizada Milli Q (sistema de purificação Millipore, Bedford, MA, EUA) até o teor alcóolico atingir 14% v/v, sendo então acrescentado 6 g L<sup>-1</sup> de (+)-ácido tartárico PA (Synth, São Paulo, SP, Brasil). O pH da solução de vinho sintético foi ajustado a 3,5 com a adição de hidróxido de sódio puro (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil). As fibras de SPME (50/30 divinilbenzeno carboxen-polidimetilsiloxano DVB/Car/PDMS) StableFlex foram obtidas da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e condicionadas antes do primeiro uso, de acordo com as recomendações do fabricante. O cloreto de sódio de grau analítico, foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e seco previamente ao uso por 2 h a 150 °C, sendo posteriormente armazenado em dessecador. Os frascos de *headspace* de 20 mL, com tampas magnéticas de rosca e septos de teflon foram obtidos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Para a silanização do tubo de vidro empregado no sistema de olfatométrica foi utilizada uma solução de 98% trimetilclorosilano (Acros Organics, Geel, Turnhout, Bélgica).

### 3.4.2 Preparo das amostras e extração dos voláteis

As garrafas de vinho foram enviadas da Embrapa Semiárido (Petrolina, Pernambuco, Brasil) via transporte aéreo para o Instituto de Química da UFRGS sendo mantidas em local livre de umidade e incidência solar e à temperatura ambiente por 24 h até serem abertas. Após a abertura das garrafas, uma alíquota de 200 mL de cada amostra de vinho foi coletada e transferida para um frasco âmbar, previamente limpo, sendo armazenada posteriormente, em ultra freezer a temperatura de - 86 °C. Para a extração dos voláteis dos vinhos utilizou-se a técnica de HS-SPME empregando-se a fibra DVB/Car/PDMS com 2 cm de comprimento.<sup>136</sup> Procedeu-se a extração a uma temperatura de 55 °C ( $\pm 0,9$ ), em bloco termostático, fabricado no Instituto de Física da UFRGS, por 45 minutos, sem o emprego de agitação e em frascos de vidro adequados para análise de *headspace*. No frasco de 20 mL, foi colocado 1 mL de vinho, o padrão interno e 0,3 g de NaCl. Após a extração os voláteis foram dessorvidos diretamente no pórtico de injeção do cromatógrafo a gás, sendo este equipado com insersor de vidro (*liner*) adequado para SPME, por 5 min, a uma temperatura de 250 °C, no modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*).

### 3.4.3 Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID) e com detector quadrupolar de espectrometria de massas (GC/MS)

Os compostos voláteis foram analisados utilizando-se um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies 6890N (Palo Alto, CA, EUA) equipado com detector de ionização em chama (FID). As colunas capilares empregadas foram uma DB-Wax (100% polietilenoglicol, J&W Scientific Inc. Folsom, CA, EUA) de dimensões 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m, e a coluna DB-5 (5% fenil, 95% polidimetilsiloxano) J&W Scientific Inc. Folsom, CA, EUA) de dimensões 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m. A programação de temperatura do forno teve início em 40 °C, onde permaneceu por 5 min. Após, houve um acréscimo de 3 °C min<sup>-1</sup> até que fossem alcançados 200 °C, sendo a temperatura final da análise de 250 °C, a qual foi atingida a uma razão de 20 °C min<sup>-1</sup> e mantida por 3 minutos. O tempo total de uma análise foi de aproximadamente 65 minutos. O modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*) foi mantido à temperatura de 250 °C e a temperatura do detector foi de 280 °C. O gás de arraste foi o hélio (pureza 99,999%, White Martins, Porto Alegre, RS, Brasil) a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>.

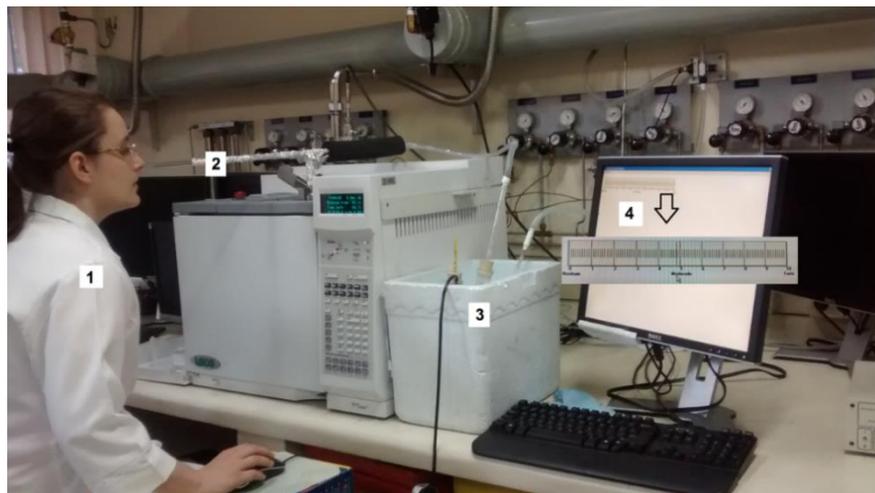
Para a identificação dos compostos voláteis utilizou-se também um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu (Kyoto, Keihanshin, Japão), equipado com um detector quadrupolar de espectrometria de massas QP 2010 (GC/MS), operando no modo varredura (*scan*) para a

quantificação dos voláteis, onde a ionização eletrônica ocorreu a uma voltagem de 70 eV. O intervalo de massas escaneado foi de 45 até 450 uma. A linha de transferência foi mantida a 250 °C e a fonte de íons a 240 °C. Os demais parâmetros operacionais foram os mesmos descritos para o GC-FID.

#### 3.4.4 Cromatografia gasosa olfatométrica no modo OSME (GC-O-OSME)

Para a determinação da importância odorífera dos voláteis dos vinhos utilizou-se a GC-olfatométrica (GC-O), empregando-se a técnica de OSME. O GC empregado para as análises olfatométricas foi o mesmo em GC-FID, sendo que as condições experimentais foram semelhantes às descritas no item 3.4.3, utilizando a mesma coluna DB-Wax. As análises olfatométricas foram realizadas alternadamente às análises por GC-FID, sendo os dados obtidos, analisados posteriormente, em conjunto, a fim de que as áreas e tempos de retenção dos picos encontrados por ambas as técnicas fossem correlacionadas. Anteriormente à realização das análises por GC-O-OSME, foram feitas análises empregando-se GC/MS, com a finalidade de identificar tentativamente/positivamente os compostos presentes na amostra. Posteriormente, realizou-se uma correlação desses compostos com aqueles obtidos por GC-FID, por meio do cálculo dos LTPRI, bem como por comparação visual dos cromatogramas.

Durante as análises por GC-O-OSME, a coluna cromatográfica foi desconectada do FID e conectada a outro pÓrtico de detecção do cromatógrafo, o qual não continha qualquer outro detector, sendo mantido a temperatura de 250 °C. Na parte superior da base do pÓrtico de detecção, foi conectado um suporte na forma de um canal de aço inoxidável, sobre o qual se encaixava um tubo de vidro que conduzia os eluentes cromatográficos para o nariz do julgador, conforme descrito por Sampaio *et al.*<sup>137</sup> Esse tubo de vidro foi previamente silanizado com trimetilclorosilano 98% (Acros Organics, Geel, Turnhout, Bélgica) para evitar a interação da superfície do vidro com os voláteis da amostra. Os eluentes da coluna foram carregados até o nariz do julgador por meio de um fluxo de ar sintético (pureza 99,999%, Air Products, Canoas, RS, Brasil) de 4 L min<sup>-1</sup> (fluxômetro FX010, Unitec, Jabaquara, SP, Brasil), previamente umidificado através do borbulhamento do mesmo em água, à temperatura controlada de 29 °C, dentro de um balão de vidro, em sistema fechado e filtrado com carvão ativo (Synth, São Paulo, SP, Brasil). A **Figura 4**, exibe em detalhes o sistema de olfatometria empregado neste trabalho, com destaque para as partes que compõe o sistema.



**Figura 4:** Julgador avaliando o eluente cromatográfico utilizando a escala de 10 cm alocada no monitor do computador e o software SCDTI.<sup>138</sup> Detalhes da Figura: 1: 1 - julgador treinado; 2 - tubo de vidro silanizado para condução dos eluentes ao nariz do julgador; 3 - sistema de umidificação do ar utilizado nas análises de GC-O-OSME; 4 - escala de 10 cm alocada no monitor do computador.

Para a avaliação dos eluentes que deixavam a coluna e alcançavam o nariz do julgador, utilizou-se uma escala de 10 cm, ancorada nos extremos, esquerdo e direito, em termos de intensidade como, “nenhum” e “forte”, respectivamente. A escala foi alocada no monitor de um computador e um software de coleta de dados tempo-intensidade, intitulado SCDTI (Sistema de Coleta de Dados Tempo - Intensidade), foi empregado. Quatro julgadores utilizaram esta escala para registrar tanto a intensidade, quanto o tempo de duração de cada estímulo olfativo, descrevendo também ao analista (outra pessoa que acompanhava as análises fazendo anotações relativas à análise em curso) o descritor do odor percebido, tais como “floral”, “doce”, “pungente”, entre outros. Para cada amostra analisada foram feitas quatro repetições da análise por GC-O-OSME. Treinamento prévio dos julgadores foi efetuado em quatro sessões, nas quais os indivíduos eram orientados a avaliar uma das amostras de vinho Syrah utilizando os mesmos procedimentos descritos acima.

Após cada análise, realizou-se a integração dos dados obtidos por cada julgador através do software SCDTI. Para a obtenção do aromagrama, os parâmetros coletados no software SCDTI, tempo inicial, tempo de intensidade máxima e tempo final de cada aroma percebido, intensidade máxima e área, foram transferidos para o excel, sendo então, o aromagrama produzido, onde os picos com maior área e/ou intensidade, indicam compostos de maior importância odorífera. Um aromagrama consiste em um cromatograma, onde o eixo x, é o tempo de duração dos estímulos olfativos provenientes dos compostos que eluem da coluna cromatográfica e o eixo y indica a intensidade de cada um destes estímulos. Para cada amostra

quatro aromagramas foram gerados para cada julgador, considerando os picos detectados em no mínimo duas corridas. Um aromagrama consensual da equipe foi obtido considerando-se apenas os picos detectados por no mínimo dois julgadores. Finalmente, realizou-se a comparação dos aromagramas consensuais gerados por GC-O-OSME com os cromatogramas obtidos por GC-FID para cada amostra, juntamente com a identificação dos voláteis feita no GC/MS, sendo assim possível determinar a importância odorífera de cada composto volátil presente nos vinhos avaliados.

### **3.4.5 Cromatografia gasosa bidimensional com detector de espectrometria de massas por tempo de voo (GC×GC/TOFMS)**

As análises por GC×GC foram realizadas em sistema Agilent 6890N equipado com espectrômetro de massas por tempo de voo (TOFMS) Pegasus IV (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA), bem como com um amostrador automático CTC CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Laufen, Suíça). A coluna empregada na primeira dimensão (<sup>1</sup>D) foi a DB-Wax, descrita no item 3.4.3. Na segunda dimensão, empregou-se uma coluna DB-17ms [ (50% fenil) – metilpolisiloxano]; 1,70 m × 0,18 mm × 0,18 µm, J&W Scientific Inc. Folsom, CA, EUA).

O sistema de GC é equipado com forno secundário, que foi mantido a 10 °C acima do forno primário, durante todas as análises cromatográficas e com um modulador criogênico com quatro jatos, sendo os jatos frios mantidos por um fluxo de nitrogênio gasoso resfriado por nitrogênio líquido (Linde, Canoas, RS, Brasil). A programação de temperatura foi a mesma utilizada nas análises por GC-FID e GC/MS e o gás de arraste foi o hélio (pureza 99,999%, White Martins, Porto Alegre, RS, Brasil). O período de modulação foi de 7 s e as temperaturas empregadas foram 300° C na linha de transferência e 240 °C na fonte de íons. Um amostrador automático foi utilizado para a extração do *headspace* dos frascos que continham as amostras dos vinhos. Os parâmetros do MS incluíam ionização eletrônica a 70 eV, voltagem do detector de 1500 V, aquisição de 100 espectros s<sup>-1</sup> e faixa de massas de 45 a 450 uma. Para a aquisição dos dados utilizou-se o software da LECO ChromaTOF versão 4.22.

### **3.4.6 Identificação dos compostos**

Para a identificação positiva dos compostos foram preparadas soluções em hexano P.A (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil) dos padrões citados no item 3.4.1, as quais foram analisadas em GC/MS e GC×GC/TOFMS em condições idênticas às empregadas para as análises dos

voláteis dos vinhos. Os tempos de retenção destes padrões foram comparados com aqueles dos componentes desconhecidos do *headspace* do vinho Syrah em coluna polar (item 3.4.3). Os espectros de massa obtidos experimentalmente para os padrões também foram comparados com os dos voláteis do vinho, bem como com os espectros de massas das bibliotecas NIST versão 107 e Wiley versão 229.

Os demais compostos foram tentativamente identificados através da comparação entre os índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI) determinados via análise por GC/MS e GC×GC/TOFMS. Para isso, uma série de alcanos lineares (de C7 a C24, heptano a tetracosano) foi dissolvida em hexano P.A (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil) e analisada nos cromatógrafos, sendo os dados obtidos comparados com os reportados na literatura. Os índices foram calculados de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz<sup>139</sup> conforme **Equação 5**, a seguir.

$$\text{Equação 5: } LTPRI = 100n + 100 \left( \frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \right)$$

Onde:  $t_{R(x)}$  = tempo de retenção do composto desconhecido ( $x$ );  $t_{R(n)}$  = tempo de retenção do alcano linear que é menos retido pela fase estacionária do que o composto  $x$ ;

$t_{R(n+1)}$  = tempo de retenção do alcano linear que é mais retido do que o composto  $x$ .

A identificação tentativa foi realizada de forma semelhante ao procedimento empregado na identificação positiva relativamente à comparação dos espectros de massas. Os LTPRI obtidos experimentalmente na coluna DB-Wax e DB-5, foram comparados com os publicados na literatura científica para colunas polares e apolares (na GC/MS). Para considerarmos um composto identificado tentativamente, o valor mínimo de similaridade espectral foi de 80%, tanto para as análises realizadas no GC/MS, como no GC×GC/TOFMS. O valor máximo aceito para a diferença entre índices determinados experimentalmente e aqueles reportados foi de 20 unidades para que o composto fosse considerado tentativamente identificado na GC/MS e GC×GC/TOFMS.<sup>140</sup> Entretanto, no caso das análises por GC-O-OSME, admite-se que existam diferenças maiores, de até 40 unidades<sup>137,141</sup> entre os LTPRI do OSME e FID. Isso pode acontecer devido ao fato do detector ser o nariz humano, havendo um desvio entre o tempo que o julgador sente o odor e a marcação na escala. Foram considerados detectados os picos cromatográficos, cuja relação sinal/ruído foi maior do que 3 nas análises por GC/MS e 30 para GC×GC/TOFMS. A soma de todas as áreas dos picos detectados foi considerada 100% da

amostra, sendo que para cada pico foi atribuída uma porcentagem correspondente à sua área. Áreas relacionadas a solvente e sangria de coluna, não foram consideradas neste cálculo.

### **3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS VOLÁTEIS DO VINHO SYRAH**

Para a quantificação dos compostos voláteis importantes para o aroma dos vinhos Syrah, foi otimizado e validado um método cromatográfico empregando a cromatografia monodimensional e bidimensional. A extração dos compostos seguiu procedimento descrito no item 3.4.2. Os parâmetros validados foram linearidade e curva de calibração, limites de detecção e quantificação (instrumentais), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão e *bias*. Para tal, foram empregadas soluções padrão dos compostos que se desejou quantificar, conforme mostrados nas **Tabelas 3 e 7**.

#### **3.5.1 Linearidade e Curva de calibração**

As equações da reta, com pelo menos cinco níveis de concentração para cada composto padrão, foram construídas por meio de regressão linear dos mínimos quadrados. A área relativa de cada composto (área do composto/área do padrão interno) foi representada graficamente versus a concentração do respectivo composto, obtendo-se para cada composto uma equação da reta, um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e uma faixa linear de concentrações. A curva foi obtida por meio das injeções em triplicata das soluções padrão, nas faixas de concentração referidas nas **Tabelas 3 e 7**. Os padrões internos utilizados nas curvas foram o nonanoato de metila,  $\alpha$ -metil benzil álcool, 2-metil ácido valérico, isocineol, fenil acetato, nas respectivas concentrações: 250, 1000, 1000, 500 e 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As injeções foram realizadas em ordem crescente de concentração, sendo o padrão interno utilizado para compensar possíveis erros ocorridos.

#### **3.5.2 Precisão**

A repetibilidade do método foi avaliada através do coeficiente de variação das áreas dos picos cromatográficos. Foram realizadas três injeções sucessivas de solução padrão dos voláteis estudados nos vinhos, juntamente com os padrões internos nos pontos baixo e alto da curva (concentrações são mostradas nas **Tabelas 3 e 7**). A precisão intermediária também foi avaliada

através do coeficiente de variação das áreas dos picos gerados por meio de injeções realizadas em três dias diferentes, totalizando nove injeções (três a cada dia).

### 3.5.3 Exatidão e *Bias* (teste para erro sistemático)

O ensaio de recuperação foi realizado através da fortificação do vinho sintético 14% em dois níveis de concentração, ( $n = 3$  no mesmo dia). Nas **Tabelas 3 e 7** são mostrados os níveis para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, sendo estes os mesmos utilizados para realizar o ensaio de recuperação. Foi realizado o teste t sugerido pela norma E1655-00 da ASTM.<sup>117</sup> Para isso, considerou-se as concentrações adicionadas ao vinho artificial 14% como os valores de referência ( $y_i$ ) e as concentrações recuperadas através do teste de recuperação, como os valores previstos pelo modelo ( $\hat{y}_i$ ).

### 3.5.4 Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

A determinação dos limites de detecção e quantificação instrumentais foram realizadas de acordo com o que preconiza a Sanco.<sup>114</sup> Os cálculos foram baseados no desvio padrão das sete replicatas do ponto baixo injetadas,  $s$ , e no coeficiente angular,  $S$ , da curva, conforme as **Equações 6 e 7**.

Para o limite de detecção:  $LOD = 3,3(s/S)$

**Equação 6**

Para o limite de quantificação:  $LOQ = 10(s/S)$

**Equação 7**

## 3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A influência dos fatores grau de maturação e tempo de maceração na qualidade do vinho (fatores físico-químicos, compostos fenólicos e voláteis quantificados por HPLC e GC/MS, respectivamente), foi avaliada através da abordagem da ANOVA - PCA implementada no MatLab conforme descrito por Harrington *et al.*<sup>142</sup> Antes de submeter os dados à análise por ANOVA - PCA, foi verificada a presença de *outliers*, usando o conceito de amostras extremas na projeção de PCA, gerando um limiar robusto baseado em modelagem independente de dados, conduzida por classificador de analogia de classe (DD-SIMCA). Resumidamente, cada matriz de dados X (parâmetros físico-químicos, compostos voláteis e fenólicos), previamente auto escaladas, foi submetida à decomposição em componentes principais. A distância das

pontuações (DP) e a distância ortogonal (DO) foram combinadas em um novo parâmetro "c", chamado de distância total. A distância total é a soma escalada de DP<sub>i</sub> e DO<sub>i</sub>. O valor "c" apresenta a distribuição do tipo  $\chi^2$ , com graus de liberdade NDP + NDO e foi usado para gerar uma área de aceitação que distingue amostras regulares, extremas e *outliers*. Os dados foram previamente auto escalados.

Os dados obtidos por GC×GC/TOFMS foram adquiridos e processados pelo programa LECO ChromaTOF versão 4.22. A razão de Fisher foi calculada através do programa Excel, com a finalidade de selecionar os compostos voláteis mais discriminantes entre os diferentes tratamentos e tempos de maceração dos vinhos Syrah. Foram considerados os compostos que apresentaram maior razão de Fisher, até o ponto em que se observou uma queda nos valores da razão de Fisher (5%, considerando-se que o maior valor de razão de Fisher é 100% e os demais correspondem a x%). Posteriormente, foram quantificados os compostos indicados pela razão de Fisher como mais discriminantes, sendo realizada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) a fim de comparar as médias entre as amostras (software Statistica - versão 7.1, Statsoft, 2005). As médias obtidas foram submetidas à análise de componentes principais PCA (software Statistica - versão 7.1, Statsoft, 2005). Os mapas de calor foram realizados através do programa XLSTAT 2017 (Addinsoft, Nova York, EUA) para o programa Microsoft Excel, utilizando dados de intensidade e persistência do odor obtidos por meio das análises de GC-O-OSME.

## ***4.RESULTADOS E DISCUSSÃO***

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

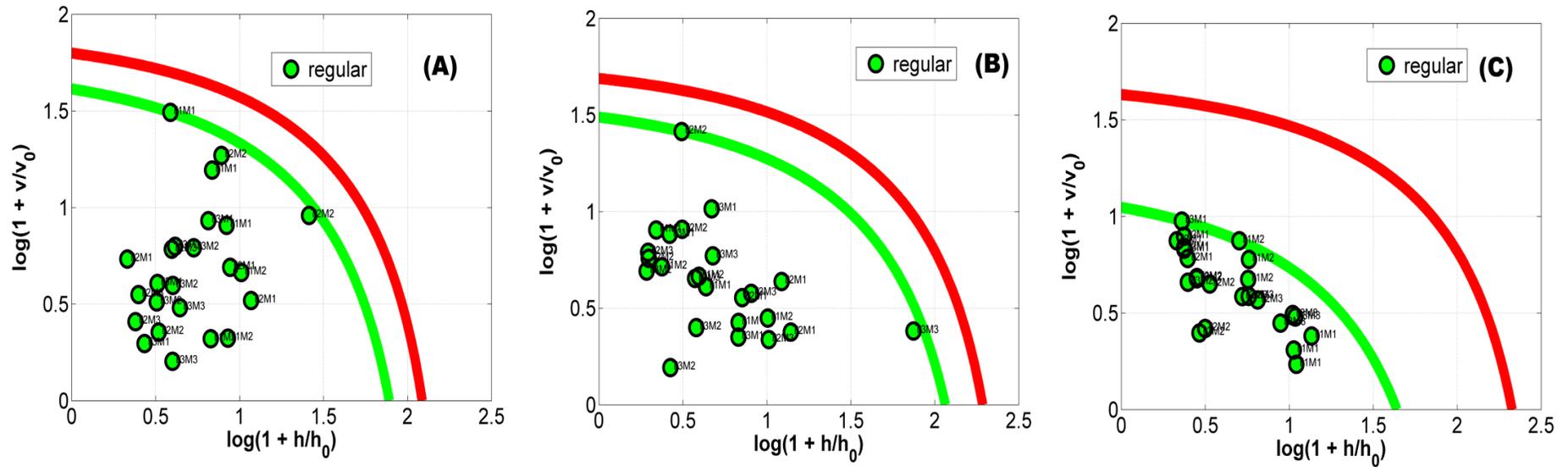
Os resultados e a discussão deste trabalho serão apresentados em duas partes. Na parte 1 será abordado o efeito do grau de maturação da uva e do tempo de maceração na composição físico-química, fenólica e volátil dos vinhos Syrah. Os resultados foram obtidos por meio das análises realizadas por HPLC-DAD-FD e GC/MS. Na segunda parte, foi realizada a análise do perfil volátil e odorífero dos vinhos por meio de técnicas de cromatografia a gás, empregadas em conjunto (GC-FID, GC/MS, GC-O-OSME e GC×GC/TOFMS).

### PARTE 1

#### 4.1 EFEITO DO GRAU DE MATURAÇÃO DA UVA E DO TEMPO DE MACERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, FENÓLICA E VOLÁTIL DOS VINHOS SYRAH

##### 4.1.1 Detecção de *Outliers*

A **Figura 5a, b e c** apresenta os resultados do DD-SIMCA, onde é possível observar que não foram detectados *outliers* no conjunto de dados, com 95% de confiança sendo que todas as amostras apresentaram um valor “*c*” designado como regular. A ANOVA - PCA foi aplicada para avaliar os parâmetros físico-químicos, compostos fenólicos e voláteis. Para as duas últimas classes de compostos, as somas das subclasses não foram consideradas para essa abordagem. Os pesos considerados importantes para PC1 e PC2 com 95% de confiança estatística são mostrados nos gráficos **da Figura 5**, além das linhas verticais e horizontais para PC1 e PC2, respectivamente. Esta abordagem permitiu identificar as variáveis (parâmetros físico-químicos, compostos fenólicos e voláteis) que apresentaram correlação com a PC1 e/ou PC2.



**Figura 5:** Área de aceitação para detecção de *outliers* baseada no DD-SIMCA dos três principais componentes relacionando as amostras de vinho derivadas de diferentes tempos de maturação e maceração (A) dos parâmetros físico-químicos, (B) dos compostos fenólicos, (C) dos compostos voláteis. As linhas sólidas em verde e vermelho são a fronteira (com 95% de confiança) de amostras regulares e extremas, respectivamente. A posição de uma amostra particular é definida por  $v$  (distância ortogonal) e  $h$  (distância das pontuações). Os termos  $h_0$  e  $v_0$  são fatores de escala.

#### 4.1.2 Influência da maturação e da maceração na composição físico-química dos vinhos Syrah

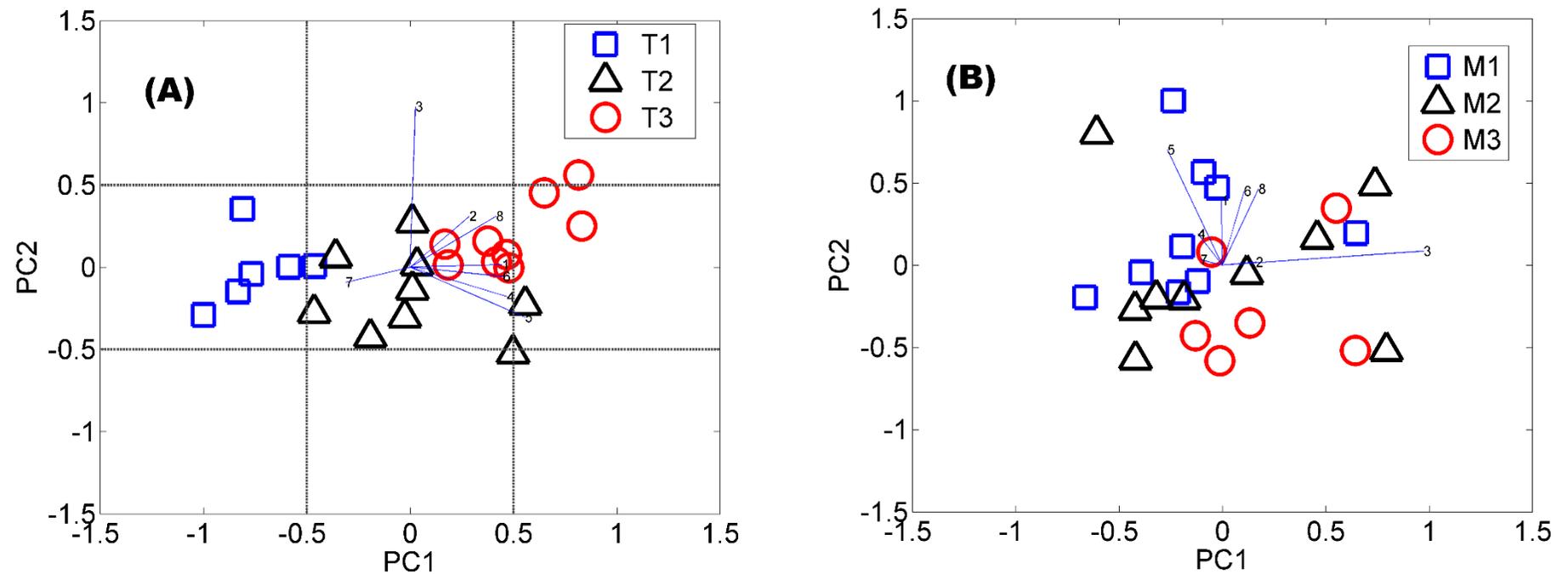
A **Figura 6A** mostra o gráfico biplot que corresponde ao subespaço definido pela PC1 (43%) versus PC2 (18%), obtido através da abordagem ANOVA - PCA para a maturação das uvas (T). A distinção entre diferentes tempos de maturação ocorre principalmente na PC1, o que significa que esta componente, é a principal fonte de variação dos dados e que o efeito da maturação é significativo nos parâmetros físico-químicos em relação ao erro experimental. Quanto maior é o período de maturação da uva (de T1 e T2 para T3), maiores são os valores de intensidade de cor (#5), antocianinas monoméricas totais (#1), compostos fenólicos totais (#2), índice de polifenóis totais (#4), teor alcoólico (#6) e extrato seco (#8). Os números entre parênteses referem-se àqueles mostrados na **Tabela 1** onde estão listados os valores de cada parâmetro físico-químico, os quais representam os valores médios obtidos nos experimentos realizados em triplicata.

A intensidade da cor (#5) mostrou um peso pronunciado e significativo na PC1 e foi o principal parâmetro para o agrupamento das amostras T1, T2 e T3 na **Figura 6A**. Este resultado era esperado, já que a presença de compostos fenólicos coloridos aumenta quando as uvas estão em grau de maturação mais elevado. A mesma tendência é seguida por AMT, CFT e IPT, pois estes parâmetros estão todos relacionados ao aumento de compostos fenólicos.<sup>8</sup> O conteúdo de compostos fenólicos totais (#2) na **Tabela 1** em vinhos Syrah variou de 1408 em T1 a 2108 mg L<sup>-1</sup> em T3 e está em acordo com os valores anteriormente relatados na literatura para vinhos Syrah, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Malbec e Merlot (948 - 3526 mg L<sup>-1</sup>).<sup>66</sup> O IPT (#4) dos vinhos elaborados a partir das uvas do T1 foi de 42, enquanto os vinhos elaborados a partir de uvas com maior grau de maturação (> 120 DAP) alcançaram o valor de IPT de 65. Estes resultados reportados estão em acordo com os relatados por Gil *et al.*<sup>143</sup> para vinhos tintos Tempranillo e Cabernet Sauvignon da Espanha (40 - 68). De acordo com Hernández *et al.*<sup>144</sup>, os vinhos com IPT superior a 60 podem ser destinados ao envelhecimento (vinhos de guarda), já aqueles cujo IPT fica entre 45 e 55, são melhores como vinhos jovens; enquanto isso, vinhos com IPT < 40 são considerados de qualidade inferior. Os resultados indicam que os vinhos elaborados a partir de uvas mais maduras (T3) podem ser direcionados para a produção de vinhos de guarda, independentemente do período da maceração empregado.

O teor alcoólico (#6) dos vinhos foi de 11,5% para 113 DAP (T1) e 14,6% para 127 DAP (T3) e estes valores estão em acordo com a legislação brasileira, que preconiza valores entre 8,6 e 14%.<sup>145</sup> Estes valores de teor alcoólico são também semelhantes aos relatados para

as variedades de vinhos espanhóis Cabernet Sauvignon e Tempranillo, elaborados com uvas de diferentes níveis de maturação e macerados por distintos períodos (11,9 - 14,6%).<sup>143</sup> Finalmente, o extrato seco dos vinhos (#8) também mostrou relação direta com a maturação das uvas, uma vez que as uvas colhidas aos 127 DAP (T3) proporcionaram maior quantidade de extrato seco. A combinação de extrato seco, acidez e álcool proporciona corpo e ótima estrutura ao vinho.<sup>8</sup> É importante ressaltar que algumas variáveis, tais como compostos fenólicos e parâmetros físico-químicos, apresentaram altos desvios-padrão (> 30%), pois refletem a heterogeneidade da maturação da uva como consequência da falta de uniformidade no manejo dos vinhedos. São exemplos de manejo a irrigação, a nutrição, a poda e outras práticas empregadas, bem como as diferenças que ocorrem em relação ao desenvolvimento vegetativo e produtivo das videiras. Por outro lado, observa-se um efeito antagônico para a acidez total titulável (#7), que reduziu de um valor médio de 8,83 para 6,69 g L<sup>-1</sup>, quando a vinificação foi realizada com uvas colhidas em 113 DAP (T1) e 127 DAP (T3), respectivamente. Essa diminuição na acidez era esperada, pois é um indicativo do amadurecimento da uva.<sup>8</sup> O pH dos vinhos aumentou com o avanço da maturação das uvas (3,37 a 3,45) enquanto a ATT diminuiu. O pH recomendado para vinhos tintos deve ser mantido na faixa de 3,30 a 3,60.<sup>11</sup>

Com relação ao fator tempo de maceração, o biplot PC1 × PC2 mostrado na **Figura 6B** não revela a formação de grupos de acordo com os tempos de maceração (M1, M2 e M3). Isso indica que o erro experimental é a principal fonte de variância dos dados submetidos à ANOVA - PCA e que o período de maceração não influenciou os parâmetros físico-químicos do vinho. Além disso, a interação do grau de maturação da uva e o tempo de duração da maceração não teve efeito nos parâmetros físico-químicos, como pode ser visto na **Figura A3 (A) do Anexo**.



**Figura 6:** Biplot para parâmetros físico-químicos dos vinhos Syrah obtidos por meio da ANOVA - PCA para (A) diferentes graus de maturação da uva (fator T) e (B) para distintos tempos de maceração (fator M). T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias. Os pesos que excedem as linhas pontilhadas horizontais e verticais são estatisticamente significativos. A ausência das linhas pontilhadas horizontais e verticais revela que os pesos não foram significativos. Os números de 1 a 8 representam os parâmetros físico-químicos mostrados na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Valores médios dos parâmetros físico-químicos relacionados com os vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em diferentes fases de maturação e maceradas em períodos distintos durante o processo de vinificação. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias

Parâmetro	Nível de Maturação	Tempo de Maceração			Médias dos diferentes níveis de maturação (T1, T2 e T3) *
	DAP: dias após a poda	10 dias - M1	20 dias - M2	30 dias - M3	
#1) Antocianinas Monoméricas Totais (AMT, mg L <sup>-1</sup> )	T1: 113 DAP	145 ± 10	105 ± 27		125
	T2: 120 DAP	216 ± 14	198 ± 15	170 ± 19	195
	T3: 127 DAP	233 ± 29	235 ± 10	188 ± 24	219
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	198	179	179	
#2) Fenólicos Totais (CFT, mg L <sup>-1</sup> )	T1	1375 ± 216	1441 ± 140		1408
	T2	1669 ± 324	1581 ± 253	1703 ± 226	1651
	T3	2209 ± 167	2095 ± 119	2018 ± 35	2108
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1751	1706	1861	
#3) pH	T1	3,41 ± 0,09	3,33 ± 0,04		3,37
	T2	3,29 ± 0,03	3,36 ± 0,10	3,41 ± 0,05	3,35
	T3	3,39 ± 0,02	3,48 ± 0,11	3,48 ± 0,11	3,45
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	3,36	3,39	3,45	
#4) Índice de Polifenóis Totais (IPT)	T1	41 ± 2	42 ± 2		42
	T2	60 ± 4	62 ± 5	56 ± 3	59
	T3	66 ± 2	63 ± 2	65 ± 2	65
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	56	56	60	
#5) Intensidade de Cor (IC, 420 + 520 + 620nm)	T1	10,5 ± 0,4	9,1 ± 0,5		9,8

	T2	13,1 ± 1,9	12,8 ± 3,3	11,4 ± 1,6	12,4
	T3	13,8 ± 0,6	13,8 ± 0,5	13,4 ± 0,6	13,7
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	12,5	11,9	12,4	
(#6) Teor Alcoólico (TA, % v/v)	T1	11,5 ± 0,6	11,5 ± 0,4		11,5
	T2	14,3 ± 1,8	14,1 ± 1,3	13,8 ± 1,2	14,1
	T3	14,6 ± 0,6	14,6 ± 0,9	14,6 ± 0,7	14,6
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	13,5	13,4	14,2	
(#7) Acidez Total Titulável (ATT, g L <sup>-1</sup> )	T1	8,8 ± 1,6	8,9 ± 0,9		8,8
	T2	7,9 ± 0,4	7,3 ± 0,6	7,7 ± 0,3	7,6
	T3	7,1 ± 0,2	6,6 ± 0,4	6,4 ± 0,04	6,7
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	7,9	7,6	7,0	
(#8) Extrato Seco (ES, g L <sup>-1</sup> )	T1	26 ± 4	19 ± 2		23
	T2	27 ± 3	26 ± 2	26 ± 3	26
	T3	35 ± 3	35 ± 5	34 ± 1	35
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	30	27	30	

Os dados são expressos como os valores médios das três repetições experimentais ± desvio padrão relativo (RSD). O número de dígitos após a vírgula foi inserido de acordo com o menor RSD encontrado para um conjunto de números específicos de um parâmetro.

### 4.1.3 Efeito da maturação e da maceração na composição fenólica dos vinhos Syrah

A **Tabela 2** apresenta os resultados da quantificação dos compostos fenólicos (estilbeno, ácidos fenólicos, flavanóis, flavonóis e antocianinas) e a **Figura 7** corresponde ao biplot obtido pela aplicação da ANOVA - PCA para os dados referentes à concentração de compostos fenólicos. O grau de maturação da uva se mostrou significativo para o teor de compostos fenólicos, uma vez que as amostras aparecem agrupadas de acordo com os níveis dos fatores (**Figura 7A**) no espaço definido pela PC1 versus PC2, o que está em acordo com o observado para os parâmetros físico-químicos.

Para a maioria dos compostos fenólicos investigados neste trabalho, o avanço na maturação da uva de T1 para T2 promoveu o aumento do conteúdo fenólico do vinho. No entanto, o prolongamento do tempo de maturação (T2 a T3) reduziu a concentração de alguns desses compostos. Serão discutidos a seguir, apenas os compostos que apresentaram pesos significativos.

