

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

**USO DA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E DA
CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL E
BIDIMENSIONAL ABRANGENTE NA CARACTERIZAÇÃO DE
VOLÁTEIS DE VINHOS GAÚCHOS**

JULIANE ELISA WELKE

Porto Alegre, agosto/2012.

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

JULIANE ELISA WELKE

**USO DA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E DA
CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL E
BIDIMENSIONAL ABRANGENTE NA CARACTERIZAÇÃO DE
VOLÁTEIS DE VINHOS GAÚCHOS**

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

Prof. Dra. Cláudia Alcaraz Zini
Orientadora

Porto Alegre, agosto/2012.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (setembro/2008) e (agosto/2012), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Cláudia Alcaraz Zini. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

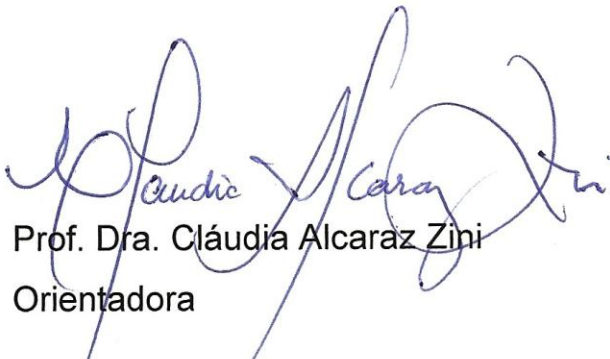
Comissão Examinadora:


Prof. Dra. Janaína Heberle Bortoluzzi


Prof. Dr. Marcio Talhavini


Prof. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale


Prof. Dr. Elina Bastos Caramão


Prof. Dra. Cláudia Alcaraz Zini
Orientadora

Doutoranda Juliane Elisa Welke

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Norberto, meu maior exemplo de dedicação e competência,

À minha mãe, Solange, que nunca mediu esforços para que meus objetivos fossem alcançados,

Ao meu esposo, Aldrin, que sempre esteve ao meu lado me incentivado e ajudando,

À estas pessoas especiais,

Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, seja na forma de orientação, auxílio, compreensão ou estímulo, pois foram fundamentais para a conclusão desta importante etapa da minha vida. Em especial agradeço:

- À professora Dra. Claudia Alcaraz Zini pela orientação, confiança, incentivo e amizade.
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Uva e Vinho, em especial aos pesquisadores Dr. Marcelo Lazzarotto e Dr. Mauro Zanus, pelo fornecimento das amostras e informações necessárias para a execução deste trabalho.
- À Dra. Leila Falcão que colaborou com os padrões utilizados na pesquisa.
- Ao professor Dr. Vitor Manfoi (ICTA/UFRGS) pelos esclarecimentos em relação a elaboração de vinhos e pela disponibilidade nas contribuições para este trabalho.
- À professora Dra. Isa Beatriz Noll (ICTA/UFRGS), minha orientadora do mestrado, por ter me incentivado a realizar o doutorado na área de Química e por ter me encaminhado à área de Química Analítica do Instituto de Química.
- Aos alunos de iniciação científica: Francis Loro, Karine Gregorius Schmitt e Lilian Antoni pela ajuda durante a realização deste trabalho.
- Aos colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO), especialmente à: Maria Elisabete Machado, Flaviana Damasceno, Juliana Macedo, Marcelo Migliorini e Silvana Aranda pela ajuda na parte técnica e amizade.
- À 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.
- Aos meus pais, Solange e Norberto, e irmãs, Josiane e Jaqueline, pelo amor, carinho, incentivo e por terem, mesmo à distância, me apoiado em todos os momentos.
- Ao Aldrin, que sempre me incentivou e apoiou minhas decisões. Agradeço pela companhia nas análises realizadas durante a noite e nos finais de semana, pela ajuda no preparo de material para as análises e por nunca ter poupado esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos.

TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA TESE

A. Artigos publicados relacionados ao tema desta tese

- Welke, J.E.; Zini, C.A. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Analysis of Volatile Compounds in Foods and Beverages. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 609.
- Welke, J.E.; Zanús, M.; Lazarotto, M.; Schmitt, K.G.; Zini, C.A. Volatile Characterization by Multivariate Optimization of Headspace-solid Phase Microextraction and Sensorial Evaluation of *Chardonnay* Base Wines. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23, 678.
- Welke, J.E.; Manfroi, V.; Zanús, M.; Lazarotto, M.; Zini, C.A. Characterization of the Aroma Profile of Brazilian Merlot Wines through Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography Time-of-flight Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1226, 124.

B. Trabalhos apresentados na forma de pôsteres e respectivos resumos publicados em anais de evento científico

- Welke, J.E.; Manfroi, V.; Zanús, M.; Lazarotto, M.; Zini, C.A. Multivariate analysis of comprehensive two dimensional gas chromatography and time-of-flight mass spectrometric detection data for wines differentiation. 16th IUFOST. World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, 2012.
- Welke, J.E.; Manfroi, V.; Zanús, M.; Lazarotto, M.; Zini, C.A. The superior selectivity of comprehensive two dimensional gas chromatography and time-of-flight mass spectrometric detection applied to the characterization of volatile profile of Chardonnay wines. 16th IUFOST. World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, 2012.
- Zini, C.A., Welke, J.E., Manfroi, V., Zanús, M., Lazarotto, M. Differentiation of wines according to grape variety using multivariate analysis of two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection data. 36th International Symposium on Capillary Chromatography and 9th GCxGC Symposium Riva del Garda, 2012.
- Zini, C.A., Welke, J.E., Manfroi, V., Zanús, M., Lazarotto, M. Study of volatile compounds of Chardonnay wines using two dimensional gas chromatography time-of-

flight mass spectrometric detection. 36th International Symposium on Capillary Chromatography and 9th GCxGC Symposium Riva del Garda, 2012.

- Zini, C.A.; Welke, J.E.; Manfroi, V.; Lazarotto, M.; Zanús, M.; Loro, F. Volatile profile of Merlot wines using comprehensive two dimensional gas chromatography with headspace solid phase microextraction. In: 35th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC) and 8th GCxGC Symposium, 2010, San Diego. Abstracts Book, 2011.

- Welke, J.E.; Manfroi, V.; Zanús, M.; Lazarotto, M.; Zini, C.A. Characterization of the Aroma Profile of Brazilian Merlot Wines through Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography Time-of-flight Mass Spectrometry. In: 16^o Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão. Livro de Resumos, 2011.

- Welke, J.E.; Zanús, M.; Zini, C.A. Volatile Characterization by Multivariate Optimization of Headspace Solid Phase Microextraction and Sensorial Evaluation of Chardonnay Base Wines. In: 34th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC) and 7th GCxGC Symposium, 2010, Riva del Garda. Abstracts Book, 2010. p. 441.

- Welke, J.E.; Zanús, M.; Lazarotto, M.; Schmitt, K.G.; Zini, C.A. Otimização das condições de análise de voláteis em vinho por GCxGC. In: Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2010, Campos do Jordão. Livro de resumos do SIMCRO, 2010.

- Welke, J.E.; Zanús, M.; Zini, C.A. Otimização das condições de microextração em fase sólida para extração de voláteis de vinho base através de planejamento experimental. In: 15^o Encontro Nacional de Química Analítica/3^o Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador - Bahia. Anais do Congresso, 2009.

- Welke, J.E.; Zanús, M.; Zini, C.A. Caracterização preliminar de compostos voláteis de vinhos base da Serra Gaúcha através de microextração em fase sólida no modo *headspace*. In: 15^o Encontro Nacional de Química Analítica/3^o Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador - Bahia. Anais Congresso, 2009.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo geral	3
1.1.2 Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 VINHOS	5
2.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS RELACIONADOS AO AROMA DOS VINHOS	6
2.2.1 Compostos voláteis originários da uva	7
2.2.1.1 Terpenos	9
2.2.1.2 Metoxipirazinas	10
2.2.1.3 Norisoprenóides	11
2.2.2 Compostos voláteis responsáveis pelo aroma pré-fermentativo	11
2.2.3 Compostos voláteis originados na fermentação	12
2.2.3.1 Álcoois	13
2.2.3.2 Ácidos	13
2.2.3.3 Ésteres	14
2.2.3.4 Compostos sulfurados	16
2.2.3.5 Compostos carbonilados – aldeídos e cetonas	16
2.2.3.6 Lactonas	17
2.2.3.7 Fenóis voláteis	17
2.3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE VINHOS	18
2.4 TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS	22
2.4.1 Cromatografia Gasosa monodimensional	22
2.4.2 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC)	25
2.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	28
2.6 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE E PARA A DIFERENCIAÇÃO DE VINHOS DE ACORDO COM AS CULTIVARES DE UVA	31
2.6.1 Planejamento experimental	34