A influência da maturação é especialmente notável para as antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo (#23), delphinidina-3-O-glicosídeo (#24), peonidina-3-O-glicosídeo (#26), pelargonidina-3-O-glicosídeo (#22), que apresentaram pesos significativos no eixo positivo da PC1 em relação ao tratamento empregado. A soma das concentrações de todas as antocianinas foi maior nas amostras de vinhos T2 e T3 (63 no T1, 95 no T2 e 102 mg L<sup>-1</sup> no T3, **Tabela 2, Figura 7A**), apresentando um padrão semelhante para quase todas as antocianinas. Estas concentrações estão em acordo com os dados publicados para os vinhos Syrah nacionais e de outras regiões do mundo (Brasil, Espanha, Argentina e Chile), que estão na faixa de 11,89 a 259,59 mg L<sup>-1</sup>.<sup>65,66</sup> A evolução dessas antocianinas (exceto a #22) durante o amadurecimento da uva foi investigada em uvas Nebbiolo da Itália, e seu conteúdo também aumentou de 31,34 para 272,17 mg kg<sup>-1</sup> quando houve aumento no conteúdo de sólidos solúveis de 22,6 para 25,0 °Brix.

Com relação aos ácidos fenólicos (29 em T1 a 36 mg L<sup>-1</sup> em T3) estes seguiram tendência semelhante, estando também em acordo com o aumento da concentração do ácido *p*-cumárico de 0,03 a 0,06 mg kg<sup>-1</sup> detectado nas mesmas uvas Nebbiolo.<sup>67</sup> Os ácidos fenólicos são relatados como não tendo nenhuma influência particular no sabor ou odor do vinho, no entanto, eles são precursores de fenóis voláteis produzidos pela ação de leveduras do gênero *Brettanomyces*. Os etil fenóis são exemplos destes fenóis, conhecidos por conferirem notas de odor “animal” aos vinhos tintos.<sup>8</sup>

Da mesma forma, a concentração total de flavonóis apresentou crescimento quando o vinho foi elaborado com uvas mais maduras, variando de 8,61 T1 a 14,86 mg L<sup>-1</sup> em T3. De modo semelhante ao obtido neste trabalho, os flavonóis miricetina (#18) e quercetina (#19), atingiram concentrações mais elevadas nas películas das uvas Tannat colhidas com maior grau de maturação.<sup>146</sup> Além disso, o flavanol procianidina A2 (#12) mostrou um peso significativo ao longo da PC2, tendo o seu conteúdo aumentado com a maturação prolongada da uva.

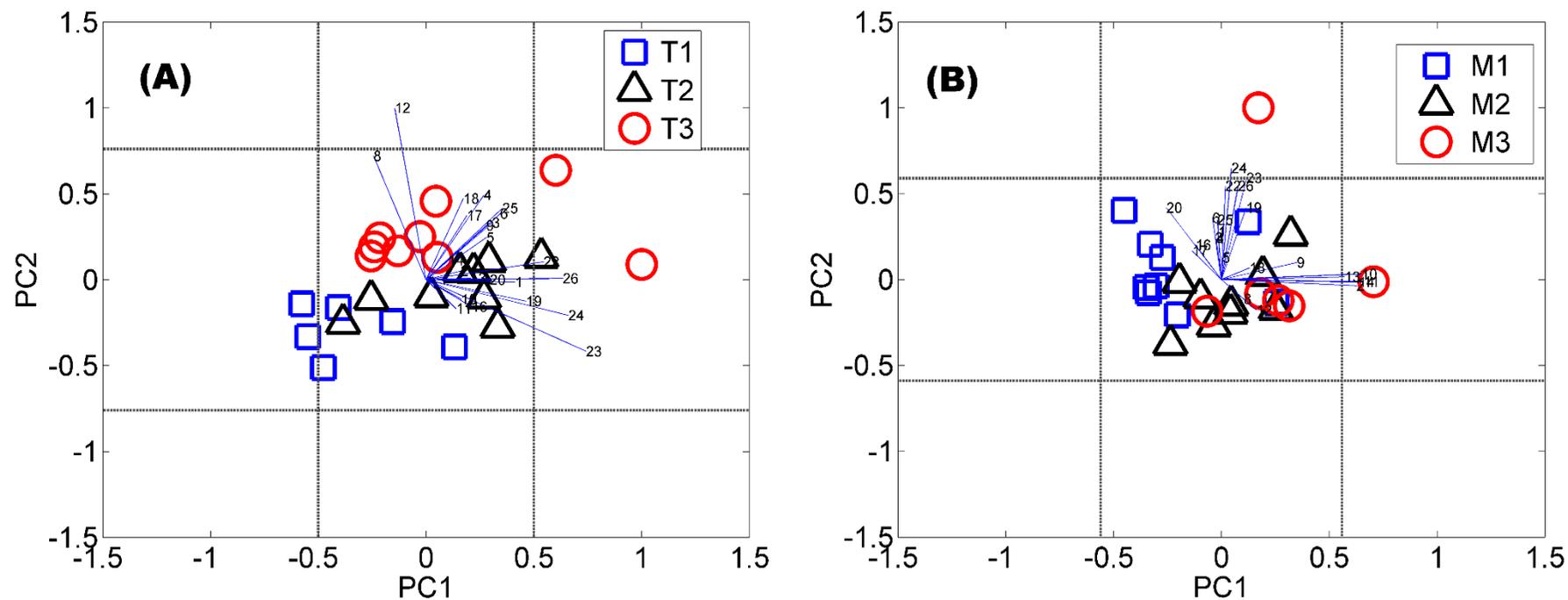
A **Figura 7B** apresenta um gráfico biplot para o efeito da maceração (M) no conteúdo fenólico dos vinhos, na qual as amostras de vinho M1 e M2 foram preferencialmente agrupadas em lados opostos do subespaço definido pela PC1 versus PC2. As amostras submetidas a 30 dias de maceração (M3), são mostradas como pontos dispersos sem um padrão aparente, o que sugere que o nível do fator M que muda de M2 para M3 não afetou significativamente a concentração dos compostos fenólicos. Os dois conjuntos de pesos mais expressivos são orientados preferencialmente ao longo da PC1 e da PC2, apontando para dois eventos não relacionados ao efeito da maceração na concentração de compostos fenólicos nos vinhos.

As concentrações das antocianinas delphinidina-3-O-glicosídeo (#24; PC2 0,6478) e cianidina-3-O-glicosídeo (#23; PC2 0,5907) foram reduzidas à medida que o tempo de maceração foi prolongado de M1 para M3. A evolução da concentração de várias antocianinas individuais (**Tabela 2**) está em acordo com um estudo relatado para vinhos Teran da Croácia, cujo efeito dos tempos de maceração (5, 10, 15 e 20 dias) foi investigado para as mesmas antocianinas e seus conteúdos atingiram um máximo com 10 dias de maceração.<sup>147</sup> Estes compostos são os principais responsáveis pela coloração nas uvas e vinhos, contribuindo positivamente para a sua qualidade, uma vez que influenciam as características sensoriais e a aceitabilidade do vinho pelo consumidor.<sup>65</sup>

Por outro lado, os flavanóis (-)-epicatequina (#11), (+)-catequina (#10), procianidina B2 (#14), procianidina B1 (#13) apresentaram maiores pesos na PC1, tendo suas concentrações aumentadas com a maceração mais prolongada. A soma total dos flavanóis seguiu a mesma tendência dos flavanóis #10, #11, #13 e #14, que tiveram suas concentrações aumentadas com os períodos mais longos de maceração. Um estudo sobre as concentrações de (+)-catequina (#10) e (-)-epicatequina (#11) em vinhos espanhóis da variedade Syrah também alcançou concentrações mais altas nos vinhos macerados durante período de maceração mais longo (5 e 10 dias foram os períodos estudados) (de 9,8 a 17,8 mg L<sup>-1</sup> para a #10 e de 5,2 a 15,0 mg L<sup>-1</sup>, para a # 11).<sup>148</sup> Um padrão semelhante foi observado para ambos os flavanóis em vinhos tintos Karaoglan da Turquia<sup>149</sup> e vinhos tintos Teran da Croácia.<sup>147</sup> A extração dos flavanóis da

película da uva começa nos primeiros dois ou três dias de maceração devido à sua alta solubilidade em água, embora a liberação dos flavanóis das sementes exija maiores tempos de maceração. Estes compostos são geralmente relacionados à adstringência e amargor dos vinhos.<sup>150</sup>

Dentre os ácidos, o gálico (#2) foi o principal ácido fenólico dos vinhos Syrah, variando entre 9,73 no T1M1 e 18,20 mg L<sup>-1</sup> no T3M3. Outros estudos também relataram este como sendo o principal ácido fenólico presente em maiores teores em vinhos tintos franceses e italianos.<sup>66</sup> Além disso, o vinho tinto croata da variedade Teran apresentou 9,15 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico, após cinco dias de maceração, com um aumento significativo para 11,89 mg L<sup>-1</sup>, após 20 dias de maceração.<sup>147</sup> Por fim, nenhum efeito significativo foi observado nos compostos fenólicos devido à interação do grau de maturação da uva e do tempo de maceração, como pode ser observado na **Figura A3 (B) do Anexo**.



**Figura 7:** Biplot para compostos fenólicos dos vinhos Syrah obtidos por meio da ANOVA - PCA para (A) diferentes graus de maturação da uva (fator T) e (B) para tempos distintos de maceração (fator M). T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias. Os pesos que excedem as linhas pontilhadas horizontais e verticais são estatisticamente significativos.

**Tabela 2:** Concentração dos compostos fenólicos nos vinhos Syrah analisados com HPLC-DAD-FD e elaborados com uvas provenientes de diferentes fases de maturação e maceradas em períodos distintos durante a vinificação. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias

	Nível de Maturação DAP: dias após a poda	Tempo de Maceração			Médias dos diferentes níveis de maturação (T1, T2 e T3) *
		10 dias - M1	20 dias - M2	30 dias - M3	
<b>Estilbeno (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
(#1) <i>trans</i> -resveratrol	T1: 113 DAP	0,28 ± 0,03	0,43 ± 0,19		0,36
	T2: 120 DAP	0,88 ± 0,08	0,60 ± 0,10	0,48 ± 0,10	0,65
	T3: 127 DAP	0,60 ± 0,10	0,43 ± 0,12	0,60 ± 0,14	0,54
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	0,59	0,49	0,54	
<b>Ácidos Fenólicos (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
(#2) ácido gálico	T1	9,73 ± 1,96	14,15 ± 2,65		11,94
	T2	10,03 ± 0,29	14,28 ± 2,71	18,18 ± 4,35	14,16
	T3	11,72 ± 2,63	12,95 ± 1,31	18,20 ± 1,20	14,29
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	10,49	13,79	18,19	
(#3) ácido cafeíco	T1	11,80 ± 1,70	11,23 ± 1,03		11,52
	T2	14,50 ± 0,52	13,97 ± 0,80	13,63 ± 4,35	14,03
	T3	14,88 ± 2,88	11,65 ± 0,26	13,43 ± 1,73	13,32
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	13,73	12,28	13,53	
(#4) ácido ferrúlico	T1	1,62 ± 0,31	1,68 ± 0,08		1,65
	T2	2,50 ± 0,76	2,57 ± 0,40	2,48 ± 0,03	2,52
	T3	3,03 ± 0,60	2,42 ± 0,03	3,10 ± 0,42	2,85
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	2,38	2,22	2,79	
(#5) ácido clorogênico	T1	2,55 ± 0,39	3,23 ± 0,43		2,89
	T2	4,18 ± 0,95	4,45 ± 0,09	3,97 ± 0,29	4,20

	T3	3,97 ± 0,29	3,08 ± 0,51	4,35 ± 0,00	3,80
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	3,57	3,59	4,16	
(#6) ácido <i>p</i> -cumárico	T1	1,17 ± 0,15	1,10 ± 0,05		1,14
	T2	1,85 ± 0,22	1,58 ± 0,16	1,55 ± 0,13	1,66
	T3	1,93 ± 0,30	1,60 ± 0,05	2,00 ± 0,21	1,84
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1,65	1,43	1,78	
	<hr/>				
<b>(#7) Total de Ácidos Fenólicos</b>	<b>T1</b>	<b>27 ± 3</b>	<b>31 ± 3</b>		<b>29</b>
	<b>T2</b>	<b>33 ± 3</b>	<b>37 ± 3</b>	<b>40 ± 6</b>	<b>37</b>
	<b>T3</b>	<b>36 ± 7</b>	<b>32 ± 1</b>	<b>41 ± 2</b>	<b>36</b>
	<b>Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>40</b>	
<hr/>					
<b>Flavanóis (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
(#8) (-)-epicatequina galato	T1	1,17 ± 0,38	1,23 ± 0,24		1,20
	T2	1,22 ± 0,38	0,83 ± 0,25	1,48 ± 0,24	1,18
	T3	2,10 ± 0,39	1,75 ± 0,15	2,40 ± 0,35	2,08
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1,50	1,27	1,94	
(#9) (-)-epigallocatequina galato	T1	2,17 ± 0,65	3,05 ± 0,40		2,61
	T2	2,32 ± 0,40	4,67 ± 1,19	4,73 ± 1,04	3,91
	T3	3,87 ± 0,73	3,83 ± 0,45	5,05 ± 0,21	4,25
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	2,79	3,85	4,89	
(#10) (+)-catequina	T1	12,75 ± 5,56	16,80 ± 3,86		14,78
	T2	10,48 ± 1,82	15,23 ± 3,59	18,95 ± 5,24	14,89
	T3	11,90 ± 2,85	13,28 ± 1,86	17,85 ± 0,00	14,34
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	11,71	15,10	18,40	

#11 (-)-epicatequina	T1	5,05 ± 1,05	7,28 ± 1,81		6,17
	T2	4,05 ± 0,75	6,18 ± 1,55	8,98 ± 2,73	6,40
	T3	4,52 ± 1,37	5,43 ± 1,08	7,63 ± 0,46	5,86
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	4,54	6,30	8,31	
#12 procianidina A2	T1	1,78 ± 0,55	1,40 ± 0,13		1,59
	T2	1,50 ± 0,26	3,40 ± 0,65	3,62 ± 0,72	2,84
	T3	4,73 ± 0,90	3,95 ± 0,31	5,08 ± 0,25	4,59
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	2,67	2,92	4,35	
#13 procianidina B1	T1	14,07 ± 2,32	16,68 ± 1,20		15,38
	T2	14,05 ± 1,00	17,47 ± 2,63	19,15 ± 4,39	16,87
	T3	15,22 ± 3,33	13,95 ± 1,47	17,10 ± 0,57	15,42
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	14,45	16,03	18,10	
#14 procianidina B2	T1	9,05 ± 3,10	12,73 ± 3,60		10,89
	T2	7,18 ± 2,01	12,33 ± 4,27	17,55 ± 4,82	12,35
	T3	10,08 ± 2,65	12,70 ± 2,41	17,40 ± 0,85	13,39
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	8,77	12,59	17,48	
<b>#15 Total de Flavanóis (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>T1</b>	<b>46,03 ± 9,40</b>	<b>59,18 ± 10,25</b>		<b>52,50</b>
	<b>T2</b>	<b>40,80 ± 5,21</b>	<b>60,12 ± 11,99</b>	<b>74,47 ± 20,40</b>	<b>58,66</b>
	<b>T3</b>	<b>52,42 ± 11,34</b>	<b>54,90 ± 6,46</b>	<b>72,50 ± 0,07</b>	<b>59,83</b>
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	46,42	58,07	73,49	
<b>Flavonóis (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
#16 caempferol-3-O-glicosídeo	T1	1,27 ± 0,28	1,30 ± 0,05		1,29
	T2	1,97 ± 0,29	1,65 ± 0,30	1,63 ± 0,56	1,75
	T3	1,08 ± 0,09	1,40 ± 0,43	2,00 ± 0,42	1,49

	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1,44	1,45	1,82	
(#17) isorhamnetina-3-O-glicosídeo	T1	6,03 ± 1,76	6,02 ± 1,81		6,03
	T2	11,30 ± 4,30	11,12 ± 3,82	10,03 ± 1,67	10,82
	T3	11,53 ± 3,01	9,88 ± 1,36	12,25 ± 0,00	11,22
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	9,62	9,01	11,14	
(#18) miricetina	T1	0,42 ± 0,13	0,15 ± 0,05		0,29
	T2	0,32 ± 0,13	0,88 ± 0,25	0,80 ± 0,05	0,67
	T3	0,75 ± 0,15	0,60 ± 0,05	1,00 ± 0,00	0,78
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	0,50	0,54	0,90	
(#19) quercetina	T1	0,25 ± 0,09	0,28 ± 0,88		0,27
	T2	0,52 ± 0,03	0,50 ± 0,00	0,53 ± 0,15	0,52
	T3	0,40 ± 0,10	0,30 ± 0,10	0,63 ± 0,11	0,44
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	0,39	0,36	0,58	
(#20) rutina	T1	0,77 ± 0,15	0,73 ± 0,06		0,75
	T2	1,30 ± 0,23	0,75 ± 0,15	0,75 ± 0,13	0,93
	T3	0,98 ± 0,20	0,77 ± 0,03	1,00 ± 0,14	0,92
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1,02	0,75	0,88	
<b>(#21) Total de Flavonóis</b>	<b>T1</b>	<b>9,73 ± 3,00</b>	<b>8,48 ± 1,77</b>		<b>8,61</b>
	<b>T2</b>	<b>15,40 ± 4,97</b>	<b>14,90 ± 4,75</b>	<b>13,75 ± 2,38</b>	<b>14,68</b>
	<b>T3</b>	<b>14,75 ± 3,99</b>	<b>12,95 ± 1,66</b>	<b>16,88 ± 0,46</b>	<b>14,86</b>
	<b>Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *</b>	<b>12,96</b>	<b>12,11</b>	<b>15,32</b>	
<b>Antocianinas (mg L<sup>-1</sup>)</b>					
(#22) pelargonidina-3-O-glicosídeo	T1	8,17 ± 0,53	8,08 ± 1,71		8,13
	T2	12,70 ± 0,85	10,87 ± 0,83	9,95 ± 1,23	11,17

(#23) cianidina-3-O-glicosídeo	T3	12,55 ± 2,34	9,68 ± 1,26	11,53 ± 0,67	11,25
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	11,14	9,54	10,74	
	T1	0,45 ± 0,13	0,48 ± 0,20		0,47
	T2	0,72 ± 0,10	0,65 ± 0,09	0,55 ± 0,13	0,64
	T3	0,53 ± 0,14	0,40 ± 0,10	0,43 ± 0,04	0,45
(#24) delphinidina-3-O-glicosídeo	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	0,57	0,51	0,49	
	T1	3,40 ± 0,35	3,42 ± 0,90		3,41
	T2	4,87 ± 0,48	3,98 ± 0,10	3,67 ± 0,64	4,17
	T3	4,27 ± 0,90	3,32 ± 0,63	3,73 ± 0,04	3,77
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	4,18	3,57	3,70	
(#25) malvidina-3-O-glicosídeo	T1	47 ± 8	47 ± 1		47
	T2	79 ± 9	72 ± 8	69 ± 7	73
	T3	86 ± 15	70 ± 1	86 ± 10	81
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	70	63	78	
	(#26) peonidina-3-O-glicosídeo	4T1	4,13 ± 0,32	4,27 ± 0,94	
T2		6,70 ± 0,52	5,83 ± 0,30	5,45 ± 1,03	5,99
T3		6,07 ± 1,16	4,93 ± 0,53	5,53 ± 0,04	5,51
Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *		5,63	5,01	5,49	
<b>(#27) Total de Antocianinas</b>		<b>T1</b>	<b>63 ± 8</b>	<b>63 ± 4</b>	
	<b>T2</b>	<b>104 ± 9</b>	<b>93 ± 8</b>	<b>88 ± 9</b>	<b>95</b>
	<b>T3</b>	<b>109 ± 19</b>	<b>89 ± 4</b>	<b>107 ± 10</b>	<b>102</b>
	<b>Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *</b>	<b>92</b>	<b>82</b>	<b>98</b>	

Os dados são expressos como os valores médios das três repetições experimentais  $\pm$  desvio padrão (RSD). O número de dígitos após a vírgula foi inserido de acordo com o menor RSD encontrado para um conjunto de números específicos de uma classe de compostos. Todos os compostos foram incluídos na ANOVA - PCA, exceto a soma das concentrações de cada subclasse de compostos.

#### 4.1.4 Avaliação do perfil volátil dos vinhos Syrah

##### 4.1.4.a. Validação do método HS-SPME – GC/MS

O desempenho do método cromatográfico foi avaliado em termos de linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), recuperação (**Tabela 3**) e *bias*. O intervalo de concentração para cada composto volátil foi escolhido de acordo com trabalho publicado anteriormente<sup>151</sup>, bem como através de análises preliminares realizadas para confirmar as faixas correspondentes de linearidade. Onze curvas de calibração foram utilizadas para quantificar os 41 compostos voláteis (12 ésteres, 10 ácidos, 14 álcoois, 4 terpenos e um tiol) dos 52 compostos identificados positivamente/tentativamente.

As curvas de calibração mostraram boa linearidade com coeficientes de determinação variando de 0,990 a 0,999. Os valores de LOD variaram de 3,6 µg L<sup>-1</sup> para linalol a 363,3 µg L<sup>-1</sup> para 2-fenil etanol, enquanto o LOQ foi de 11,0 µg L<sup>-1</sup> para o linalol a 1101,8 µg L<sup>-1</sup> para 2-fenil etanol. A repetibilidade se alterou de 1,2% para o hexanoato de etila a 16,7% para o decanoato de etila. A precisão intermediária sofreu variação de 4,5% para o linalol a 19,4% para succinato de dietila e para o (*E*)-nerolidol. Finalmente, a recuperação para cada um dos 11 padrões variou de 91,2% para o 2-fenil etanol a 119,7% para o ácido hexanóico. Estes valores confirmam o bom desempenho do método analítico e concordam com as diretrizes preconizadas pela Sanco.<sup>114</sup> O teste t sugerido pela norma E1655-00 da ASTM mostrou que o valor do t calculado é menor que o seu valor crítico para 2 graus de liberdade com 95% de confiança, sendo assim o *bias* incluído no modelo pode ser considerado insignificante.

A **Tabela 4** mostra os dados relacionados à identificação e quantificação de 41 compostos, bem como os onze compostos designados com números romanos, os quais não foram quantificados. O OAV calculado para cada composto, assim como as concentrações limiares de odor publicadas na literatura, são também relatadas. Números arábicos foram usados para designar os 41 voláteis quantificados, bem como a soma das concentrações das subclasses de compostos.

**Tabela 3:** Resultados para os parâmetros de validação do método para determinação de compostos voláteis em vinhos Syrah por GC/MS

# Composto <sup>a</sup>	Equação de regressão	Faixa de concentração (µg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	LOD <sup>b</sup> (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>c</sup> (µg L <sup>-1</sup> )	Repetibilidade		Precisão Intermediária		Recuperação (%) <sup>d</sup>	Recuperação (%) <sup>e</sup>
						RSD(%) <sup>d</sup>	RSD(%) <sup>e</sup>	(RSD%) <sup>d</sup>	(RSD%) <sup>e</sup>		
<b>Ésteres</b>											
(#2) butanoato de etila	y = 0,0006 x + 0,0114	30 - 2500	0,993	9,9	30,0	14,5%	1,2%	18,6%	9,0%	106,6%	94,6%
(#3) hexanoato de etila	y = 0,0011 x + 0,0499	94 - 2500	0,997	30,9	93,5	1,2%	4,6%	6,8%	17,8%	98,4%	107,4%
(#5) octanoato de etila	y = 0,0061 x - 0,0430	34 - 500	0,999	11,2	34,1	5,4%	8,0%	6,9%	17,3%	97,4%	102,3%
(#6) decanoato de etila	y = 0,0065 x - 0,0759	18 - 500	0,993	6,1	18,5	13,7%	16,7%	18,1%	17,5%	110,1%	101,2%
(#8) succinato de dietila	y = 0,0024 x - 0,7898	344 - 10000	0,999	113,4	343,8	6,5%	7,2%	19,4%	6,4%	99,3%	99,4%
<b>Ácidos</b>											
(#18) ácido hexanóico	y = 0,0003 x + 0,0143	225 - 1250	0,995	74,3	225,1	10,6%	2,6%	18,0%	10,5%	119,7%	97,5%
(#19) ácido octanóico	y = 0,0025 x + 0,5624	244 - 2500	0,991	80,4	243,5	5,4%	12,4%	14,1%	12,7%	98,7%	95,8%
<b>Álcoois</b>											
(#29) álcool benzílico	y = 0,0003 x + 0,0059	102 - 1 000	0,990	33,6	101,8	16,6%	15,5%	13,1%	15,7%	97,2%	95,7%
(#30) 2-fenil etanol	y = 0,0004 x + 0,6670	1101 - 50000	0,996	363,3	1101,8	10,2%	13,3%	8,3%	18,6%	91,2%	113,8%
<b>Terpenos</b>											
(#40) linalol	y = 0,0072 x - 0,0486	11 - 250	0,995	3,6	11,0	12,4%	2,9%	11,8%	4,5%	98,3%	106,6%
(#42) (E)-nerolidol	y = 0,0052 x - 0,0072	25 - 250	0,998	8,2	25,0	9,8%	14,0%	19,4%	18,5%	107,3%	103,1%

<sup>a</sup> compostos numerados de acordo com a Tabela 4. <sup>b</sup> LOD: limite de detecção; <sup>c</sup> LOQ: limite de quantificação; <sup>d</sup> calculado no nível mais baixo da curva; <sup>e</sup> calculado no nível mais alto da curva.

**Tabela 4:** Compostos tentativamente identificados no *headspace* dos vinhos Syrah produzidos a partir de uvas colhidas em 19, 21 e 23 °Brix e macerados por 10, 20 e 30 dias, e seus respectivos limiares de odor, valor de atividade de odor (OAV) e descrição de odor

Compostos	LTPRIexp.	LTPRIlit.	OTS <sup>c</sup> (µg L <sup>-1</sup> )	OAV									Odor literatura
	DB- Wax <sup>a</sup>	DB-Wax <sup>b</sup>		T1M1	T1M2	T2M1	T2M2	T2M3	T3M1	T3M2	T3M3		
<b>Ésteres</b>													
I	acetato de etila	894	887 <sup>152d</sup>	12000 <sup>153</sup>	Nc	abacaxi <sup>94</sup>							
V	acetato de 2-metil propila	1018	1018 <sup>154</sup>	1600 <sup>155</sup>	Nc	frutado <sup>156</sup>							
1	acetato de 3-metil butila	1118	1124 <sup>152</sup>	30 <sup>70</sup>	30,7	14,4	25,4	34,1	15,4	48,4	18,7	8,8	banana, doce <sup>94</sup>
2	butanoato de etila	1038	1023 <sup>157</sup>	20 <sup>70</sup>	3,8	3,8	6,8	16,0	14,8	10,0	24,3	25,1	morango <sup>94</sup>
3	hexanoato de etila	1231	1238 <sup>158</sup>	14 <sup>159</sup>	56,1	38,4	19,3	30,1	13,0	17,4	15,1	16,4	maçã verde <sup>94</sup>
4	lactato de etila	1345	1334 <sup>158</sup>	150000 <sup>153</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	fruta, manteiga <sup>99</sup>
5	octanoato de etila	1433	1424 <sup>158</sup>	580 <sup>94</sup>	4,0	3,1	1,9	2,2	1,7	2,0	1,7	1,6	doce, pêra <sup>94</sup>
6	decanoato de etila	1637	1638 <sup>158</sup>	200 <sup>159</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	frutado <sup>94</sup>
7	3-metil butil octanoato	1655	1658 <sup>157</sup>	152 <sup>160</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	oleoso <sup>77</sup>
8	succinato de dietila	1677	1690 <sup>136</sup>	1200 <sup>153</sup>	<1	1,0	2,8	2,3	2,5	<1	2,1	6,3	fruta, melão <sup>99</sup>
9	acetato de 2-fenil etanol	1809	1829 <sup>158</sup>	1800 <sup>153</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	rosa <sup>94</sup>
10	9-decenoato de etila	1688	1689 <sup>157</sup>	100 <sup>161</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	rosa <sup>99</sup>
XXVIII	dodecanoato de etila	1841	1835 <sup>158</sup>	3500 <sup>162</sup>	Nc	doce, floral, fruta <sup>99</sup>							
11	tetradecanoato de etila	2048	2065 <sup>158</sup>	800 <sup>163</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Ne
12	hexadecanoato de etila	2252	2246 <sup>158</sup>	1500 <sup>160</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	gordura, rançoso, fruta, doce <sup>99</sup>
<b>Ácidos</b>													
14	ácido acético	1476	1461 <sup>154</sup>	200000 <sup>70</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	vinagre <sup>162</sup>
15	ácido 2-metil propanóico	1591	1581 <sup>164</sup>	2300 <sup>159</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	rançoso, ácido <sup>165</sup>

16	ácido butanóico	1651	1650 <sup>166</sup>	173 <sup>159</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1,1	<1	rançoso, queijo <sup>167</sup>
17	ácido 3-metil butanóico	1680	1682 <sup>168</sup>	33 <sup>159</sup>	42,3	41,7	55,5	54,4	57,4	49,9	50,1	57,5	rançoso, ácido <sup>165</sup>
18	ácido hexanóico	1864	1865 <sup>169</sup>	420 <sup>159</sup>	2,3	2,1	1,3	1,3	1,2	1,4	1,5	1,7	queijo, gorduroso <sup>167</sup>
19	ácido octanóico	2076	2072 <sup>170</sup>	500 <sup>159</sup>	7,2	6,9	4,5	4,3	3,8	4,5	3,8	4,7	gordura, rançoso <sup>153</sup> ,
20	ácido nonanóico	2189	2174 <sup>171</sup>	3000 <sup>165,f</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	gordura <sup>165</sup>
21	ácido decanóico	2292	2288 <sup>172</sup>	1000 <sup>159</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	gordura <sup>163</sup>
22	ácido dodecanóico	2509	2529 <sup>173</sup>	1000 <sup>163</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	seco, metálico <sup>163</sup>
23	ácido 9-decenóico	2355	2348 <sup>174</sup>	40 <sup>155</sup>	1,1	<1	<1	<1	<1	1,2	<1	1,1	cêra, gordura, sabão <sup>155</sup>

### Álcoois

XXXIX	1-propanol	1044	1049 <sup>175</sup>	306000 <sup>155</sup>	Nc	fruta madura <sup>155</sup>							
XLI	2-metil, 1-propanol	1107	1107 <sup>154</sup>	40000 <sup>163</sup>	Nc	maça <sup>163</sup>							
25	3-metil, 1-butanol	1221	1221 <sup>154</sup>	30000 <sup>70</sup>	2,0	3,0	2,5	3,2	3,5	2,1	2,8	<1	solvente, terra <sup>94</sup>
26	(Z)-3-hexen-1-ol	1384	1382 <sup>157</sup>	1000 <sup>153</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	verde <sup>99</sup>
27	1-octanol	1558	1559 <sup>157</sup>	800 <sup>155</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	jasmim, herbáceo <sup>155</sup>
28	1-nonanol	1660	1676 <sup>158</sup>	Ne	Nc	Ne							
29	álcool benzílico	1874	1869 <sup>158</sup>	200000 <sup>167,f</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	frutado, doce <sup>167</sup>
30	2-fenil etanol	1908	1914 <sup>157</sup>	14000 <sup>159</sup>	1,5	2,2	2,3	3,0	3,2	2,3	3,3	3,9	rosa <sup>99</sup>
31	1-dodecanol	1968	1970 <sup>157</sup>	1000 <sup>163</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	floral <sup>163</sup>
32	4-metil, 1-pentanol	1316	1328 <sup>176</sup>	50000 <sup>167,f</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	amêndoas, torrado <sup>167</sup>
33	3-metil, 1-pentanol	1328	1343 <sup>158</sup>	50000 <sup>167,f</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	herbáceo, cacau <sup>167</sup>
34	1-hexanol	1354	1357 <sup>154</sup>	1100 <sup>153</sup>	<1	2,5	1,4	2,2	2,5	1,6	2,0	2,3	herbáceo <sup>94</sup>
35	1-butanol	1155	1155 <sup>154</sup>	150000 <sup>155</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	doce <sup>177</sup>
LII	2-etil, 1-hexanol	1491	1491 <sup>158</sup>	8000 <sup>160</sup>	Nc	frutado <sup>163</sup>							
36	2,3-butanodiol	1542	1545 <sup>77</sup>	150000 <sup>167,f</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	frutado <sup>167</sup>
37	1,3-butanodiol	1580	1578 <sup>178</sup>	Ne	Nc	Ne							

38	1-hexadecanol	2379	2382 <sup>157</sup>	Ne	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Ne
<b>Terpenos</b>													
40	linalol	1551	1555 <sup>158</sup>	15 <sup>153</sup>	<1	<1	1	<1	1,1	<1	1,3	<1	cítrico, floral, doce <sup>153</sup>
41	geraniol	1849	1853 <sup>152</sup>	30 <sup>70</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	rosa, gerânio <sup>99</sup>
42	( <i>E</i> )-nerolidol	2043	2045 <sup>179</sup>	1000 <sup>153</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	rosa, maçã, verde, cítrico <sup>153</sup>
43	citronelol	1767	1778 <sup>158</sup>	100 <sup>70</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	cítrico <sup>180</sup>
<b>Sulfurados</b>													
45	3-(metiltio)-1-propanol	1713	1720 <sup>157</sup>	500 <sup>70</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	vegetal cozido <sup>167</sup>
LXXVI	benzotiazol	1938	1956 <sup>158</sup>	Ne	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	borracha <sup>165</sup>
<b>Aldeídos</b>													
LXXXI	benzaldeído	1513	1513 <sup>157</sup>	2000 <sup>153</sup>	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	amêndoa <sup>153</sup>
<b>Cetonas</b>													
LXXXVII	2,3-butanodiona	984	997 <sup>152</sup>	100 <sup>70</sup>	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	manteiga <sup>77</sup>
LXXXVIII	2,3-pentanodiona	1063	1064 <sup>181</sup>	Ne	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	caramelo, doce <sup>182</sup>
<b>Lactonas</b>													
XCII	γ-butirolactona	1616	1635 <sup>183</sup>	20000 <sup>153</sup>	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	caramelo, doce <sup>99</sup>

a. LTPRI exp. DB-Wax: Índice de retenção experimental com programação linear de temperatura (LTPRI) calculado utilizando n-alcenos (C9-C24) numa coluna polar (DB-Wax, 100% polietilenoglicol) b.LTPRI lit DB-Wax - índice de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI) relatado na literatura científica para uma coluna polar (DB-Wax, 100% polietilenoglicol); c. OTS = limiar de odores determinado em etanol a 10 - 12% (v/v) relatado na literatura; Ne = não encontrado; Nc = OAV não foi calculado porque o sinal ruído para estes compostos específicos foi inferior a dez ou o OTS não foi encontrado; Os números romanos indicam os compostos identificados e não quantificados devido a sua baixa relação sinal / ruído, inferior a dez. Números arábicos representam compostos quantificados em vinhos Syrah.

#### 4.1.4.b Avaliação da influência da maturação e da maceração na composição volátil dos vinhos Syrah

A **Figura 8** mostra o efeito da maturação e do tempo de maceração na concentração dos compostos voláteis presentes nos vinhos Syrah, que podem ser observados através de grupos bem definidos e isolados. Observa-se ainda, que os vinhos produzidos com as uvas do tratamento T1 continham níveis mais elevados de (*Z*)-3-hexen-1-ol (#26) e ácido decanóico (#21), com pesos significativos no eixo da PC2. O aumento do grau de maturação, especialmente de T1 para T2, causou uma redução na concentração dos compostos #26 e #21. Por outro lado, houve aumento do conteúdo de ácido 2-metil propanóico (#15), ácido acético (#14), lactato de etila (#4), citronelol (#43) e do 3-metil, 1-butanol (#25), de T1 para T2. Amostras elaboradas com uvas dos tratamentos T3 ou T1 foram caracterizadas por apresentarem os maiores níveis de ácido 9-decenóico (#23), 9-decenoato de etila (#10) e ácido hexanóico (#18).

O efeito do fator maceração foi altamente significativo, como pode ser visto na **Figura 8B**, onde os pesos para os compostos acetato de 3-metil butila (#1) e ácido nonanóico (#20) se destacam em relação aos demais, havendo uma redução da sua concentração com o aumento do tempo de maceração. Além disso, os pesos elevados no quadrante superior esquerdo, definidos pela parte negativa da PC1, também estão relacionados às concentrações mais altas nos vinhos M3 do succinato de dietila (#8), assim como do 2,3-butanodiol (#36). Uma tendência similar em relação às concentrações mais altas em M2/M3 pode ser observada para compostos localizados no eixo negativo da PC1: 1-hexanol (#34), tetradecanoato de etila (#11), 2-fenil etanol (#30), 3-metil, 1-pentanol (#33), (*E*)-nerolidol (#42), álcool benzílico (#29) e 1-nonanol (#28).

Dentre os ésteres o #1, #2, #3, #5 e #8 apresentaram OAV > 1. O OAV do hexanoato de etila (#3), por exemplo, variou de 56,1 a 13,0 em T1M1 a T3M3, respectivamente, (referido na literatura como maçã verde, frutado), o acetato de 3-metil butila (#1) variou de 30,7 em T1M1 a 8,8 em T3M3 (fruta, banana e doce), e o octanoato de etila (#5), de 4,0 em T1M1 a 1,6 em T3M3 (doce, fruta, pêra). Todos apresentaram contribuição positiva para o aroma do vinho e maiores concentrações nos vinhos elaborados com uvas menos maduras (T1, 19 °Brix, **Tabela 5**). A concentração de éster #1 foi relatada como variando de 465 a 508  $\mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos Syrah da Austrália<sup>182</sup> e de 458 a 701  $\mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos Syrah da Espanha<sup>134</sup>, dados que estão em acordo com o presente trabalho, cuja variação foi de 1045 em M1 a 363  $\mu\text{g L}^{-1}$  em M3. Por outro lado, o butanoato de etila (#2) apresentou maior concentração nos vinhos Syrah feitos com uvas mais

maduras (T3 = 395  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 23 °Brix) conferindo odor de morango e maçã (maior OAV em T3M3 = 25,1). Esta mesma tendência foi observada para o éster #2 em vinhos australianos de uvas Cabernet Sauvignon, cuja concentração foi de 301000  $\mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos elaborados com uvas de 20,3 °Brix e 474000  $\mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos de uvas colhidas a 26,0 °Brix. A faixa de concentração do butanoato de etila foi menor nos vinhos Syrah estudados no presente trabalho (75 T1M1 a 501  $\mu\text{g L}^{-1}$  T3M3) em comparação com os valores encontrados para os vinhos australianos Cabernet Sauvignon<sup>184</sup>. O succinato de dietila (#8) apresentou OAV inferior a 1 no T1M1, atingindo 6,3 em T3M3 (fruta, melão). Tendência semelhante foi observada para a sua concentração, que aumentou de T1M1 para T3M3. Dentre todos os ésteres quantificados, o #8 foi o majoritário, sendo além disso, o único que apresentou peso significativo no eixo da PC1 relacionado com a maceração. Os compostos #1, #2, #3 e #5 foram relatados como importantes contribuintes para o aroma dos vinhos australianos Syrah devido ao seu OAV elevado.<sup>182</sup>

O succinato de dietila (#8) e o tetradecanoato de etila (#11) tiveram as suas concentrações aumentadas com um período de maceração mais longo (M3), comportamento oposto ao observado para o acetato de 3-metil butila (#1). Os vinhos tintos Karaoglan da Turquia mostraram a mesma tendência para ambos os compostos em distintos graus de maceração.<sup>86</sup> A concentração total dos ésteres em estudo nos vinhos Syrah aumentou de 5934 em M1 para 9892  $\mu\text{g L}^{-1}$  em M3 e isto ocorreu, principalmente, devido ao aumento na concentração do succinato de dietila (#8; 1709 em M1 a 5283  $\mu\text{g L}^{-1}$  em M3), visto que este é o éster majoritário nos vinhos Syrah. A observação geral de que as uvas de maturação avançada fornecem vinhos com maior concentração de ésteres foi confirmada para os vinhos tropicais Syrah em estudo e estão em acordo com os dados relatados para vinhos Cabernet Sauvignon.<sup>184</sup>

Os monoterpênicos também tiveram influência no aroma do vinho e entre os que foram quantificados, o linalol (#40) foi o único que apresentou OAV > 1, no entanto em apenas alguns dos vinhos estudados [1 (T2M1), 1,1 (T2M3) e 1,3 (T3M2)]. Este composto está relacionado à aromas cítricos, florais e doces sendo o OAV relatado no presente trabalho, superior ao referido em vinhos Syrah da Austrália (OAV = 1).<sup>182</sup> Mesmo não tendo influência significativa nos pesos da PC, a concentração média do linalol (#40) mostrou tendência a maiores teores com o avanço na data da colheita (de 10,0 em T1 para 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3) e isso está em acordo com os resultados relatados por Suklje et al.<sup>135</sup>, cujos vinhos Syrah australianos apresentaram 2,33  $\mu\text{g L}^{-1}$  de linalol quando as uvas colhidas apresentaram sólidos solúveis correspondentes a 21 °Brix e 2,59  $\mu\text{g L}^{-1}$  quando as uvas foram coletadas com 24,6 °Brix. Este composto é relatado na literatura com concentração variando de 13,0 a 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  em vinhos Syrah

australianos.<sup>182</sup> Da mesma forma, pode ser esperada uma contribuição positiva do (*E*)-nerolidol (#42; rosa, maçã, verde, cítrico), uma vez que a sua concentração aumenta com períodos mais longos de maceração. Seu peso foi significativo no eixo negativo da PC1 para o fator tempo de maceração (**Figura 8B**).

Alguns dos álcoois variaram significativamente com o aumento do tempo de maceração, como é o caso de 1-nonanol (#28), álcool benzílico (#29), 2-fenil etanol (#30), 3-metil, 1-pentanol (#33), 1-hexanol (#34) e 2,3-butanodiol (#36) como observado na **Tabela 5** e na **Figura 8B**. Estes compostos apresentaram as maiores concentrações médias com tempos de maceração de 20 (M2) e 30 dias (M3), e este resultado está em acordo com relatos da literatura.<sup>9</sup> Além disso, o 3-metil, 1-butanol (#25) apresentou maior concentração nos vinhos elaborados a partir de uvas colhidas com 120 DAP (**Figura 8A**, com média aumentando de 74851 em T1 para 92192 em T2 e reduzindo para 49506  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3). Este álcool foi referido como o majoritário nos vinhos Syrah, com concentração máxima de 105794  $\mu\text{g L}^{-1}$  no T2M3. Este teor foi menor que o relatado em trabalhos da literatura para vinhos australianos Cabernet Sauvignon durante a fermentação alcoólica (179000 a 205000  $\mu\text{g L}^{-1}$ )<sup>184</sup> e para vinhos Syrah da Austrália (161250 a 208400  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).<sup>182</sup> A soma das concentrações de todos os álcoois apresentou a mesma tendência observada para o 3-metil, 1-butanol (#25), de acordo com a **Tabela 5**.

O álcool (#25) apresentou ainda um alto OAV (OAV 2,0 em T1M1 e < 1 em T3M3), juntamente com 2-fenil etanol (#30; OAV 1,5 em T1M1 e 3,9 em T3M3) e 1-hexanol (#34; OAV < 1 em T1M1 e 2,3 em T3M3). O OAV relatado na literatura para os mesmos compostos em vinhos australianos Syrah estavam na faixa de 5,4 a 6,9 para o 3-metil, 1-butanol, 1,9 a 4,0 para o 2-fenil etanol, e < 1 para o 1-hexanol.<sup>182</sup> As altas concentrações obtidas para os álcoois 2-fenil etanol (21049 em T1M1 a 53654  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M3) e 1-hexanol (1219 em T1M1 a 2511  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M3) mostram que estes são álcoois importantes na composição volátil dos vinhos Syrah. Os níveis do 2-fenil etanol reportados neste trabalho, estão em acordo com o intervalo descrito para vinhos Syrah espanhóis - 62270-85350  $\mu\text{g L}^{-1}$ <sup>134</sup> e para os vinhos Syrah australianos (26350 a 56450  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).<sup>182</sup> De modo oposto, o (*Z*)-3-hexen-1-ol (#26) atingiu a concentração máxima em T1 (média de 338 em T1, **Tabela 5**). Esta tendência está em acordo com a reportada para vinhos Cabernet Sauvignon, cujas uvas colhidas com 20,3 °Brix apresentaram maiores concentrações do composto #26 (27,3  $\text{mg L}^{-1}$ ) em relação àquelas coletadas com 26 °Brix (3,1  $\text{mg L}^{-1}$ ).<sup>184</sup> Os álcoois C6 são possivelmente derivados dos ácidos graxos C18 via lipoxigenase e álcool desidrogenase, que ocorrem durante o amadurecimento das uvas, assim como sob as condições oxidativas fornecidas durante o esmagamento da uva.<sup>184</sup>

A concentração total dos ácidos variou de 7472 em T1M1 a 6058  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M3. A exemplo, o ácido octanóico (#19; 3543 em T1 e 2158  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3) obteve a concentração majoritária, apresentando o mesmo padrão observado para o total de ácidos, seguida do ácido decanóico (#21; de 407 no T1M1 para 89  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M3), ácido dodecanóico (#22; de 152 em T1M1 a 152  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M3), ácido hexanóico (#18; de 958 em T1M1 a 719  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M3) e ácido acético (#14; de 355 em T1M1 e 266 em  $\mu\text{g L}^{-1}$  T3M3). A presença destes ácidos em vinhos já foi relatada nas seguintes faixas de concentração: ácido hexanóico (1023-1461  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para vinhos tintos da Espanha<sup>134</sup>, ácido acético (680000 - 510000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e ácido decanóico (224 - 350  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em vinhos Syrah australianos.<sup>182</sup> Alguns ácidos apresentaram diferentes perfis de concentração à medida que o grau de maturação da uva foi aumentado, como é o caso do ácido 2-metil propanóico (#15) e do ácido acético (#14), que atingiram máxima concentração quando as uvas foram colhidas com 120 DAP (T2). Por outro lado, o ácido 9-decenóico (#23) e o ácido hexanóico (#18) apresentaram menores concentrações nos vinhos T2. Estes quatro ácidos desempenharam um papel importante para a separação dos vinhos T1, T2 e T3, em grupos bem distintos, como pode ser visto na **Figura 8A**.

Os ácidos com maior contribuição para o aroma dos vinhos Syrah foram: #17, #18, #19 e #23, pois apresentaram OAV > 1 (**Tabela 4**): ácido 3-metil butanóico (#17, OAV 42,3 em T1M1 a 57,5 em T3M3), ácido hexanóico (#18; OAV de 2,3 em T1M1 a 1,7 em T3M3), ácido octanóico (#19; OAV de 7,2 em T1M1 a 4,7 em T3M3) e ácido 9-decenóico (#23) (OAV de 1,1 em T1M1 a 1,2 em T3M1). De acordo com Mayr *et al.*<sup>182</sup>, os ácidos #17, #18 e #19 contribuem com aromas de doce e queijo, folha, madeira e verniz, manteiga e amêndoa, respectivamente para vinhos Syrah. O ácido nonanóico (#20) foi o único ácido que apresentou peso significativo em relação ao tempo de maceração (**Figura 8B**), apresentando uma diminuição na concentração média em vinhos macerados por períodos mais longos (M1 = 295 a M3 = 251  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). A presença dos ácidos nos vinhos está geralmente relacionada à odores desagradáveis, embora, em baixas concentrações, não tenham um efeito negativo direto no aroma e sabor do vinho. Suas concentrações durante a maceração podem diminuir devido à formação de ésteres e, durante a vinificação, também podem ser consumidas pelas leveduras como fonte de carbono.<sup>9</sup>



**Tabela 5:** Concentração dos compostos voláteis dos vinhos Syrah analisados por GC/MS e elaborados com uvas provenientes de diferentes estágios de maturação e macerados em períodos distintos durante a vinificação. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 - 120 DAP (21 °Brix) e T3 - 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20; e M3, 30 dias

Ésteres ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Nível de Maturação DAP: dias após a poda	Tempo de Maceração			Médias dos diferentes níveis de maturação (T1, T2 e T3) *
		10 dias - M1	20 dias - M2	30 dias - M3	
(#1) acetato de 3-metil butila	T1: 113 DAP	922 ± 7	433 ± 44		678
	T2: 120 DAP	763 ± 86	1022 ± 105	463 ± 55	749
	T3: 127 DAP	1451 ± 111	561 ± 17	263 ± 59	758
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1045	672	363	
(#2) butanoato de etila	T1	75 ± 12	76 ± 16		76
	T2	136 ± 20	320 ± 4	297 ± 92	251
	T3	198 ± 38	486 ± 107	501 ± 5	395
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	136	294	399	
(#3) hexanoato de etila	T1	786 ± 1	537 ± 25		662
	T2	271 ± 28	421 ± 29	182 ± 10	291
	T3	243 ± 10	212 ± 36	229 ± 37	228
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	433	390	206	
(#4) lactato de etila	T1	395 ± 2	425 ± 23		410
	T2	1348 ± 173	1983 ± 63	2957 ± 68	2096
	T3	457 ± 12	1471 ± 115	1370 ± 28	1099
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	733	1293	2164	
(#5) octanoato de etila	T1	2342 ± 54	1789 ± 36		2066
	T2	1121 ± 35	1252 ± 74	955 ± 34	1109
	T3	1133 ± 61	1006 ± 22	945 ± 82	1028

	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1532	1349	950	
(#6) decanoato de etila	T1	171 ± 28	107 ± 11		139
	T2	134 ± 14	88 ± 21	91 ± 23	104
	T3	131 ± 24	107 ± 21	122 ± 12,	120
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	145	101	107	
(#7) 3-metil butil octanoato	T1	44 ± 1	17 ± 3		31
	T2	10 ± 1	13 ± 2	10 ± 1	11
	T3	11 ± 1	10 ± 0	22 ± 1	14
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	22	13	16	
(#8) succinato de dietila	T1	865 ± 53	1219 ± 125		1042
	T2	3322 ± 228	2802 ± 286	2978 ± 283	3034
	T3	939 ± 38	2485 ± 6	7588 ± 336	3671
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) **	1709	2169	5283	
(#9) acetato de 2-fenil etanol	T1	211 ± 41	66 ± 9		139
	T2	69 ± 2	80 ± 3	89 ± 9	79
	T3	59 ± 2	70 ± 9	77 ± 13	69
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	113	72	83	
(#10) 9-decenoato de etila	T1	43 ± 1	6 ± 0		25
	T2	11 ± 2	7 ± 2	14 ± 1	11
	T3	48 ± 4	25 ± 1	42 ± 1	38
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	34	13	28	
(#11) tetradecanoato de etila	T1	13 ± 2	25 ± 2		19
	T2	17 ± 1	12 ± 1	9 ± 1	13
	T3	10 ± 1	211 ± 1	531 ± 1	251
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	13	83	270	

(#12) hexadecanoato de etila	T1	6 ± 1	17 ± 2		12
	T2	14 ± 1	18 ± 2	29 ± 1	20
	T3	32 ± 2	13 ± 2	20 ± 1	22
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	17	16	25	
(#13) Total de ésteres	<b>T1</b>	<b>5874 ± 42</b>	<b>4718 ± 218</b>		<b>5296</b>
	<b>T2</b>	<b>7215 ± 77</b>	<b>8017 ± 209</b>	<b>8074 ± 171</b>	<b>7769</b>
	<b>T3</b>	<b>4712 ± 201</b>	<b>6657 ± 103</b>	<b>11710 ± 436</b>	<b>7693</b>
	<b>Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *</b>	<b>5934</b>	<b>6464</b>	<b>9892</b>	
<b>Ácidos (µg L<sup>-1</sup>)</b>					
(#14) ácido acético	T1: 113 DAP	355 ± 39	252 ± 67		304
	T2: 120 DAP	468 ± 61	495 ± 97	542 ± 37	502
	T3: 127 DAP	369 ± 49	331 ± 70	266 ± 42	322
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	397	359	404	
(#15) ácido 2-metil propanóico	T1	186 ± 1	181 ± 7		184
	T2	475 ± 21	438 ± 10	441 ± 13	451
	T3	140 ± 6	162 ± 3	165 ± 6	156
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	267	260	303	
(#16) ácido butanóico	T1	126 ± 3	126 ± 28		126
	T2	116 ± 8	151 ± 16	130 ± 31	132
	T3	126 ± 10	181 ± 31	167 ± 6	158
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) **	123	153	149	
(#17) ácido 3-metil butanóico	T1	1395 ± 4	1377 ± 57		1386
	T2	1833 ± 348	1796 ± 6	1893 ± 172	1841
	T3	1648 ± 53	1654 ± 20	1897 ± 112	1733
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1625	1609	1895	

(#18) ácido hexanóico	T1	958 ± 1	865 ± 60		912
	T2	562 ± 14	565 ± 20	510 ± 57	546
	T3	604 ± 13	620 ± 13	719 ± 60	648
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	708	683	615	
(#19) ácido octanóico	T1	3603 ± 166	3483 ± 449		3543
	T2	2274 ± 137	2137 ± 196	1914 ± 180	2108
	T3	2257 ± 70	1890 ± 101	2326 ± 367	2158
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	2711	2503	2120	
(#20) ácido nonanóico	T1	314 ± 64	169 ± 9		242
	T2	295 ± 39	146 ± 21	193 ± 30	211
	T3	275 ± 77	130 ± 32	308 ± 69	238
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	295	148	251	
(#21) ácido decanóico	T1	340 ± 23	473 ± 73		407
	T2	148 ± 23	108 ± 4	84 ± 10	113
	T3	102 ± 7	74 ± 12	91 ± 15	89
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	197	218	88	
(#22) ácido dodecanóico	T1	152 ± 1	127 ± 9		140
	T2	99 ± 15	123 ± 11	83 ± 10	102
	T3	66 ± 4	89 ± 3	76 ± 3	77
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	106	113	80	
(#23) ácido 9-decenóico	T1	44 ± 1	22 ± 4		33
	T2	12 ± 1	20 ± 3	13 ± 1	15
	T3	48 ± 4	25 ± 1	43 ± 1	39
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	35	22	28	
<b>T1</b>		<b>7472 ± 162</b>	<b>7075 ± 636</b>		<b>7274</b>

<b>(#24) Total de ácidos</b>	<b>T2</b>	<b>6282 ± 245</b>	<b>5978 ± 214</b>	<b>5804 ± 455</b>	<b>6021</b>
	<b>T3</b>	<b>5636 ± 124</b>	<b>5155 ± 32</b>	<b>6058 ± 336</b>	<b>5616</b>
	<b>Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *</b>	<b>6463</b>	<b>6069</b>	<b>5931</b>	
<b>Alcoois (µg L<sup>-1</sup>)</b>					
<b>(#25) 3-metil, 1-butanol</b>	T1	59031 ± 3983	90670 ± 5337		74851
	T2	76272 ± 12848	94511 ± 6681	105794 ±	92192
	T3	63985 ± 4000	84333 ± 2045	1882 ± 6	49506
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	66429	89838	52997	
<b>(#26) (Z)-3-hexen-1-ol</b>	T1	250 ± 33	425 ± 29		338
	T2	193 ± 7	286 ± 7	286 ± 3	255
	T3	128 ± 3	175 ± 8	188 ± 30	164
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	190	295	237	
<b>(#27) 1-octanol</b>	T1	137 ± 14	259 ± 27		198
	T2	219 ± 16	273 ± 26	275 ± 18	256
	T3	196 ± 29	251 ± 6	232 ± 7	226
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	184	261	254	
<b>(#28) 1-nonanol</b>	T1	53 ± 1	218 ± 53		136
	T2	139 ± 30	175 ± 15	209 ± 25	174
	T3	110 ± 27	158 ± 17	159 ± 3	142
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	101	184	184	
<b>(#29) álcool benzílico</b>	T1	47 ± 8	100 ± 8		74
	T2	139 ± 8	214 ± 8	263 ± 28	205
	T3	87 ± 14	168 ± 26	210 ± 33	155
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	91	161	237	
	T1	21049 ± 2357	31258 ± 3544		26154

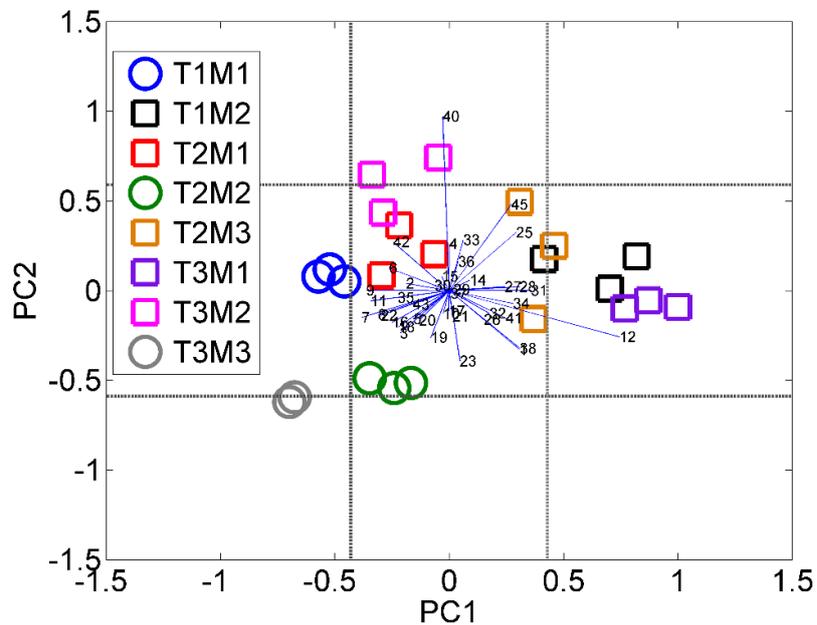
(#30) 2-fenil etanol	T2	32271 ± 2070	41766 ± 2132	44658 ± 972	39565
	T3	31619 ± 1321	45882 ± 8492	53654 ± 1583	43718
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	28313	39365	49156	
	T1	140 ± 31	193 ± 17		167
(#31) 1-dodecanol	T2	351 ± 29	267 ± 78	303 ± 51	307
	T3	366 ± 28	255 ± 74	210 ± 33	277
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	286	238	257	
	T1	47 ± 2	71 ± 6		59
(#32) 4-metil, 1-pentanol	T2	19 ± 1	32 ± 3	31 ± 2	27
	T3	26 ± 2	31 ± 1	22 ± 1	26
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	31	45	27	
	T1	49 ± 1	95 ± 1		72
(#33) 3-metil, 1-pentanol	T2	62 ± 6	99 ± 5	199 ± 5	120
	T3	127 ± 5	211 ± 2	215 ± 16	184
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	79	135	207	
	T1	1219 ± 96	2745 ± 138		1982
(#34) 1-hexanol	T2	1578 ± 23	2435 ± 150	2768 ± 78	2260
	T3	1706 ± 33	2239 ± 99	2511 ± 158	2152
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	1501	2473	2640	
	T1	25 ± 2	7 ± 1		16
(#35) 1-butanol	T2	60 ± 6	99 ± 1	83 ± 11	81
	T3	65 ± 8	110 ± 2	152 ± 10	109
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	50	72	118	
	T1	173 ± 13	284 ± 47		229
(#36) 2,3-butanodiol	T2	784 ± 16	1170 ± 1	4433 ± 227	2129

	T3	290 ± 34	1253 ± 172	3144 ± 390	1562
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	416	902	3789	
(#37) 1,3-butanodiol	T1	479 ± 51	542 ± 45		511
	T2	1055 ± 126	1326 ± 57	1623 ± 160	1335
	T3	795 ± 141	993 ± 4	1495 ± 19	1094
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	776	954	1559	
(#38) 1-hexadecanol	T1	25 ± 1	53 ± 5		39
	T2	46 ± 7	62 ± 2	85 ± 2	64
	T3	48 ± 10	26 ± 2	82 ± 2	52
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	40	47	84	
(#39) Total de álcoois	<b>T1</b>	<b>82726 ± 6462</b>	<b>126920 ± 7976</b>		<b>104823</b>
	<b>T2</b>	<b>113189 ± 12949</b>	<b>142714 ± 8054</b>	<b>161010 ± 499</b>	<b>138971</b>
	<b>T3</b>	<b>99549 ± 4744</b>	<b>136086 ± 7966</b>	<b>62473 ± 2083</b>	<b>99369</b>
	<b>Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *</b>	<b>98488</b>	<b>135240</b>	<b>111742</b>	
<b>Terpenos (µg L<sup>-1</sup>)</b>					
(#40) linalol	T1	9 ± 1	10 ± 1		10
	T2	15 ± 3	11 ± 1	17 ± 5	14
	T3	14 ± 1	19 ± 2	13 ± 1	15
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	13	13	15	
(#41) geraniol	T1	6 ± 1	7 ± 1		7
	T2	7 ± 1	11 ± 1	12 ± 1	10
	T3	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	8	10	12	
	T1	11 ± 1	11 ± 1		11

(#42) ( <i>E</i> )-nerolidol	T2	12 ± 1	16 ± 1	19 ± 1	16
	T3	15 ± 1	30 ± 1	29 ± 1	25
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	13	19	24	
	T1	10 ± 0	10 ± 1		10
(#43) citronelol	T2	13 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	11
	T3	10 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	10
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	11	10	11	
	<b>T1</b>	<b>36 ± 1</b>	<b>38 ± 0</b>		<b>37</b>
<b>(#44) Total de terpenos</b>	<b>T2</b>	<b>46 ± 1</b>	<b>48 ± 2</b>	<b>58 ± 6</b>	<b>51</b>
	<b>T3</b>	<b>50 ± 1</b>	<b>70 ± 1</b>	<b>64 ± 1</b>	<b>61</b>
	<b>Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *</b>	<b>44</b>	<b>52</b>	<b>61</b>	
	T1	189 ± 6	202 ± 3		196
(#45) 3-(metiltio)-1-propanol	T2	199 ± 11	167 ± 19	305 ± 9	224
	T3	210 ± 25	221 ± 28	215 ± 16	215
	Médias dos diferentes tempos de maceração (M1, M2 e M3) *	199	197	260	

Os dados são expressos como os valores médios das três repetições experimentais ± desvio padrão (RSD). Todos os compostos foram incluídos na ANOVA - PCA, exceto a soma das concentrações de cada subclasse de compostos.

A **Figura 9** mostra o biplot da interação dos fatores T versus M. A principal contribuição da interação dos dois fatores é observada em termos de redução da concentração de compostos voláteis, como linalol (#40) e hexadecanoato de etila (#12) em amostras de vinho que apresentaram os mesmos níveis de ambos os fatores [T1M1 (círculos azuis na **Figura 9**), T2M2 (círculos verdes) e T3M3 (círculos cinzas) ]. Os compostos #40 e #12 aparecem distantes dos pesos vetoriais (**Figura 9**), mas nos experimentos onde a maturação e a maceração corresponderam a níveis cruzados (T1M2, T2M1, T2M3, T3M1, T3M2), suas concentrações aumentaram nos vinhos, de modo que é possível supor que o cruzamento dos níveis dos fatores traga uma compensação, causando assim o aumento das suas concentrações.



**Figura 9:** Biplot para os compostos voláteis dos vinhos Syrah por meio da ANOVA - PCA para a interação entre os fatores maturação (T) e maceração (M). Os pesos que excedem as linhas pontilhadas horizontais e verticais são estatisticamente significativos.

## PARTE 2

### 4.2 ANÁLISE DO PERFIL VOLÁTIL DOS VINHOS SYRAR POR MEIO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS COMBINADAS

#### 4.2.1 Influência das diferentes combinações do grau de maturação e tempo de maceração das uvas no perfil volátil avaliado por GC×GC/TOFMS

A **Tabela 6** lista 145 compostos de acordo com sua classe química, que foram identificados positiva ou tentativamente nos vinhos Syrah (de T1M1 a T3M3) por GC×GC/TOFMS (os critérios de processamento de dados e a identificação de compostos foram descritas no item 3.4.6). A **Tabela A1** do anexo mostra os tempos de retenção e os LTPRI experimental e referidos na literatura. Trinta e quatro voláteis foram identificados positivamente através da injeção de soluções padrão na GC×GC/TOFMS, dentre os quais tem-se nove ésteres, oito álcoois, cinco terpenos e cinco ácidos. Estes compostos foram escolhidos com base em sua importância para o aroma dos vinhos, de acordo com trabalhos publicados na literatura<sup>185</sup>, e estão marcados na **Tabela 6** com a letra “a” entre parênteses “()”.

Dentre todos os grupos químicos encontrados no conteúdo volátil dos vinhos, os ésteres apresentaram-se em maior número (46), seguido dos álcoois (31), terpenos (19), ácidos (14), aldeídos (10), lactonas (7), compostos sulfurados (7), cetonas (5), furanos (4) e fenóis (2). A presença predominante de ésteres e álcoois já foi observada em dois vinhos Syrah da Austrália, em estudo realizado através das análises de GC-O-AEDA e GC/MS, que considerou apenas os principais compostos odoríferos que contribuíram positivamente para o aroma do vinho.<sup>182</sup> Suklje *et al.*<sup>135</sup> investigaram as mudanças na composição da uva e do vinho australiano, usando bagas de uva Syrah murchas e não murchas colhidas em três diferentes pontos de maturação, bem como o perfil volátil dos vinhos produzidos a partir dessas mesmas bagas pela técnica de GC/MS. Embora o foco do trabalho relatado pelos autores fosse diferente do nosso, eles também observaram a presença predominante dos ésteres e álcoois no perfil volátil dos vinhos feitos de uvas Syrah murchas e não murchas. Em outro trabalho deste mesmo grupo de pesquisa, mudanças no perfil volátil do vinho Syrah elaborado a partir de uvas colhidas em datas de colheita sequenciais, em quatro vinhedos dentro do mesmo mesoclima quente foram estudadas, usando HS-SPME-GC×GC/TOFMS.<sup>186</sup>

A razão de Fisher foi calculada a partir dos 145 compostos voláteis determinados por GC×GC/TOFMS nos vinhos Syrah elaborados a partir de uvas colhidas em diferentes graus de

maturação (T1, T2 e T3) e macerados por diferentes períodos (10, 20 e 30 dias). Quanto maior é o valor da razão de Fisher, maior é a contribuição daquele dado composto na separação das amostras dos diferentes tratamentos e tempos de maceração, conforme mostrado na **Tabela 6**. Esta abordagem foi aplicada com sucesso na diferenciação de outros tipos de vinho em estudos anteriores<sup>185,187</sup> e foi utilizada para garantir que todos os voláteis responsáveis pela diferenciação dos vinhos, de acordo com as variáveis estudadas, fossem considerados na etapa de quantificação.

Este parâmetro indicou os 29 compostos voláteis que apresentaram maior razão de Fisher, que estão apresentados a seguir, em ordem decrescente (letras e números entre parênteses, logo após o nome do composto, indicam o posicionamento destes voláteis na **Tabela 6**): carvona (#LXIX), 3-(metiltio)-propionato de etila (#LXXIV), 2-pentanol (#XLII), (Z)-3-hexen-1-ol (#26), ácido decanóico (#21), acetato de 3-hexen-1-ol (#XII), 1-(2-furanyl) etanona (#CII), 2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona (#LXXII), 2-hidróxi benzoato de etila (#XXVII), 4-hepten-1-ol (#LIII), ácido octanóico (#19), nerolidol (#42), 1-octanol (#27), 2-furancarboxilato de etila (#CIII), 2-hidróxi-4-metil pentanoato de etila (#XVIII), 1-nonanol (#28), dodecanoato de etila (#XXVIII), metiltio acetato (#LXXI), cinamato de etila (#XXXI), 2-hexen-1-ol (#XLVIII), 5-etóxidihidro-2(3H)-furanona (#XCIII), decanoato de etila (#6), 3-penten-2-one (#LXXXIX), 2-penten-1-ol (#XLVII), dodecanoato de metila (#XXVI),  $\alpha$ -terpineol (#LXVIII), acetato de hexila (#IX), acetofenona (#XCI) e glutarato de dietila (#XXV). Estes compostos mostraram uma razão de Fisher correspondente a pelo menos 5% da razão Fisher do composto mais discriminante (carvona; #LXIX, razão Fisher: 1132487).

**Tabela 6:** Área relativa e razão de Fisher dos compostos voláteis dos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três diferentes graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante três períodos diferentes (M1: 10 dias, M2: 20 dias e M3: 30 dias), resultando nas combinações T1M1, T1M2, T2M1, T2M2, T2M3, T3M1, T3M2 e T3M3. As condições HS-SPME-GC×GC/TOFMS estão descritas nos itens 3.4.2 e 3.4.5. Os índices de retenção experimentais e da literatura são definidos na **Tabela A1**

Compostos	T1M1	T1M2	T2M1	T2M2	T2M3	T3M1	T3M2	T3M3	Fisher	Fisher (%) <sup>a</sup>
<i>Ésteres</i>										
I acetato de etila	5,870	6,299	7,667	5,149	9,086	9,225	2,146	9,511	4064	0,4
II propanoato de etila	0,106	0,074	0,046	0,066	0,044	0,091	0,129	0,138	18744	1,7
1 acetato de 3-metil butila	1,492	0,882	0,897	0,557	0,469	1,227	0,159	0,712	15265	1,3
2 butanoato de etila (a)	0,371	0,228	0,205	0,197	0,148	0,446	0,050	0,339	8581	0,8
III 2-metil etil butirato (Co 1)	0,070	0,048	0,024	0,052	0,029	0,050	0,011	0,043	17830	1,6
IV isopentanoato de etila (a)	0,077	0,046	0,024	0,048	0,029	0,052	0,011	0,043	18008	1,6
V acetato de 2-metil propila (a)	0,038	0,022	0,016	0,018	0,013	0,031	0,005	0,025	8458	0,7
VI but-2-enoato de etila	0,036	0,009	0,015	0,027	0,011	0,024	0,005	0,022	40523	3,6
VII hexanoato de metila	0,010	0,011	0,004	0,006	0,003	0,007	0,005	0,005	20765	1,8
3 hexanoato de etila (a)	2,229	1,641	1,236	1,866	1,151	1,724	0,357	2,422	4618	0,4
VIII butanoato de isoamila	0,002	0,003	0,002	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002	3147	0,3
<b>IX acetato de hexila (a)</b>	<b>0,035</b>	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,008</b>	<b>0,005</b>	<b>0,014</b>	<b>0,002</b>	<b>0,009</b>	<b>61479</b>	<b>5,4</b>
X 2-oxopropanoato de etila (Co 3)	0,015	0,004	0,008	0,021	0,008	0,011	0,010	0,009	21863	1,9
XI hex-3-enoato de etila	0,003	0,000	0,008	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	10775	1,0
<b>XII acetato de 3-hexen-1-ol</b>	<b>0,009</b>	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	<b>180560</b>	<b>15,9</b>
XIII heptanoato de etila (Co 4)	0,003	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	6705	0,6
4 lactato de etila (Co 4)	15,547	16,203	17,218	13,763	16,590	13,350	15,273	14,162	658	0,1
XIV 2-hexenoato de etila	0,006	0,006	0,011	0,005	0,004	0,010	0,006	0,007	3741	0,3
XV 2-hidróxi-3-metil butanoato de etila	0,018	0,024	0,033	0,021	0,019	0,028	0,015	0,029	2922	0,3
5 octanoato de etila (a)	4,954	3,132	2,476	4,551	1,945	3,006	0,630	3,241	17768	1,6
<b>6 decanoato de etila (a) (Co 7)</b>	<b>1,063</b>	<b>2,838</b>	<b>1,568</b>	<b>0,611</b>	<b>0,149</b>	<b>0,289</b>	<b>0,066</b>	<b>0,256</b>	<b>68553</b>	<b>6,1</b>
7 3-metil butil octanoato	0,024	0,009	0,027	0,019	0,004	0,006	0,003	0,005	17525	1,5
XVI 3-hidróxi butirato de etila	0,046	0,048	0,007	0,051	0,039	0,038	0,043	0,049	40039	3,5

XVII	nonanoato de etila	0,005	0,002	0,001	0,004	0,004	0,003	0,002	0,003	18634	1,6
<b>XVIII</b>	<b>2-hidróxi-4-metil pentanoato de etila (Co 6)</b>	<b>0,002</b>	<b>0,263</b>	<b>0,005</b>	<b>0,253</b>	<b>0,181</b>	<b>0,185</b>	<b>0,269</b>	<b>0,151</b>	<b>86685</b>	<b>7,7</b>
XIX	lactato de isoamila	1,376	0,864	0,004	1,163	0,675	0,442	0,859	0,388	39099	3,5
XX	propanodioato de dietila	0,003	0,002	0,003	0,004	0,002	0,002	0,003	0,003	6312	0,6
XXI	decanoato de metila	0,004	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	22731	2,0
XXII	succinato de etil metila (Co 7)	0,009	0,036	0,023	0,021	0,024	0,028	0,031	0,029	11288	1,0
XXIII	hexanoato de isoamila (Co 8)	0,027	0,008	0,033	0,017	0,004	0,010	0,004	0,006	21492	1,9
XXIV	benzoato de etila	0,019	0,017	0,030	0,017	0,012	0,015	0,012	0,015	17955	1,6
8	succinato de dietila (a)	3,297	3,780	3,982	16,049	18,822	17,615	13,823	20,346	12366	1,1
9	acetato de 2-fenil etanol (a) (Co 11)	0,046	0,034	0,058	0,559	0,463	0,557	0,574	0,407	49677	4,4
10	9-decenoato de etila	0,080	0,072	0,023	0,005	0,003	0,018	0,002	0,002	27754	2,5
<b>XXV</b>	<b>glutarato de dietila</b>	<b>0,005</b>	<b>0,007</b>	<b>0,003</b>	<b>0,127</b>	<b>0,057</b>	<b>0,071</b>	<b>0,095</b>	<b>0,072</b>	<b>57795</b>	<b>5,1</b>
<b>XXVI</b>	<b>dodecanoato de metila</b>	<b>0,041</b>	<b>0,017</b>	<b>0,007</b>	<b>0,036</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,016</b>	<b>0,008</b>	<b>64325</b>	<b>5,7</b>
<b>XXVII</b>	<b>2-hidróxi benzoato de etila</b>	<b>0,022</b>	<b>0,017</b>	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>118252</b>	<b>10,4</b>
<b>XXVIII</b>	<b>dodecanoato de etila (a)</b>	<b>0,006</b>	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>77895</b>	<b>6,9</b>
XXIX	2-metil propanoato de 2-fenil etila	0,003	0,002	0,002	0,003	0,001	0,001	0,002	0,002	5340	0,5
XXX	hexanodioato de dietila	1,356	1,221	0,735	0,839	0,504	0,762	1,046	0,805	3848	0,3
11	tetradecanoato de etila	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	4086	0,4
<b>XXXI</b>	<b>cinamato de etila</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,000</b>	<b>72235</b>	<b>6,4</b>
XXXII	hexadecanoato de metila	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	7107	0,6
12	hexadecanoato de etila	0,016	0,016	0,005	0,009	0,009	0,012	0,009	0,014	5487	0,5
XXXIII	octanoato de 2-fenil etanol (Co 15)	0,008	0,007	0,003	0,008	0,004	0,003	0,005	0,003	38489	3,4
XXXIV	succinato de monoetila	1,693	2,951	2,308	0,065	0,174	0,067	0,277	0,187	40634	3,6
	<b>Ácidos</b>										
14	ácido acético	3,424	5,749	5,432	3,606	6,098	5,767	6,369	7,220	12287	1,1
XXXV	ácido fórmico	0,095	0,103	0,053	0,015	0,026	0,163	0,153	0,137	19579	1,7
XXXVI	ácido propanóico (Co 6)	0,012	0,012	0,011	0,013	0,013	0,016	0,013	0,021	1190	0,1
15	ácido 2-metil propanóico (a)	0,205	0,303	0,197	0,252	0,284	0,199	0,311	0,269	8349	0,7
16	ácido butanóico	0,202	0,205	0,169	0,204	0,190	0,188	0,185	0,215	1578	0,1