2.6.2 Pré-processamento dos dados	37
2.6.3 Razão de Fisher.....	38
2.6.4 Análise de Componentes Principais (PCA).....	39
2.6.5 Análise Discriminante Linear (LDA)	41
3. EXPERIMENTAL.....	44
3.1 AMOSTRAS	44
3.2 REAGENTES E SOLUÇÃO PADRÃO.....	44
3.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO <i>HEADSPACE</i>	45
3.3.1 Escolha do filme polimérico da SPME	45
3.3.2 Otimização das condições de extração através de planejamento experimental	46
3.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	48
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	50
3.6 ANÁLISE SENSORIAL.....	51
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DOS VOLÁTEIS DE VINHO BASE NO MODO <i>HEADSPACE</i>	54
4.1.1 Escolha do filme polimérico de SPME	54
4.1.2 Uso de agitação	57
4.2. Planejamento experimental para otimização dos demais parâmetros do método de micro extração em fase sólida no modo <i>headspace</i>	58
4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO <i>HEADSPACE</i> A AMOSTRAS DE VINHO BASE GAÚCHO	66
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE.....	70
4.4.1 Conjunto de colunas	70
4.4.2 Período de modulação	73
4.4.3 Diferença de temperatura (ΔT) entre o forno primário e secundário	75
4.4.4 Duração do jato quente.....	76
4.5 APLICAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS OBTIDAS PARA GCxGC Á ANÁLISE DE VINHOS CHARDONNAY	77
4.6 ÍNDICE DE RETENÇÃO COM PROGRAMAÇÃO LINEAR DE TEMPERATURA OBTIDO EM CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE EM COLUNA DB-WAX (POLAR) x DB-17MS (MEDIANAMENTE POLAR).....	85
4.7 COMPOSTOS VOLÁTEIS DE VINHO MERLOT INVESTIGADOS ATRAVÉS DA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO <i>HEADSPACE</i> E CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE COM DETECÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE MASSAS POR TEMPO DE VÔO.....	91
4.8 DIFERENCIAÇÃO DOS VINHOS DE ACORDO COM O PERFIL VOLÁTIL.....	94
5. CONCLUSÕES	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
7. ANEXOS.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Exemplos de compostos que contribuem para o <i>flavour</i> das uvas e vinhos e a respectiva percepção sensorial associada aos mesmos.....	6
Tabela II. Compostos precursores de aroma encontrados nas uvas e as respectivas substâncias deles derivadas, que influenciam no aroma dos vinhos.....	9
Tabela III. Terpenos provenientes de uvas e vinhos, com exemplos de compostos representativos de cada classe e seus respectivos aroma e limiar de percepção.....	10
Tabela IV. Principais C13-norisoprenóides no que diz respeito a sua contribuição para o aroma do vinho.....	11
Tabela V. Exemplos de ácidos produzidos durante a elaboração dos vinhos com seu respectivo limiar de percepção e contribuição para o aroma.....	14
Tabela VI. Principais ésteres que contribuem para o aroma do vinho e suas respectivas contribuições para o aroma e limiares de percepção.....	15
Tabela VII. Principais fenóis voláteis que contribuem para o aroma do vinho com sua respectiva contribuição para o aroma e limiar de percepção.....	18
Tabela VIII. Número de compostos extraídos através de diversas técnicas de extração de voláteis e análise de vinhos elaborados a partir de uvas das mesmas cultivares analisadas no presente trabalho.....	24
Tabela IX. Parâmetros gerados na ANOVA para avaliação do planejamento fatorial.	35
Tabela X. Matriz do planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}).....	47
Tabela XI. Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) para otimização das condições da HS-SPME de voláteis de vinho.....	48
Tabela XII. Condições empregadas nas análises cromatográficas.....	49
Tabela XIII. Conjuntos de colunas cromatográficas utilizadas nos sistemas GCxGC.	50
Tabela XIV. Número de picos e área total obtidos através da extração de voláteis do <i>headspace</i> de vinho base espumante com e sem agitação da amostra de vinho..	58
Tabela XV. Experimentos realizados com base no planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) com os valores reais e as respostas obtidas através do número de picos e área total, para a otimização das condições de SPME de voláteis de vinho.....	59
Tabela XVI. Experimentos realizados pelo delineamento composto central e resultados para as respostas número de picos e área total.....	61
Tabela XVII. Coeficientes de regressão para a resposta número de picos obtidos	

após os experimentos do delineamento composto central.....	62
Tabela XVIII. Valores da ANOVA para a resposta número de picos obtidos após os experimentos do delineamento composto central.....	62
Tabela XIX. Coeficientes de regressão para a resposta área total obtida após os experimentos do delineamento composto central.....	63
Tabela XX. Valores da ANOVA para a resposta área total obtida após os experimentos do delineamento composto central.....	63
Tabela XXI. Identificação tentativa dos compostos voláteis de vinhos base elaborados a partir de uvas da cultivar Chardonnay.....	68
Tabela XXII. Média dos atributos sensoriais dos vinhos base Chardonnay.....	70
Tabela XXIII. Tempo de retenção dos compostos padrão nos períodos de modulação de 4, 6 e 7 s.....	73
Tabela XXIV. Fator de assimetria (2A_s) e respectivo desvio padrão (entre parênteses) para os picos na 2D , com a utilização de diferentes durações de jato quente e do conjunto de colunas DB-Wax x DB-17ms. Os compostos voláteis que apresentaram picos cromatográficos com 2A_s fora do intervalo considerado satisfatório (0,8 -1,2) estão destacados em negrito e em itálico.....	77
Tabela XXV. Índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI) de 22 compostos padrão, obtidos experimentalmente através da GCxGC, utilizando-se o 1t_R e os LTPRI reportados pela literatura científica para 1D-GC.....	86
Tabela XXVI. Pesos obtidos na PCA feita com os compostos voláteis tentativamente identificados em vinhos analisados por GCxGC/TOFMS, cujas razões de Fisher foram maiores do que 970.....	95
Tabela XXVII. Porcentagens de variância individual e acumulada explicadas pelos 14 principais componentes.....	99
Tabela XXVIII. Teste de seleção de variáveis discriminantes entres os 14 PC através da utilização de Wilks' Lambda e fator estatístico F para construção de um modelo de diferenciação de vinhos de acordo com a cultivar de uva utilizada para a elaboração dos mesmos.....	102
Tabela XXIX. Compostos voláteis apontados pela análise multivariada como os mais discriminantes para cada um dos cinco tipos de vinho elaborados com uvas Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir.....	104

Tabela XXX. Contribuição para o aroma dos doze compostos voláteis apontados pela análise multivariada como os mais importantes para a diferenciação dos vinhos Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir.....	105
Tabela XXXI. Compostos tentativamente identificados no <i>headspace</i> de vinhos Chardonnay através da GC×GC/TOFMS.....	127

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho ilustrativo das partes de um pico cromatográfico que são levadas em consideração para o cálculo do fator de assimetria de pico (2A_s), que corresponde à razão entre as distâncias A e B a 10% da altura do pico..... 26
- Figura 2.** Representação de um gráfico de escores (relacionado às amostras) e seu respectivo gráfico de pesos (relacionado às variáveis que diferenciam as amostras)..... 40
- Figura 3.** Representação da separação de amostras entre dois grupos (X e Y). Ao traçar uma linha (azul) e projetar as amostras sobre essa linha, as amostras pertencentes a cada grupo foram separadas apenas no exemplo **B**... 41
- Figura 4.** Etapas do planejamento experimental aplicado para otimização das condições de extração de compostos voláteis de vinho base Chardonnay, através da avaliação simultânea de vários fatores e seus respectivos níveis, os quais podem exercer influência na eficiência da extração e são verificados na obtenção da superfície de resposta..... 46
- Figura 5.** Cromatogramas de análises em GC-FID, obtidos após a extração do *headspace* de vinho base de uva *Chardonnay* com os revestimentos (A) PDMS 7 μm StableFlex, (B) PDMS 100 μm , (C) PA 85 μm , (D) CW(PEG) 60 μm metal, (E) PDMS-DVB 65 μm StableFlex, (F) CAR-PDMS 85 μm StableFlex e (G) DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex. As condições das análises cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**..... 55
- Figura 6.** Diagramas de barras que indicam a eficiência dos diferentes filmes poliméricos de SPME para extração de compostos voláteis de vinhos, através da média do total de picos cromatográficos e dos percentuais de área obtidos nas triplicatas da extração. As barras indicam o erro padrão da média..... 56
- Figura 7.** Cromatogramas resultantes de análises em GC-FID, obtidos após a extração de voláteis do *headspace* de vinho base de uva Chardonnay com a fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex (A) com agitação e (B) sem agitação. As condições das análises cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**..... 58
- Figura 8.** Diagrama de Pareto com a estimativa dos efeitos das variáveis estudadas no planejamento experimental para (A) área total dos compostos e (B) número de picos cromatográficos detectados por GC-FID. As condições

utilizadas nas análises cromatográficas estão descritas na Tabela XII	60
Figura 9. Superfícies de resposta e curvas de contorno para: o número de picos em função do tempo e temperatura de extração (A) e (B) ; o tempo de extração e a concentração de sal (C) e (D) e para a temperatura de extração e concentração de sal (E) e (F)	64
Figura 10. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a área total em função do tempo e temperatura de extração (A) e (B) , do tempo de extração e concentração de sal (C) e (D) e da temperatura de extração e concentração de sal (E) e (F)	65
Figura 11. Cromatograma de corrente iônica total (TIC) para os compostos presentes no <i>headspace</i> de vinho base elaborado a partir de uvas da cultivar Chardonnay. O número de cada pico corresponde a composto apresentado na Tabela XXI . As condições utilizadas na análises dos vinhos estão descritas na Tabela XII	67
Figura 12. Avaliação sensorial global dos vinhos produzidos em quatro diferentes locais da Serra Gaúcha e avaliados pela ANOVA e teste LSD ao nível de 95% de confiança. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras. Amostras provenientes de: VV: Vale dos Vinhedos; FC: Flores da Cunha; VA: Vacaria; PB: Pinto Bandeira.....	69
Figura 13. Separação de compostos voláteis de vinho utilizando-se a cromatografia gasosa bidimensional abrangente e os seguintes conjuntos de colunas: (A) DB-5 x DB-Wax, (B) DB-Wax x DB-1ms e (C) DB-Wax x DB-17ms. As condições utilizadas na análises cromatográficas dos padrões estão descritas na Tabela XII . Os compostos estão listados na Tabela XXIII ; PI: padrão interno (3-octanol).....	72
Figura 14. Distribuição de 22 compostos voláteis de vinho empregando-se o conjunto de colunas DB-Wax x DB-17ms em diferentes períodos de modulação (A) 4 s, (B) 6 s e (C) 7 s. As condições utilizadas na análises cromatográficas dos padrões estão descritas na Tabela XII . Os compostos estão listados na Tabela XXIII ; PI: padrão interno (3-Octanol).....	74
Figura 15. Distribuição de 22 compostos voláteis de vinho no espaço de separação empregando-se o conjunto de colunas DB-Wax x DB-17ms e diferenças de temperatura de (A) 10, (B) 20, (C) 40 e (D) 50°C entre os dois	

- fornos. As condições utilizadas na análises cromatográficas dos padrões estão descritas na **Tabela XII**..... 75
- Figura 16.** Diagrama de cores que demonstra a distribuição estruturada das classes de **(A)** compostos padrão listados na **Tabela XXIII** e **(B)** compostos voláteis de vinhos Chardonnay obtidos com um conjunto de colunas DB-Wax (polar) × DB17ms (medianamente polar). Demais condições de análise constam do **item 3.4**..... 79
- Figura 17.** Distribuição de alguns compostos voláteis do *headspace* de vinho Chardonnay no diagrama de cores de **(A)** ésteres estruturalmente similares: (1) *acetato de etila*, (2) *propanoato de etila*, (3) 2-metil propanoato de etila, (4) *butanoato de etila*, (5) 2-metil butanoato de etila, (6) *pentanoato de etila*, (7) acetato de isoamila (3-metil etanoato de etila), (8) *hexanoato de etila*, (9) *heptanoato de etila*, (10) octanoato de metila, (11) *octanoato de etila* e **(B)** álcoois estruturalmente similares: (1) *1-propanol*, (2) 2-metil-propanol, (3) *1-butanol*, (4) 3-metil-1-butanol, (5) *1-pentanol*, (6) 3-metil-1-pentanol, (7) *1-hexanol*, (8) etil-hexanol. As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**..... 80
- Figura 18.** Diagrama tridimensional de parte do diagrama de cores mostrado na **Figura 16B**, apresentando também a reconstrução dos cromatogramas da ¹D e ²D de amostra de vinho Chardonnay. As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**..... 82
- Figura 19.** Parte do diagrama de cores apresentado na **Figura 16B** mostrando a coeluição de undecanoato de etila (¹t_R = 42,35 min, ²t_R = 4,30 s, 195 na **Tabela XXXI- Anexos**) e 5H-2-furanona (¹t_R = 42,35 min, ²t_R = 3,50 s, 279 na **Tabela XXXI- Anexos**). As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**..... 82
- Figura 20.** Coeluição de picos cromatográficos de compostos voláteis de vinhos Chardonnay determinados por HS-SPME-GC×GC/TOFMS: **(A)** parte do cromatograma dos picos modulados de quatro compostos que coeluíram na ¹D: (1) linha verde, 3-hidróxi-4,4-dimetil-2(5H)-furanona (284), *m/z* 71; (2) linha cinza, 2-pirrolidinona (304), *m/z* 85; (3) linha azul, miristato de isopropila (206), *m/z* 43; (4) linha vermelha, 4-etil-guaicol (296), *m/z* 137. **(B)** espectros de massas deconvoluídos dos compostos e os respectivos espectros de

massas da biblioteca NIST 2005 na Figura 20A . As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na Tabela XII	84
Figura 21. Comparação entre os LTPRI obtidos experimentalmente por GCxGC/TOFMS para 22 compostos voláteis de uma mistura padrão (listados na Tabela XXV) por dois métodos de cálculo, utilizando o 1t_R ou $^1t_R+^2t_R$, bem como dos LTPRI obtidos através da GCxGC/TOFMS para os mesmos compostos de uma amostra de vinho Chardonnay e os LTPRI da literatura obtidos por 1D-GC.....	89
Figura 22. Diagrama de cores demonstrando a distribuição estruturada das classes de compostos voláteis de vinhos Merlot obtido com um conjunto de colunas DB-Wax (polar) x DB-17ms (polaridade média). Demais condições de análise constam do item 3.4	92
Figura 23. Distribuição no diagrama de cores de (A) ésteres estruturalmente similares: (1) propanoato de etila, (2) butanoato de etila, (3) 2-metil-butanoato de etila, (4) butanoato de 3-metila, (5) hexanoato de etila, (6) hexanoato de propila, (7) octanoato de etila e (B) álcoois: (1) 1-propanol, (2) 1-butanol, (3) 3-metil-1-butanol, (4) 4-metil-1-pentanol, (5) 1-hexanol, (6) 3-etóxi-1-propanol, (7) 3-hexen-1-ol. As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na Tabela XII	93
Figura 24. Autovalores para cada componente principal obtidos após a PCA de 77 compostos voláteis de 54 amostras de vinho de diferentes cultivares de uvas. A linha pontilhada ilustra o critério de Kaiser (autovalor >1).....	99
Figura 25. Gráficos da PCA dos 77 compostos voláteis de 54 amostras de vinhos Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir; (A) gráfico de escores que apresenta a distinção entre as amostras e (B) gráfico de pesos que mostra os compostos voláteis dispostos no plano definido pela PC1 e PC2 de acordo com a diferenciação das cultivares de uva. Os números que constam do gráfico designam compostos tentativamente identificados, conforme a Tabela XXVI	100
Figura 26. Gráfico das amostras de vinho distribuídas no plano definido pelas duas variáveis canônicas, após a aplicação da LDA. As amostras de vinho estão agrupadas de acordo com a variedade de uva utilizada na sua produção: C (Chardonnay), M (Merlot), CS (Cabernet Sauvignon), SB	

(Sauvignon Blanc) e C+PN (50% Chardonnay/50% Pinot Noir).....	103
Figura 27. Exemplo da necessidade do emprego da deconvolução espectral para identificação de compostos voláteis extraídos por HS-SPME de vinhos Cabernet Sauvignon, analisados através da GCxGC/TOFMS: (A) Parte do cromatograma referente aos picos modulados de três compostos voláteis que coeluíram na ¹ D e coeluíram parcialmente na ² D: (1) linha azul: decen-9-oato de etila, <i>m/z</i> 55; (2) linha vermelha: 5-etildihidro-2(3H)-furanona, <i>m/z</i> 85; (3) linha preta, 2-etilhexanal, <i>m/z</i> 57; (B) espectro de massas deconvoluído dos compostos da Figura 27A e os respectivos espectros de massas dos mesmos da biblioteca NIST 2005. As condições cromatográficas utilizadas nas análises estão na Tabela XII	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
2A_s	Assimetria de pico
CAR-PDMS	Carboxen-polidimetilsiloxano
CCD	Delineamento composto central, do inglês <i>central composite design</i>
CW	Carbowax
1D	Primeira dimensão
2D	Segunda dimensão
1D-GC-FID	Cromatografia gasosa monodimensional associada a detector de ionização em chama, do inglês <i>gas chromatography</i>
1D-GC/MS	Cromatografia gasosa monodimensional associada a espectrometria de massas, do inglês <i>gas chromatography with mass spectrometry</i>
DO	Denominação de origem
DVB-CAR-PDMS	Divinil benzeno-carboxen-polidimetilsiloxano
GC	cromatografia gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>
GC/qMS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do tipo quadrupolar, do inglês <i>gas chromatography with quadrupole mass spectrometry</i>
GCxGC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente, do inglês <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography</i>
GCxGC-FID	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por ionização em chama, do inglês <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization detector</i>
GCxGC/qMS	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas do tipo quadrupolar, do inglês <i>comprehensive two-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometry</i>
GCxGC/TOFMS	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo, do inglês