17	ácido 3-metil butanóico (a) (Co 9)	0,528	0,628	0,405	0,587	0,559	0,421	0,641	0,441	8338	0,7
18	ácido hexanóico (a) (Co 12)	4,069	3,000	2,136	4,143	2,373	2,120	2,755	2,200	17399	1,5
XXXVII	2-etil, ácido capróico (Co 14)	0,013	0,016	0,009	0,016	0,015	0,006	0,033	0,010	17670	1,6
<b>19</b>	<b>ácido octanóico (a)</b>	<b>9,370</b>	<b>5,575</b>	<b>3,316</b>	<b>9,766</b>	<b>3,874</b>	<b>10,805</b>	<b>4,677</b>	<b>3,344</b>	<b>101218</b>	<b>8,9</b>
20	ácido nonanóico (a)	0,033	0,035	0,017	0,009	0,026	0,016	0,067	0,019	22814	2,0
<b>21</b>	<b>ácido decanóico (a)</b>	<b>1,565</b>	<b>0,704</b>	<b>0,352</b>	<b>1,674</b>	<b>0,437</b>	<b>0,276</b>	<b>0,706</b>	<b>0,391</b>	<b>192221</b>	<b>17,0</b>
22	ácido dodecanóico (a)	0,007	0,007	0,006	0,007	0,008	0,006	0,008	0,007	5300	0,5
23	ácido 9-decenóico	0,030	0,027	0,009	0,011	0,009	0,008	0,006	0,008	6333	0,6
XXXVIII	ácido benzenocarboxílico	0,020	0,021	0,019	0,018	0,025	0,020	0,020	0,025	902	0,1
	<i>Álcoois</i>										
XXXIX	1-propanol (a)	0,096	0,125	0,133	0,222	0,244	0,297	0,274	0,269	28	0,0
XL	3-metil, 2-butanol	0,034	0,301	0,448	0,066	0,134	0,200	0,160	0,250	27774	2,5
XLI	2-metil, 1-propanol	0,577	0,484	0,384	0,452	0,328	0,332	0,284	0,538	5965	0,5
<b>XLII</b>	<b>2-pentanol</b>	<b>0,011</b>	<b>0,010</b>	<b>0,000</b>	<b>0,080</b>	<b>0,009</b>	<b>0,011</b>	<b>0,010</b>	<b>0,009</b>	<b>669747</b>	<b>59,1</b>
XLIII	2-metil, 1-butanol	0,060	0,031	0,508	4,023	8,510	5,462	7,703	1,727	15900	1,4
25	3-metil, 1-butanol (a)	10,463	10,408	12,014	8,004	8,401	5,295	5,980	7,386	6538	0,6
XLIV	3-metil, 3-buten-1-ol	0,032	0,011	0,032	0,024	0,012	0,013	0,010	0,019	5241	0,5
XLV	1-pentanol (Co 2)	0,051	0,051	0,058	0,054	0,024	0,025	0,044	0,043	4260	0,4
XLVI	2-heptanol	0,045	0,036	0,002	0,037	0,027	0,041	0,031	0,038	13021	1,1
<b>XLVII</b>	<b>2-penten-1-ol</b>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,019</b>	<b>0,007</b>	<b>0,006</b>	<b>0,012</b>	<b>0,009</b>	<b>66233</b>	<b>5,8</b>
<b>26</b>	<b>(Z)-3-hexen-1-ol</b>	<b>0,332</b>	<b>0,171</b>	<b>0,120</b>	<b>0,020</b>	<b>0,010</b>	<b>0,012</b>	<b>0,011</b>	<b>0,013</b>	<b>244846</b>	<b>21,6</b>
<b>XLVIII</b>	<b>2-hexen-1-ol (a)</b>	<b>0,141</b>	<b>0,080</b>	<b>0,259</b>	<b>0,081</b>	<b>0,078</b>	<b>0,097</b>	<b>0,081</b>	<b>0,063</b>	<b>70985</b>	<b>6,3</b>
XLIX	2-octanol	0,025	0,016	0,026	0,033	0,014	0,018	0,021	0,017	7027	0,6
L	1-heptanol	0,034	0,035	0,020	0,050	0,023	0,028	0,033	0,034	26565	2,3
LI	6-metil, 5-hepten-2-ol	0,002	0,002	0,010	0,008	0,009	0,010	0,011	0,017	34760	3,1
LII	2-etil, 1-hexanol	0,030	0,029	0,031	0,075	0,036	0,030	0,035	0,041	22124	2,0
<b>LIII</b>	<b>4-hepten-1-ol</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>109746</b>	<b>9,7</b>
<b>27</b>	<b>1-octanol</b>	<b>0,250</b>	<b>0,065</b>	<b>0,065</b>	<b>0,138</b>	<b>0,046</b>	<b>0,082</b>	<b>0,068</b>	<b>0,065</b>	<b>97644</b>	<b>8,6</b>
<b>28</b>	<b>1-nonanol (a)</b>	<b>0,021</b>	<b>0,018</b>	<b>0,062</b>	<b>0,035</b>	<b>0,016</b>	<b>0,021</b>	<b>0,021</b>	<b>0,023</b>	<b>84664</b>	<b>7,5</b>
29	álcool benzílico (a)	0,114	0,112	0,141	0,091	0,099	0,148	0,143	0,137	7232	0,6
30	2-fenil etanol (a) (Co 13)	20,281	21,192	26,536	10,990	9,196	8,140	12,607	8,848	18352	1,6

31	1-dodecanol (a)	0,014	0,006	0,026	0,004	0,005	0,005	0,006	0,005	56031	4,9
32	4-metil, 1-pentanol	0,009	0,025	0,025	0,048	0,022	0,034	0,025	0,035	22329	2,0
33	3-metil, 1-pentanol	0,066	0,054	0,054	0,076	0,045	0,070	0,051	0,079	14228	1,3
34	1-hexanol (a)	1,717	1,593	1,618	1,936	1,319	1,830	1,956	2,034	2523	0,2
35	1-butanol	0,098	0,137	0,150	0,080	0,009	0,121	0,111	0,091	25141	2,2
36	2,3-butanodiol	3,014	6,056	4,588	3,277	4,658	5,372	6,256	7,444	9409	0,8
37	1,3-butanodiol	0,084	0,180	0,004	0,084	0,162	0,189	0,261	0,380	18068	1,6
LIV	2-undecanol (Co 10)	0,011	0,008	0,005	0,009	0,003	0,007	0,005	0,006	17331	1,5
LV	undecanol	0,000	0,006	0,017	0,036	0,005	0,023	0,000	0,022	16601	1,5
38	1-hexadecanol (Co 15)	0,001	0,001	0,005	0,006	0,003	0,000	0,003	0,002	28537	2,5
<b>Terpenos</b>											
LVI	$\alpha$ -tujeno	0,013	0,005	0,004	0,011	0,011	0,008	0,008	0,007	6891	0,6
LVII	$\alpha$ -pineno	0,074	0,040	0,018	0,063	0,031	0,047	0,034	0,035	25364	2,2
LVIII	limoneno	1,111	0,045	0,014	0,959	0,345	0,798	0,793	0,717	30679	2,7
LIX	eucaliptol (a)	0,055	0,028	0,001	0,053	0,018	0,032	0,039	0,026	23258	2,1
LX	$\beta$ -ocimeno (Co 2)	0,006	0,011	0,007	1,033	0,385	0,502	0,488	0,533	39026	3,4
LXI	$\alpha$ -terpinoleno (Co 3)	0,127	0,058	0,031	0,107	0,037	0,068	0,074	0,055	15561	1,4
LXII	<i>p</i> -cimeno	0,054	0,029	0,004	0,058	0,025	0,036	0,038	0,034	24055	2,1
LXIII	cânfora (Co 5)	0,006	0,002	0,027	0,005	0,004	0,010	0,004	0,008	52669	4,7
40	linalol	0,045	0,047	0,037	0,044	0,037	0,057	0,051	0,045	2928	0,3
LXIV	terpinen-4-ol	0,035	0,018	0,013	0,038	0,014	0,020	0,030	0,019	30972	2,7
LXV	hotrienol	0,009	0,007	0,012	0,007	0,006	0,006	0,006	0,006	9901	0,9
LXVI	$\beta$ -farneseno (Co 8)	0,001	0,002	0,010	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	13508	1,2
LXVII	carvotanacetona (Co 9)	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4080	0,4
<b>LXVIII</b>	<b><math>\alpha</math>-terpineol (a)</b>	<b>0,067</b>	<b>0,063</b>	<b>0,136</b>	<b>0,007</b>	<b>0,003</b>	<b>0,003</b>	<b>0,079</b>	<b>0,038</b>	<b>62409</b>	<b>5,5</b>
<b>LXIX</b>	<b>carvona</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,046</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	<b>8,974</b>	<b>0,004</b>	<b>1132487</b>	<b>100</b>
LXX	$\beta$ -damascenona (a) (Co 11)	0,037	0,031	0,086	0,011	0,020	0,028	0,017	0,016	51434	4,5
41	geraniol (a) (Co 12)	0,012	0,015	0,013	0,008	0,011	0,013	0,015	0,013	3478	0,3
<b>42</b>	<b>(<i>E</i>)-nerolidol (a)</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>	<b>0,019</b>	<b>0,003</b>	<b>0,003</b>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>	<b>100753</b>	<b>8,9</b>
43	citronelol (a)	0,015	0,019	0,023	0,014	0,016	0,020	0,025	0,029	1973	0,2
<b>Sulfurados</b>											

<b>LXXI</b>	<b>metiltio acetato (Co 1)</b>	<b>0,052</b>	<b>0,027</b>	<b>0,084</b>	<b>0,014</b>	<b>0,006</b>	<b>0,019</b>	<b>0,003</b>	<b>0,022</b>	<b>72584</b>	<b>6,4</b>
<b>LXXII</b>	<b>2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona</b>	<b>0,033</b>	<b>0,023</b>	<b>0,015</b>	<b>0,032</b>	<b>0,015</b>	<b>0,012</b>	<b>0,016</b>	<b>0,014</b>	<b>130147</b>	<b>11,5</b>
LXXIII	2-(metiltio)-etanol	0,007	0,010	0,008	0,005	0,008	0,010	0,009	0,008	6241	0,6
<b>LXXIV</b>	<b>3-(metiltio)-propionato de etila</b>	<b>0,074</b>	<b>0,008</b>	<b>0,004</b>	<b>0,051</b>	<b>0,007</b>	<b>0,005</b>	<b>0,011</b>	<b>0,006</b>	<b>1046336</b>	<b>92,4</b>
LXXV	2-tiofenocarboxaldeído	0,020	0,009	0,010	0,014	0,007	0,005	0,014	0,010	18798	1,7
45	3-(metiltio)-1-propanol (Co 10)	0,063	0,062	0,007	0,058	0,070	0,054	0,074	0,056	6291	0,6
LXXVI	benzotiazol (Co 14)	0,017	0,010	0,068	0,007	0,005	0,097	0,113	0,098	24346	2,1
<b>Aldeídos</b>											
LXXVII	2-propenal	0,010	0,000	0,006	0,013	0,019	0,008	0,015	0,012	21680	1,9
LXXVIII	3-metil, butanal	0,041	0,047	0,078	0,026	0,042	0,054	0,051	0,000	34995	3,1
LXXIX	nonanal	0,008	0,005	0,029	0,005	0,003	0,003	0,005	0,004	18980	1,7
LXXX	decanal	0,007	0,002	0,002	0,006	0,005	0,004	0,007	0,004	6681	0,6
LXXXI	benzaldeído (a)	0,051	0,025	0,127	0,047	0,045	0,055	0,064	0,053	14641	1,3
LXXXII	$\beta$ -ciclocitral	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	4360	0,4
LXXXIII	benzenoacetaldeído	0,229	0,240	0,142	0,244	0,159	0,151	0,184	0,133	2690	0,2
LXXXIV	4-etil, benzaldeído	0,002	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,004	0,003	5346	0,5
LXXXV	dodecanal	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,003	0,002	3654	0,3
LXXXVI	3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	0,008	0,004	0,002	0,009	0,004	0,003	0,005	0,002	10457	0,9
<b>Cetonas</b>											
LXXXVII	2,3-butanodiona	0,005	0,008	0,006	0,002	0,006	0,012	0,006	0,005	9654	0,9
LXXXVIII	2,3-pentanodiona	0,003	0,009	0,011	0,003	0,011	0,006	0,007	0,008	17155	1,5
<b>LXXXIX</b>	<b>3-penten-2-ona</b>	<b>0,016</b>	<b>0,012</b>	<b>0,050</b>	<b>0,012</b>	<b>0,010</b>	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>	<b>0,021</b>	<b>66461</b>	<b>5,9</b>
XC	3-hidróxi-2-butanona	0,023	0,045	0,097	0,026	0,027	0,027	0,000	0,000	22109	2,0
<b>XCI</b>	<b>acetofenona</b>	<b>0,007</b>	<b>0,012</b>	<b>0,058</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,029</b>	<b>0,063</b>	<b>0,033</b>	<b>58446</b>	<b>5,2</b>
<b>Lactonas</b>											
XCII	$\gamma$ -butirolactona	0,198	0,326	0,334	0,153	0,327	0,264	0,356	0,361	17055	1,5
<b>XCIII</b>	<b>5-etóxidihidro-2(3H)-furanona</b>	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,007</b>	<b>0,002</b>	<b>0,007</b>	<b>0,006</b>	<b>68930</b>	<b>6,1</b>
XCIV	$\gamma$ -croto lactona (a)	0,003	0,005	0,005	0,002	0,006	0,003	0,007	0,003	8561	0,8
XCV	$\gamma$ -octalactona (Co 13)	0,027	0,014	0,015	0,027	0,013	0,015	0,019	0,012	8434	0,7
XCVI	$\gamma$ -nonalactona	0,011	0,015	0,009	0,008	0,010	0,008	0,014	0,010	8905	0,8

XCVII	pantolactona	0,005	0,007	0,007	0,004	0,005	0,004	0,010	0,005	23497	2,1
XCVIII	5-hexildihidro-2(3H)-furanona	0,005	0,004	0,002	0,007	0,002	0,002	0,002	0,002	24384	2,2
<i>Fenóis</i>											
XCIX	2-metóxi-4-vinilfenol	0,010	0,026	0,004	0,002	0,021	0,019	0,002	0,027	30036	2,7
C	2,4-bis-(1,1-dimetiletil)-fenol	0,005	0,009	0,002	0,014	0,013	0,008	0,007	0,004	9800	0,9
<i>Furanos</i>											
CI	2-pentil-furano	0,005	0,011	0,012	0,005	0,004	0,008	0,012	0,005	13076	1,2
<b>CII</b>	<b>1-(2-furanil)-etanona (Co 5)</b>	<b>0,009</b>	<b>0,013</b>	<b>0,026</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,008</b>	<b>144720</b>	<b>12,8</b>
<b>CIII</b>	<b>2-furancarboxilato de etila</b>	<b>0,121</b>	<b>0,062</b>	<b>0,029</b>	<b>0,130</b>	<b>0,040</b>	<b>0,030</b>	<b>0,055</b>	<b>0,027</b>	<b>94686</b>	<b>8,4</b>
CIV	2-furan metanol (a)	0,004	0,006	0,006	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	18081	1,6

a. composto positivamente identificado.

b As coeluições (Co) foram numeradas de 1 a 15 e esses números são escritos entre parênteses após o nome do composto. Sempre que os compostos são seguidos pelo mesmo número, eles são coeluídos em <sup>1</sup>D.

c O maior valor do coeficiente de Fisher é definido como 100% e os demais correspondem a x%, sendo que os compostos com valores acima de 5% estão em negrito. Estes compostos foram utilizados na Análise de Componentes Principais (PCA).

A **Tabela 7** apresenta os parâmetros de mérito do método analítico quantitativo. O menor LOD ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e LOQ ( $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram encontrados para o 1-nonanol, enquanto o maior valor de LOD ( $9,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e LOQ ( $29,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram verificados para o ácido hexanóico. O RSD dos ensaios de repetibilidade e precisão foi inferior a 13,3 e 14,7%, respectivamente, e a recuperação média para os compostos apresentados foi de 99%. O *bias* incluído no modelo pode ser considerado não significativo, já que o valor do t calculado é menor que o seu valor crítico para 2 graus de liberdade com 95% de confiança, conforme a norma E1655-00 da ASTM.<sup>117</sup>

A **Tabela 8** apresenta a concentração dos 29 compostos indicados pela razão Fisher como os mais importantes para diferenciar os vinhos Syrah. Dentre os 29 voláteis, 7 compostos foram encontrados em níveis menores que o LOQ do método para todas as amostras, são eles: 4-hepten-1-ol (#LIII,  $< 4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), 1-nonanol (#28,  $< 1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), dodecanoato de etila (#XXVIII,  $< 5,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), cinamato de etila (#XXXI,  $< 5,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), 5-etóxidihidro-2(3H)-furanona (#XCIII,  $< 4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), 3-penten-2-ona (#LXXXIX,  $< 4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e 2-penten-1-ol (#XLVII,  $< 1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Além disso, o ácido octanóico (#19) foi encontrado acima da maior concentração utilizada nas curvas analíticas ( $> 270 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Portanto, esses compostos não foram usados para realizar a PCA. No entanto, o ácido octanóico foi apontado como um dos principais ácidos dos vinhos Syrah analisados por GC/MS, conforme discutido anteriormente.

Entre os 29 compostos, sete também foram detectados por GC/MS: (Z)-3-hexen-1-ol (#26), ácido decanóico (#21), ácido octanóico (#19), (E)-nerolidol (#42), 1-octanol (#27), 1-nonanol (#28) e decanoato de etila (#6). O (Z)-3-hexen-1-ol (#26) e o ácido decanóico (#21) foram apontados como compostos importantes nos vinhos Syrah produzidos a partir de uvas menos maduras, analisados por GC/MS. O decanoato de etila não foi destacado quando a GC/MS foi empregada juntamente com a ANOVA - PCA. Além disso, quando a GC×GC foi usada, sua coeluição (abreviada como “Co” no texto e nas tabelas e figuras) com o succinato de etil metila (XXII) na <sup>1</sup>D mostra que sua contribuição cromatográfica no vinho foi influenciada pela presença de outro composto. Todas as coeluições cromatográficas foram numeradas de 1 a 15 e os compostos envolvidos em cada uma delas são designados entre parênteses como "Cox" após o nome do composto nas **Tabelas 6, A1 e 10**, onde x é o número da coeluição.

Todos os outros compostos apontados como importantes pela razão de Fisher não foram detectados quando a GC/MS foi empregada e isso pode ser atribuído à coeluições de compostos e/ou a uma sensibilidade mais baixa da técnica monodimensional, levando em consideração

que a GC×GC geralmente fornece maior eficiência de separação e a modulação criogênica resulta em maior sensibilidade para a detecção dos compostos. Consequentemente, os compostos que foram destacados pela razão de Fisher não podem ser vinculados aos destacados pela GC/MS. Por outro lado, isso mostra que o uso da GC×GC tornou possível a detecção e identificação de compostos que não podiam ser vistos em GC/MS, o que representa um avanço e ao mesmo tempo mostra as deficiências da GC/MS.

**Tabela 7:** Parâmetros de validação obtidos para o método de microextração em fase sólida no modo *headspace* e cromatografia gasosa bidimensional abrangente com espectrometria de massa por tempo de voo (HS-SPME-GC×GC/TOFMS) usado para a determinação da concentração de compostos voláteis em vinhos Syrah. As condições experimentais são descritas na seção 3.4.2 e 3.4.5

#Composto <sup>a</sup>	Equação de regressão	R <sup>2</sup>	Faixa de concentração (µg L <sup>-1</sup> )	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ (µg L <sup>-1</sup> )	Repetibilidade <sup>c</sup>		Precisão Intermediária <sup>d</sup>		Recuperação (%)
						RSD <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>c</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>c</sup> (%)	
<b>Ésteres</b>										
(#V) acetato de 2-metil propila	y = 7984x + 28518	0,9978	0,7 - 350,0	0,3	0,7	18,4	22,3	5,9	19,7	100,7
(#3) hexanoato de etila	y = 58145x - 207270	0,9996	5,5 - 500,0	2,0	5,5	27,6	5,6	19,0	20,0	116,2
(#5) octanoato de etila	y = 141089x + 2499737	0,9968	5,7 - 2280,0	1,5	4,7	13,3	15,2	13,7	14,1	90,8
(#8) succinato de dietila	y = 14627x 857817	0,9907	10,0 - 300,0	3,0	9,1	6,1	3,4	17,8	4,4	95,2
<b>Ácidos</b>										
(#18) ácido hexanóico	y = 4726x + 264379	0,9924	36,0 - 2160,0	9,9	29,9	8,6	7,3	17,2	15,6	116,4
(#19) ácido octanóico	y = 9104 + 165575	0,9955	1,1 - 270,0	0,6	1,1	8,9	11,0	11,4	17,9	110,9
(#22) ácido dodecanóico	y = 4870x + 192365	0,9942	11,4 - 57,0	1,1	3,4	7,9	12,8	17,4	14,7	82,5
<b>Álcoois</b>										
(#28) 1-nonanol	y = 38287x + 250446	0,9949	1,2 - 610,0	0,1	0,3	15,1	8,8	4,7	8,9	101,9
(#29) álcool benzílico	y = 5493x + 562248	0,9829	7,1 - 2840,0	1,2	3,8	10,1	10,4	11,1	8,0	100,5
(#34) 1-hexanol	y = 7347x 175302	0,9997	4,5 - 1800,0	1,4	4,2	2,1	4,9	10,7	3,8	97,2
<b>Terpenos</b>										
(#LIX) eucaliptol	y = 3822x + 8306	0,9999	1,5 - 312,5	0,2	0,6	12,7	26,4	17,9	18,7	111,1
(#LXVIII) α-terpineol	y = 76456x + 1122432	0,9858	1,0 - 215,0	0,2	0,9	4,4	2,0	16,9	13,2	98,1
<b>Outras classes</b>										
(#LXX) β-damascenona	y = 2788x - 69441	0,9991	4,0 - 1580,0	1,4	4,0	13,2	17,6	14,4	16,2	97,6
2-heptanona	y = 37540x + 101471	0,9951	4,25 - 212,5	0,5	1,7	18,5	12,9	19,2	16,6	96,4
3-mercaptophexanol	y = 6879,4x - 40552,9	0,9750	0,7 - 350,0	0,2	0,7	2,9	2,0	18,0	26,3	81,2

- a Compostos numerados de acordo com a Tabela 6. b ponto baixo da curva. c ponto alto da curva  
c Repetibilidade: avaliada realizando três ensaios realizados sob as mesmas condições analíticas no mesmo dia;  
d Precisão intermediária: determinada através de nove ensaios realizados em três dias diferentes (três ensaios em cada dia)

**Tabela 8:** Concentração dos 29 compostos indicados pela razão de Fisher como os mais importantes para diferenciar os vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três graus de maturação [T1:19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante três períodos diferentes (M1: 10 dias, M2: 20 dias e M3: 30 dias). As condições empregadas na GC×GC/TOFMS estão descritas na seção 3.4.5

#	Compostos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) $\pm$ RSD								
		Maturação da uva (T) e maceração (M)		T1M1	T1M2	T2M1	T2M2	T2M3	T3M1	T3M2
LXIX	carvona <sup>a</sup>		28,4 $\pm$ 0,1 d	28,6 $\pm$ 0,2 d	27,5 $\pm$ 0,04 d	27,7 $\pm$ 1,0 d	> 1580,0 a	150,7 $\pm$ 3,4 b	37,2 $\pm$ 3,8 c	31,1 $\pm$ 1,1 d
LXXIV	3-(metiltio)-propionato de etila <sup>b</sup>		58,4 $\pm$ 0,6 a	42,1 $\pm$ 1,0 b	10,6 $\pm$ 0,4 de	10,7 $\pm$ 0,4 cd	12,3 $\pm$ 0,8 c	8,8 $\pm$ 0,2 f	8,9 $\pm$ 0,3 ef	9,8 $\pm$ 0,7 def
XLII	2-pentanol <sup>c</sup>		< 7,1 b	59,9 $\pm$ 4,4 a	< 7,1 b	< 7,1 b	< 7,1 b	< 7,1 b	< 7,1 b	< 7,1 b
26	(Z)-3-hexen-1-ol <sup>d</sup>		35,7 $\pm$ 0,1 a	< 1,2 d	12,4 $\pm$ 2,9 b	< 1,2 d	< 1,2 d	8,6 $\pm$ 0,6 c	< 1,2 d	< 1,2 d
21	ácido decanóico <sup>e</sup>		1555,6 $\pm$ 52,2 a	1661,2 $\pm$ 97,7 a	574,2 $\pm$ 4,6 b	365,5 $\pm$ 39,6 c	530,6 $\pm$ 54,3 b	302,0 $\pm$ 20,8 cd	199,6 $\pm$ 23,8 d	285,1 $\pm$ 68,5 cd
XII	acetato de 3-hexen-1-ol <sup>f</sup>		2,0 $\pm$ 0,1 a	< 0,7 b	< 0,7 b	< 0,7 b	< 0,7 b	< 0,7 b	< 0,7 b	< 0,7 b
CII	1-(2-furanyl)-etanona <sup>a</sup>		41,0 $\pm$ 0,2 c	38,2 $\pm$ 0,7 d	45,2 $\pm$ 1,1 b	40,4 $\pm$ 0,7 c	38,1 $\pm$ 0,6 d	69,4 $\pm$ 0,9 a	38,2 $\pm$ 0,1 d	36,7 $\pm$ 0,2 d
LXXII	2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona <sup>b</sup>		29,0 $\pm$ 0,03 a	28,4 $\pm$ 1,0 a	20,2 $\pm$ 0,6 b	15,9 $\pm$ 0,04 cd	15,2 $\pm$ 0,7 cd	16,5 $\pm$ 0,8 c	13,2 $\pm$ 0,4 e	14,2 $\pm$ 0,7 de
XXVII	2-hidróxi benzoato de etila <sup>f</sup>		10,1 $\pm$ 1,3 a	< 0,7 c	5,4 $\pm$ 0,3 b	< 0,7 c	< 0,7 c	1,9 $\pm$ 0,4 c	< 0,7 c	< 0,7 c
LIII	4-hepten-1-ol <sup>g</sup>		< 4,5	< 4,5	< 4,5	< 4,5	< 4,5	< 4,5	< 4,5	< 4,5
19	ácido octanóico <sup>h</sup>		> 270,0	> 270,0	> 270,0	> 270,0	> 270,0	> 270,0	> 270,0	> 270,0
42	(E)-nerolidol <sup>i</sup>		3,6 $\pm$ 0,1 bc	2,1 $\pm$ 0,2 bc	3,8 $\pm$ 0,5 bc	< 1,5 c	2,0 $\pm$ 0,6 bc	21,7 $\pm$ 2,5 a	4,7 $\pm$ 0,7 b	3,9 $\pm$ 0,1 bc
27	1-octanol <sup>g</sup>		141,9 $\pm$ 6,8 a	67,2 $\pm$ 0,1 b	13,5 $\pm$ 3,1 de	4,4 $\pm$ 0,2 e	12,4 $\pm$ 4,6 de	18,8 $\pm$ 2,2 cd	25,1 $\pm$ 2,3 c	12,8 $\pm$ 0,3 de
CIII	2-furancarboxilato de etila <sup>j</sup>		13,7 $\pm$ 0,3 a	14,4 $\pm$ 0,04 a	8,1 $\pm$ 0,2 b	6,7 $\pm$ 0,3 cd	7,3 $\pm$ 0,5 c	6,0 $\pm$ 0,2 de	5,8 $\pm$ 0,2 e	5,5 $\pm$ 0,2 e
XVIII	2-hidróxi-4-metil pentanoato de etila <sup>j</sup>		< 5,5 d	24,6 $\pm$ 0,4 a	22,7 $\pm$ 1,4 a	17,8 $\pm$ 1,4 b	21,7 $\pm$ 2,0 a	< 5,5 d	17,5 b	14,3 $\pm$ 0,8 c
28	1-nonanol <sup>d</sup>		< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2
XXVIII	dodecanoato de etila <sup>j</sup>		< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5
LXXI	metiltio acetato <sup>j</sup>		7,9 $\pm$ 0,4 b	< 5,5 c	5,6 $\pm$ 0,1 c	< 5,5 c	< 5,5 c	10,5 $\pm$ 0,3 a	< 5,5 c	< 5,5 c
XXXI	cinamato de etila <sup>j</sup>		< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5	< 5,5

XLVIII	2-hexen-1-ol <sup>g</sup>	69,6 ± 0,1 b	29,7 ± 3,1 cd	22,3 ± 8,4 cde	24,3 ± 1,0 cde	19,7 ± 3,4 de	145,3 ± 7,4 a	33,8 ± 4,6 c	11,8 ± 2,8 e
XCIII	5-etóxidihidro-2(3H)-furanona <sup>k</sup>	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3
	6 decanoato de etila <sup>l</sup>	19,0 ± 0,03 c	< 5,7 d	67,3 ± 7,9 a	< 5,7 d	< 5,7 d	35,7 ± 7,4 b	< 5,7 d	< 5,7 d
LXXXIX	3-penten-2-one <sup>k</sup>	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3
XLVII	2-penten-1-ol <sup>d</sup>	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2
XXVI	dodecanoato de metila <sup>j</sup>	7,0 ± 0,1 a	6,6 ± 0,1 b	< 5,5 c	< 5,5 c	< 5,5 c	< 5,5 c	< 5,5 c	< 5,5 c
LXVIII	α-terpineol <sup>i</sup>	83,0 ± 4,0 b	7,0 ± 0,05 d	67,8 ± 5,6 b	1,8 ± 0,2 d	79,2 ± 10,6 b	168,5 ± 15,3 a	< 1,5 d	39,1 ± 1,0 c
IX	acetato de hexila <sup>f</sup>	17,9 ± 0,7 a	1,5 ± 0,04 d	5,4 ± 0,3 bc	< 0,7 d	< 0,7 d	6,7 ± 1,4 b	4,3 ± 0,8 c	1,0 ± 0,3 d
XCI	acetofenona <sup>k</sup>	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	< 4,3	4,7 ± 0,9	< 4,3	< 4,3
XXV	glutarato de dietila <sup>j</sup>	< 5,5 c	14,2 ± 0,5 a	< 5,5 c	8,0 ± 0,7 b	8,7 ± 0,5 b	< 5,5 c	8,9 ± 0,1 b	< 5,5 c

RSD: desvio padrão relativo; # Compostos numerados conforme na Tabela 6. A quantificação foi realizada com curvas de calibração externas para os seguintes compostos: a –β-damascenona, b - mercaptohexanol, c - álcool benzílico, d - 1-nonanol, e – ácido hexanóico, f – acetato de 2-metil propila, g-1-hexanol, h-ácido octanóico, i-eucaliptol, j-hexanoato de etila, k-2-heptanona, l-octanoato de etila. As faixas de concentração usadas nas curvas de calibração são mostradas na Tabela 7. Quando a quantidade de um composto era menor ou maior que a faixa de concentração usada na curva de calibração, a concentração desse composto era expressa como “<” que o nível mais baixo da curva e “>” do que o nível mais alto da curva.

A PCA permitiu a seleção de cinco componentes principais (PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5) com autovalores maiores que 1, o que explicou 98,7% da variância total observada nos dados. Os autovalores correspondem à variância de cada PC sendo que o número de autovalores significativos foi determinado pela regra de Kaiser, que considera apenas os componentes com autovalores maiores que 1. As duas primeiras componentes principais são responsáveis por 73,43% da variação total na composição volátil dos vinhos Syrah e permitiram distinguir os vinhos macerados por 10 dias (M1), daqueles macerados por períodos mais longos (M2 e M3, 20 e 30 dias respectivamente).

As variáveis relacionadas a essas componentes são posicionadas de acordo com os pesos fatoriais e a distribuição das amostras no plano dividido pelo subespaço definido pela PC1 versus PC2 (**Figura 10**). As variáveis que apresentaram maiores valores de peso e que contribuíram significativamente para explicar cada fator (PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5), são mostrados na **Tabela A2**.

O vinho T1M1 apresentou concentração significativamente maior (**Tabela 8**), de acordo com ANOVA seguido por Tukey ( $p < 0,05$ ) comparado com as outras amostras dos seguintes compostos (**Figura 10B**): ácido decanóico (#21), (*Z*)-3-hexen-1-ol (#26), 1-octanol (#27), acetato de hexila (# IX), acetato de 3-hexen-1-ol (#XII), dodecanoato de metila (#XXVI), 2-hidróxi benzoato de etila (#XXVII), 2-furancarboxilato de etila (#CIII), 2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona (#LXXII) e 3-(metiltio)-propionato de etila (# LXXIV). Estes compostos foram responsáveis pela diferenciação deste vinho em relação aos demais. O vinho T1M2 apresentou concentração significativamente maior do 2-pentanol (#XLII) e do glutarato de dietila (#XXV) em relação as outras amostras. O T2M1 apresentou os maiores níveis de apenas um composto (decanoato de etila, #6). Finalmente, o T3M1 foi diferenciado de outras amostras devido aos níveis mais elevados de 2-hexen-1-ol (#XLVIII), 1-(2-furanyl) etanona (#CII), acetofenona (#XCI),  $\alpha$ -terpineol (# LXVIII), (*E*)-nerolidol (#42) metiltio acetato (#LXXI).

As amostras M1 (maceradas por 10 dias) apresentaram maior concentração dos ésteres estudados, sendo dois deles acetatos de álcoois superiores: o acetato de 3-hexen-1-ol (#XII) encontrado em maior concentração no vinho T1M1 ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e relatado abaixo do limite de quantificação para os demais ( $< 0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ), e o acetato de hexila (#IX) com maior concentração nas amostras M1 (T1M1 -  $17,9$ , T2M1 -  $5,4$  e T3M1 -  $6,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Verificou-se ainda a presença de um éster derivado de ácidos graxos de cadeia linear, o dodecanoato de metila (#XXVI), presente em concentração majoritária no vinho T1M1 ( $7,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Os ésteres etílicos derivados de ácidos graxos de cadeia linear são sintetizados enzimaticamente pelas leveduras durante a

fermentação alcoólica, sendo possível também a sua formação pelas bactérias do ácido láctico durante a fermentação malolática, e seus níveis parecem depender de fatores como composição química dos mostos, condições de fermentação, temperatura, aeração e tempo de contato com as películas das uvas.<sup>86,89</sup> O éster etil-2-hidróxi benzoato de etila (#XXVII - T1M1 = 10,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), éster etílico derivado de ácidos graxos ramificados, são sintetizados principalmente durante o envelhecimento dos vinhos através do processo de esterificação entre os ácidos ramificados e o etanol. Os ésteres são compostos muito importantes para o aroma dos vinhos, contribuindo positivamente para a qualidade geral dessas bebidas, proporcionando odores delicados, descritos como “frutados” e “florais”, interferindo na qualidade aromática e propriedades sensoriais.<sup>9</sup> A exemplo disso, os ésteres responsáveis pela separação das amostras, com relação ao tempo de maceração, são relatados na literatura por sua contribuição positiva para o aroma dos vinhos.<sup>182</sup> Resultados reportados para os vinhos Karaoglan mostraram que a concentração dos ésteres foi maior quando a maceração ocorreu por menor tempo (5 dias), a exceção do succinato de dietila.<sup>86</sup> Por outro lado, Petropulos *et al.* relataram que o aumento no tempo de maceração dos vinhos Vranec, de 4 para 7 dias, resultou em crescimento na concentração de maior parte dos ésteres estudados. No entanto, quando a maceração atingiu 14, e posteriormente 30 dias, esses teores foram significativamente reduzidos.<sup>9</sup> O tempo prolongado de maceração pode gerar a redução na concentração dos ésteres, provavelmente como resultado da hidrólise não enzimática.<sup>9</sup> Em estudo com uvas das variedades Cabernet Sauvignon e Syrah, colhidas com 21 e 23 °Brix, observou-se com o avanço da maturação, uma redução na concentração dos ésteres etílicos derivados de ácidos graxos de cadeia linear para as uvas Cabernet Sauvignon, enquanto para as uvas Syrah a redução ocorreu para os ésteres etílicos derivados de ácidos graxos ramificados<sup>89</sup>, tendência semelhante a reportada no presente estudo, cujo os vinhos do tratamento T1 apresentaram as maiores concentrações dos ésteres estudados.

Os compostos terpênicos presentes nos vinhos estão propensos a mudanças durante o processo de vinificação e são considerados muito importantes na determinação do aroma e do caráter varietal das uvas *Vitis vinifera*.<sup>188,189</sup> As mudanças ocorrem especialmente no caso dos álcoois monoterpênicos que podem sofrer várias reações durante a elaboração e armazenamento do vinho, induzidos por fatores tais como tempo de armazenamento, pH relativamente baixo e a presença de compostos que podem interagir com eles. Podem sofrer reações de isomerização e oxidação, facilmente, formando óxidos e aldeídos.<sup>188</sup> **A Figura 10** mostra que os terpenos tiveram influência na segmentação das amostras de vinho Syrah, estando presentes em maiores

teores nas amostras maceradas por longo período (M3) e elaboradas com uvas colhidas em estádios de maturação mais avançados (T2 e T3). A carvona (#LXIX), foi o composto com maior razão Fisher, dos 29 voláteis destacados como determinantes na diferenciação dos oito vinhos. Sua maior concentração foi observada no vinho T2M3 ( $> 1580 \mu\text{g L}^{-1}$ ) estando acima do limite superior da curva de calibração. Este terpeno é caracterizado pelo odor de refrescante, característico da menta<sup>190</sup>, tendo sido relatado como potencial marcador químico no aroma dos vinhos Bordeaux envelhecidos.<sup>191</sup> O (*E*)-nerolidol (#42) e o  $\alpha$ -terpineol (#LXVIII) foram os terpenos responsáveis pelo agrupamento das amostras quanto ao grau de maturação da uva na data da colheita, estando em concentração majoritária na amostra T3M1 (21,7 e  $168,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente). Mesma tendência crescente para os terpenos foi observada durante a maturação das uvas Pinot Noir<sup>192</sup>, enquanto Kalua *et al.*<sup>193</sup> relataram resultado oposto para as uvas Cabernet Sauvignon. A concentração dos terpenos aumenta gradualmente durante o amadurecimento da uva,<sup>189</sup> no entanto, os terpenos podem sofrer redução nas suas concentrações quando os níveis ótimos de açúcar são atingidos, embora isso possa ser influenciado pela temperatura e disponibilidade de água durante o amadurecimento.<sup>7</sup>

Os compostos voláteis de enxofre são reconhecidos pelo forte impacto no aroma do vinho e são relacionados ao odor de reduzido, que se assemelha a ovo podre, repolho cozido, cebola, alho e borracha. Esses odores são geralmente relacionados a presença de altas concentrações de tióis de cadeia curta, sulfetos, dissulfetos, tio ésteres e compostos heterocíclicos, entretanto em concentrações baixas, contribuem com notas positivas.<sup>91,194</sup> Os sulfurados 3-(metiltio)-propionato de etila (#LXXIV), 2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona (#LXXII) e metiltio acetato (#LXXI) foram determinantes não somente para a discriminação das amostras quanto ao tempo de maceração, bem como com relação à maturação da uva. Os compostos #LXXIV e #LXXII apresentaram concentrações mais elevadas nas amostras T1M1 (58,4 e  $29,0 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente). Entretanto, o #LXXI apresentou maior concentração no vinho T3M1 ( $10,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Níveis crescentes do sulfurado 3-(metiltio)-1-propanol foram observados nos vinhos Vranec à medida em que a maceração evoluiu<sup>9</sup>, resultado que se opõe aos relatados no presente trabalho para os vinhos Syrah. Os compostos sulfurados podem ser formados através de processos biológicos (por via enzimática no metabolismo dos microrganismos durante a fermentação) e químicos (reações fotoquímicas e térmica durante o armazenamento dos vinhos).<sup>194</sup>

Os álcoois superiores são formados principalmente durante a fermentação alcóolica como produto do metabolismo da levedura, a partir dos açúcares ou aminoácidos presentes nas

polpas das uvas.<sup>9</sup> Seu conteúdo é afetado por fatores tais como composição físico-química do mosto e variedade da uva.<sup>195,196</sup> Estes compostos estão relacionados à odores vegetais e herbáceos e costumam ter efeitos negativos na qualidade do vinho. Entretanto, conforme relatado por Etievant, em concentrações totais de até 300 mg L<sup>-1</sup> sua contribuição seria positiva para o aroma dos vinhos, aumentando as notas referidas como frutado e floral, e conseqüentemente, a complexidade dos vinhos, enquanto, as concentrações acima de 300 mg L<sup>-1</sup> causariam um efeito negativo, com o surgimento de notas pungentes e desagradáveis.<sup>197</sup>

De acordo com a **Figura 10** da PCA, os álcoois responsáveis por distinguir as amostras M1 das demais, e que conseqüentemente apresentaram os maiores pesos no eixo negativo da PC1 foram o (Z)-3-hexen-1-ol (#26) e o 1-octanol (#27) (**Tabela A2**). A concentração do composto #26 foi maior nas amostras maceradas por 10 dias (M1) variando de 35,7 µg L<sup>-1</sup> para T1M1, 12,4 µg L<sup>-1</sup> para T2M1 a 8,6 µg L<sup>-1</sup> para T3M1, enquanto para o 1-octanol a concentração majoritária foi para a amostra T1M1 (141,9 µg L<sup>-1</sup>). Yilmaztekin *et al.* encontraram concentrações mais elevadas de álcoois nos vinhos Karaoglan quando a maceração ocorreu por períodos mais curtos.<sup>86</sup> Foram testados diferentes tempos de maceração (5, 10 e 15 dias) sendo relatado pelos autores que as maiores concentrações foram obtidas quando a maceração ocorreu por 5 dias. Em outro estudo, Petropulos *et al.* observaram que tempos mais curtos favoreceram o aumento na concentração dos álcoois quantificados nos vinhos Vranec. De acordo com os autores os maiores teores foram alcançados quando os vinhos foram macerados por 7 dias, seguido de pequena redução quando a maceração se prolongou por 14 e 30 dias.<sup>9</sup> A produção dos álcoois superiores sofre redução com o aumento do tempo de maceração, devido principalmente ao aumento dos níveis de substâncias nitrogenadas nos mostos macerados por longos períodos, possivelmente em virtude do bloqueio do mecanismo de Ehlich, principal via de formação desses compostos.<sup>86</sup> Além disso, a redução na concentração dos álcoois pode estar também relacionada à fixação a macromoléculas.<sup>9</sup>

Os álcoois também foram responsáveis pela segmentação das amostras com relação ao tratamento empregado, sendo relevante destacar aqueles que tiveram os maiores pesos na PC2. A concentração do 2-pentanol (#XLII) reduziu com o avanço da maturação da uva, presente em maior teor na amostra T1M2 (59,9 µg L<sup>-1</sup>) conforme mencionado anteriormente, enquanto o 2-hexen-1-ol (#XLVIII) teve sua concentração aumentada, sendo majoritário no vinho T3M1 (145,3 µg L<sup>-1</sup>). Resultados reportados para as uvas tintas da variedade Serradelo mostraram que a concentração do 2-pentanol manteve-se constante durante a maturação (18 para 19,6 °Brix), no entanto, o teor do 2-hexen-1-ol aumentou.<sup>189</sup> Resultado confirmado por Kalua *et al.* que

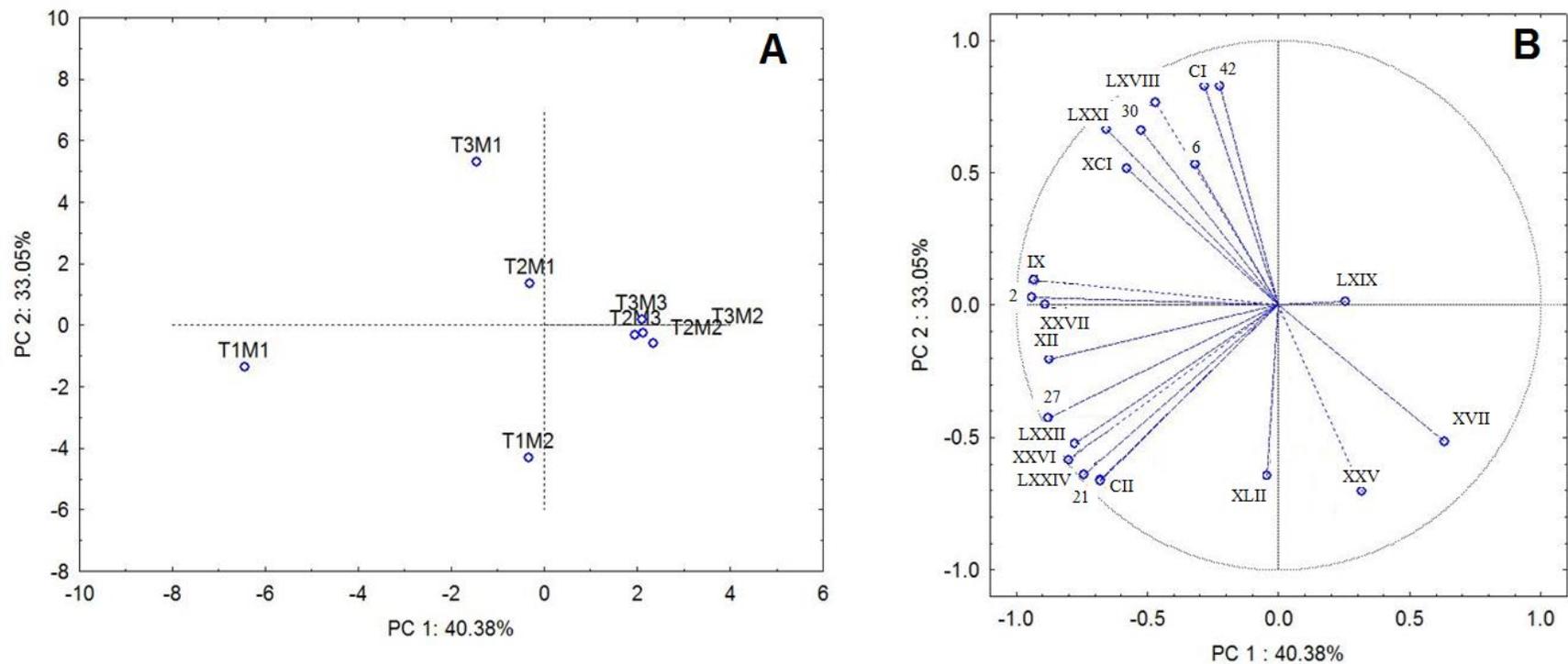
mostraram que durante a maturação a concentração dos C6-álcoois tendeu a aumentar em uvas Cabernet Sauvignon.<sup>193</sup>

A produção e a presença dos ácidos graxos nos vinhos dependem da composição do mosto das uvas e das condições de fermentação empregadas. Desse modo, esses compostos podem ser formados por vias anabólicas nas leveduras ou surgir através de reações de  $\beta$  - oxidação dos ácidos graxos superiores.<sup>9</sup> O ácido decanóico (#21) foi o único ácido que influenciou na diferenciação dos vinhos, apresentando peso significativo no eixo negativo da PC1, e, portanto, apresentando maiores concentrações nos vinhos T1 (1555,6 para T1M1 e 1661,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  para T1M2). Além disso, foi relatado como um dos voláteis responsáveis pela segmentação das amostras analisadas por GC/MS, apresentadas anteriormente. Resultados observados para os vinhos Karaoglan mostram que a maceração por períodos mais curtos proporcionou as maiores concentrações dos ácidos, incluindo o ácido decanóico.<sup>86</sup> Para os vinhos Vranec, a concentração dos ácidos graxos aumentou do quarto para o sétimo dia de maceração. Entretanto, quando a maceração se prolongou para 14 e 30 dias essas quantidades relativas decaíram.<sup>9</sup> Os ácidos graxos podem participar da formação dos ésteres, sendo esta uma razão para a redução de seus teores durante a etapa de maceração. É também durante a maceração e a fermentação alcoólica, que os ácidos graxos podem ser utilizados pelas leveduras como fonte de carbono, decaindo assim, suas quantidades.<sup>9</sup>

Furanos são compostos formados por três vias: (i) pirólise de carboidratos, (ii) desidratação de açúcares através da reação de Maillard e (iii) caramelização.<sup>98</sup> No presente estudo dois compostos classificados como furanos foram importantes para a separação das amostras em grupos. O 2-furancarboxilato de etila (#CIII) apresentou maiores teores nas amostras T1M1 e T1M2, enquanto o 1-(2-furanyl) etanona (#CII) está presente em maior concentração no vinho elaborado com uvas colhidas em maturação mais avançada (T3). No entanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que mostrem a influência dessa classe de compostos em vinhos elaborados de uvas colhidas com diferentes graus de maturação e macerados por distintos períodos.

Estes resultados indicam que o prolongamento do tempo de maceração para 20 (M2) ou 30 dias (M3) resultou numa diminuição da concentração dos compostos mostrados na **Tabela 8**. Estas amostras (T2M2, T2M3, T3M2 e T3M3) apresentaram perfil volátil semelhante, conforme visualizado na PCA da **Figura 10B**. Além disso, as uvas colhidas com maior grau de maturação (T2 e T3) favoreceram também a redução da concentração dos voláteis estudados.

Dentre os 21 compostos responsáveis pela diferenciação de vinhos segundo a PCA, sete voláteis foram tentativamente identificados pela primeira vez em vinhos Syrah: dodecanoato de metila (#XXVI), 2-hidróxi benzoato de etila (#XXVII), 2-furancarboxilato de etila (#CIII), glutarato de dietila (#XXV), 2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona (#LXXII), 1-(2-furanyl) etanona (#CII), metiltio acetato (#LXXI). No entanto, esses compostos já foram relatados em outros vinhos tintos varietais, como os vinhos Merlot da Campanha Gaúcha, Brasil<sup>185</sup>, Pinotage e Cabernet Sauvignon, ambos da África do Sul.<sup>100,198</sup>

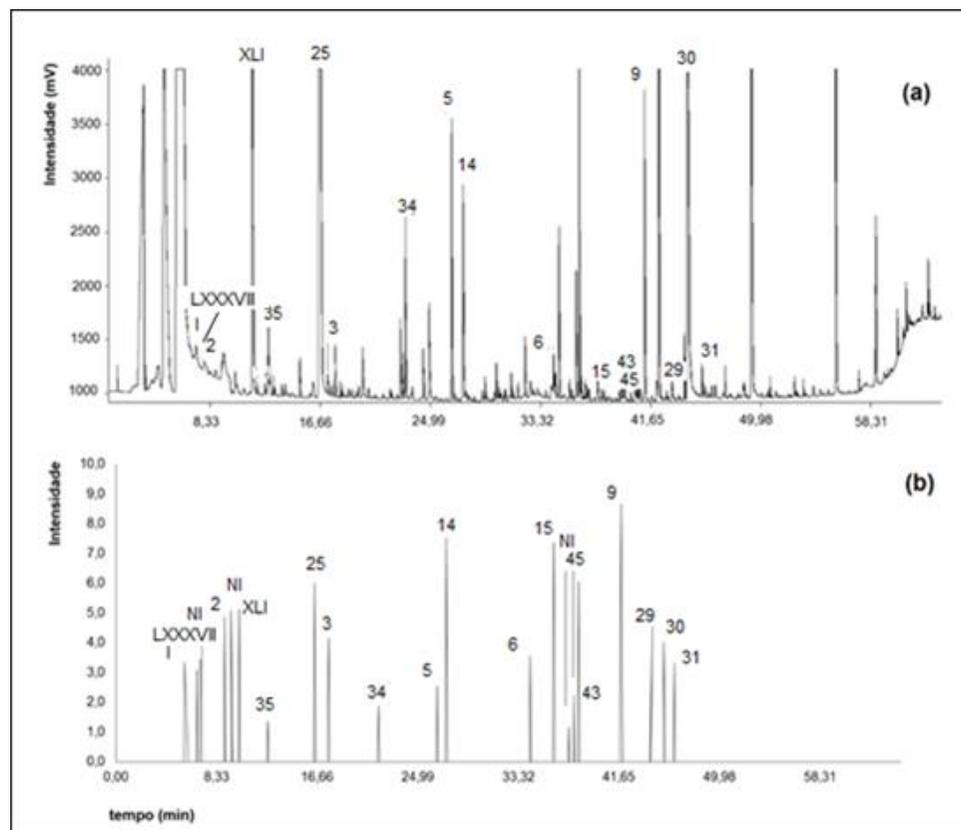


**Figura 10:** Gráfico das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) obtidas na análise de componentes principais com base nos 21 compostos voláteis mais discriminantes dos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três diferentes graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante três períodos diferentes (M1: 10 dias, M2: 20 dias e M3: 30 dias), resultando nas combinações T1M1, T1M2, T2M1, T2M2, T2M3, T3M1, T3M2 e T3M3. As amostras (A) e os compostos voláteis (B) foram numerados de acordo com a **Tabela 6**

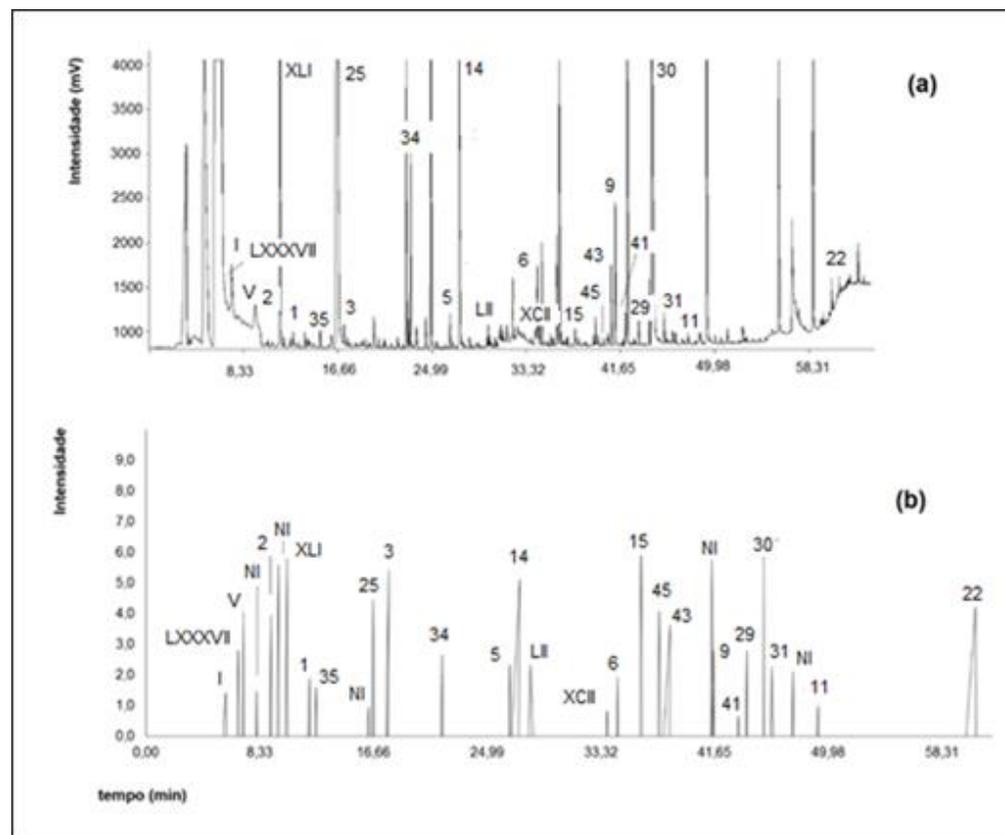
#### 4.2.2 Compostos odoríferos analisados por GC-O-OSME, GC/MS e GC-FID e quantificados por GC×GC/TOFMS

Considerando que os vinhos macerados por um período mais curto (10 dias, M1) apresentaram as maiores concentrações dos 21 compostos voláteis mostrados na PCA, verificados por GC×GC/TOFMS, as amostras T1M1, T2M1 e T3M1 foram escolhidas para serem avaliadas pela técnica de GC-O-OSME, com a finalidade de verificar a importância dos compostos odoríferos presentes nessas amostras.

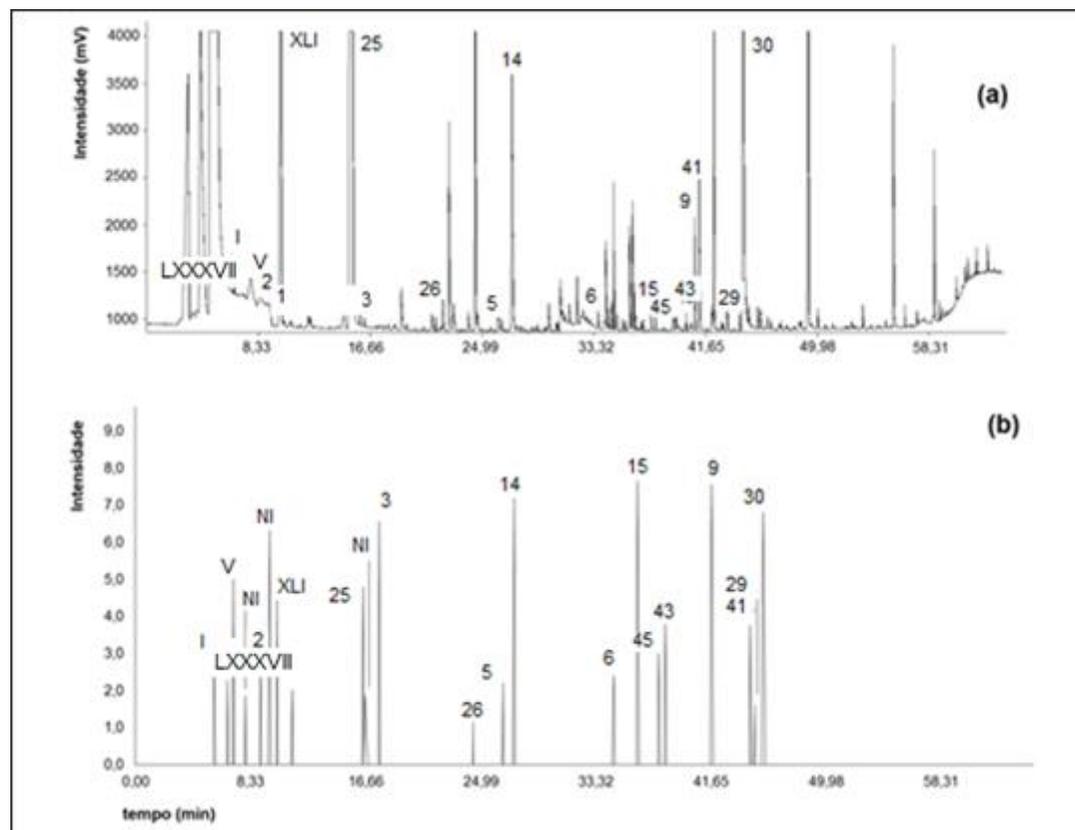
A **Tabela 9** mostra a identificação dos 31 voláteis odoríferos nos vinhos com a intensidade e persistência do odor percebido no eluente cromatográfico, além do respectivo odor descrito pelos julgadores da GC-O-OSME. Onze ésteres (#I, V, 2, 1, 3, 5, 6, 9, 11, II e III), dez álcoois (#XLI, 35, 26, LII, 29, 30, 31, 25, 34 e XLIII), três ácidos (#14, 15 e 22), dois terpenos (#43 e 41), dois aldeídos (#LXXVIII e LXXXIV), uma cetona (#LXXXVII), uma lactona (#XCII), e um composto sulfurado (#45) foram identificados como os compostos odoríferos dos vinhos Syrah. Um elevado percentual deles contribui positivamente para o aroma dos vinhos T1M1, T2M1 e T3M1: 78, 71 e 75%, respectivamente, com notas descritas de frutado, floral, doce, refrescante, mel, menta, entre outros, exceto oito voláteis [ (ácidos #14, 15 e 22), (álcoois #25, 34 e XLIII),  $\gamma$ -butirolactona #XCII e 3-(metiltio)-1-propanol #45]. Os cromatogramas, bem como os aromagramas dos vinhos encontram-se nas **Figuras 11a, 12a e 13a e 11b, 12b e 13b**, respectivamente. A numeração que consta na **Tabela 9** se refere à numeração dos picos nos cromatogramas e aromagramas das **Figuras 11, 12 e 13**. A **Tabela 9**, apresenta a identificação dos picos odoríferos representados nos aromagramas dos vinhos, os LTPRI, a intensidade máxima do odor percebido (I max) (referente à intensidade com a qual o aroma é percebido pelo julgador), o percentual de área da região odorífera em relação a área total do aromagrama obtido por GC-O-OSME (% área OSME, o qual se relaciona à persistência, P, com que o aroma é sentido pelo julgador) e a qualidade do aroma, conforme descrito pela equipe de avaliação sensorial que avaliou os eluentes cromatográficos. A intensidade de odor e a porcentagem de área do pico odorífero estão associados com o potencial odorífero do composto na análise OSME. Sendo assim, uma elevada intensidade (I<sub>max</sub> = intensidade odorífera máxima percebida pelo julgador) e/ou um alto % de área é (são) indicativo (s) da importância do composto para o aroma dos vinhos.



**Figura 11:** Cromatograma obtido com detector de ionização em chama (FID) (a) e respectivo aromagrama proveniente da cromatografia associada à olfatomia (GC-O-OSME) (b) do vinho Syrah elaborado a partir de uvas colhidas a 19 °Brix. A numeração dos picos está em acordo com a Tabela 9.



**Figura 12:** Cromatograma obtido com detector de ionização em chama (FID) (a) e respectivo aromagrama proveniente da cromatografia associada à olfatomia (GC-O-OSME) (b) do vinho Syrah elaborado a partir de uvas colhidas a 21 °Brix. A numeração dos picos está em acordo com a Tabela 9.



**Figura 13:** Cromatograma obtido com detector de ionização em chama (FID) (a) e respectivo aromagrama proveniente da cromatografia associada à olfatomia (GC-O-OSME) (b) do vinho Syrah elaborado a partir de uvas colhidas a 23 °Brix. A numeração dos picos está em acordo com a Tabela 9.

**Tabela 9:** Compostos odoríferos encontrados nos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas em três diferentes graus de maturação [T1: 19° Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante 10 dias (M1), resultando nas combinações T1M1, T2M1 e T3M1 e avaliados por cromatografia gasosa com diferentes detectores: olfatométrica, espectrometria de massa e ionização de chama. Os compostos identificados somente após as análises por GC×GC/TOFMS estão sombreados em cinza e em negrito. As condições experimentais são descritas na seção 3.4.4

#	Composto	LTPRI OSME <sup>a</sup>	LTPRI FID <sup>a</sup>	T1M1	T2M1	T3M1	Odor GC-O-OSME	T1M1	T2M1	T3M1
				Intensidade de odor (cm) ± RSD (%) <sup>b</sup>				Persistência de odor ± RSD % <sup>c</sup>		
<b>Contribuição Positiva</b>										
XLI	2-metil-1-propanol	1068	1094	5,80 ± 0,56	5,11 ± 0,59	4,47 ± 0,52	frutado, doce	5,75 ± 0,68	5,69 ± 0,59	4,10 ± 0,52
35	1-butanol	1125	1155	1,35 ± 0,05	1,59 ± 0,05	ND	refrescante, doce	1,00 ± 0,21	1,22 ± 0,12	ND
26	(Z)-3-hexen-1-ol	1391	1366	ND	ND	1,22 ± 0,02	refrescante, cítrico	ND	ND	0,73 ± 0,09
LII	2-etil, 1-hexanol	1480	1481	ND	2,33 ± 0,07	ND	frutado	ND	2,14 ± 0,16	ND
29	álcool benzílico	1905	1882	4,83 ± 0,31	2,85 ± 0,08	1,61 ± 0,05	frutado, doce	5,98 ± 0,08	0,49 ± 0,01	1,51 ± 0,10
30	2-fenil etanol	1946	1929	5,70 ± 0,52	4,08 ± 0,31	6,56 ± 0,56	rosa, mel	13,58 ± 0,95	10,34 ± 0,84	5,71 ± 0,64
31	1-dodecanol	1973	1976	3,36 ± 0,12	2,27 ± 0,09	ND	floral	2,53 ± 0,27	2,02 ± 0,01	ND
I	acetato de etila	934	900	3,38 ± 0,01	1,64 ± 0,03	2,84 ± 0,09	frutado, frutas vermelhas	2,99 ± 0,16	1,70 ± 0,01	2,74 ± 0,20
V	acetato de 2-metil propila	980	1001	ND	3,95 ± 0,49	3,93 ± 0,39	fruta madura	ND	2,56 ± 0,39	4,14 ± 0,53
2	butanoato de etila	1038	1040	4,93 ± 0,30	2,94 ± 0,32	2,90 ± 0,25	frutado, doce	5,76 ± 0,39	3,56 ± 0,28	2,57 ± 0,28
1	acetato de 3-metil butila	1110	1102	2,04 ± 0,13	1,99 ± 0,06	ND	banana, frutado	1,70 ± 0,20	1,42 ± 0,24	ND
3	hexanoato de etila	1239	1227	4,16 ± 0,03	4,43 ± 0,35	6,66 ± 0,23	frutado, doce	4,81 ± 0,33	5,16 ± 0,59	5,60 ± 0,41
5	octanoato de etila	1444	1440	2,53 ± 0,06	2,17 ± 0,06	2,21 ± 0,09	frutado, doce	1,82 ± 0,23	3,32 ± 0,24	1,90 ± 0,15
6	decanoato de etila	1642	1633	3,57 ± 0,31	1,94 ± 0,09	2,50 ± 0,25	frutado, floral, queimado, doce	2,29 ± 0,34	0,98 ± 0,09	2,49 ± 0,20
9	acetato de 2-fenil etanol	1843	1825	8,71 ± 0,18	5,86 ± 0,60	7,06 ± 0,38	rosa, floral, jasmim	14,52 ± 1,91	11,77 ± 0,54	13,48 ± 1,01
11	tetradecanoato de etila	2063	2013	ND	1,00 ± 0,01	ND	floral	ND	1,05 ± 0,36	ND
LXXX										
VII	2,3-butanodiona	969	980	3,08 ± 0,12	3,04 ± 0,10	2,29 ± 0,20	doce, amanteigado	2,41 ± 0,08	3,40 ± 0,66	2,07 ± 0,16
43	citronelol	1744	1736	6,05 ± 0,02	3,64 ± 0,35	3,79±0,39	menta, cítrico	5,79±0,57	2,26±0,40	3,65±0,39

41	geraniol	1887	1857	3,90 ± 0,40	0,67 ± 0,01	ND	refrescante, gerânio	4,62±0,47	0,58±0,04	ND
<b>LXXVI</b>										
<b>II</b>	<b>3-metil, 1-butanal</b>	<b>960</b>	<b>957<sup>d</sup></b>	<b>4,55 ± 0,57</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>doce, frutado</b>	<b>5,91±0,48</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>II</b>	<b>propanoato de etila</b>	<b>1009</b>	<b>955</b>	<b>ND</b>	<b>1,47 ± 0,06</b>	<b>1,86±0,02</b>	<b>refrescante, fruta verde</b>	<b>ND</b>	<b>1,39±0,08</b>	<b>1,59±0,08</b>
<b>III</b>	<b>2-metil etil butirato</b>	<b>1055</b>	<b>1037</b>	<b>5,09 ± 0,08</b>	<b>5,76 ± 0,10</b>	<b>6,11±0,34</b>	<b>morango, frutado</b>	<b>6,21±0,35</b>	<b>7,69±0,34</b>	<b>7,55±0,39</b>
<b>LXXXI</b>										
<b>V</b>	<b>4-etil, benzaldeído</b>	<b>1720</b>	<b>1714</b>	<b>1,14 ± 0,09</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>doce, verde</b>	<b>0,62±0,44</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>Contribuição Negativa</b>									
14	ácido acético	1462	1460	7,55 ± 0,12	5,12 ± 0,50	7,50 ± 0,32	vinagre	5,78 ± 0,09	5,62 ± 0,25	6,09 ± 0,00
15	ácido 2- metilpropanóico	1687	1703	5,59 ± 0,53	6,21 ± 0,49	7,69 ± 0,70	queijo, rançoso	6,23 ± 1,07	6,86 ± 0,53	9,25 ± 1,61
22	ácido dodecanóico	2531	2492	ND	4,21 ± 0,30	ND	gás, ovo podre	ND	3,71 ± 0,01	ND
25	3-metil, 1-butanol	1211	1215	4,80 ± 0,70	4,44 ± 0,10	6,05 ± 0,07	pungente, solvente	4,56 ± 0,06	4,86 ± 0,02	5,62 ± 0,02
34	1-hexanol	1329	1358	1,95 ± 0,01	2,66 ± 0,08	ND	cozido, queimado	2,25 ± 0,23	1,55 ± 0,09	ND
XCII	γ-butirolactona	1621	1617	ND	1,04 ± 0,01	ND	fermentado, pungente, solvente	ND	0,58 ± 0,09	ND
45	3-(metiltio)-1- propanol	1730	1733	2,23 ± 0,01	3,38 ± 0,09	3,02 ± 0,09	feijão verde cozido, mato úmido	1,50 ± 0,12	2,50 ± 0,006	3,27 ± 0,09
<b>XLIII</b>	<b>2-metil, 1-butanol</b>	<b>1214</b>	<b>1210</b>	<b>ND</b>	<b>1,12 ± 0,02</b>	<b>1,89 ± 0,08</b>	<b>fermentado, solvente</b>	<b>ND</b>	<b>2,35 ± 0,07</b>	<b>1,79 ± 0,20</b>

# Compostos numerados como na Tabela 6.

Índice de retenção experimental (LTPRI) calculado utilizando n-alcenos (C9-C24) em DB-Wax (polietilenoglicol a 100%) para análises GC-O-OSME (LTPRI OSME) e GC-FID (LTRI FID). Na GC-O-OSME, o tempo de retenção da intensidade máxima do pico de odor foi utilizado no cálculo do IR.

b Avaliados em uma escala de 10 cm ancorada nas extremidades esquerda e direita pelos termos de intensidade “nenhum” e “alto”, respectivamente, foi obtida como uma intensidade média do aromagrama consensual construído após as análises da amostra por 4 juízes em quatro repetições. RSD: desvio padrão relativo

c Avaliado através de % OSME área ± desvio padrão relativo: corresponde à porcentagem de área de um composto odorífero em relação à soma da área de todos os compostos detectados quando a técnica OSME foi usada para obter informações sobre os voláteis determinados por GC-O-OSME, através de um painel sensorial.

d Índice de retenção obtido nas análises GC×GC/TOFMS. ND = composto não detectado na amostra.

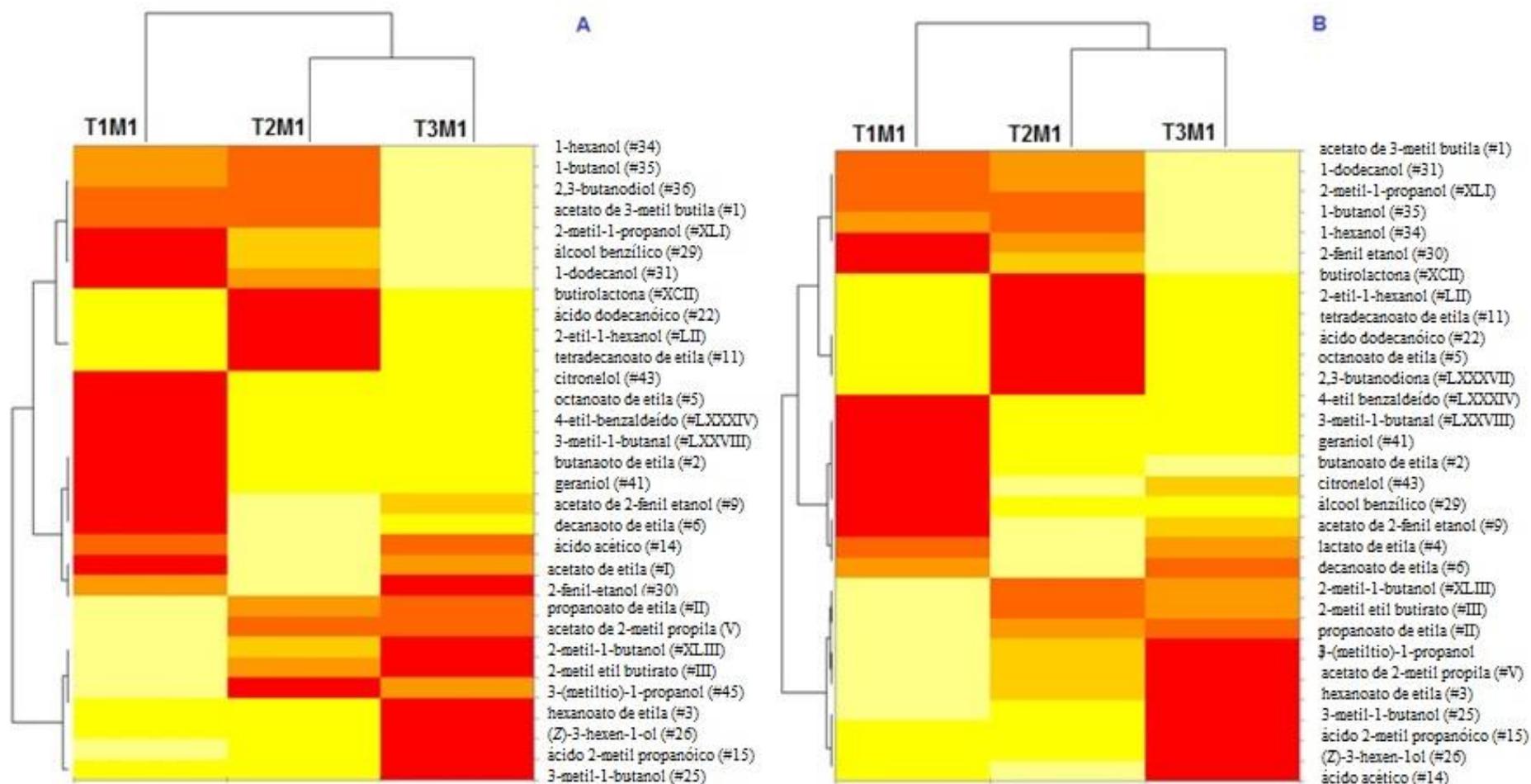
A **Figura 14** mostra os mapas de calor gerados a partir dos dados de intensidade de odor (I) e persistência (P) da **Tabela 9**, obtidos a partir das análises por GC-O-OSME. O vinho T1M1 foi diferenciado de T2M1 e T3M1 tanto pela intensidade quanto pela persistência, como mostrado nos dendrogramas da **Figura 14A e 14B**, respectivamente. Os compostos voláteis cuja intensidade e persistência de odor são responsáveis pelas diferenças entre as amostras são listados no eixo vertical dos mapas de calor.