	<i>comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry</i>
HCA	Análise a agrupamento hierárquico, do inglês <i>hierarchical cluster analysis</i>
HS-SPME	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> , do inglês: <i>headspace solid phase microextraction</i>
IG	Indicação geográfica
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IP	Indicação de procedência
IR	Índice de retenção
KI	Índice de Kovats, do inglês <i>Kovats retention index</i>
KNN	Método dos k-vizinhos mais próximos, do inglês <i>K-nearest neighbor</i>
LDA	Análise discriminante linear, do inglês: <i>linear discriminant analysis</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>
LP	Limiar de percepção
LTPRI	Índice de retenção com programação linear de temperatura, do inglês <i>linear temperature programmed retention index</i>
m/z	Razão massa/carga
PA	Poliacrilato
PC	Componente principal, do inglês <i>principal component</i>
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>principal component analysis</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno
PG	Polietilenoglicol
PLS-DA	Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais, do inglês <i>partial least square discriminant analysis</i>
qMS	Espectrometria de massas do tipo quadropolar, do inglês <i>quadrupole mass spectrometry</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i>

TIC	Cromatograma de corrente iônica total, do inglês: <i>total ion current chromatogram</i>
TOFMS	Espectrometria de massas por tempo de vôo, do inglês: <i>time-of-flight mass spectrometry</i>
1t_R	Tempo de retenção na primeira dimensão
2t_R	Tempo de retenção na segunda dimensão

RESUMO

Doze compostos voláteis de cinco vinhos de diferentes cultivares foram indicados pela análise multivariada (análise de componentes principais e análise discriminante linear) das razões de Fisher de suas áreas cromatográficas normalizadas como potenciais marcadores para diferenciação entre estes vinhos. Este tratamento quimiométrico permitiu a redução da dimensionalidade dos dados obtidos por método otimizado de microextração em fase sólida no modo *headspace* e cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (GCxGC/TOFMS), apontando os seguintes componentes como potenciais marcadores para os diferentes vinhos: succinato de dietila, 2,3-butanodiol e 3-penten-2-ona para Sauvignon Blanc; nerol, β -santalol, e 4-careno para 50% Chardonnay/Pinot Noir; malonato de dietila e 9-decenoato de etila para Chardonnay; um álcool e dihidro-2(3H)-tiofenona para Merlot; tetrahydro-2H-piranona e, 3-metil-2(5H)-furanona para Cabernet Sauvignon. A GCxGC/TOFMS também propiciou a identificação tentativa de um número maior de compostos em vinhos Chardonnay (313) e Merlot (334), sendo a presença de alguns destes constatada pela primeira vez em vinhos. Verificou-se uma relação linear entre os índices de retenção calculados experimentalmente para os voláteis de vinho por GCxGC/TOFMS em conjunto de colunas polar x medianamente polar e os índices de retenção reportados na literatura para 1D-GC, a qual foi confirmada com padrões.

ABSTRACT

Twelve volatile compounds from different wine cultivars were found to be potential markers when multivariate analysis (principal component analysis and linear discriminant analysis) were applied to the Fisher ratio of chromatographic normalized areas of these wine volatiles. This chemometric treatment allowed reduction of data dimensionality, as data was obtained through an optimized headspace solid phase microextraction with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC/TOFMS) method. The following compounds were the most discriminatory: diethyl succinate; 2,3-butanediol and 3-penten-2-one to Sauvignon Blanc; nerol, β -santalol, and 4-carene to 50% Chardonnay/Pinot Noir; diethyl malonate and 9-ethyl-decenoate for Chardonnay; an alcohol and dihydro-2(3H)-thiophenone to Merlot; tetrahydro-2H-pyranone and 3-methyl-2(5H)-furanone to Cabernet Sauvignon. GC×GC/TOFMS also allowed the tentative identification of a higher number of compounds of Chardonnay (313) and Merlot (334) wines, taking into account that the presence of some volatiles were verified for the first time in wines. A linear relationship between GC×GC/TOFMS experimental retention indices obtained from a polar × medium polar column set and the retention indices reported in the literature for 1D-GC was observed and confirmed with standard compounds.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul destaca-se no mercado mundial como grande produtor de vinhos, entretanto os vinhos fabricados no Brasil sofrem concorrência com os produtos importados. A fim de aumentar a competitividade da produção nacional, os produtores de vinhos do Rio Grande do Sul buscam o título de Indicação Geográfica (IG), oficialmente regulamentado pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Indicação Geográfica é como convencionou-se chamar a identificação de um produto ou serviço como originário de um local, quando determinada característica pode ser vinculada essencialmente a sua origem geográfica.¹ No Brasil, uma IG pode apresentar duas diferentes classificações para seus produtos: Indicação de Procedência (IP) e Denominação de Origem (DO). A IP é “o nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, que se tenha tornado conhecido como centro de extração, produção ou fabricação de determinado produto ou de prestação de determinado serviço”. A DO é a designação atribuída aos produtos originários e tradicionalmente produzidos numa dada região, cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente ao meio geográfico, incluindo os fatores naturais e humanos.² A obtenção destes títulos e, conseqüentemente, de uma maior qualidade aos vinhos nacionais, depende, entre vários fatores, de um maior conhecimento do *flavour* dos mesmos. O *flavour* caracteriza-se como uma sensação complexa que envolve aroma e sabor. A formação de *flavour* nos vinhos durante a vinificação é um processo complexo, no qual várias reações químicas e enzimáticas contribuem para a composição volátil final do vinho. A combinação de diferentes compostos de aroma, como por exemplo, álcoois, ésteres, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e terpenos formam as características particulares de cada tipo de vinho e diferenciam um tipo do outro.³

Os voláteis são encontrados nos vinhos em níveis variando de ng L^{-1} a mg L^{-1} . A análise destes compostos requer uma etapa prévia de isolamento e concentração. A microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME, do inglês: *headspace solid phase microextraction*) é uma técnica na qual a amostragem, extração e concentração são realizadas em uma única etapa.⁴ Ao comparar a HS-SPME com técnicas tradicionais de extração, como por exemplo a extração líquido-líquido (LLE, do inglês: *liquid-liquid extraction*), observa-se que a SPME apresenta

como vantagem o fato de não utilizar solvente e requer pequeno volume de amostra para a extração, além de geralmente apresentar alta sensibilidade e reprodutibilidade e poder ser completamente automatizada. Por estas razões, a SPME tem sido bastante utilizada na análise de compostos voláteis de alimentos e bebidas.⁵

A cromatografia gasosa monodimensional associada ao detector de ionização em chama (1D-GC-FID, do inglês: *one-dimensional gas chromatography with flame ionization detector*) e acoplada a espectrometria de massas (MS, do inglês: *mass spectrometry*) tem sido a técnica de referência para análise de compostos voláteis em vinhos. A 1D-GC apresenta bons resultados no campo dos vinhos e espumantes, entretanto, devido à complexidade da matriz, que envolve compostos de diferentes classes químicas e presentes em nível de traços, nem sempre fornece suficiente resolução e sensibilidade para a caracterização dos aromas. Frequentemente, a análise dos cromatogramas obtidos pela 1D-GC indica que alguns picos são resultado de dois ou mais compostos coeluídos, o que impede a correta identificação dos mesmos.⁶⁻⁸

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC, do inglês: *comprehensive two-dimensional gas chromatography*) acoplada a espectrometria de massas por tempo-de-vôo (TOFMS, do inglês: *time-of-flight mass spectrometry*) é uma técnica que submete toda a amostra inserida no sistema cromatográfico a dois mecanismos de separação diferentes em duas colunas, sendo que a separação na segunda dimensão (²D) ocorre no mesmo período em que a análise se completa na primeira dimensão (¹D). A introdução de fragmentos das bandas cromatográficas do efluente da ¹D na ²D ocorre através de um modulador, durante curtos períodos, os quais correspondem ao tempo de uma análise cromatográfica na ²D. Esta técnica oferece superior capacidade de pico, seletividade, sensibilidade e possibilidade de estruturação dos picos cromatográficos no espaço bidimensional (2D), de acordo com as propriedades físico-químicas destes.⁹

As pesquisas científicas relacionadas aos voláteis dos vinhos nacionais, utilizando-se GCxGC são inexistentes e aquelas feitas através de 1D-GC, são ainda em pequeno número, o que é extremamente prejudicial para a valorização desta bebida no mercado nacional e internacional. Sabe-se que o conhecimento dos componentes voláteis dos vinhos gaúchos pode levar a uma melhor compreensão sobre sua qualidade, sobre o aprimoramento dos processos de fabricação e também

pode revelar características diferenciais e únicas dos vinhos regionais em relação a outros vinhos.¹⁰ Estudos relacionados a voláteis de vinhos de várias procedências e sua diferenciação através do estudo do perfil dos compostos voláteis por GCxGC também são escassos, até mesmo na Academia.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo a aplicação da HS-SPME, da 1D-GC e da GCxGC ao estudo dos voláteis dos vinhos gaúchos a fim de ampliar os conhecimentos sobre os mesmos, bem como verificar o potencial da GCxGC para separação e identificação de compostos voláteis marcadores de vinhos elaborados a partir de diferentes cultivares de uvas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- otimizar um método de HS-SPME para extração de compostos voláteis de vinho base da cultivar Chardonnay, empregando-se abordagem univariada e multivariada.
- realizar o estudo preliminar dos compostos voláteis e semi-voláteis de vinhos base da cultivar Chardonnay de quatro localidades do Rio Grande do Sul, empregando um método de HS-SPME otimizado e 1D-GC/MS.
- otimizar o método analítico para avaliação do perfil cromatográfico dos compostos voláteis de vinhos, empregando GCxGC/TOFMS.
- avaliar qualitativamente e comparar os perfis cromatográficos (GCxGC/TOFMS) dos voláteis de vinhos elaborados a partir de uvas das cultivares Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir a fim de investigar a presença de compostos voláteis marcadores de cada uma destas cultivares de uva.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VINHOS

O vinho é definido, segundo a legislação brasileira, como sendo uma bebida proveniente exclusivamente da fermentação alcoólica de uva madura e fresca ou de suco de uva fresca. Ele é o resultado da transformação dos açúcares do suco de uva em álcool etílico, gás carbônico e em centenas de outros compostos. O espumante é definido como o vinho cujo anidrido carbônico provém exclusivamente da segunda fermentação alcoólica do vinho. Quando a segunda fermentação ocorre em garrafas, o método é conhecido como *Champenoise* ou tradicional, sendo que a primeira fermentação ocorre em tanques de inox, o que dá origem ao vinho base e a segunda fermentação ocorre após o engarrafamento do vinho base e dará origem ao espumante.^{2, 11}

A vitivinicultura brasileira tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, decorrente da vigorosa expansão na área cultivada e na tecnologia de produção de uvas e de elaboração de vinhos. Além disso, a inserção crescente de conceitos como indicações geográficas como sinais de qualidade, segurança dos alimentos, alimentos funcionais, entre outros colocam a produção dos vinhos nacionais em sintonia com as tendências da vitivinicultura mundial, na qual a competitividade é cada vez mais essencial para a sustentabilidade econômica.¹²

Os maiores produtores de vinho são a França, a Itália, a Espanha, os Estados Unidos e a Argentina. Atualmente o Brasil é o 14º produtor mundial de vinho e o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor, com três regiões vitivinícolas: a tradicional região produtora da Serra Gaúcha e as regiões emergentes – Campanha e Serra do Sudeste.¹³

Os vinhos finos são aqueles elaborados exclusivamente a partir de uvas de variedades européias (*Vitis vinifera* L.).² As principais variedades deste grupo cultivadas no Brasil são: i) variedades tintas: Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinotage, Pinot Noir e Tannat e ii) variedades brancas: Chardonnay, Malvasia Bianca, Moscato Branco, Proseco e Riesling Itálico.¹³

2.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS RELACIONADOS AO AROMA DOS VINHOS

A qualidade dos vinhos, em geral, é grandemente influenciada por componentes que lhe conferem o *flavour*. O aroma de vinhos e espumantes é determinado por compostos voláteis percebidos pelo olfato, enquanto o sabor está relacionado às sensações do paladar. O *flavour* caracteriza-se como uma sensação mais complexa, que envolve sabor e aroma.¹⁴ Muitos compostos influenciam no *flavour* (**Tabela I**). Entretanto, o aroma exerce a maior contribuição para a percepção total do *flavour*.¹⁵

Tabela I. Exemplos de compostos que contribuem para o *flavour* das uvas e vinhos e a respectiva percepção sensorial associada aos mesmos.

Percepção sensorial	Atributo	Exemplo de composto químico
Olfato (aroma) ^{16, 17}	Aroma floral	Linalool
	Aroma de banana	Acetato de Isoamila
	Aroma de morango	Isobutirato de etila
	Aroma frutado	Hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila
Paladar (Gosto) ¹⁸	Doce	Glicose, frutose, glicerol
	Azedo	Ácido tartárico
	Salgado	Cloreto de sódio, cloreto de potássio
	Amargo	Catequina
Tato ^{19, 20}	Viscosidade	Glicerol, polissacarídeos
	Adstringência	Taninos
Visão ²¹	Vermelho	Malvidina-3-glicosídeo (antocianina)

A percepção do aroma do vinho é resultado de múltiplas interações entre vários compostos químicos e receptores sensoriais. Os compostos interagem e combinam-se, o que pode resultar em efeitos sinérgicos, em que a presença de um composto aumenta a percepção da presença de outro ou ainda efeitos antagônicos, de modo que um composto dificulta ou impede a percepção de um outro composto volátil.^{22, 23}

A intensidade de uma sensação olfativa não depende somente da concentração de um componente do vinho, mas também da sua volatilidade, da sua

pressão de vapor e do seu limiar de percepção olfativa. O limiar de percepção pode ser definido como o menor estímulo capaz de produzir uma sensação olfativa em pelo menos 50% dos provadores de um júri, quando este vinho for submetido à avaliação sensorial.^{24, 25}

Centenas de compostos de distintas classes químicas, presentes em diferentes concentrações são os responsáveis pelo aroma. Tais compostos são provenientes da uva, dos processos fermentativos e do envelhecimento do vinho.²⁶ Contudo, tanto qualitativamente, como quantitativamente, os compostos originários da fermentação são o grupo principal.²⁷ O aroma, dependendo da sua origem, pode ser classificado em quatro categorias distintas: varietal, pré-fermentativo, fermentativo e pós-fermentativo.²⁸ A composição global da maioria das cultivares de uva é semelhante, entretanto, há diferenças que podem ser atribuídas principalmente à variações nas proporções dos compostos voláteis que constituem o perfil aromático da uva, havendo também diferenças qualitativas que podem estar diretamente associadas à cultivar da uva.²⁵ Desta maneira, a composição volátil representa a impressão digital de uma determinada variedade de uva e pode ser usada para diferenciar vinhos da mesma variedade proveniente de diferentes regiões ou para distinguir variedades de uva.²⁹⁻³¹

2.2.1 Compostos voláteis originários da uva

A composição volátil da uva está relacionada ao seu genótipo varietal, que corresponde às características genéticas de cada cultivar de uva, e ao fenótipo caracterizado pelas interações do genótipo com os fatores ambientais, os quais, quando se referem à vinhos, são agrupados através do conceito de *terroir*. O *terroir* é basicamente caracterizado por um padrão relativamente homogêneo de topografia, clima, geologia, solo, influência do homem, altitude, latitude, entre outros fatores. Pode também ser definido como: um conjunto complexo de fatores naturais que não podem ser facilmente modificados pelo produtor e que, em conjunto com várias decisões de manejo tomadas pelo homem, levarão à obtenção de um produto final característico de uma determinada região.²⁸ Desta maneira, a produção de aroma é influenciada por fatores que incluem solo, clima³², cultivar de uva³³, grau de

maturação, condições utilizadas na fermentação, cepa da levedura e condições utilizadas na produção do vinho.²⁷ A literatura científica indica que pode existir relação entre a fração volátil de alimentos e bebidas e os seguintes aspectos: matéria-prima empregada, local onde o produto foi elaborado e processo de produção empregado. Da mesma maneira, a caracterização e diferenciação dos vinhos pode ser feita com base na fração volátil dos mesmos.³²⁻³⁴ Belancic e colaboradores³² avaliaram o efeito da exposição solar das uvas durante o cultivo na composição aromática de uvas *Vitis vinífera* da cultivar Muscat, Moscatel Alejandria e Moscatel rosada. Os autores compararam uvas totalmente expostas ao sol e uvas que recebiam 20 e 50% da radiação solar. Vinhos que receberam 50% da radiação solar apresentaram concentração mais elevada de terpenos, especialmente do linalol, que é considerado um composto importante para o aroma do vinho.