O vinho T1M1 destacou-se em relação às demais amostras devido à maior intensidade de 12 compostos (células vermelhas na coluna T1M1 da **Figura 14A**) que apresentaram uma descrição de odor desejável através da análise por GC-O-OSME, incluindo: 2-metil, 1-propanol (#XLI; frutado, doce), álcool benzílico (#29; frutado, doce), 1-dodecanol (#31, floral), citronelol (#43; menta, cítrico), octanoato de etila (#5; frutado, doce), 4-etil, benzaldeído (#LXXXIV; doce, verde), 3-metil, 1-butanal (#LXXVIII; doce, frutado), butanoato de etila (#2; frutado, doce), geraniol (#41; refrescante, gerânio), acetato de 2-fenil etanol (#9; rosa, floral, jasmim), decanoato de etila (#6; frutado, floral, queimado, doce) e acetato de etila (#I; frutado, frutas vermelhas).

Comparado ao vinho T1M1, um menor número de compostos com a maior intensidade e descrição de odor positivo foram encontrados em T2M1 [2 compostos: 2-etil, 1-hexanol (#LII; frutado) e tetradecanoato de etila (#11; floral)] e finalmente, para o vinho T3M1 [4 compostos: 2-fenil etanol (#30; rosa, mel), 2-metil etil butirato (#III; morango, frutado), hexanoato de etila (#3; frutado, doce) e (*Z*)-3-hexen-1-ol (#26; refrescante, cítrico)].

Como mencionado anteriormente, apenas o decanoato de etila (#6) foi relevante em termos de razão de Fisher, contribuindo para a separação dos vinhos de acordo com o tempo de maceração e também em relação à intensidade do odor. Suas maiores concentrações ocorreram em T2M1, T3M1 e T1M1 (67,3, 35,7 e 19,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, **Tabela 8**). Apesar disso, suas concentrações mais altas em T2M1 e T3M1 não implicam necessariamente que sua contribuição para o aroma do vinho Syrah seja importante. Por outro lado, a **Figura 14A** confirma que sua intensidade odorífera é maior no vinho do tratamento T1M1. Este é um exemplo da complexidade dos perfis voláteis e odoríferos dos vinhos. Nesse caso, um efeito de matriz pode ser responsável por esses resultados contraditórios aparentes. De fato, T2M1 e T3M1 apresentaram maior grau alcoólico (14,3 e 14,6%, respectivamente) em relação à T1M1 (11,5%) e a maior concentração de álcool pode ter suprimido a percepção de alguns dos compostos odoríferos em T2M1 e T3M1. Um efeito semelhante foi observado para o (*Z*)-3-hexen-1-ol. (#26, T1M1 = 35,7; T2M1 = 12,4; T3M1 = 8,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), uma vez que foi verificada

uma expressão odorífera mais elevada em T3M1 (**Figura 14**). Outros dois ésteres odoríferos apresentaram comportamento semelhante: acetato de etila (#1, I = 3,38% em T1M1 e 2461,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M1) e acetato de 2-fenil etanol (#9, I = 8,71% em T1M1 e 8,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M1), já que seus odores foram mais intensos no T1M1, apesar de suas concentrações serem maiores no T3M1. O aroma dos vinhos Malbec foi descrito como frutado quando o teor de etanol foi menor (10,0 a 12,0%) e como herbáceo quando o etanol foi maior (14,5 a 17,2%).<sup>199</sup> Escudero *et al.* também observaram que as porcentagens crescentes de etanol (0 a 14,5%) em vinhos sintéticos (soluções de etanol e água, com a adição de compostos padrão odoríferos, 5 g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico e pH ajustado para 3,5), resultaram na supressão de odores frutados. Na ausência de etanol, o aroma foi descrito como maçã e quando o teor de etanol aumentou para 12%, a intensidade do aroma diminuiu. Quando o percentual de etanol atingiu 14,5%, o aroma frutado não foi mais detectado.<sup>73</sup>



**Figura 14:** Mapa de calor obtido pela (A) intensidade e (B) persistência do odor mencionado nos vinhos Syrah analisados por GC-O-OSME elaborados com três diferentes graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante 10 dias (M1), resultando nas combinações T1M1, T2M1 e T3M1.

Por outro lado, maior intensidade odorífera e concentração, podem ser encontradas nos vinhos T1M1, como no caso do propanoato de etila (#II, I = não detectado e 12,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T1M1), butanoato de etila (#2, I = 4,93% e 34,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T1M1) e octanoato de etila (#5, I = 2,53% e 153,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T1M1). Esses resultados mostram que a complexa relação entre os ésteres e a maturação da uva exige estudos mais detalhados visando alcançar uma compreensão mais clara e melhor dos fenômenos subjacentes que ocorrem. Os resultados de Antalick *et al.*<sup>89</sup> suportam essas informações, uma vez que os autores relataram que as concentrações de octanoato de etila e acetato de 2-fenil etanol foram maiores nos vinhos elaborados com bagas menos maduras, embora a concentração de butanoato de etila tenha aumentado com períodos de maturação mais longos e a de acetato de etila permaneceu constante entre os dois estádios de maturação diferentes (20,9 e 22,7 °Brix para bagas de Cabernet Sauvignon e 21,1 e 23,0 °Brix para uvas de Syrah).

Uma tendência distinta foi encontrada para os ésteres hexanoato de etila (#3, I = 6,66 em T3M1 e 190,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T1M1, frutado, doce), 2-metil etil butirato (#III; I = 6,11 em T3M1 e 9,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T1M1, morango, fruta), e para o álcool (Z)-3-hexen-1-ol (#26, I = 1,22 em T3M1 e 35,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T1M1, refrescante, cítrico) cujas concentrações máximas foram encontradas no vinho T1M1, com bagas que não atingiram a maturação tecnológica, enquanto o seu maior impacto odorífero foi alcançado no T3M1 (**Figura 14, Tabelas 9 e 10**). O álcool 2-fenil etanol (#30; I = 6,56% e > 2840  $\mu\text{g L}^{-1}$ , rosa, mel) também mostrou sua intensidade odorífera máxima em T3M1. Uma tendência semelhante foi verificada para as concentrações de (Z)-3-hexen-1-ol nas uvas norte - americanas Pinot Noir, quando os sólidos solúveis variaram de 17 a 23 °Brix<sup>192</sup>, em uvas australianas Cabernet Sauvignon com 20,3° em vez de 26,0 °Brix<sup>184</sup>, e em uvas desta mesma casta com 18,1 em vez de 24,4 °Brix<sup>193</sup>. Maiores concentrações de hexanoato de etila (#3) também foram relatadas em vinhos feitos com uvas Cabernet Sauvignon com 20,9 em vez de 22,7 °Brix.<sup>89</sup>

Nenhum composto de odor negativo foi encontrado em maior intensidade odorífera na amostra T1M1. Em contraste, 3 compostos com as maiores intensidades de odores indesejáveis foram encontrados tanto na amostra T2M1 [ $\gamma$ -butirolactona (#XCII; pungente, solvente), 3-(metiltio)-1-propanol (#45; feijão verde cozido, mato úmido), ácido dodecanóico (#22; gás, ovo podre)] quanto em T3M1 [2-metil, 1-butanol (#XLIII; fermentado, solvente), ácido 2-metil propanóico (#15; queijo, rançoso), 3-metil, 1-butanol (#25; pungente, solvente) ].

**Tabela 10:** Concentrações dos compostos odoríferos detectados por GC-O-OSME e suas respectivas coeluições resolvidas através da GC×GC/TOFMS dos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas com graus de maturação [T1: 19 °Brix, T2: 21 °Brix, T3: 23 °Brix] e macerados durante 10 dias (M1). As condições experimentais GC-O-OSME e GC×GC/TOFMS estão descritas nas seções 3.4.4 e 3.4.5

Co*	#	Composto	C ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) T1M1	C ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) T2M1	C ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) T3M1	Odor GC-O	Odor literatura
<b>Contribuição positiva</b>							
	XLI	2-metil, 1-propanol <sup>c</sup>	358,6 ± 10,1 a	254,7 ± 11,5 b	248,5 ± 2,6 b	frutado, doce	maçã <sup>163</sup>
	35	1-butanol <sup>c</sup>	41,1 ± 0,3 c	55,2 ± 2,0 b	74,1 ± 4,2 a	refrescante, doce	doce <sup>177</sup>
	26	(Z)-3-hexen-1-ol <sup>d</sup>	35,7 ± 0,1 a	12,4 ± 2,9 b	8,6 ± 0,6 c	refrescante, cítrico	verde <sup>99</sup>
	LII	2-etil, 1-hexanol <sup>e</sup>	27,1 ± 0,9 a	23,5 ± 2,2 a	25,3 ± 3,4 a	frutado	frutado <sup>163</sup>
	29	álcool benzílico <sup>f</sup>	90,8 ± 0,4 b	75,6 ± 4,5 c	113,1 ± 7,4 a	frutado, doce	frutado, doce <sup>167</sup>
Co13	30	2-fenil etanol <sup>f</sup>	> 2840,0	> 2840,0	> 2840,0	rosa, mel	rosa <sup>99</sup>
	XCV	$\gamma$ -octalactona <sup>g</sup>	72,9 ± 0,07 a	45,5 ± 4,3 b	50,3 ± 0,4 b		coco, verde <sup>177</sup>
	31	1-dodecanol <sup>e</sup>	16,0 ± 0,05 b	9,3 ± 0,4 c	24,2 ± 1,6 a	floral	floral <sup>163</sup>
	I	acetato de etila <sup>h</sup>	1894,6 ± 13,8 b	1761,8 ± 12,0 c	2461,5 ± 24,1 a	frutado, frutas vermelhas	abacaxi <sup>94</sup>
	V	acetato de 2-metil propila <sup>i</sup>	19,7 ± 2,3 a	57,8 ± 0,2 b	7,4 ± 0,7 b	fruta madura	frutado <sup>156</sup>
	1	acetato de 3-metil butila <sup>h</sup>	437,9 ± 7,7 a	196,3 ± 4, c	236,2 ± 38,1 b	banana, frutado	banana, doce <sup>94</sup>
	2	butanoato de etila <sup>j</sup>	34,6 ± 0,7 a	20,1 ± 0,3 b	20,5 ± 4,1 b	frutado, doce	morango <sup>94</sup>
	3	hexanoato de etila <sup>j</sup>	190,0 ± 17,0 a	122,9 ± 4,1b	114,3 ± 8,7 b	frutado, doce	maçã verde <sup>94</sup>
	5	octanoato de etila <sup>k</sup>	153,2 ± 13,7 a	76,1 ± 12,6 b	66,6 ± 10,8 b	frutado, doce	doce, pêra <sup>94</sup>
Co7	6	decanoato de etila <sup>k</sup>	19,0 ± 0,03 c	67,3 ± 7,9 a	35,7 ± 7,4 b	frutado, floral, queimado, doce	frutado <sup>94</sup>
	XXII	succinato de etil metila <sup>i</sup>	10,03 ± 1,1 b	15,24 ± 0,69 a	< 0,7 c		não encontrado
Co11	9	acetato de 2-fenil etanol <sup>j</sup>	7,4 ± 0,4 b	6,0 ± 0,2 c	8,4 ± 0,5 a	rosa, floral, jasmim	rosa <sup>94</sup>

	LXX	$\beta$ -damascenona <sup>g</sup>	104,0 $\pm$ 5,3 b	72,2 $\pm$ 6,7 c	173,3 $\pm$ 16,2 a		mel, doce <sup>77</sup>
	11	tetradecanoato de etila <sup>j</sup>	< 5,5	< 5,5	< 5,5	floral	não encontrado
	LXXX VII	2,3-butanodiona <sup>g</sup>	33,8 $\pm$ 0,6 b	37,1 $\pm$ 2,1 a	34,7 $\pm$ 0,5 ab	doce, amanteigado	caramelo <sup>162</sup>
	43	citronelol <sup>l</sup>	17,1 $\pm$ 0,8 b	19,0 $\pm$ 2,2 b	26,7 $\pm$ 1,6 a	menta, cítrico	cítrico <sup>180</sup>
Co12	41	geraniol <sup>l</sup>	12,8 $\pm$ 0,5 a	14,2 $\pm$ 0,4 a	14,0 $\pm$ 0,8 a	refrescante, gerânio	rosa, gerânio <sup>99</sup>
	18	ácido hexanóico <sup>a</sup>	> 2160,0	> 2160,0	> 2160,0		queijo, gorduroso <sup>94</sup>
	LXXVI II	3-metil, 1-butanal <sup>c</sup>	4,7 $\pm$ 0,01 b	3,0 $\pm$ 0,1 b	27,3 $\pm$ 0,1 a	doce, frutado	verde, malte <sup>165</sup>
	II	propanoato de etila <sup>j</sup>	12,4 $\pm$ 0,2 a	8,9 $\pm$ 0,6 b	7,4 $\pm$ 0,05 b	refrescante, fruta verde	doce, frutado <sup>77</sup>
Co1	III	2-metil etil butirato <sup>j</sup>	9,5 $\pm$ 0,2 a	7,1 $\pm$ 0,05 b	5,6 $\pm$ 0,4 b	morango, frutado	maçã, doce <sup>77</sup>
	LXXI	metiltio acetato <sup>j</sup>	7,9 $\pm$ 0,4 b	5,6 $\pm$ 0,1 b	10,5 $\pm$ 0,3 a		sulfurado <sup>177</sup>
	LXXXI V	4-etil, benzaldeído <sup>f</sup>	< 7,1	< 7,1	< 7,1	doce, verde	verde, malte <sup>165</sup>
<b>Contribuição Negativa</b>							
	14	ácido acético <sup>a</sup>	> 2160	> 2160	> 2160	vinagre	vinagre <sup>162</sup>
	15	ácido 2-metil propanóico <sup>a</sup>	390,5 $\pm$ 11,0 b	510,0 $\pm$ 26,5 a	505,9 $\pm$ 18,5 a	queijo, rançoso	rançoso, ácido <sup>165</sup>
	22	ácido dodecanóico <sup>b</sup>	< 1,1	< 1,1	< 1,1	gás, ovo podre	seco, metálico <sup>163</sup>
	XLII	2-metil, 1-butanol <sup>c</sup>	45,1 $\pm$ 6,1 b	23,3 $\pm$ 2,0 b	337,7 $\pm$ 8,6 a	fermentado, solvente	terra, solvente <sup>182</sup>
	25	3-metil, 1-butanol <sup>c</sup>	> 1800	> 1800	> 1800	pungente, solvente	solvente, terra <sup>94</sup>
	34	1-hexanol <sup>c</sup>	1113,55 $\pm$ 34,4 a	892,7 $\pm$ 63,1 a	1035,1 $\pm$ 199,5 a	cozido, queimado	herbáceo <sup>94</sup>
	XCII	$\gamma$ -butirolactona <sup>g</sup>	371,3 $\pm$ 5,5 c	519,3 $\pm$ 40,4 b	600,6 $\pm$ 21,7 a	pungente, solvente	oleoso com nuances de gordura <sup>177</sup>
Co10	45	3-(metiltio)-1-propanol <sup>e</sup>	50,5 $\pm$ 2,6 a	44,2 $\pm$ 3,0 b	11,0 $\pm$ 0,1 c	feijão verde cozido, mato úmido	vegetal cozido <sup>167</sup>
	LIV	2-undecanol <sup>d</sup>	< 1,22	< 1,22	< 1,22		frutado <sup>162</sup>

Concentrações menores de ésteres em T2M1 e T3M1 podem estar relacionadas as altas concentrações do ácido 2-metil propanóico (#15, T2M1 = 510,0, I = 6,21% e T3M1 = 505,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ , I = 7,69%) (**Tabela 10**), ácido 3-metil butanóico (#17, com concentração de 265,5 em T1M1, 276,7 em T2M1 e 448,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  em T3M1) e do ácido fórmico (#XXXV com teores em T1M1 = 25,8, T2M1 = 59,5 e T3M1 = 140,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (resultados desses dois últimos ácidos não são mostrados nas tabelas). A presença dos ácidos pode reduzir a atividade das leveduras resultando em menores concentrações de ésteres.<sup>200</sup> Desse modo, a presença desses ácidos reduziu a concentração dos seguintes ésteres nos vinhos Syrah elaborados com uvas colhidas com 21 e 23 °Brix: acetato de 2-metil propila (#V), butanoato de etila (#2), acetato de 3-metil butila (#1), hexanoato de etila (#3), octanoato de etila (#5), propanoato de etila (#II) e 2-metil etil butirato (#III), bem como reduziu a percepção dos aromas agradáveis relacionados a esses compostos.

O potencial odorífero promissor do vinho T1M1, verificado pela intensidade do odor, foi confirmado na avaliação da persistência odorífera obtida pela GC-O-OSME. Na amostra T1M1 foram encontrados 8 compostos com odor desejável que se destacaram em relação à persistência do odor quando comparados às demais amostras, são eles: o 2-fenil etanol (#30; rosa, mel), 4-etil, benzaldeído (#LXXXIV; doce, verde), 3-metil, 1-butanal (#LXXVIII; doce, frutado), geraniol (#41; refrescante, gerânio), butanoato de etila (#2; frutado, doce), citronelol (#43; menta, cítrico), álcool benzílico (#29; frutado, doce) e acetato de 2-fenil etanol (#9; rosa, floral, jasmim).

Quatro e três compostos com a maior persistência de odor desejável foram encontrados, respectivamente, em T2M1 [2-etil, 1-hexanol (#LII; frutado), tetradecanoato de etila (#11; floral), 2,3-butanodiona (#LXXXVII; doce, amanteigado) e 4-etil, benzaldeído (#LXXXIV; doce, verde)] e T3M1 [acetato de 2-metil propila (#V; fruta madura), hexanoato de etila (#3; frutado, doce) e (*Z*)-3-hexen-1-ol (#26; refrescante, cítrico)].

Entre os compostos designados pela GC-O-OSME no *headspace* do vinho, o acetato de 2-fenil etanol (#9) e álcool 2-fenil etanol (#30) apresentaram as maiores persistências bem como intensidades odoríferas. O 2-fenil etanol origina-se principalmente na fermentação, tendo a 2-fenilalanina como seu precursor.<sup>201</sup> Já o acetato de 2-fenil etanol (#9) origina-se do 2-fenil etanol e sua contribuição é positiva estando relacionada ao odor de rosa.<sup>182</sup>

Quanto aos compostos com odor indesejável, um, dois e quatro compostos apresentaram a maior persistência de odores, respectivamente, nas amostras T1M1 [1-hexanol (#34; cozido, queimado)], T2M1 [ $\gamma$ -butirolactona (#XCII; pungente, solvente), ácido dodecanóico (#22;

gás, ovo podre) ] e T3M1 [3-(metiltio)-1-propanol (#45; feijão verde cozido, mato úmido), 3 - metil, 1-butanol (#25; pungente, solvente), ácido 2-metil propanóico (#15; queijo, rançoso) e ácido acético (#14; vinagre) ].

O composto sulfurado 3-(metiltio)-1-propanol apresentou maior intensidade (T2M1, I = 3,38) e persistência odorífera (T3M1, P = 3,27) nos vinhos Syrah elaborados com bagas em grau de maturação estendido (T3) se comparado ao T1M1 (menor I = 2,23 e P = 1,50), embora sua maior concentração tenha sido relacionada aos vinhos T1M1 ( $50,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (**Tabela 10**). A formação deste composto de enxofre se dá a partir da desaminação da metionina, seguida pelas reações de descarboxilação e redução durante a fermentação.<sup>202</sup> A depender das condições de cultivo das uvas (exposição solar, temperatura, metabolismo da levedura, tratamento térmico ou outras reações não - enzimáticas) a expressão dos odores frutados pode ser reduzida, devido à redução na síntese dos carotenóides e terpenos e o desenvolvimento dos odores vegetais pode ser aumentado, em razão da síntese de ácidos graxos insaturados e compostos sulfurados. Ainda assim, a alta concentração reportada para o composto sulfurado no vinho T1M1, mostra que o metabolismo secundário, responsável pela formação de carotenóides, terpenos, entre outros compostos que conferem odores agradáveis à essas bebidas, não foi prejudicado em favor do metabolismo primário (produção de glicose via fotossíntese e formação de aminoácidos necessários à sobrevivência da videira).<sup>11</sup> Isso é evidente quando se observa as maiores concentrações dos ésteres acetato de 2-metil propila (#V), butanoato de etila (#2), acetato de 3-metil butila (#1), hexanoato de etila (#3), octanoato de etila (#5), propanoato de etila (#II), 2-metil etil butirato (#III) no vinho T1M1. Adicionalmente, o vinho T1M1 também apresentou maiores intensidade e/ou persistência dos ésteres acetato de etila (#I), butanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila e acetato de 2-fenil etanol (#9), conforme relatado anteriormente.

Além disso, notas negativas de odor relacionadas ao ácido acético (#14, I = 7,50 em T3M1; P = 6,09 em T3M1), 3-metil, 1-butanol (# 25, I = 6,05 em T3M1; P = 5,62 em T3M1) e 1-hexanol (#34, I = 2,66 no T2M1; P = 2,25 no T1M1) estão em acordo com os resultados relatados para os vinhos australianos comerciais Syrah estudados através da GC-O-AEDA.<sup>182</sup>

O 2-metil, 1-propanol (#XLI, I = 4,47 - 5,80%, P = 4,10 - 5,75%, **Tabela 9**), o tetradecanoato de etila (#11, I = 1,00%, P = 1,05%) e o 3-(metiltio)-1-propanol (#45, I = 2,23 - 3,38%, P = 1,50-3,27%) também foram relacionados como apresentando intensidade e persistência odorífera em vinhos Merlot da Campanha do Rio Grande do Sul. As contribuições odoríferas destes compostos foram do mesmo tipo nos vinhos Merlot e nos vinhos Syrah em

estudo: os dois primeiros contribuíram positivamente e foram descritos como fruta, cítrico, fruta madura, doce, enquanto o composto de enxofre foi referido como negativo, com notas de odor de feijão verde cozido, mato molhado, gás, verde.<sup>185</sup>

Na parte 1 dos resultados e discussão desta tese, que empregou uma abordagem mais simples (GC/MS e cálculo de OAV) foram destacados seis compostos, também reportados como importantes pela análise de GC-O-OSME: butanoato de etila (#2, I = 2,90 - 4,93%, P = 2,57 - 5,76, hexanoato de etila (#3, I = 4,16 - 6,66%, P = 4,81 - 5,60%), octanoato de etila (#5, I = 2,17 - 2,53%, P = 1,82 - 3,32), 2-fenil etanol (#30, I = 4,08 - 6,56%, P = 5,71 - 13,58%), 3-metil, 1-butanol (#25, I = 4,44 - 6,05%, P = 4,56 - 5,62%) e 1-hexanol (#34, I = 1,95 - 2,66%, P = 1,55 - 2,25%). Os quatro primeiros voláteis contribuíram positivamente para o aroma do vinho, principalmente para o T1M1, enquanto os dois últimos deram uma contribuição odorífera negativa para os vinhos T3M1 ou T2M1. A abordagem do cálculo do OAV associada aos dados de GC/MS é amplamente utilizada para estimar a contribuição sensorial de compostos voláteis para o aroma global do vinho, já que é uma abordagem rápida e simples. A razão entre a concentração do composto e seu limiar de percepção é usada para obter o OAV. Sempre que o OAV é maior do que um, o composto é considerado como um contribuinte para o aroma do vinho.<sup>70</sup> Em contraste, a GC-O-OSME é uma medida de intensidade direta de estímulos olfatométricos que inclui avaliação qualitativa (descrição do odor) e quantitativa (tempo e intensidade) do eluato cromatográfico por um painel de juízes treinados. Embora, leve mais tempo para ser executada, a GC-O-OSME fornece resultados mais detalhados e confiáveis. Estas duas abordagens baseiam-se em diferentes estratégias e são utilizadas com finalidades distintas e, conseqüentemente, os seus resultados não podem ser comparados, embora tenha sido reportada a presença dos mesmos compostos importantes para o aroma do vinho por ambas técnicas. Curiosamente, nenhum destes compostos coeluiu com outros voláteis, exceto no que se refere à Co13, em que o álcool 2-fenil etanol (#30) coeluiu com a  $\gamma$ -octalactona (#XCV). As coeluições observadas no perfil odorífero dos vinhos Syrah, estão listadas nas **Tabelas 6 e A1**. A  $\gamma$ -octalactona, descrita com o odor de coco e verde (**Tabelas 9 e 10**), não foi um composto relevante em termos de razão de Fisher nem para GC-O-OSME, e sua concentração foi muito menor do que a observada para o 2-fenil etanol (**Tabela 10**).

Além disso, um dos compostos odoríferos mais persistentes e intensos dos vinhos Syrah (acetato de 2-fenil etanol, #9) coeluiu com  $\beta$ -damascenona (#LXX) na GC/MS (Co11), não sendo apontado pelo OAV como uma contribuição importante para o aroma do vinho. Os compostos #9 e #LXX também foram relacionados em coeluições em vinhos Merlot, sendo o

álcool apontado como de grande intensidade e persistência odorífera para os vinhos, também analisados por GC-O-OSME.<sup>185</sup>

Por outro lado, cinco compostos presentes no vinho Syrah que apresentaram importância odorífera de acordo com os resultados da GC-O-OSME, foram detectados apenas quando a GC×GC/TOFMS foi empregada (**Tabela 9**). Entre eles, quatro apresentaram contribuição positiva: 3-metil, 1-butanal (#LXXVIII, doce e frutado, I = 4,55, P = 4,62 no T1M1), 4-etil, benzaldeído (#LXXXIV, doce, verde, I = 1,14, P = 0,62 em T1M1), propanoato de etila (#II, refrescante, fruta, verde, I = 1,47 - 1,86, P = 1,39 - 1,59% em T2M1/T3M1), 2-metil etil butirato (#III, morango, frutado I = 5,09 - 6,11, P = 6,21 - 7,69, concentração 5,6 - 9,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , T1M1 - T3M1). O éster 2-metil etil butirato coeluiu (Co1) com o metiltio acetato (#LXXI, 5,6 - 10,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sulfuroso, **Tabela 10**) que confere um odor prejudicial ao vinho. Embora a concentração desses dois compostos coeluídos tenha sido da mesma ordem de magnitude, o odor positivo relacionado ao éster predominou sobre a nota desagradável do enxofre e a percepção final dos juízes da GC-O-OSME foi positiva.

O 2-metil, 1-butanol (#XLII, fermentado, solvente, I = 1,12 - 1,89, P = 1,79 - 2,35) que também foi detectado apenas na <sup>2</sup>D, apresentou uma contribuição negativa para o aroma do vinho, com descrição odorífera de terra e solvente. Apesar destes compostos terem sido detectados pelo nariz humano devido ao seu potencial de odor, eles foram encontrados em concentrações que não eram suficientes para torná-los detectáveis por GC/MS. Os compostos propanoato de etila (#II, 7,4 - 12,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), 2-metil etil butirato (#III, 5,6 - 9,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), e 2-metil, 1-butanol (#XLIII, 23,3 - 337,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram encontrados em níveis mais baixos nos vinhos Syrah do presente estudo, em comparação aos vinhos Syrah australianos, cujas concentrações variaram de 318 a 723  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 36 a 76  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 161250 a 208400  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.<sup>182</sup> Além disso, o aumento na concentração do 2-metil, 1-butanol no vinho T3M1 (de 23,3/45,1 para 337,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), está em acordo com os dados reportados por Bindon *et al.*<sup>184</sup>, que também encontraram uma maior concentração do 2-metil, 1-butanol, entre outros álcoois, em vinhos Cabernet Sauvignon quando as uvas foram colhidas com 26,0 em vez de 20,3 °Brix. Estes resultados confirmam que, à medida que as uvas amadurecem, podem perder compostos voláteis odoríferos que conferem notas positivas ao aroma, enquanto outros voláteis com efeito prejudicial ao aroma podem ter sua concentração aumentada.

Entre os compostos odoríferos detectados pela GC-O-OSME (**Tabelas 9 e 10 e Figura 14**), seis coeluições (Co 1, Co 7, Co 10, Co 11, Co 12, Co 13, cuja numeração está em acordo com as **Tabelas 6 e A1**) envolvendo 12 compostos importantes para o aroma dos vinhos Syrah

foram resolvidos apenas na <sup>2</sup>D da GC×GC/TOFMS, como mostra a **Figura 14**. De acordo com a GC-O-OSME houve predomínio do odor positivo em quase todas as coeluições, exceto para Co 10, que envolveu o 2-undecanol (#LIV, frutado, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 37,22 min, <sup>2</sup><sub>tr</sub> 3,29 s) e o 3-(metiltio)-1-propanol (#45, feijão verde cozido, mato úmido, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 37,22 min, <sup>2</sup><sub>tr</sub> 2,31 s). Neste caso, a concentração do 2-undecanol foi menor em relação a do 3-(metiltio)-1-propanol e o odor final relatado pela equipe da GC-O-OSME foi negativo. De modo oposto, a Co 12, que compreendeu o geraniol (#41, refrescante, gerânio, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 41,88 min, <sup>2</sup><sub>tr</sub> 2,81 s) e o ácido hexanóico (#18, queijo, gorduroso, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 41,88 min, <sup>2</sup><sub>tr</sub> 1,99 s), foi referida com um odor fresco de gerânio, apesar da maior concentração de ácido hexanóico observada nos vinhos (> 2160 µg L<sup>-1</sup>) comparado a 12,8 - 14,2 µg L<sup>-1</sup> encontrado para o geraniol (**Tabelas 9 e 10**).

O sulfurado metiltio acetato (#LXXI) e o éster decanoato de etila (#6) envolvidos nas Co 1 e Co 7 foram apontados dentre os 29 compostos mais relevantes em termos de razão de Fisher para a separação dos vinhos (**Tabela 8**). O 2-metil etil butirato (#III) foi considerado de importância odorífera na avaliação realizada pela GC-O-OSME e coeluiu com o #LXXI (Co 1). Finalmente, o decanoato de etila (#6) foi apontado como importante também na olfatometria. A 1-(2-furanyl) etanona (#CII) e o 2-hidróxi-4-metil pentanoato de etila (#XVIII) foram parte das Co 5 e Co 6, respectivamente e também foram encontrados entre os 29 compostos mais relevantes apontados pela razão de Fisher. Na Co 5, a 1-(2-furanyl) etanona (#CII, caramelo, café, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 28,93 min; <sup>2</sup><sub>tr</sub> 2,62 s) coeluiu com a cânfora (#LXIII, cânfora, menta, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 28,93 min; <sup>2</sup><sub>tr</sub> 5,85 s) e na Co 6 o 2-hidróxi-4-metil pentanoato de etila (#XVIII, fruta, limão, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 30,45 min; <sup>2</sup><sub>tr</sub> 2,80 s) coeluiu com o ácido propanóico (#XXXVI, pungente, rançoso, <sup>1</sup><sub>tr</sub> 30,45 min; <sup>2</sup><sub>tr</sub> 1,79 s). Estes compostos não foram considerados relevantes nas análises de GC-O-OSME.

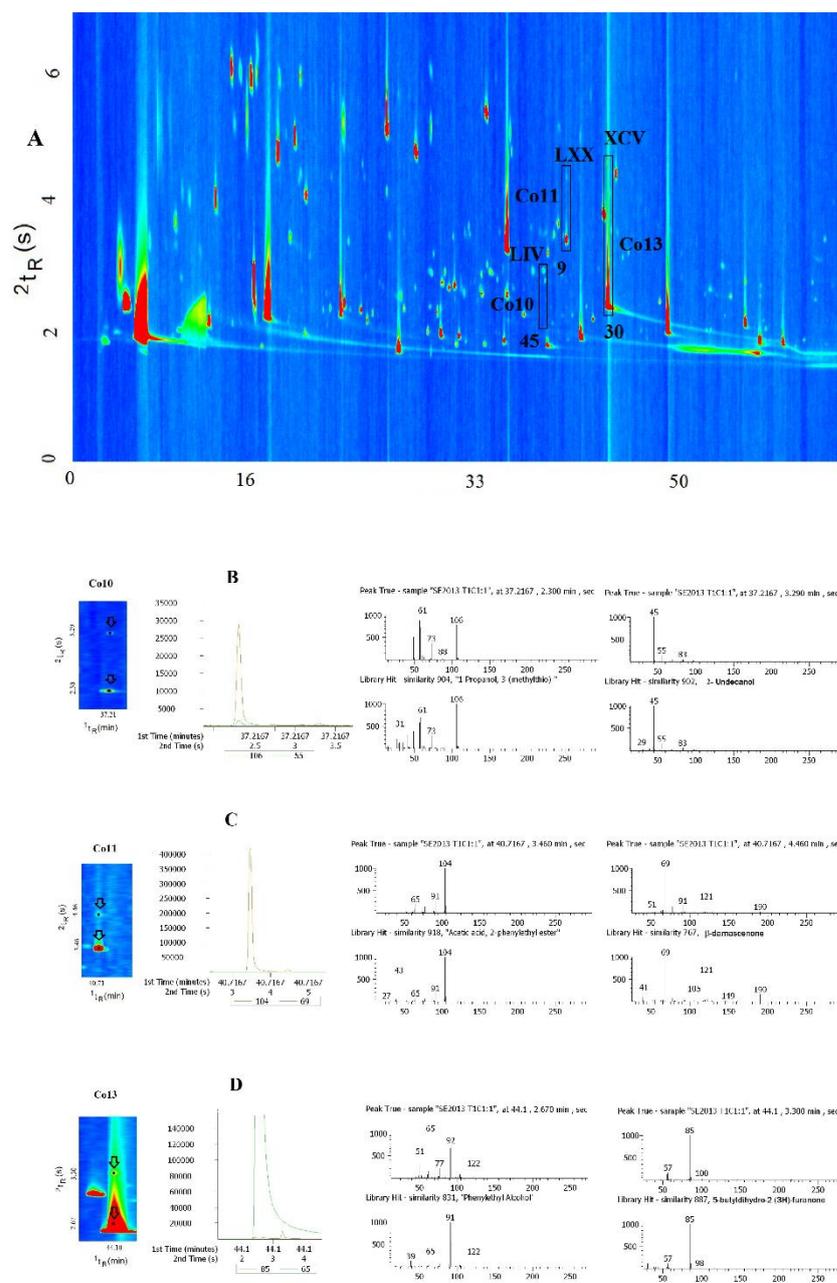
Três das coeluições ocorridas nos vinhos Syrah, são relatadas pela primeira vez em vinhos: Co 1, Co 7 e Co 12 (**Figura A1**). As outras já foram relatadas no *headspace* dos vinhos Merlot: Co 5, Co 10, Co 11 e Co 13.

A exemplo da importância do uso das técnicas olfatométricas combinadas com a cromatografia bidimensional abrangente, vários trabalhos foram referidos na literatura. Nicolli *et al.* reportaram em estudo com vinhos Merlot obtidos experimentalmente da região da Campanha do Rio Grande do Sul (Brasil), a identificação de 220 compostos voláteis por meio da análise de GC×GC/TOFMS. Dentre os quais, 5 compostos foram apontados pela análise de GC-O-OSME como importantes para o aroma dessas bebidas. No entanto, foram identificados corretamente, somente quando empregada a técnica de GC×GC/TOFMS, devido a presença de coeluições com outros compostos (5 coeluições que envolviam 13 compostos: (1) ácido

hexanóico coeluiu com a geranyl acetona; (2) 1-propanol coeluiu com o 2-butenal; (3) octanoato de etila coeluiu com a 5-metil-2(3H)-furanona e com o *p*-cimeno; (4) acetato de 2-fenil etanol coeluiu com a  $\beta$ -damascenona; (5) 3-(metiltio)-1-propanol coeluiu com a isopiperitona, o (*Z*)-6-nonen-1-ol e o 2-undecanol <sup>185</sup>.

O uso combinado das técnicas de GC $\times$ GC/TOFMS e GC-O-FD (frequência de detecção) também foi relatado por Chin *et al.*<sup>203</sup> para analisar vinhos Syrah australianos comerciais. Neste estudo, foi utilizado um sistema que acopla a GC $\times$ GC/MDGC e FID/O/MS para analisar o perfil odorífero dos vinhos. Após uma inspeção mais cuidadosa das regiões odoríferas pela técnica de MDGC, foram identificados 11 compostos odoríferos de grande potencial para os vinhos (ácido acético, 1-octen-3-ol, octanoato de etila, 2-oxo-nonanoato de metila, ácido butanóico, ácido 2-metilbutanóico, ácido 3-metilbutanóico, 3-(metiltio)-1-propanol, ácido hexanóico,  $\beta$ -damascenona e 3-fenil propanoato de etila).

Villers *et al.* <sup>156</sup> também mostraram a eficiência do uso associado das técnicas cromatográficas para a resolução de zonas odoríferas não identificadas pela cromatografia monodimensional, presentes no perfil odorífero de sidras francesas comerciais. Neste estudo foi realizada a avaliação das sidras pela GC-O-OSME e 41 zonas de importância odorífera foram detectadas, das quais 25 foram atribuídas à compostos identificados por GC/MS. As zonas indeterminadas pela olfatométrica foram submetidas à análise por cromatografia gasosa bidimensional abrangente combinada com espectrometria de massa por tempo de voo (GC $\times$ GC/TOFMS). Oito regiões odoríferas foram elucidadas apenas com o uso da <sup>2</sup>D da GC $\times$ GC, e dentre elas a do composto oct-1-en-3-ona, considerado um dos mais significativos para o aroma das sidras estudadas.



**Figura 15:** Separação dos compostos voláteis do *headspace* dos vinhos Syrah (A) Diagrama de cores obtido por GC×GC/TOFMS. O gradiente de cor reflete a intensidade do sinal TOFMS sendo que o azul representa os sinais baixos e o vermelho os sinais altos. A região expandida do gráfico colorido mostra detalhadamente os picos coeluídos na primeira dimensão, os picos modulados das coeluições e os espectros de massa deconvoluídos dos compostos identificados nas seguintes regiões de coeluição: (B) Co 10: 2-undecanol #LIV e 3-(metiltio)-1-propanol #45; (C) Co 11: acetato de 2-fenil etanol #9 e  $\beta$ -damascenona #LXX; (D) Co 13: 2-fenil etanol #30 e  $\gamma$ -octalactona # XCV.

## *RESUMO DOS RESULTADOS*

## 5. RESUMO DOS RESULTADOS

### PARTE 1

#### Parâmetros físico-químicos

- Através da ferramenta estatística ANOVA - PCA foi possível observar que o efeito da maturação é significativo nos parâmetros físico-químicos.
- Quanto maior o período de maturação da uva (de T1, T2 para T3), maiores os valores de intensidade de cor, antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais, índice de polifenóis totais (IPT), teor alcoólico e extrato seco.
- A intensidade da cor foi o principal parâmetro para o agrupamento das amostras com relação ao tratamento empregado (T1, T2 e T3).
- O IPT dos vinhos elaborados a partir de uvas mais maduras (tratamentos T2 e T3) alcançaram valores superiores a 65, o que sugere que esses vinhos podem ser destinados ao armazenamento prolongado (vinhos de guarda), independentemente do tempo de maceração empregado.
- A acidez total titulável do vinho T1 foi maior (8,83 g L<sup>-1</sup>) em relação ao vinho T3 (6,69 g L<sup>-1</sup>) sendo esse comportamento esperado, visto que é um indicativo do amadurecimento da uva.
- Com relação ao fator tempo de maceração, a ANOVA - PCA não revelou a formação de grupos de acordo com os diferentes tempos de maceração empregados (M1 - 10 dias, M2 - 20 dias e M3 - 30 dias).
- A interação do grau de maturação da uva e o tempo de duração da maceração não teve efeito nos parâmetros físico-químicos.

#### Composição fenólica

- O grau de maturação (T) da uva se mostrou significativo para o teor de compostos fenólicos, de acordo com a ANOVA - PCA.
- Para a maioria dos compostos fenólicos investigados neste trabalho, o aumento do período de maturação da uva de T1 para T2 promoveu o aumento do conteúdo fenólico

do vinho. No entanto, o prolongamento do tempo de maturação (T2 a T3) reduziu a concentração de alguns desses compostos.

- A concentração total dos ácidos fenólicos e dos flavonóis aumentou com o avanço da maturação da uva (de T1 a T3).
- O efeito do fator da maceração (M) no conteúdo fenólico dos vinhos foi significativo quando houve o aumento de 10 (M1) para 20 dias (M2).
- A concentração das antocianinas diminuiu à medida em que o tempo de maceração foi prolongado de M1 para M3 (30 dias).
- Outros compostos, tais como os flavanóis (-)-epicatequina (#11), (+)-catequina (#10), procianidina B2 (#14), procianidina B1 (#13) e o ácido gálico (#2) apresentaram concentrações mais elevadas quando a maceração ocorreu por período prolongado (M2 e M3).
- O ácido fenólico majoritário nos vinhos Syrah foi o ácido gálico (#2), sendo que sua concentração aumentou com o avanço da maturação da uva, bem como com o aumento do tempo de maceração dos vinhos (de 9,73 no T1M1 a 18,20 mg L<sup>-1</sup> no T3M3).
- Nenhum efeito significativo foi observado nos compostos fenólicos devido à interação do grau de maturação da uva e do tempo de maceração.

### **Composição volátil**

- O método de análise cromatográfica foi validado e se mostrou adequado para a quantificação dos voláteis dos vinhos Syrah.
- Os ésteres acetato de 3-metil butila (#1), butanoato de etila (#2), hexanoato de etila (#3), octanoato de etila (#5) e succinato de dietila (#8), cujos odores são frutados, apresentaram OAV maior que 1 nas amostras de vinho Syrah estudadas.
- A concentração total dos ésteres em estudo nos vinhos Syrah aumentou de 5934 em M1 para 9892 µg L<sup>-1</sup> em M3 e isto ocorreu, principalmente, devido ao aumento na concentração do succinato de dietila, visto que este é o éster majoritário nos vinhos Syrah.
- O succinato de dietila (#8), 2,3-butanodiol (#36), 1-hexanol (#34), tetradecanoato de etila (#11), 2-fenil etanol (#30), 3-metil, 1-pentanol (#33), (*E*)-nerolidol (#42), álcool benzílico (#29) e 1-nonanol (#28) apresentaram altas concentrações nos vinhos macerados por 20 e 30 dias (M2 e M3).

- A concentração dos compostos acetato de 3-metil butila (#1) e ácido nonanóico (#20) foi maior com o tempo de maceração mais curto (M1).
- O linalol (odor floral) foi o único terpeno que apresentou  $OAV > 1$ , mostrando tendência a concentrações mais elevadas com o avanço da data da colheita.
- A concentração dos álcoois 1-nonanol (#28), álcool benzílico (#29), 2-fenil etanol (#30), 3-metil, 1-pentanol (#33), 1-hexanol (#34) e 2,3-butanodiol (#36), que apresentam odores de “não encontrado”, “frutado e doce”, “rosa”, “herbáceo e cacau”, “herbáceo”, “frutado”, respectivamente, variou significativamente com o aumento do tempo de maceração (M2 e M3).
- O ácido 2-metil propanóico (#15) e o ácido acético (#14) atingiram máxima concentração quando as uvas foram colhidas com 120 DAP (T2), o ácido 9-decenóico (#23) e o ácido hexanóico (#18) apresentaram menores concentrações nos vinhos T2.
- Os ácidos com  $OAV > 1$  nos vinhos Syrah foram o ácido 3-metil butanóico (#17), ácido hexanóico (#18), ácido octanóico (#19) e ácido 9-decenóico (#23).
- A principal contribuição da interação dos fatores maturação e tempo de maceração é observada em termos de redução da concentração de compostos voláteis, como linalol (#40) e hexadecanoato de etila (#12) em amostras de vinho que apresentaram os mesmos níveis de ambos os fatores (T1M1, T2M2 e T3M3). Entretanto, suas concentrações aumentaram nos vinhos que correspondem a níveis cruzados (T1M2, T2M1, T2M3, T3M1, T3M2).

## PARTE 2

- 145 compostos foram identificados positiva e/ou tentativamente nos vinhos Syrah do Vale do São Francisco por GC×GC/TOFMS.
- A razão de Fisher indicou 29 compostos voláteis como os mais discriminantes, os quais foram quantificados por GC×GC/TOFMS e empregados na análise de componentes principais (PCA).
- A PCA mostrou que as amostras de vinho Syrah maceradas por menor período (M1), foram claramente separadas das demais (M2 e M3).
- O vinho T1M1 apresentou concentração significativamente maior dos seguintes compostos: ácido decanóico (#21), (Z)-3-hexen-1-ol (#26), 1-octanol (#27), acetato de hexila (#IX), acetato de 3-hexen-1-ol (#XII), dodecanoato de metila (#XXVI), 2-hidróxi

benzoato de etila (#XXVII), 2-furancarboxilato de etila (#CIII), 2-metil dihidro- 3(2H)-tiofenona (#LXXII) e 3-(metiltio)-propionato de etila (#LXXIV).

- Considerando que os vinhos macerados por um período mais curto (10 dias, M1) apresentaram as maiores concentrações dos 21 compostos voláteis mostrados na PCA, as amostras T1M1, T2M1 e T3M1 foram analisadas pela técnica de GC-O-OSME.
- 31 voláteis odoríferos foram percebidos nos vinhos Syrah: Onze ésteres, dez álcoois, três ácidos, dois terpenos, dois aldeídos, uma cetona, uma lactona e um composto sulfurado.
- O vinho T1M1 destacou-se em relação às demais amostras devido à maior intensidade de 12 compostos odoríferos, sendo que nenhum dos compostos de odor negativo foi encontrado nestas amostras em maior intensidade. Em contraste, 3 compostos com as maiores intensidades de odores indesejáveis foram encontrados tanto na amostra T2M1 quanto na T3M1.
- Um menor número de compostos com a maior intensidade e descrição de odor positivo foram encontrados em T2M1 (2 compostos) e em T3M1 (4 compostos).
- O potencial odorífero promissor do vinho T1M1, verificado pela intensidade do odor, foi confirmado na avaliação da persistência odorífera obtida pela GC-O-OSME através da presença de 8 compostos com aroma positivo.
- Apenas quatro e três compostos com a maior persistência de odor desejável foram encontrados, respectivamente, em T2M1 e T3M1.
- Cinco compostos presentes nos vinhos Syrah que apresentaram importância odorífera de acordo com os resultados da GC-O-OSME, foram detectados apenas quando a GC×GC/TOFMS foi empregada.
- Entre os compostos odoríferos detectados pela GC-O-OSME, seis coeluições cromatográficas (Co 1, Co 7, Co 10, Co 11, Co 12, Co 13) envolvendo 12 compostos importantes para o aroma do vinho Syrah foram resolvidos apenas na <sup>2</sup>D da GC×GC/TOFMS.

## ***6. CONCLUSÃO***

## 6. CONCLUSÃO

Nas análises realizadas por GC/MS e HPLC-DAD-FD observou-se que as uvas colhidas com maior grau de maturação (21 - 23 °Brix) e maceradas por períodos mais longos durante a etapa de vinificação (> 20 dias) foram as mais apropriadas para produzir vinhos com maiores concentrações de ésteres, álcoois e terpenos descritos na literatura como positivos para o aroma/sabor do produto, e compostos fenólicos, que são conhecidos por conferirem características sensoriais adequadas ao vinho e melhorarem sua qualidade nutricional no que tange aos benefícios à saúde humana. Um maior grau de maturação da uva levou também a um aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais quantificados por método espectrofotométrico e na intensidade de coloração do vinho. Algumas antocianinas, flavonóis, procianidina A2 e o terpeno linalol, também se apresentaram em maiores concentrações nos vinhos elaborados a partir de uvas mais maduras. A duração da etapa de maceração não influenciou os parâmetros físico-químicos dos vinhos Syrah. Em geral, um tempo de maceração mais prolongado produziu vinhos com níveis mais elevados de flavanóis, ácido gálico, alguns ésteres, álcoois, nerolidol, enquanto o ácido nonanóico (cujo aroma é descrito como “desagradável”) teve sua concentração reduzida. O uso da ANOVA - PCA foi vantajoso devido à possibilidade da análise de múltiplas respostas e mostrou que T (estádio de maturação da uva) e M (tempo de maceração), assim como a interação entre os dois fatores, influenciaram na composição dos compostos voláteis dos vinhos Syrah.

Quando as amostras foram analisadas através do emprego das técnicas de GC×GC/TOFMS, GC-O-OSME, GC/FID e GC/MS, foi possível verificar que a colheita das uvas a partir dos 21 °Brix e/ou o prolongamento do tempo de maceração ( $\geq 20$  dias) são desfavoráveis à obtenção de vinhos com potencial odorífero positivo. Portanto, a combinação mais promissora para elaboração de vinhos com maiores concentrações de voláteis de poder odorífero positivo ocorreu com uvas colhidas a 19 °Brix e maceradas por 10 dias.

É relevante ressaltar que os compostos apontados como importantes pela razão de Fisher não foram detectados quando a GC/MS foi empregada e isso pode ser atribuído a uma menor sensibilidade da técnica monodimensional, bem como às coeluições observadas entre alguns compostos, que levam a uma identificação equivocada. Apesar da GC/MS ser uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas para analisar voláteis em vinhos, a sua sensibilidade pode ser insuficiente para detectar componentes em baixas concentrações, que podem ser importantes contribuintes para o aroma do vinho. Além disso, a GC×GC geralmente fornece maior eficiência de separação, resultando em maior sensibilidade para a detecção de compostos em

baixas concentrações, especialmente quando do uso de modulação criogênica. Consequentemente, os compostos que foram destacados pela razão de Fisher não podem ser vinculados aos evidenciados pela GC/MS, sendo este um dos principais motivos apontados pelas diferenças observadas entre os resultados do presente trabalho. Por outro lado, isso mostra que o uso da GC×GC tornou possível a detecção e identificação de compostos que não podiam ser analisados na GC/MS, o que representa um avanço e ao mesmo tempo mostra as deficiências da GC/MS. A GC×GC/TOFMS também auxiliou na elucidação da identidade dos compostos que coeluíram em zonas odoríferas indicadas pela GC-O-OSME.

Por fim, o presente trabalho mostrou que o uso combinado das técnicas cromatográficas (gasosa e líquida) pode ser uma ferramenta promissora para definir práticas de manejo de vinhedos, tratamentos de vinificação, tempo de envelhecimento do vinho, entre outros parâmetros. Embora o uso das técnicas de GC×GC/TOFMS, GC-O-OSME, GC/FID e GC/MS tenha evidenciado que as uvas colhidas com 19 °Brix e maceradas por 10 dias são as mais promissoras para a obtenção de vinhos com maior potencial odorífero, deve-se considerar também para a escolha da melhor combinação entre estágio de maturação da uva e tempo de maceração com relação à composição fenólica. Sendo assim, levando em consideração todas as análises realizadas no presente trabalho, a melhor condição para a obtenção de vinhos de boa qualidade se deu com uvas colhidas a partir de 21 °Brix e maceradas por período superior a 20 dias. Os resultados obtidos, além de proporcionarem inovações científicas e tecnológicas relacionadas ao cultivo e ao processamento das uvas Syrah para a elaboração de vinhos tintos finos, também pretendem apoiar a conquista do selo de Indicação Geográfica e Denominação de Origem para os vinhos Syrah do Vale do São Francisco, bem como a melhoria da qualidade dessas bebidas.

## ***7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/28923708/estudos-sobre-a-vitivinicultura-no-vale-do-sao-francisco-serao-apresentados-durante-evento>.
- (2) Orlando, T. G. S. *Ciênc. Agrotec* **2008**, 32 (3), 749–755.
- (3) Hidalgo, L. *Tratado de Viticultura General*; Mundi-Prensa: Madrid, 1999.
- (4) Freund, M. *Vinho no Sertão: Vinicultura no Vale do São Francisco. Pernambuco*; Senai: Brasília, DF, 2007.
- (5) Oliveira, C. M.; Ferreira, A. C. S.; De Freitas, V.; Silva, A. M. S. *Food Res. Int.* **2011**, 44, 1115–1126.
- (6) Aznar, M.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2700–2707.
- (7) Ribéreau- Gayon, P.; Dubourdie, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. *Handbook of Enology - The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; John Wiley & Sons, Ltda, 2006; Vol. 2.
- (8) Ribéreau- Gayon, P.; Dubourdie, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. *Handbook of Enology - The Microbiology of Wine and Vinifications*; John Wiley & Sons, Ltda: Chichester, 2006; Vol. 1.
- (9) Petropulos, V. I.; Bogeva, E.; Stafilov, T.; Stefova, M.; Siegmund, B.; Pabi, N.; Lankmayr, E. *Food Chem.* **2014**, 165, 506–514.
- (10) Peynaud, E. *Connaissance et travail du vin.*, 5th ed.; Dunod, Ed.; Paris, 2012.
- (11) Jackson, R. S. *Wine Science - Principles and Applications*, 4th ed.; San Diego, CA, USA., 2014; Vol. 1.
- (12) Gamero, A.; Wesseling, W.; Jong, C. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 1–7.
- (13) Demyttenaere, J. C. R.; Dagher, C.; Sandra, P.; Kallithraka, S.; Verhe, R.; De Kimpe, N. *J. Chromatogr. A* **2003**, 985, 233–246.
- (14) Heftmann, E. *Chromatography*; Elsevier: Amsterdam, 2004.
- (15) Reineccius, G. *Flavor chemistry and technology*, 2nd ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, EUA, 2006.
- (16) Ryan, D.; Morrison, P.; Marriott, P. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1071, 47–53.
- (17) Lima, M. A. C.; Leão, P. C.; Silva, A. L.; Azevedo, S. S. N.; Santos, P. S. In

- Congresso Brasileiro de Fruticultura*; Florianópolis, 2004.
- (18) Siqueira, T. . *Vitivinicultura mundial:1961-2007*; Rio de Janeiro, 2007.
- (19) Lona, A. A. *Vinhos e Espumantes: elaboração, degustação e serviços*; Age: Porto Alegre, 2009.
- (20) Instituto do Vinho do Vale do São Francisco.  
<https://www.vinhovsaf.com.br/site/internas/valetecnico.php>.
- (21) Sousa, J. S. I. *Viticultura brasileira: principais variedades e suas características.*; Fealq: Piracicaba, SP, 2002.
- (22) Coelho, E.; Rocha, S. M.; Barros, A. S.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 597 (2), 257–264.
- (23) Guerra, C. C.; Zanús, M. C. *Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado. Maturação e colheita.*, Embrapa Uv.; Bento Gonçalves, RS, 2003.
- (24) Guerra, C. C.; Barnabé, D. In *Vinho*; Venturini-Filho, W. G., Ed.; Edgard Blucher: São Paulo, 2005; pp 423–451.
- (25) Peynaud, E. *Enología práctica: conocimiento y elaboracion del vino.*, 2nd ed.; Mundi-Prensa: Madrid, Spain., 1984.
- (26) Robredo, L. M.; Junquera, B.; González-Sanjosé; M. L., & Barrón, L. J. *Ital. J. Food Sci.* **1991**, 3, 173–180.
- (27) Junquera, B.; Robredo, L. M.; Díez, C. *An. Edafol. y Agrobiol.* **1988**, 47, 1619–1634.
- (28) Kliewer, W. M. *Am. J. Enol. Vitic.* **1967**, 18, 33–41.
- (29) Maujean, A.; Brun, O.; Vesselle, G.; Bureau, G.; Boucher, J. M.; Cousin, M. *Vitis* **1983**, 22 (2), 137–150.
- (30) González-Sanjosé, M. L.; Barrón, L. J. R.; Díez, C. *J. Sci. Food Agric.* **1990**, 51, 337–343.
- (31) Do, C. B.; Cormier, F. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **1991**, 24, 49–54.
- (32) Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Robinson, S. P. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2003**, 9, 15–27.
- (33) Peña-Neira, A.; Dueñas, M.; Duarte, A.; Hernandez, T.; Estrella, I.; Loyola, E. *Vitis* **2004**, 43, 51–57.
- (34) Kennedy, J. A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. J.; Jones, G. P. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 5348–5355.
- (35) Fernández, S. B.; Hernández, T.; Estrella, I.; Gómez-Cordovés, C. *Z. Leb. Unters. Forsch.* **1992**, 194, 351–354.

- (36) Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Food Chemistry*, 4th ed.; Springer, 2009.
- (37) Plutowska, B.; Wardencki, W. *Food Chem.* **2007**, *101*, 845–872.
- (38) Ebeler, S. E. *Food Rev. Int.* **2001**, *17* (1), 45–64.
- (39) Wilson, B.; Strauss, C. R.; Williams, P. J. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, *37*, 107–114.
- (40) Strauss, C. R.; Wilson, B.; Anderson, R.; Williams, P. J. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 23–27.
- (41) Strauss, C. R.; Gooley, P. R.; Wilson, B.; Williams, P. J. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 519–524.
- (42) Peyrot des Gachons, C. Tominaga, T.; Dubourdieu, D. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 144–146.
- (43) Giovannini, E.; Manfroi, V. *Viticultura e Enologia: Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros*; Bento Gonçalves, 2009.
- (44) Cadot, Y.; Caillé, S.; Samson, A.; Barbeau, G.; Cheynier, V. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *732*, 91–99.
- (45) Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S. Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. *Food Chem.* **2006**, *95*, 394–404.
- (46) Cheynier, V. In *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*; Markham, O. M., Anderson, K. R., Eds.; New York: Boca Raton, 2006; pp 263–370.
- (47) Konczak, I.; Zhang, W. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *5*, 239–240.
- (48) He, F.; Mu, L.; Yan, G. L.; Liang, N. N.; Pan, Q. H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C. *Q. Molecules* **2010**, *15*, 9057–9091.
- (49) Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M.; Velasco, R. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7692–7702.
- (50) Gollop, R.; Farhi, S.; Perl, A. *Plant Sci.* **2001**, *161*, 579–588.
- (51) Cortell, J. M.; Halbleib, M.; Gallagher, A. V.; Righetti, T. L.; Kennedy, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5798–5808.
- (52) Mazza, G.; Brouillard, R. *Food Chem.* **1987**, *25*, 207–225.
- (53) Flamini, R.; Mattivi, F.; De Rosso, M.; Arapitsas, P.; Bavaresco, L. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (10), 19651–19669.
- (54) Azuma, A.; Yakushiji, H.; Koshita, Y.; Kobayashi, S. *Planta* **2012**, *236*, 1067–1080.
- (55) Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230S–242S.
- (56) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. *Am. J. Clin. Nutr.*

- 2004**, 79, 727–747.
- (57) Koyama, K.; Ikeda, H.; Poudel, P. R.; Goto-Yamamoto, N. *Phytochemistry* **2012**, 78, 54–64.
- (58) Neo, Y. P.; Ariffin, A.; Tan, C. P.; Tan, Y. A. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, 43, 1832–1837.
- (59) Day, A. J.; Mellon, F.; Barron, D.; Sarrazin, G.; Morgan, M. R.; Williamson, G. *Free Radic. Res.* **2001**, 35, 941–952.
- (60) Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V. *FEBS Lett.* **1998**, 426, 331–336.
- (61) Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. *Phytochemistry* **1994**, 35, 781–784.
- (62) Baba, S.; Furuta, T.; Horie, M.; Nakagawa, H. *J. Pharm. Sci.* **1991**, 70, 780–782.
- (63) Aura, A. M.; O’Leary, K. A.; Williamson, G. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (1725–1730).
- (64) Villiers, A.; Alberts, P.; Tredoux, A. G. J.; Nieuwoudt, H. H. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 730, 2–23.
- (65) Lingua, M. S.; Fabani, M. P.; Wunderlin, D. A.; Baroni, M. V. *Food Chem.* **2016**, 208, 228–238.
- (66) Van Leeuw, R.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J. O.; Dommès, J. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, 36 (1–2), 40–50.
- (67) Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coisson, J. D.; Bordiga, M.; Arlorio, M. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, 242 (7), 1057–1068.
- (68) Natividade, M. M. P.; Corrêa, L. C.; Souza, S. V. C.; Pereira, G. E.; Lima, L. C. D. *Microchem. J.* **2013**, 110, 665–674.
- (69) Piggott, J. R. *J. Sens. Stud.* **1990**, No. 4, 261–272.
- (70) Guth, H. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3027–3032.
- (71) Simón, B. F. De; Cadahía, E.; Álamo, M.; Nevares, I. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 660, 211–220.
- (72) Clarke, R. J.; Bekker, J. *Wine flavour chemistry*; Blackwell Publishing: Oxford, 2004.
- (73) Escudero, A.; Campo, E.; Fariña, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 4501–4510.
- (74) Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F. F. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 38, 1145–1159.
- (75) Newman, J. D.; Chappell, J. *Crit. Rev Biochem. Mol.* **1999**, 34, 95–106.
- (76) Canuti, V.; Conversano, M.; Calzi, L. M.; Heymann, H.; Matthews, M. A.; Ebeler, S. E. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 3012–3022.

- (77) Gurbuz, O.; Rouseff, J. M.; Rouseff, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3990–3996.
- (78) Winterhalter, P.; Schreier, P. *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9*.
- (79) Feng, H.; Yuan, F.; Skinkis, P. A.; Qian, M. C. *Food Chem.* **2015**, *173*, 414–423.
- (80) Navajas, M. P. S.; Campos, E.; Culleré, L.; Zurbano, P. F.; Valentin, D.; Ferreira, V. J. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5574–5585.
- (81) Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 103–108.
- (82) Falcão, L. D.; Revel, G.; Perello, M. C.; Moutsiou, A.; Zanus, M. C.; Bordignon-Luiz, M. T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (9), 3605–3612.
- (83) Francis, I. L.; Newton, J. L. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 114–126.
- (84) López, R.; Ortín, N.; Trujillo-Pérez, J. P.; Cacho, J.; Ferreira, V. J. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3419–3425.
- (85) Tehlivets, O.; Scheuringer, K.; Kohlwein, S. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771*, 255–270.
- (86) Yilmaztekin, M.; Kocabey, N.; Hayaloglu, A. A. *J. Food Sci.* **2015**, *80* (3), C556–C563.
- (87) Bardi, L.; Cocito, C.; Marzona, M. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *47*, 133–140.
- (88) Baena-Ruano, S.; Santos-Duenas, I. M.; Mauricio, J. C.; García-García, I. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 2675–2681.
- (89) Antalick, G.; Šuklje, K.; Blackman, J. W.; Meeks, C.; Deloire, A.; Schmidtke, L. M. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (18), 4664–4672.
- (90) Marais, J. *Vitis* **1980**, *19*, 151–164.
- (91) Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 569–581.
- (92) Darriet, P.; Tominaga, T.; Boidron, V.; Dubourdie, D. *Flavour Fragr. J.* **1995**, *10*, 385–392.
- (93) Fang, Y.; Qian, M. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 22–29.
- (94) Peinado, R. A.; Moreno, J. A.; Muñoz, D.; Medina, M.; Moreno, J. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6389–6393.
- (95) Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *96*, 235–252.
- (96) Mosedale, J. R.; Puech, J. L. *Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 95–101.
- (97) Guillén, M. D.; Manzanos, M. J. *Food Chem.* **2002**, *79*, 283–292.
- (98) Perestrelo, R.; Barros, A. S.; Câmara, J. S.; Rocha, S. M. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3186–3204.

- (99) Ortega-Heras, M.; González-SanJosé, M. L.; Beltrán, S. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 85–93.
- (100) Weldegergis, B. T.; Crouch, A. M.; Górecki, T.; Villiers, A. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *701*, 98–111.
- (101) Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C. *J. Microcolumn Sep.* **1999**, *11* (10), 737–747.
- (102) Gil, M.; Cabellos, J. M.; Arroyo, T.; Prodanov, M. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 145–153.
- (103) Acree, T. E.; Barnard, J.; Cunningham, D. G. A. *Food Chem.* **1984**, *14*, 273–286.
- (104) Ulrich, F.; Grosch, W. Z. *Leb. Unters Forsch* **1987**, *184*, 277–282.
- (105) Plutowska, B.; Wardencki, W. *Food Chem.* **2008**, *107* (1), 449–463.
- (106) McDaniel, M. R.; Miranda-Lopez, B. T.; Watson, M.; Libbey, L. M. *Pinot Noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach.*; ELSEVIER, Ed.; Amsterdam, 1990.
- (107) Linssen, J. P. H.; Janssens, G. M.; Roozen, J. P.; Posthumus, M. A. *Food Chem.* **1993**, *46*, 367–371.
- (108) Casimir, D. J.; Whitfield, F. B. *Berichte der Int. Fruchtsaftunion* **1978**, *15* (325–345).
- (109) Phillips, J. . B.; Beens, J. . *J. Chromatogr. A* **1999**, *856* (1–2), 331–347.
- (110) Leco. Joseph, MI 2007.
- (111) von Muhlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriot, J. P. *Quim. Nov.* **2007**, *30*, 682–687.
- (112) Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T. *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 540–553.
- (113) Ribani, M.; Botolli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771–780.
- (114) Sanco. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.*; 2015.
- (115) Chasin, A. A. M.; Nascimento, E. S.; Ribeiro Neto, L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; Andraus, M. H.; Salvatori, M. C.; Fernícola, N. A. G.; Gorni, R.; Salcedo, S. R. *Bras. Toxicol.* **1998**, *11*, 1.
- (116) Currie, L. A. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *391*, 105–126.
- (117) ASTM International: *Annual Book of ASTM Standards; Standards practices for multivariate, quantitative analysis, E1655, vol 03.06.*; West Conshohocken, 2000.
- (118) INMETRO. *Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*; 2007.

- (119) Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. *Quim. Nova* **1999**, *22*, 724–731.
- (120) Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A practical guide*; John Wiley & Sons: New York, 1998.
- (121) Ferreti, G.; Maggi, F.; Tinlini, B. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 295–298.
- (122) Pierce, K. M.; Hoggard, J. C.; Hope, J. L.; Rainey, P. M.; Hoofnagle, A. N.; Jack, R. M.; Wright, B. W.; Synovec, R. E. *Anal. Chem.* **2008**, *78*, 5068–5075.
- (123) Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. .; Heberger, K. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1158*, 196–214.
- (124) Fisher, R. A. *Ann. Eugen.* **1936**, *7*, 179–188.
- (125) Pleil, J. D.; Stiegel, M. A.; Madden, M. C.; Sobus, J. R. *Chemosphere* **2011**, *84*, 716–723.
- (126) Sarembaud, J.; Pinto, R.; Rutledge, D. N.; Feinberg, M. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *603*, 147–154.
- (127) Zontov, Y. V.; Rodionova, O. Y.; Kucheryavskiy, S. V.; Pomerantsev, A. L. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2017**, *167*, 23–28.
- (128) Leão, P. C. S.; Silva, S. F.; Soares, E. B.; Santos, J. Y. B. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento- Embrapa Semiárido*. Petrolina, PE, Brazil 2013.
- (129) OIV. In *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*; 2017.
- (130) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
- (131) Harbertson, J.; Spayd, S. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 280–288.
- (132) Lee, J.; Durst, R.; Wrolstad, R. E. *J. AOAC Int.* **2005**, *88* (5), 1269–1278.
- (133) Martínez-Gil, A. M.; Angenieux, M.; Pardo-García, A. I.; Alonso, G. L.; Ojeda, H.; Rosario Salinas, M. *Food Chem.* **2013**, *138* (2–3), 956–965.
- (134) Moreno-Pérez, A.; Vila-López, R.; Fernández-Fernández, J. I.; Martínez-Cutillas, A.; Gil-Muñoz, R. *Food Chem.* **2013**, *139* (1–4), 770–776.
- (135) Šuklje, K.; Zhang, X.; Antalick, G.; Clark, A. C.; Deloire, A.; Schmidtke, L. M. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (4), 870–880.
- (136) Welke, J. E.; Zanús, M.; Lazarotto, M.; Schmitt, K. G.; Zini, C. A. *J. Brazilian Chem. Soc.* **2012**, *23* (4), 678–687.
- (137) Sampaio, K. L.; Garruti, D. S.; Franco, M. R. B.; Janzzanti, N. S.; da Silva, M. A. A. P. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91* (10), 1801–1809.
- (138) Cardello, H. M. A. B.; Silva, M. A. A. P.; Damásio, M. H. *Rev. da Soc. Bras. Ciência e*

- Tecnol. Aliment.* **2003**, *37*, 54–60.
- (139) Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. *J. Chromatogr. A* **1963**, No. 11, 463–471.
- (140) Babushok, V. I. *Trends Anal. Chem.* **2015**, *69*, 98–104.
- (141) Sampaio, K. L.; Biasoto, C. . T.; da Silva, M. A. A. P. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 229–313.
- (142) Harrington, P. B.; Vieira, N. E.; Espinoza, J.; Nien, J. K.; Romero, R.; Yergey, A. L. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *544* (1–2), 118–127.
- (143) Gil, M.; Kontoudakis, N.; González, E.; Esteruelas, M.; Forcesca, F.; Canals, J. M.; Zamora, F. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7988–8001.
- (144) Hernández, M. R. In *Curso de Viticultura*; Madrid, 2004; pp 274–282.
- (145) BRASIL. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004.*
- (146) Boido, E.; García-Marino, M.; Dellacassa, E.; Carrau, F.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2011**, *17* (3), 383–393.
- (147) Plavsá, T.; Jurinjak, N.; Antunovic, D.; Persuric, D.; Ganic, K. K. *Food Technol. Biotechnol.* **2012**, *50* (2), 152–158.
- (148) Gordillo, B.; Baca-Bocanegra, B.; Rodriguez-Pulido, F. J.; González-Miret, M. L.; Estévez, I. G.; Quijana-Morín, N.; Heredia, F. J.; Escribano-Bailón, M. T. *Food Chem.* **2016**, *206*, 249–259.
- (149) Kocabey, N.; Yilmaztekin, M.; Hayaloglu, A. A. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3557–3565.
- (150) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Silva, J. . . . R. J. *Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6475–6481.
- (151) Noguerol-Pato, R.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. *Food Chem.* **2009**, *117*, 473–484.
- (152) Tatsuka, K., Suekane, S., Sakai, Y., & Sumitani, H. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38* (12), 2176–2180.
- (153) Peinado, R. A.; Moreno, J.; Bueno, J. E.; Moreno, J. A.; Mauricio, J. C. *Food Chem.* **2004**, *84*, 585–590.
- (154) Bianchi, F.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M. *J. Sep. Sci.* **2007**, *39* (4), 563–572.
- (155) Samappito, S.; Butkhup, L. *African J. Food Sci.* **2010**, *4* (2), 52–61.
- (156) Villiers, A.; Arvisenet, G.; Lethuaut, L.; Prost, C.; Sérot, T. *Food Chem.* **2012**, *131*, 1561–1568.

- (157) Ledauphin, J.; Saint-Clair, J. F.; Lablanquie, O.; Guichard, H.; Fournier, N.; Guichard, E.; Barillier, D. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (16), 5124–5134.
- (158) Welke, J. E.; Manfroi, V.; Zanusi, M.; Lazarotto, M.; Zini, A. C. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1226*, 124–139.
- (159) Ferreira, V.; Lopez, R.; Cacho, J. F. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *1667*, 1659–1667.
- (160) Tao, Y. S.; Li, H. *Nat. Sci.* **2009**, 176–182.
- (161) Tao, Y.; Zhang, L. *LWT - Food Sci. Technol.* **2010**, *43* (10), 1550–1556.
- (162) Qian, M. C.; Wang, Y. *J. Food Sci.* **2005**, *70* (1), 13–20.
- (163) Li, H.; Tao, Y. S.; Wang, H.; Zhang, L. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 287–292.
- (164) Botelho, G.; Caldeira, I.; Mendes-Faia, A.; Clímaco, M. C. *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22* (5), 414–420.
- (165) Fan, W.; Xu, Y.; Jiang, W.; Li, J. *J. Food Sci.* **2010**, *75* (1), 81–88.
- (166) Carunchia, W. M. E.; Croissant, A. E.; Drake, M. A. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88* (11), 3826–3839.
- (167) Garcia-Carpintero, E. G.; Sanchez-Palomo, E.; Gallego, M. A. G.; Gonzalez-Viñas, M. A. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1549–1560.
- (168) Ranau, R.; Kleeberg, K. K.; Schlegelmilch, M.; Streese, J.; Stegmann, R.; Steinhart, H. *Waste Manag.* **2005**, *25* (9), 908–916.
- (169) Claudela, P.; Dirningera, N.; Etievant, P. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25* (5–6), 365–370.
- (170) Cho, I. H.; Choi, H. K.; Kim, Y. S. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (13), 4820–4825.
- (171) Pozo-Bayon, M. A.; Ruiz-Rodriguez, A.; Pernin, K.; Cayot, N. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (4), 1418–1426.
- (172) Shimoda, M.; Yoshimura, Y.; Yoshimura, T.; Noda, K.; Osajima, Y. *J. Food Sci.* **2001**, *66* (6), 804–807.
- (173) Peng, C. T. *J. Chromatogr. A* **2000**, *903* (1–2), 117–143.
- (174) Mahajan, S. S.; Goddik, L.; Qian, M. C. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87* (12), 4057–4063.
- (175) Nielsen, G. S.; Larsen, L. M.; Poll, L. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (15), 4844.
- (176) Boido, E.; Lloret, A.; Medina, K.; Fariña, L.; Carrau, F.; Versini, G.; Dellacassa, E. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (18), 5408–5413.
- (177) <http://www.thegoodscentcompany.com> <http://www.thegoodscentcompany.com>.
- (178) Shimoda, M.; Wu, Y.; Osajima, Y. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (12), 3913–3918.
- (179) Wang, Y.; Finn, C.; Qian, M. C. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (9), 3563–3571.
- (180) Choi, H. S. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2687–2692.