A influência do tipo de solo (arenoso e argiloso) no cultivo das uvas da espécie *Vitis vinífera*, cultivar Zalema e do grau de maturação das uvas foi avaliada no que diz respeito à composição aromática de vinhos, tendo-se observado que para as uvas provenientes de solo argiloso, não se deve adiar a data da colheita em função da diminuição da concentração, principalmente, de hexanoato de etila, octanoato de etila, álcool isoamílico, 2-feniletanol e acetato de 2-feniletila.³³ Fang e Qian³⁴ também observaram que a concentração dos compostos voláteis relacionados ao aroma de vinhos Pinot Noir, como 2-metil-propanoato de etila, 3-metil-butanoato de etila, cinamato de etila, di-hidróxi-cinamato de etila e antranilato de etila diminuiu com o avanço do grau de maturação das uvas utilizadas para a produção do vinho.

Dois tipos de substâncias específicas da variedade de uva podem contribuir para o aroma: as substâncias que passam para o vinho sem transformações e que transmitem a sua tipicidade e as substâncias que são sujeitas à transformação durante a fermentação e conservação, com consequente liberação de aroma, que são os precursores de aroma.^{24, 25, 28} Os precursores podem ser substâncias não voláteis como glicosídeos, ácidos fenólicos, ácidos graxos e conjugados de cisteína capazes de originar compostos aromáticos pela ação de certas enzimas específicas **(Tabela II)**.^{3, 35-37} Além disso, os precursores podem ser substâncias que colaboram ou não para o aroma do vinho e que, pela sua instabilidade, se transformam em outras substâncias odoríferas, caso de alguns terpenóis, C13-norisoprenóides e dióis terpénicos. A existência dos precursores justifica o fato de cultivares de uvas

neutras produzirem vinhos aromáticos, como é o caso dos vinhos das cultivares Cabernet Sauvignon, Sauvignon blanc e Chardonnay, que originam vinhos aromáticos com características particulares.³

Tabela II. Compostos precursores de aroma encontrados nas uvas e as respectivas substâncias deles derivadas, que influenciam no aroma dos vinhos.^{3, 35-37}

Precusores	Substâncias relacionadas ao aroma
Ácidos graxos (ácido linoléico e linolênico)	C6-aldeídos e C6-álcoois
Carotenóides	C13-norisoprenóides
Ácidos fenólicos	Fenóis voláteis
S-conjugados de cisteína	Tióis voláteis
Aminoácidos	Aldeídos, ácidos, álcoois e ésteres
Glicosídeos	Terpenos, álcoois lineares e cíclicos, C13-norisoprenóides, ácidos fenólicos, fenóis voláteis

2.2.1.1 Terpenos

Os terpenos são formados por uma unidade estrutural básica que contém cinco átomos de carbono, o isopentenilpirofosfato (IPP) através da chamada “regra do isopreno”, que corresponde à união cabeça-cauda das unidades estruturais de IPP. As moléculas formadas por 10 carbonos são chamadas monoterpenos; com 15 carbonos, sesquiterpenos; com 20, diterpenos; com 25, sesterpenos; com 30, triterpenos e com 40, tetraterpenos. O IPP pode ser sintetizado a partir do ácido mevalônico e do piruvato/gliceraldeído-3-fosfato presentes na uva.³⁸ A maioria dos compostos terpênicos de uvas e vinhos são monoterpenos e sesquiterpenos. Estes compostos pertencem a várias famílias, sendo que do ponto de vista do aroma, os mais importantes são os álcoois monoterpênicos (**Tabela III**).³⁹

Tabela III. Terpenos provenientes de uvas e vinhos, com exemplos de compostos representativos de cada classe e seus respectivos aroma e limiar de percepção.

Classe	Compostos	Aroma (Limiar de percepção, $\mu\text{g L}^{-1}$)
Hidrocarbonetos		
	Mirceno	Mofado, verde ⁴⁰
	Limoneno	Cítrico ⁴⁰
Álcoois		
	Eugenol	Cravo-da-índia, ⁴¹ picante ¹⁶ (6) ⁴²
	Linalool	Flor de laranja, ⁴¹ Caramelo, maçã, ⁴³ citrus, verde, ⁴⁴ floral, ⁴⁵ rosa ³ (50) ³
	Geraniol	Floral, ⁴³ frutado ⁴⁴ , rosa ³ , gerânio ⁴⁶ (130 ³ , 20 ²⁷)
	Nerol	Flor de laranja ⁴¹ , rosa ³ (400) ³
	Citronelol	Frutado ⁴³ , citronella ³ (18) ³
	Ho-trienol	Tília ³
	α -Terpineol	Floral fraco, picante ⁴⁰ , lírio ³ , verde, fresco ⁴⁶ (400) ³
	Farnesol	Limão, aniz, flora, mel, pólen ¹⁷ (<100) ¹⁷
	4-Terpineol	Madeira, solo ⁴⁷
Óxidos		
	Óxido de linalool	Rosa, madeira ⁴⁷ (7000) ³
	Cis-óxido de rosa	verde, floral ⁴⁴ (0,2) ⁴⁸

2.2.1.2 Metoxipirazinas

As metoxipirazinas presentes nas uvas e nos vinhos são compostos heterocíclicos provenientes do metabolismo dos aminoácidos. A maioria das metoxipirazinas encontra-se na película das uvas³ e o seu teor depende do grau de maturação.⁴⁹

Os aromas vegetais, que são característicos das uvas das cultivares Sauvignon blanc e Cabemet Sauvignon, são atribuídos geralmente ao composto 2-metóxi-3-isobutilpirazina (IBMP).^{50, 51} Climas mais frios ou níveis baixos de exposição solar no vinhedo durante a maturação da uva contribuem com níveis elevados de IBMP em uvas, tendo por resultado o aroma vegetal nas uvas, que persiste nos respectivos vinhos.⁵¹

2.2.1.3 Norisoprenóides

Os C13-norisoprenóides são formados a partir de glicosídeos não voláteis que estão presentes nas uvas. Estes compostos são liberados durante a vinificação pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.⁵² Além dos glicosídeos não-voláteis, os carotenóides também podem ser precursores de C13-norisoprenóides. A degradação oxidativa dos carotenóides produz derivados com 9, 10, 11 e 13 átomos de carbono.⁵³ Esta reação é desencadeada pela luz e ação das oxidases como, por exemplo, polifenol-oxidase e lipoxigenase. Os compostos com 13 átomos de carbono são chamados de C13-norisoprenóides e os que exercem maior contribuição para o aroma do vinho estão listados na **Tabela IV**.⁵⁴

Tabela IV. Principais C13-norisoprenóides no que diz respeito a sua contribuição para o aroma do vinho.

Composto	Aroma
β -Damascenona	Chá, floral, ^{41, 43} mel, doce ⁴⁰
α -Ionona	Violeta, floral, frutado ⁴⁷
β -Ionona	Violeta ⁵⁵
3-Oxo- α -ionol	Tabaco ³
3-Hidróxi- β -damascona	Chá e Tabaco ³
1,1,6-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN)	Querosene ⁴¹
Vitispirano	Cânfora ⁴¹
β -Damascona	Tabaco e frutas ³
β -Ionol	Frutas e flores ⁴⁷

2.2.2 Compostos voláteis responsáveis pelo aroma pré-fermentativo

Os aromas de origem pré-fermentativa formam-se desde a colheita das uvas até ao início da fermentação alcoólica, o que inclui as operações de transporte, desengace, prensagem e maceração. Os efeitos mecânicos destes tratamentos vão permitir, ao romper as uvas, que as enzimas entrem em contato com os substratos existentes no mosto que está sendo produzido. Além disso, estes tratamentos têm como consequência a incorporação de oxigênio no meio, implicando em reações de

oxidação enzimática. As enzimas envolvidas na formação dos álcoois C6 (que contém 6 carbonos em sua estrutura) e aldeídos C6 originados da fase pré-fermentativa são: acil-hidrolase, lipoxigenase, enzima de clivagem dos peróxidos e álcool-desidrogenase. Estes compostos apresentam um aroma herbáceo e têm um limiar de percepção relativamente baixo. A título de exemplo, os limiares de percepção do hexanol e do (*E*)-2-hexenal, são de cerca de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 17 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.³

2.2.3 Compostos voláteis originados na fermentação

A etapa fermentativa é o processo essencial da conversão do mosto de uva em vinho, englobando duas importantes transformações biológicas, a fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica. Na primeira, comum a todos os vinhos, há produção, pelas leveduras, de etanol e de numerosos produtos secundários a partir dos açúcares do mosto. A fermentação maloláctica consiste na transformação do ácido málico em ácido láctico, pela ação das bactérias lácticas. Este tipo de fermentação, pode ocorrer de forma espontânea ou através da inoculação de bactérias lácticas no vinho, e inicia no final da fermentação alcoólica, quando a autólise das leveduras se intensifica. De maneira geral, os vinhos tintos são beneficiados com a fermentação maloláctica ao adquirirem maior complexidade aromática e suavidade gustativa. Entretanto, é indesejável na maioria dos vinhos brancos, para os quais uma acidez mais pronunciada realça o aroma e equilibra o sabor.²⁴