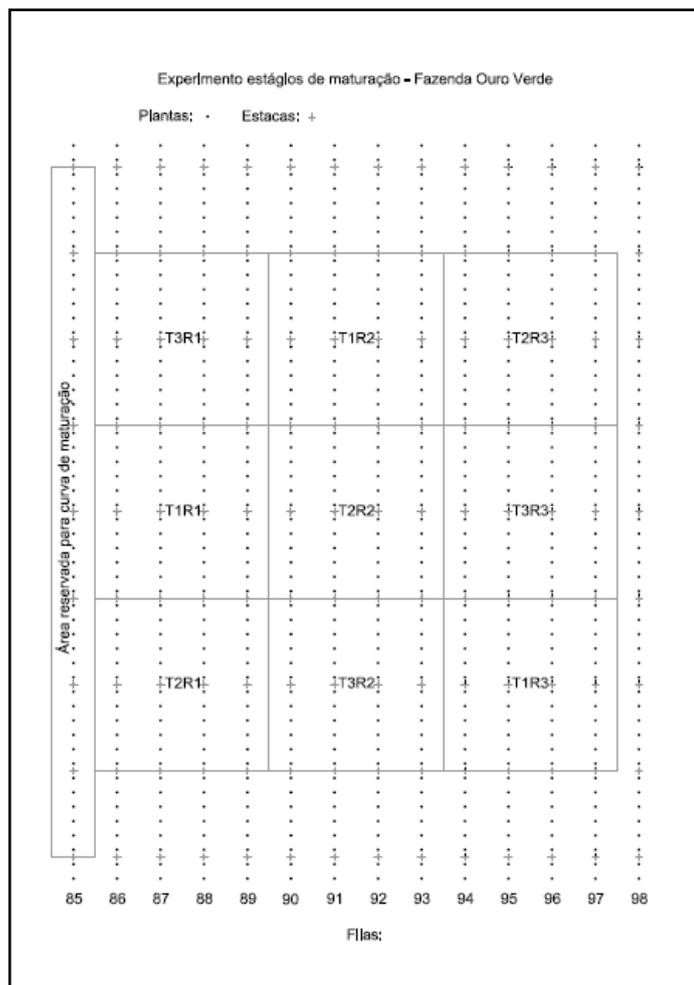
- (181) Umamo, K., Hagi, Y., Nakahara, K., Shyoji, A., & Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2212–2218.
- (182) Mayr, C. M.; Geue, J. P.; Holt, H. E.; Pearson, W. P.; Jeffrey, D. W.; Francis, I. L. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4528–4536.
- (183) Selli, S.; Canbas, A.; Cabaroglu, T.; Erten, H.; Gunata, Z. *Food Chem.* **2006**, *94* (3), 319–326.
- (184) Bindon, K.; Varela, C.; Kennedy, J.; Holt, H.; Herderich, M. *Food Chem.* **2013**, *138* (2–3), 1696–1705.
- (185) Nicolli, K. P.; Biasoto, A. C. T.; Souza-Silva, E. A.; Guerra, C. C.; dos Santos, H. P.; Welke, J. E.; Zini, C. A. *Food Chem.* **2018**, *243* (June 2017), 103–117.
- (186) Šuklje, K.; Carlin, S.; Stanstrup, J.; Antalick, G.; John, W.; Meeks, C.; Deloire, A.; Schmidtke, L. M. *Food Chem.* **2019**, *277*, 753–765.
- (187) Welke, J. E.; Zanus, M.; Lazzarotto, M.; Pulgati, F. H.; Zini, C. A. *Food Chem.* **2014**, *164*, 427–437.
- (188) Dziadas, M.; Jeleń, H. H. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *677* (1), 43–49.
- (189) Vilanova, M.; Genisheva, Z.; Bescansa, L.; Masa, A.; Oliveira, J. M. *Phytochemistry* **2012**, *74*, 196–205.
- (190) Picard, M.; Franc, C.; de Revel, G.; Marchand, S. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1001*, 168–178.
- (191) Picard, M.; Tempere, S.; de Revel, G.; Marchand, S. *Food Qual. Prefer.* **2015**, *42*, 110–122.
- (192) Yuan, F.; Qian, M. C. *Food Chem.* **2016**, *192*, 633–641.
- (193) Kalua, C. M.; Boss, P. K. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (9), 3818–3830.
- (194) Ye, D. Q.; Zheng, X. T.; Xu, X. Q.; Wang, Y. H.; Duan, C. Q.; Liu, Y. L. *Food Chem.* **2016**, *202*, 236–246.
- (195) García-Carpintero, E. G., Gómez Gallego, M. A., Sánchez-Palomo, E.; González Viñas, M. A. *Food Chem.* **2012**, *134*, 851–863.
- (196) Ugliano, M.; Henschke, P. A. In *Wine chemistry and biochemistry*; Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Eds.; New York, 2009; pp 313–392.
- (197) Etiévant, P. *Wine. Volatile compounds in foods and beverages.*; Maarse, H., Ed.; Marcel Dekker: M. H. New York, US, 1991.
- (198) Weldegergis, B. T.; Villiers, A.; Mcneish, C.; Seethapathy, S.; Mostafa, A.; Górecki, T.; Crouch, A. M. *Food Chem.* **2011**, *129*, 188–199.

- (199) Goldner, M. C.; Zamora, C. M.; di Leo, L. P.; Gianninoto, H.; Bandoni, A. *J. Sens. Stud.* **2009**, *24*, 243–257.
- (200) Saerens, S. M. G.; Delvaux, F.; Verstrepen, K. J.; Dijck, P. . V.; Thevelein, J. . M.; Delvaux, F. R. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (2), 454–461.
- (201) Laminkanra, O.; Grimm, C. C.; Inyang, I. D. *Food Chem.* **1996**, *56*, 373–376.
- (202) Etschmann, M. M. W. Kötter, P.; Hauf, J.; Bluemke, W.; Entian, K. D.; Schrader, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80* (4), 579–587.
- (203) Chin, S. T.; Eyres, G. T.; Marriott, P. J. *Food Chem.* **2015**, *185*, 355–361.
- (204) Bianchi, F.; Cantoni, C.; Careri, M.; Chiesa, L.; Musci, M.; Pinna, A. *Talanta* **2007**, *72* (4), 1552–1563.
- (205) Chung, H. Y. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (7), 2690–2696.
- (206) Osorio, C.; Alarcon, M.; Moreno, C.; Bonilla, A.; Barrios, J.; Garzon, C.; Duque, C. J. *Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (2), 509–516.
- (207) Bisio, A.; Ciarallo, G.; Romussi, G.; Fontana, N.; Mascolo, N.; Capasso, R.; Biscardi, D. *Phyther. Res.* **1998**, *12* (S1), s117–s120.
- (208) Zhao, Y.; Xu, Y.; Li, J.; Fan, W.; Jiang, W. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, C90–C99.
- (209) Umamo, K., Hagi, Y., Nakahara, K., Shoji, A., & Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (8), 3463–3469.
- (210) Wada, K.; Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *11* (45), 4362–4366.
- (211) Vichi, S., Castellote, A. I., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. *J. Chromatogr. A* **2003**, *983* (1–2), 19–33.
- (212) Lozano, P. R.; Drake, M.; Benitez, D.; Cadwallader, K. R. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (8), 3018–3026.
- (213) Shiratsuchi, H.; Shimoda, M.; Imayoshi, K.; Noda, K.; Osajima, Y. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42* (4), 984–988.
- (214) Moio, L., & Addeo, F. *J. Dairy Sci.* **1998**, *65* (2), 317–333.
- (215) Chassagne, D.; Boulanger, R.; Crouzet, J. *Food Chem.* **1999**, *6* (3), 281–288.
- (216) Wu, S.; Zorn, H.; Krings, U.; Berger, R. G. *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22* (1), 53–60.
- (217) Fan, W., & Qian, M. C. *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21* (2), 333–342.
- (218) Aubert, C.; Baumann, S.; Arguel, H. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (23), 8881–8895.
- (219) Shellie, R.; Mondello, L.; Marriott, P.; Dugo, G. *J. Chromatogr. A* **2002**, *970* (1–2), 225–234.
- (220) Umamo, K., Hagi, Y., Tamura, T., Shoji, A., & Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.*

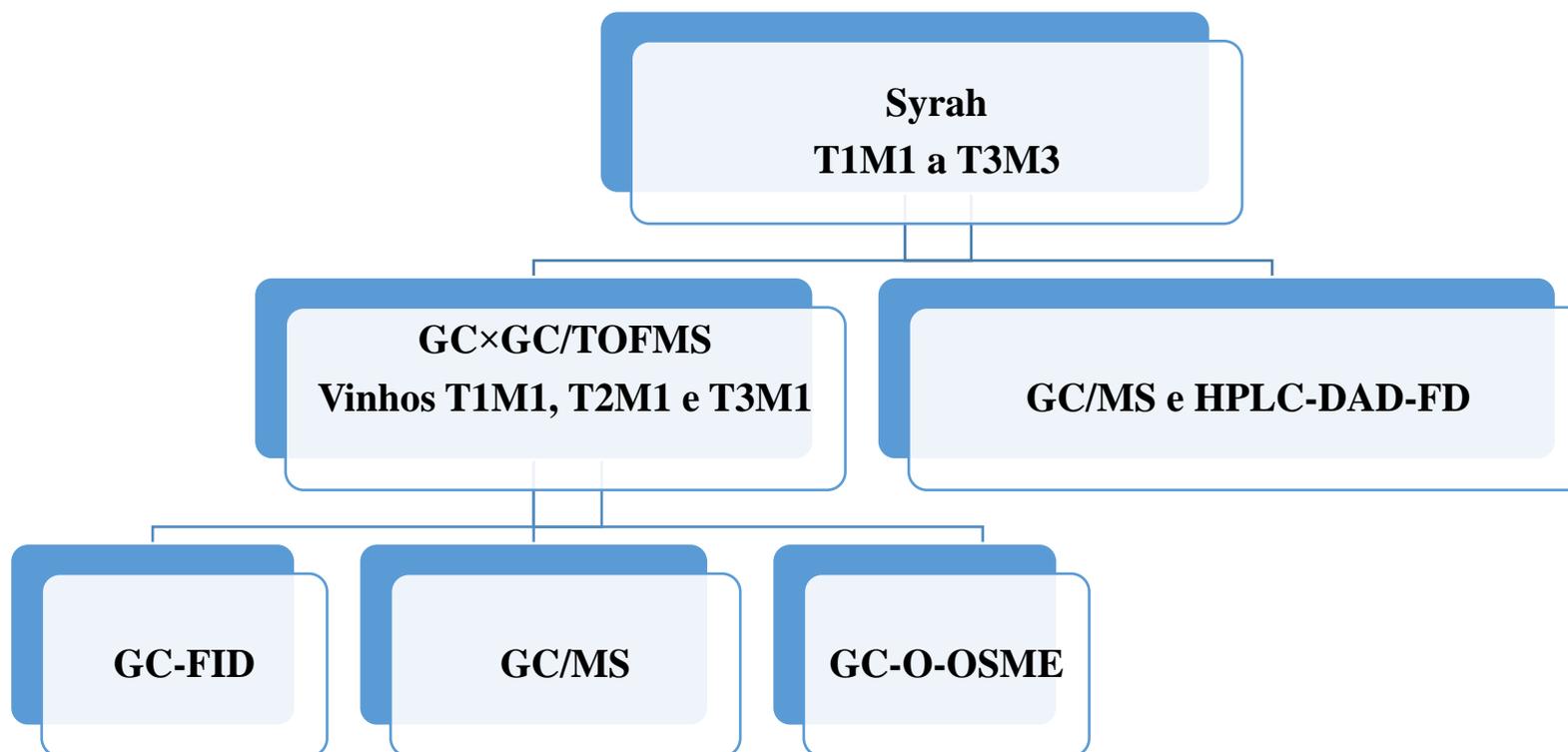
- 1994**, 42 (9), 1888–1890.
- (221) Paolini, J.; Costa, J.; Bernardini, A. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1076 (1–2), 170–178.
- (222) Romeo, V.; Ziino, M.; Giuffrida, D.; Condurso, C.; Verzera, A. *Food Chem.* **2007**, 101 (3), 1272–1278.
- (223) Gyawali, R., & Kim, K.-S. *Kathmandu Univ. J. Sci. Eng. Technol.* **2012**, 8 (1), 51–62.
- (224) Stashenko, H., Macku, C., & Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40 (11), 2257–2259.
- (225) Héberger, K., & Görgényi, M. *J. Chromatogr. A* **1999**, 845 (1–2), 21–31.
- (226) Larráyoz, P.; Addis, M.; Gauch, R.; Bosset, J. O. *Int. Dairy J.* **2001**, 11 (11–12), 911–926.
- (227) Chung, H. Y.; Yung, I. K. S.; Ma, W. C. J.; Kim, J. S. *Food Res. Int.* **2002**, 35 (1), 43–53.
- (228) Natali, N.; Chinnici, F.; Riponi, C. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (21), 8190–8198.
- (229) Chang, L. P., Sheng, L. S., Yang, M. Z., & An, D. K. *Acta Pharmacol. Sin.* **1989**, 24, 847–852.
- (230) Umamo, K.; Hagi, Y.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 599–603.
- (231) Mebazaa, R., Mahmoudi, A., Fouchet, M., Dos Santos, M., Kamissoko, F., Nafti, A., Camel, V. *Food Chem.* **2009**, 115 (4), 1326–1336.

## **8. ANEXO**

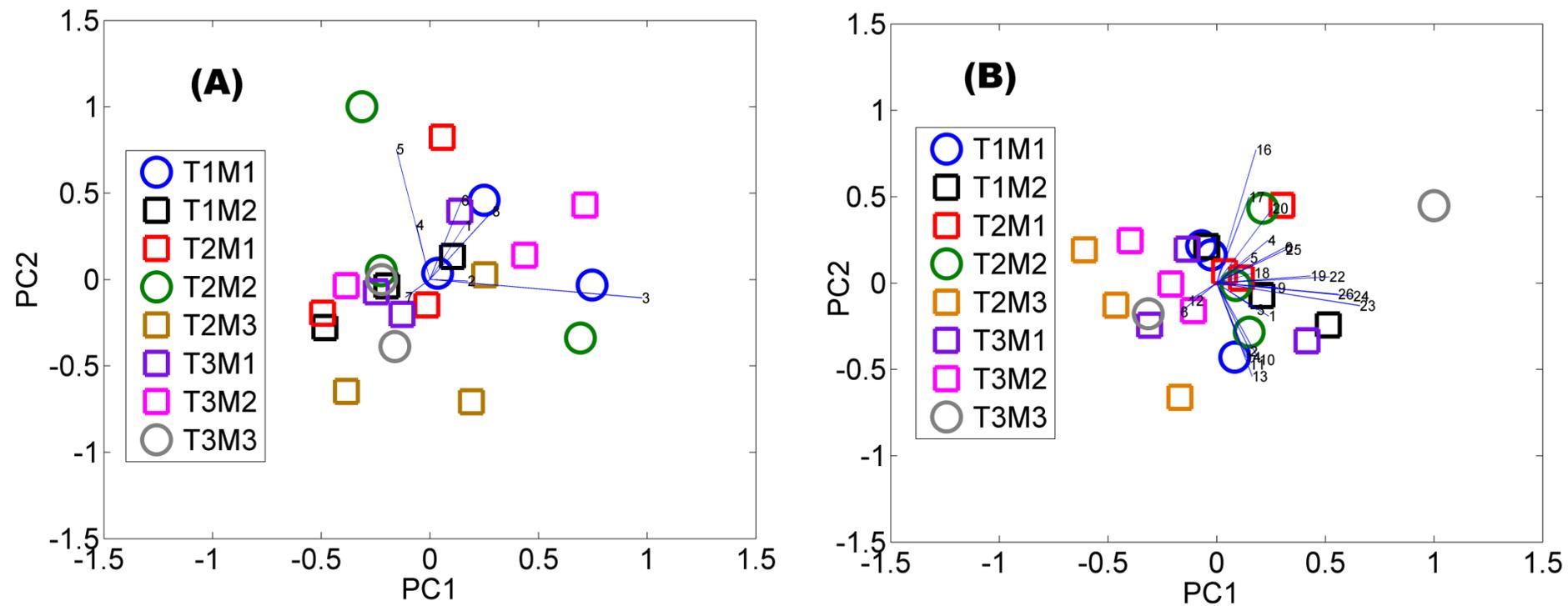
## 8 ANEXO



**Figura A1:** Croqui da área experimental mostrando a posição relativa das repetições experimentais dos tratamentos. O campo era formado por três repetições para cada tratamento (R1, R2 e R3), sendo que as uvas colhidas de cada repetição foram vinificadas separadamente, originando as triplicatas de vinificação. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 por 120 DAP (21 °Brix) e T3 por 127 DAP (23 °Brix).



**Figura A2:** Fluxograma representativo da parte experimental desenvolvida neste trabalho. T1 representa 113 DAP (19 °Brix), T2 por 120 DAP (21 °Brix) e T3 por 127 DAP (23 °Brix). M1 designa 10 dias de maceração; M2, 20 e M3, 30 dias.



**Figura A3:** biplot dos (A) parâmetros físico-químicos e (B) compostos fenólicos dos vinhos Syrah mostrando os dois primeiros componentes principais da interação entre os fatores maturação (T) versus maceração (M), por meio da ANOVA - PCA.

**Tabela A1:** Compostos voláteis positivamente e/ou tentativamente identificados nos vinhos Syrah usando HS-SPME-GC×GC / TOFMS com seus respectivos números chemical abstract service (CAS), tempos de retenção na primeira (<sup>1</sup>t<sub>R</sub>) e na segunda (<sup>2</sup>t<sub>R</sub>) dimensões cromatográficas, índice de retenção experimental e da literatura (LTPRI exp e LTPRI lit). As condições cromatográficas são descritas nos itens 3.4.2 e 3.4.5

Compostos	CAS	<sup>1</sup> t <sub>R</sub>	<sup>2</sup> t <sub>R</sub>	LTPRI exp	LTPRI lit	Ref
<i>Ésteres</i>						
I acetato de etila	141-78-6	4,32	2,50	907	887	152
II propanoato de etila	105-37-3	6,07	3,05	955	960	204
1 acetato de 3-metil butila	2445-69-4	18,43	5,18	1268	1270	205
2 butanoato de etila (a)	105-54-4	8,40	3,74	1021	1023	157
III 2-metil etil butirato (Co 1)	7452-79-1	8,98	4,23	1037	1036	157
IV isopentanoato de etila (a)	108-64-5	9,57	4,12	1052	1053	157
V acetato de 2-metil propila (a)	110-19-0	7,58	3,41	1007	1005	77
VI but-2-enoato de etila	10544-63-5	13,77	3,55	1165	1165	205
VII hexanoato de metila	106-70-7	14,82	4,11	1188	1176	157
3 hexanoato de etila (a)	123-66-0	16,92	4,78	1234	1238	158
VIII butanoato de isoamila	123-92-2	11,78	4,08	1121	1124	152
IX acetato de hexila (a)	142-92-7	18,78	4,35	1275	1276	152
X 2-oxopropanoato de etila (Co 3)	617-35-6	18,90	2,69	1277	1268	181
XI hex-3-enoato de etila	64187-83-3	20,07	4,11	1303	1294	206
XII acetato de 3-hexen-1-ol	1708-82-3	20,77	3,92	1319	1320	207
XIII heptanoato de etila (Co 4)	106-30-9	21,47	4,96	1335	1334	205
4 lactato de etila (Co 4)	97-64-3	22,05	2,47	1347	1334	158
XIV 2-hexenoato de etila	27829-72-7	22,05	4,38	1346	1329	208
XV 2-hidróxi-3-metil butanoato de etila	2441 06 7	25,55	2,76	1428	1422	157
5 octanoato de etila (a)	106-32-1	26,02	5,19	1437	1424	158
6 decanoato de etila (a) (Co 7)	110-38-3	34,18	5,42	1642	1638	158
7 3-metil butil octanoato	2035-99-6	34,88	5,95	1661	1658	157
XVI 3-hidróxi butirato de etila	5405-41-4	29,40	2,45	1520	1521	154
XVII nonanoato de etila	123-29-5	30,10	5,28	1538	1530	157

XVIII	2-hidróxi-4-metil pentanoato de etila (Co 6)	10348-47-7	30,45	2,80	1546	1547	157
XIX	lactato de isoamila	19329-89-6	31,50	2,75	1572	1570	157
XX	propanodioato de dietila	105-53-3	31,97	3,06	1586	1580	157
XXI	decanoato de metila	110-42-9	32,43	4,94	1595	1590	154
XXII	succinato de etil metila (Co 7)	627-73-6	34,18	3,08	1641	1632	157
XXIII	hexanoato de isoamila (Co 8)	93-89-0	35,23	3,59	1669	1664	158
XXIV	benzoato de etila	123-25-1	35,70	3,38	1685	1690	158
	8 succinato de dietila (a)						
	9 acetato de 2-fenil etanol (a) (Co 11)	103-45-7	40,72	3,47	1817	1829	158
	10 9-decenoato de etila	67233-91-4	36,17	4,83	1695	1689	157
XXV	glutarato de dietila	111-82-0	41,65	5,61	1804	1793	158
XXVI	dodecanoato de metila	118-61-6	40,48	3,51	1811	1798	157
XXVII	2-hidróxi benzoato de etila	2198-61-0	26,95	5,66	1462	1469	77
XXVIII	dodecanoato de etila (a)	106-33-2	41,65	5,61	1845	1835	158
XXIX	2-metil propanoato de 2-fenil etila	103-48-0	42,93	4,06	1884	1877	209
XXX	hexanodioato de dietila	141-28-6	43,75	3,88	1908	1897	157
	11 tetradecanoato de etila	124-06-1	48,53	5,77	2054	2065	158
XXXI	cinamato de etila	103-36-6	51,10	3,43	2135	2125	70
XXXII	hexadecanoato de metila	1731-84-6	53,55	5,64	2218	2223	157
	12 hexadecanoato de etila	628-97-7	54,72	5,99	2256	2246	158
XXXIII	octanoato de 2-fenil etanol (Co 15)	5457-70-5	58,33	4,37	2374	2376	157
XXXIV	succinato de monoetila	1070-34-4	58,68	1,84	2392	2395	210
	<b>Ácidos</b>						
	14 ácido acético	64-19-7	26,72	1,80	1455	1465	154
XXXV	ácido fórmico	64-18-6	29,63	1,79	1529	1528	211
XXXVI	ácido propanoico (Co 6)	79-09-4	30,45	1,79	1545	1549	212
	15 ácido 2-metil propanoico (a)	79-31-2	31,62	1,86	1574	1581	164
	16 ácido butanoico	107-92-6	33,95	1,86	1634	1650	166
	17 ácido 3-metil butanoico (a) (Co 9)	503-74-2	35,47	1,90	1675	1675	168
	18 ácido hexanoico (a) (Co 12)	142-62-1	41,88	1,99	1850	1865	169
XXXVII	2-etil, ácido caproico (Co 14)	149-57-5	45,38	2,02	1953	1950	213

19	ácido octanóico (a)	124-07-2	49,00	2,27	2067	2072	170
20	ácido nonanóico (a)	112-05-0	52,27	2,07	2173	2174	171
21	ácido decanóico (a)	334-48-5	55,42	2,19	2277	2288	172
22	ácido dodecanóico (a)	143-07-7	63,12	2,14	2531	2529	173
23	ácido 9-decenóico	14436-32-9	57,17	2,10	2334	2348	174
XXXVIII	ácido benzenocarboxílico	65-85-0	59,62	1,77	2424	2423	214
	<i>Álcoois</i>						
XXXIX	1-propanol (a)	71-23-8	8,63	2,08	1051	1049	175
XL	3-metil, 2-butanol	598-75-4	10,50	3,33	1092	1094	154
XLI	2-metil, 1-propanol	78-83-1	10,73	2,11	1097	1107	154
XLII	2-pentanol	6032-29-7	12,02	2,28	1124	1139	157
XLIII	2-metil, 1-butanol	137-32-6	15,87	2,47	1210	1212	158
25	3-metil, 1-butanol (a)	123-51-3	16,10	2,41	1215	1221	154
XLIV	3-metil, 3-buten-1-ol	763-32-6	17,62	2,20	1248	1246	215
XLV	1-pentanol (Co 2)	71-41-0	17,73	2,28	1251	1252	216
XLVI	2-heptanol	6033-23-4	20,88	2,65	1321	1318	158
XLVII	2-penten-1-ol	1576-96-1	21,00	2,17	1324	1324	152
26	(Z)-3-hexen-1-ol	928-96-1	22,87	2,38	1384	1381	157
XLVIII	2-hexen-1-ol (a)	928-95-0	24,73	2,32	1409	1409	152
XLIX	2-octanol	5978-70-1	25,32	2,80	1422	1418	217
L	1-heptanol	111-70-6	26,83	2,60	1458	1467	158
LI	6-metil, 5-hepten-2-ol	1569-60-4	27,18	2,69	1467	1461	218
LII	2-etil, 1-hexanol	104-76-7	28,23	2,72	1492	1491	158
LIII	4-hepten-1-ol	20851-55-2	28,82	2,47	1506	1502	157
27	1-octanol	111-87-5	31,03	2,71	1560	1559	157
28	1-nonanol (a)	143-08-8	35,00	2,85	1662	1676	158
29	álcool benzílico (a)	100-51-6	42,82	2,25	1876	1869	158
30	2-fenil etanol (a) (Co 13)	60-12-8	44,10	2,92	1914	1914	157
31	1-dodecanol (a)	112-42-5	45,85	3,28	1968	1970	157
32	4-metil, 1-pentanol	626-89-1	20,65	2,38	1316	1328	176
33	3-metil, 1-pentanol	589-35-5	21,23	2,40	1329	1343	158
34	1-hexanol (a)	111-27-3	22,40	2,48	1355	1354	154

35	1-butanol	71-36-3	12,95	2,23	1146	1155	154
36	2,3-butanodiol	513-85-9	30,33	2,04	1542	1545	77
37	1,3-butanodiol	107-88-0	31,73	1,99	1577	1578	178
LIV	2-undecanol (Co 10)	1653-30-1	37,22	3,29	1723	1723	157
LV	undecenal	143-08-8	38,85	2,97	1768	1781	158
38	1-hexadecanol (Co 15)	36653-82-4	58,33	3,65	2374	2382	157
<b>Terpenos</b>							
LVI	$\alpha$ -tujeno	3917-48-4	7,70	5,49	1012	1015	219
LVII	$\alpha$ -pineno	80-56-8	13,53	5,16	1160	1165	152
LVIII	limoneno	5989-54-8	14,93	5,80	1191	1181	152
LIX	eucaliptol (a)	470-82-6	15,16	6,50	1199	1209	152
LX	$\beta$ -cimeno (Co 2)	3338-55-4	17,73	5,04	1252	1234	220
LXI	$\alpha$ -terpinoleno (Co 3)	586-62-9	18,90	5,92	1278	1280	220
LXII	<i>p</i> -cimeno	99-87-6	25,90	4,22	1268	1266	209
LXIII	cânfora (Co 5)	76-22-2	28,93	5,85	1510	1510	154
40	linalol	78-70-6	30,68	2,95	1553	1555	158
LXIV	terpinen-4-ol	562-74-3	32,67	3,67	1604	1602	158
LXV	hotrienol	29957-43-5	33,13	2,83	1612	1613	178
LXVI	$\beta$ -farneseno (Co 8)	502-61-4	35,23	5,95	1670	1664	157
LXVII	carvotanacetona (Co 9)	499-71-8	35,47	4,33	1677	1669	221
LXVIII	$\alpha$ -terpineol (a)	98-55-5	36,40	3,22	1700	1695	152
LXIX	carvona	99-49-0	37,57	3,90	1732	1739	222
LXX	$\beta$ -damascenona (a) (Co 11)	23726-93-4	40,72	4,45	1818	1831	158
41	geraniol (a) (Co 12)	624-15-7	41,88	2,81	1850	1853	152
42	( <i>E</i> )-nerolidol (a)	142-50-7	48,30	3,68	2045	2039	223
43	citronelol (a)	1117-61-9	38,97	2,82	1769	1778	158
<b>Sulfurados</b>							
LXXI	metiltio acetato (Co 1)	1534-08-3	8,98	2,88	1034	1047	224
LXXII	2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona	13679-85-1	29,75	3,24	1530	1518	157
LXXIII	2-(metiltio)-etanol	5271-38-5	29,87	2,23	1531	1516	209
LXXIV	3-(metiltio)-propionato de etila	13327-56-5	31,38	3,50	1571	1562	157
LXXV	2-tiofenocarboxaldeído	98-03-3	36,28	2,69	1697	1684	157

45	3-(metiltio)-1-propanol (Co 10)	505-10-2	37,22	2,31	1718	1720	157
LXXVI	benzotiazol (Co 14)	95-16-9	45,38	3,20	1954	1956	158
<b>Aldeídos</b>							
LXXVII	2-propenal	107-02-8	4,08	2,03	894	876	225
LXXVIII	3-metil, butanal	590-86-3	5,13	2,69	975	957	226
LXXIX	nonanal	124-19-6	24,15	4,41	1395	1396	171
LXXX	decanal	112-31-2	28,58	4,57	1501	1494	158
LXXXI	benzaldeído (a)	100-52-7	29,52	2,97	1523	1513	157
LXXXII	$\beta$ -ciclocitral	432-25-7	33,25	4,49	1619	1606	157
LXXXIII	benzenoacetaldeído	122-78-1	34,42	2,97	1647	1631	157
LXXXIV	4-etil, benzaldeído	4748-78-1	36,75	3,41	1710	1714	227
LXXXV	dodecanal	112-54-9	36,87	4,84	1714	1710	158
LXXXVI	3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-propenal	4951-40-0	44,92	3,57	1942	1952	208
<b>Cetonas</b>							
LXXXVII	2,3-butanodiona	431-03-8	6,65	2,28	1008	997	152
LXXXVIII	2,3-pentanodiona	600-14-6	9,45	2,63	1070	1055	181
LXXXIX	3-penten-2-ona	3102-33-8	12,13	2,90	1129	1123	152
XC	3-hidróxi-2-butanona	513-86-0	19,25	2,18	1287	1304	158
XCI	acetofenona	98-86-2	34,53	3,11	1650	1649	158
<b>Lactonas</b>							
XCII	$\gamma$ -butirolactona	96-48-0	33,83	2,60	1633	1635	183
XCIII	5-etóxidihidro-2(3H)-furanona	932-85-4	37,45	2,83	1729	1728	228
XCIV	$\gamma$ -crotolactona (a)	497-23-4	38,50	2,30	1758	1746	181
XCV	$\gamma$ -octalactona (Co 13)	104-50-7	44,10	3,27	1918	1911	229
XCVI	$\gamma$ -nonalactona	104-61-0	47,83	3,28	2030	2010	230
XCVII	pantolactona	5405-40-3	48,07	2,07	2037	2033	231
XCVIII	5-hexildihidro-2(3H)-furanona	706-14-9	51,45	3,38	2147	2138	157
<b>Fenóis</b>							
XCIX	2-metóxi-4-vinilfenol	7786-61-0	53,08	2,62	2200	2203	164
C	2,4-bis-(1,1-dimetiletil)-fenol	96-76-4	56,70	2,59	2324	2321	213
<b>Furanos</b>							

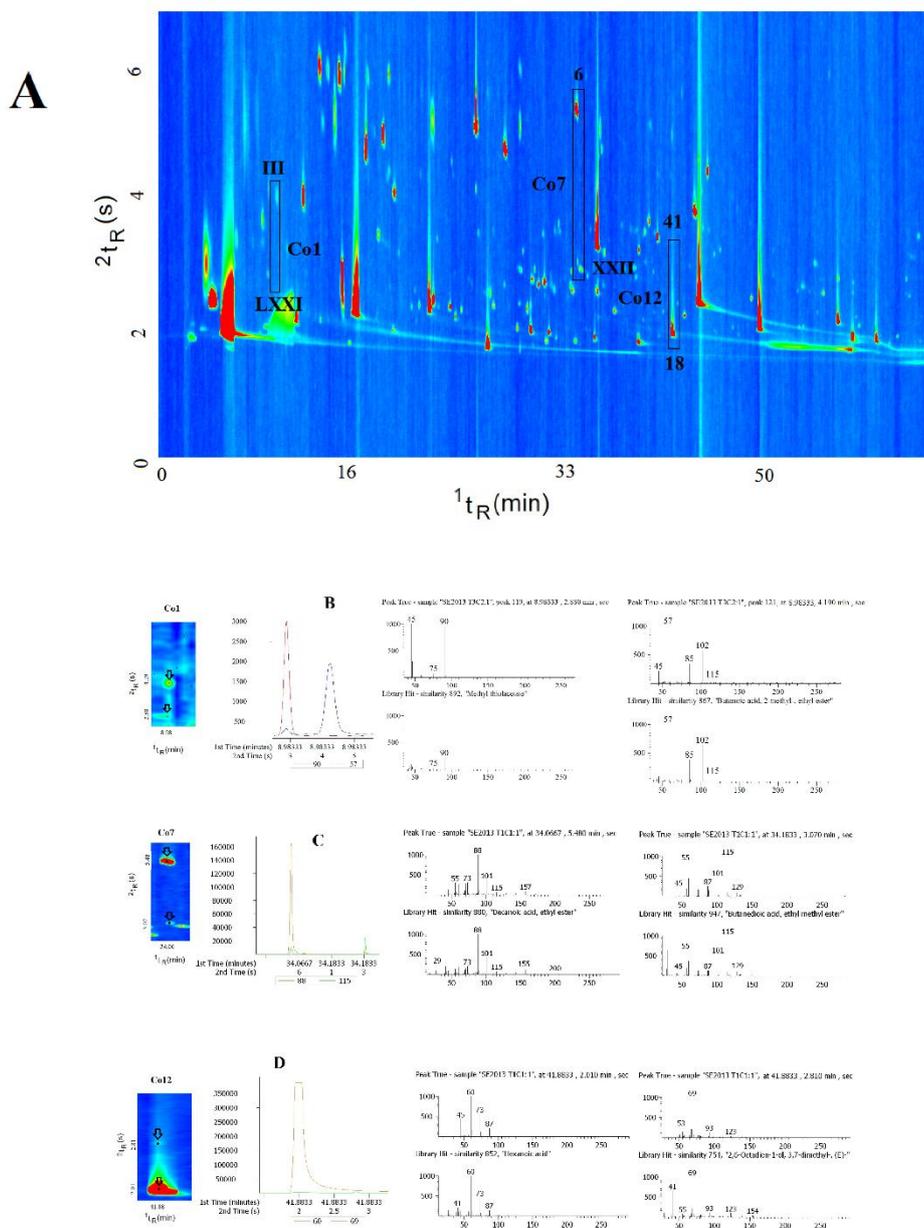
CI	2-pentil-furano	3777-69-3	16,80	4,46	1232	1225	152
CII	1-(2-furanil) etanona (Co 5)	1192-62-7	28,93	2,62	1508	1500	157
CIII	2-furancarboxilato de etila	614-99-3	33,72	2,94	1628	1618	158
CIV	2-furan metanol (a)	98-00-0	35,23	2,05	1669	1662	157

LTPRI exp: índice de retenção com programação linear de temperatura experimental (LTPRI) calculado utilizando n-alcenos (C9 – C24) com uma coluna DB-Wax (100% polietilenoglicol), como parte de um jogo de colunas empregado na GC×GC/TOFMS - DB-Wax × DB-17ms ([50% -fenil]) LTPRIlit: índice de retenção com programação linear de temperatura em uma coluna DB-WAX ou fase estacionária equivalente na GC/MS. Ref: referências da literatura.

**Tabela A2:** Pesos obtidos na análise de componentes principais para os compostos voláteis indicados pela razão de Fisher como os mais discriminantes entre as amostras de vinhos Syrah

<b>Componente principal (PC)</b>		<b>PC1</b>	<b>PC2</b>	<b>PC3</b>	<b>PC4</b>	<b>PC5</b>
	<b>Autovalor</b>	8,8	7,3	2,4	1,7	1,4
<b>#</b>	<b>Variância (%)</b>	40,38	33,05	10,9	7,8	6,5
	<b>Variância cumulativa (%)</b>	40,4	73,4	84,3	92,2	98,7
LXIX	carvona	0,255	0,014	-0,131	0,300	-0,910
LXXIV	3-(metiltio)-propionato de etila	-0,798	-0,586	0,067	-0,093	-0,065
XLII	2-pentanol	-0,046	-0,644	0,751	0,008	0,045
26	(Z)-3-hexen-1-ol	-0,940	0,031	-0,322	0,076	0,055
21	ácido decanóico	-0,679	-0,660	0,285	0,096	-0,067
XII	acetato de 3-hexen-1-ol	-0,874	-0,205	-0,406	-0,148	-0,067
CII	1-(2-furanyl) etanona	-0,282	0,829	0,457	-0,083	-0,027
LXXII	2-metil dihidro-3(2H)-tiofenona	-0,775	-0,523	0,291	0,158	0,076
XXVII	2-hidróxi benzoato de etila	-0,890	0,000	-0,358	0,242	0,141
42	(E)-nerolidol	-0,225	0,826	0,430	-0,265	-0,059
27	1-octanol	-0,879	-0,427	-0,070	-0,167	-0,043
CIII	2-furancarboxilato de etila	-0,678	-0,662	0,289	0,120	-0,031
XVIII	2-hidróxi-4-metil pentanoato de etila	0,633	-0,516	0,184	0,537	0,043
LXXI	metiltio acetato	-0,654	0,664	0,245	-0,251	0,045
XLVIII	2-hexen-1-ol	-0,524	0,659	0,387	-0,326	-0,128
6	decanoato de etila	-0,316	0,532	0,095	0,684	0,371
XXVI	dodecanoato de metila	-0,741	-0,640	0,164	0,083	-0,064
LXVIII	$\alpha$ -terpineol	-0,470	0,765	0,159	0,103	-0,360
IX	acetato de hexila	-0,934	0,095	-0,269	-0,079	0,059
XCI	acetofenona	-0,514	0,579	-0,071	0,483	-0,401
XXV	glutarato de dietila	0,319	-0,704	0,517	-0,048	-0,195

# Compostos numerados de acordo com a Tabela 6.



**Figura A4:** Separação dos compostos voláteis do *headspace* dos vinhos Syrah identificados pela primeira vez neste varietal (A) Diagrama de cores obtido por GCxGC/TOFMS. O gradiente de cor reflete a intensidade do sinal TOFMS sendo que o azul representa os sinais baixos e o vermelho os sinais altos. A região expandida do gráfico colorido mostra detalhadamente os picos coeluídos na primeira dimensão, os picos modulados das coeluições e os espectros de massa deconvoluídos dos compostos identificados nas seguintes regiões de coeluição: (B) Co 1: 2-metil etil butirato #III e metiltio acetato #LXXI, (C) Co 7: decanoato de etila #6 e succinato de etil metila #XXII, (D) Co 12: ácido hexanóico #18 e geraniol #41.