Além do etanol, outros compostos que são produzidos em quantidades menores durante a fermentação alcóolica podem contribuir de forma significativa para o aroma global do vinho. Entre estes compostos estão os álcoois superiores, ácidos voláteis e ésteres e, em menor extensão, aldeídos e cetonas. No caso dos vinhos é habitual designar-se por álcoois superiores os compostos que apresentam apenas uma função álcool e mais de dois átomos de carbono.²⁸ Também são produzidos compostos indesejáveis como ácido sulfídrico, sulfuretos orgânicos e alguns tióis.^{40, 41, 43, 47, 48, 55}

2.2.3.1 Álcoois

O etanol, produzido pelas leveduras, durante a fermentação alcóolica, é o álcool presente em maior quantidade nos vinhos. O teor de etanol dos vinhos está diretamente relacionado à percepção sensorial de outros compostos voláteis relacionados ao aroma. Em concentrações de etanol 14-17%, o aroma de vinhos Malbec foi descrito como herbáceo ao invés de frutado, como é descrito quando a quantidade de etanol dos vinhos é de 10-12%.⁵⁶

Os álcoois superiores são produzidos a partir de açúcares e aminoácidos durante a fermentação alcóolica e incluem compostos alifáticos e aromáticos. Estes álcoois podem ter efeitos tanto positivos como negativos no aroma do vinho.⁵⁷ Os álcoois alifáticos mais encontrados em vinhos são o propanol (aroma de fruta madura), butanol (aroma de solvente),⁴⁶ hexanol (floral, grama),⁵⁸ isobutanol e álcool isoamílico.^{59, 60} Os álcoois alifáticos, por exemplo, são identificados por um odor forte e sabor pungente, o que pode ter um efeito significativo sobre a qualidade sensorial e caráter do vinho.⁶⁰⁻⁶² O 2-feniletanol, cujo aroma é descrito como floral, é considerado um dos álcoois aromáticos mais importantes para a qualidade sensorial do vinho.¹⁶ Os álcoois contendo enxofre também podem exercer uma influência no sabor e aroma de vinhos.⁵⁹ Em vinhos do Porto, o odor relacionado ao metionol, por exemplo, foi descrito como semelhante ao da couve-flor.⁶³

2.2.3.2 Ácidos

Os ácidos orgânicos mais abundantes no vinho, tais como ácido tartárico, ácido málico e ácido láctico, não são voláteis, mas podem exercer influência no *flavour* do vinho, especificamente no gosto (**Tabela V**). Uma grande variedade de ácidos voláteis e semi-voláteis estão presentes no vinho. A acidez volátil do vinho é originada durante a fermentação do mosto pelas leveduras e outros microrganismos, sendo que o teor de acidez volátil pode aumentar durante a elaboração e a conservação do vinho como consequência de uma possível contaminação microbiológica. O ácido acético é de primordial importância para a qualidade do vinho, uma vez que contribui para cerca de 90% da acidez volátil. Todos os vinhos contêm ácido acético, uma vez que pequenas quantidades deste composto, da ordem de 0,6 g L⁻¹, são produzidas pelas leveduras. Concentrações mais elevadas

de ácido acético, no entanto, são originárias da deterioração microbiana.⁶⁴ Outros ácidos que contribuem, em menor proporção, para a acidez volátil estão listados na **Tabela V**. Excluem-se da acidez volátil os ácidos láctico, tartárico, málico, succínico e carbônico e o anidrido sulfuroso livre.

Os ácidos propanóico, 2-metil-propanóico e 3-metil-butanóico são produzidos por leveduras durante o metabolismo de proteínas. Outros ácidos alifáticos importantes para o aroma do vinho, como os ácidos hexanóico, octanóico e decanóico também são metabólitos provenientes da atividade de leveduras, entretanto, são produzidos a partir de ácidos graxos saturados. Além de influenciar negativamente o aroma dos vinhos (**Tabela V**), os ácidos podem atuar como inibidores de fermentação se presentes em elevadas concentrações, em nível de mg L^{-1} .²⁸

Tabela V. Exemplos de ácidos produzidos durante a elaboração dos vinhos com seu respectivo limiar de percepção e contribuição para o aroma.

Composto	Aroma	LP ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ácido acético	Vinagre ⁶⁵	200000 ⁴⁸
Ácido butanóico	Queijo ⁶⁵	10000 ⁴⁸ , 173 ⁴²
Ácido 2-metil-propanóico	Queijo ⁶⁵	2300 ⁴²
Ácido 3-metil-butanóico	Queijo ⁶⁵	3000 ⁴⁸
Ácido hexanóico	Queijo ⁶⁵ ranço ¹⁷	420, ^{42, 65} 3000 ⁴⁸
Ácido octanóico	Queijo, ranço ¹⁷ , ácido graxo ⁶⁵	500 ^{42, 65}
Ácido decanóico	Gorduroso, desagradável ¹⁷	1000 ^{42, 48}
Ácido dodecanóico	Seco, metálico, oleoso ^{17, 65}	1000 ¹⁷

^a = Limiar de percepção

2.2.3.3 Ésteres

Os ésteres são formados durante a fermentação do mosto por leveduras, a partir da reação entre álcoois e ácidos. Dado o elevado número de diferentes ácidos e álcoois no vinho há considerável potencial para a formação de vários ésteres, os quais podem estar presentes na forma de acetatos e ésteres etílicos. Os compostos etílicos resultam da combinação do grupo ácido proveniente de um ácido graxo e do grupo funcional álcool do etanol.⁶⁶ Os ésteres etílicos mais importantes para o aroma

são os de cadeia curta, que contribuem para o aroma frutado dos vinhos (**Tabela VI**). Nos acetatos, o grupo funcional ácido é derivado do ácido acético e incluem compostos importantes para o aroma como o acetato de etila e acetato de isoamila.²⁸ O acetato de etila em baixas concentrações (< 100 µg L⁻¹) confere ao vinho características frutadas,⁴⁰ entretanto, em concentrações mais elevadas podem resultar em aroma pungente, de solvente.⁴⁶

Tabela VI. Principais ésteres que contribuem para o aroma do vinho e suas respectivas contribuições para o aroma e limiares de percepção.

Composto	Aroma	LP ^a (µg L ⁻¹)
Ésteres etílicos		
Propanoato de etila	Frutado ¹⁶	5500 ⁶⁷
2-Metilpropanoato de etila (isobutirato de etila)	Frutado, morango ^{16, 46} , limão ⁶⁸ , doce ⁴⁰	15 ⁴²
Butanoato de etila	Frutado, morango, ⁴⁶ doce, ⁶⁸	20 ⁴² , 125 ⁶⁷
2-Metilbutanoato de etila	Morango, cereja, cidra, ⁴⁶ frutado, aniz, ⁶⁸ maçã, doce ⁴⁰	18 ⁴²
3-Metilbutanoato de etila (isovalerato de etila)	Fruta doce, abacaxi, ⁴⁶ limão, aniz, ⁶⁸ frutado, floral ⁴⁰	3 ⁴²
2-Hidróxipropanoato de etila (lactato de etila)	Leite, sabão, ⁴⁶ framboesa ¹⁷	154636 ⁶⁹
3-Hidróxibutanoato de etila	Frutado, uva ⁷⁰	20000 ²⁷
Butanodiato de etila (succinato de dietila)	Fruta, vinho, ⁴⁶ fermentado, floral ⁴⁰	200000 ⁶⁹
Hexanoato de etila	Frutado, morango, ⁴⁶ maçã verde, aniz ⁶⁸	14 ⁴² , 62 ⁶⁷
Octanoato de etila	Doce, frutado, ⁴⁶ queimado, cerveja ⁶⁸	5 ⁴²
Decanoato de etila	Uva ⁴⁶	200 ⁴²
4-Hidróxi-3-metóxi-benzoato de etila (vanilato de etila)	Floral, frutado, doce, vanila ⁴⁶	990 ⁷¹
Acetatos		
Acetato de etila	Pungente, solvente, ⁴⁶ frutado-etéreo ⁴⁰ frutado, doce ¹⁷	12264 ⁴⁸
Acetato de 2-metilpropila (acetato de isobutila)	Frutado, maçã ⁴⁶	1600 ⁶⁹
Acetato de 3-metilbutila (acetato de isoamila)	Banana, ^{40, 68} frutado, ⁴⁶ verde ⁴⁰	30 ⁴⁸
Acetato de 2-feniletila	Rosa, floral ⁴⁶	250 ⁴⁸
Acetato de hexila	Herbáceo, verde ⁴⁶	

^a = Limiar de percepção

A fermentação malolática também pode ter impacto sobre o perfil de ésteres nos vinhos. O éster que é produzido em maior quantidade nesta etapa é o 2-

hidróxipropanoato de etila (lactato de etila). A formação deste éster está relacionada à formação do ácido láctico a partir do ácido málico, que ocorre durante a fermentação malolática.⁷²

2.2.3.4 Compostos sulfurados

Os compostos sulfurados podem ocorrer devido a processos de degradação enzimáticos ou não-enzimáticos. O processo enzimático envolve a degradação de aminoácidos das uvas (cistina, cisteína, metionina, glutatona), de outros produtos oriundos do processo fermentativo que contenham enxofre ou ainda da degradação de resíduos de pesticidas, que também contenham enxofre. A via não-enzimática inclui reações térmicas, fotoquímicas e outros tipos de reações de compostos sulfurados, como por exemplo a transformação de vitaminas, durante o processo de obtenção e de estocagem do vinho. O sulfeto de hidrogênio é reconhecido pelo seu odor de ovos em estado de degradação, o etanotiol produz odores de alho e borracha, o metionol é relacionado ao odor de couve-flor e o sulfeto de metila apresenta odor de camarão.⁷³

2.2.3.5 Compostos carbonilados – aldeídos e cetonas

Um grande número de compostos carbonilados pode ser formado pelas leveduras por descarboxilação dos ácidos α -cetônicos.²⁸ Dentre estes, os principais são os ácidos pirúvico, α -cetolático, α -cetobutírico, α -cetoisovalérico, α -cetoisocapróico, α -ceto- β -metil-valérico e cetohidróxibutírico. O acetaldeído, que é o aldeído formado em maior quantidade no vinho, é altamente volátil e possui odor descrito como pungente e que lembra o aroma de “tinta”.⁴⁰ Este aldeído atua no desenvolvimento da cor do vinho tinto, promovendo reações de condensação entre as antocianinas, as catequinas e os taninos, formando pigmentos poliméricos estáveis resistentes à descoloração que o dióxido de enxofre pode ocasionar.⁷⁴ O hexanal e o hexenal são considerados produtos da oxidação enzimática dos ácidos linoléico e linolênico, que ocorre durante a prensagem da uva e seu aroma é descrito como “verde”.²⁸ A 2,3-butanodiona, geralmente referida como “diacetila”, é a cetona mais importante para o aroma dos vinhos. Quando está presente em vinhos em uma

concentração superior a 5-7 mg L⁻¹, é considerada de aroma indesejável. Entretanto, quando presente em concentração de 1-4 mg L⁻¹, contribui de forma positiva, com aroma amanteigado ou de caramelo.⁷⁵

2.2.3.6 Lactonas

As lactonas são formadas por uma reação de esterificação, envolvendo grupos hidroxílicos e carboxílicos para formar um éster cíclico, que na maioria dos casos tem anéis de 4 átomos de carbono e são chamadas de γ -lactonas. As lactonas podem ser originárias das uvas, de processos de transformação que ocorrem durante a fermentação ou podem ser extraídas da madeira dos barris utilizados para o envelhecimento do vinho. As lactonas provenientes das uvas, geralmente não estão envolvidas com o desenvolvimento dos aromas das variedades, com exceção da 2-vinil-dihidrofuran-2-ona, que está associada com o aroma dos vinhos elaborados com uvas das cultivares Riesling e Muscat e da 2,5-dimetil-4-hidróxi-3(2H)-furanona (furaneol) que está relacionada com vinhos Merlot.²⁸

A sótolon (3-hidróxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona) contribui para o aroma de vinhos elaborados com uvas infectadas por fungos do gênero *Botrytis* e também está relacionada ao aroma típico de vinhos envelhecidos, pois sua concentração aumenta durante o armazenamento dos vinhos. Esta lactona pode ser formada pela condensação do ácido 2-cetobutírico e etanal e seu aroma é descrito como picante ou de nozes.⁷⁶

Outras lactonas importantes para o aroma dos vinhos são as formas isoméricas cis e trans a 3-metiloxalactona, também conhecida como lactona do carvalho ou lactona do uísque. Estes compostos contribuem para o aroma amadeirado dos vinhos.⁷⁷

2.2.3.7 Fenóis voláteis

Entre os principais fenóis voláteis formados durante a fermentação alcoólica estão o guaiacol, 4-etilguaiacol, 4-vinilfenol e o 4-vinilguaiacol (**Tabela VII**). Estes compostos são produzidos pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por descarboxilação enzimática de ácidos cinâmicos provenientes das uvas. A enzima

que atua nesta reação é a cinamato-descarboxilase e os precursores são os ácidos *p*-cumárico (4-hidroxicinâmico) e o ferúlico (3-metóxi-4-hidroxicinâmico).⁷⁸ A produção de 4-vinilfenol pela cinamato descarboxilase é inibida por polifenóis, como por exemplo as procianidinas, o que explica o fato dos vinhos tintos possuírem quantidade menor de 4-vinilfenol do que os vinhos brancos.⁷⁹

Tabela VII. Principais fenóis voláteis que contribuem para o aroma do vinho com sua respectiva contribuição para o aroma e limiar de percepção.

Composto	Aroma	Limiar de percepção ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Guaiacol	Pungente, fenólico ⁴³	9,5 ⁴²
4-Etilguaiacol	Fenólico, picante ⁴³	33 ⁴²
4-Vinilfenol	Caramelo ⁴³	
4-Vinilguaiacol	Farmacêutico, picante ⁸⁰	40 ⁴⁸

2.3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE VINHOS

Várias técnicas de extração são empregadas para determinação qualitativa e quantitativa de compostos voláteis em vinho e espumantes. Dentre elas, extração líquido-líquido (LLE, do inglês: *liquid-liquid extraction*), extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), extração sortiva em barras de agitação (SBSE, do inglês: *stir bar sorptive extraction*), microextração em fase sólida (SPME, do inglês: *solid phase microextraction* e técnicas genéricas de *headspace*.⁸¹⁻⁸⁴ Dois tipos diferentes de análise do *headspace* podem ser empregados: *headspace* estático e *headspace* dinâmico. No primeiro, a amostra é mantida em um recipiente fechado até que os compostos voláteis atinjam um equilíbrio termodinâmico entre a fase líquida e a fase gasosa, a uma determinada temperatura, geralmente a ambiente. Uma alíquota da fase gasosa é então recolhida e injetada no cromatógrafo gasoso. No *headspace* dinâmico há uma coleta contínua dos compostos voláteis, realizada em um sistema à vácuo ou pela passagem de um gás inerte. Um coletor, contendo materiais adsorventes, coleta e concentra os compostos voláteis. Posteriormente, os compostos voláteis são eluídos da armadilha, utilizando-se um solvente orgânico adequado, ou desorvidos termicamente.

Na LLE, a amostra aquosa é extraída com um solvente orgânico que não é solúvel, ou pelo menos é moderadamente solúvel, em água. A partição dos analitos ocorre de acordo com os seus coeficientes de distribuição entre as fases orgânica e aquosa. A LLE de compostos voláteis em vinhos é, geralmente realizada com diclorometano, que é um solvente orgânico tóxico. Além desta desvantagem, neste tipo de extração, comumente, ocorre a formação de emulsões. A LLE compreende várias fases, o que pode provocar a perda de analitos, como por exemplo, na etapa de evaporação do solvente, na qual, a degradação de alguns componentes e formação de outros podem ocorrer.⁸⁵

Mamede e Pastore⁸⁶ utilizaram LLE e *headspace* dinâmico para determinar a composição volátil do mosto de uvas. A técnica de *headspace* dinâmico mostrou-se adequada para a extração de compostos com baixo ponto de ebulição, como por exemplo, propanal, butanal, isobutiraldeído e 3-metil-butanal. A LLE possibilitou a extração de compostos com ponto de ebulição mais elevado, incluindo feniletanol, ácidos hexanóico e octanóico, hexanoato e octanoato de etila. Os autores concluíram que estas técnicas são complementares para a caracterização do perfil volátil das amostras.

Para minimizar a quantidade de solvente necessária na LLE para extrair os analitos da matriz, foi desenvolvida a SPE. Na SPE utiliza-se um polímero adsorvente para extrair compostos de amostras líquidas. Antes da introdução da amostra no cartucho que contém material sorvente, este é condicionado com um solvente orgânico. A amostra é introduzida no cartucho e os compostos são retidos no polímero. Os interferentes presentes na matriz podem ser retirados do cartucho através da lavagem com solventes orgânicos que tenham afinidade por estes compostos e os analitos permanecem na fase estacionária. Após o procedimento de limpeza, os analitos são eluídos da fase estacionária com um solvente.⁸⁷

Hernanz e colaboradores⁸⁴ compararam a eficiência da LLE assistida por ultrassom e da SPE na extração de 44 compostos voláteis representativos do aroma de vinhos produzidos no sudoeste da Espanha. Os autores observaram que com a utilização da LLE foi possível obter maiores porcentagens de recuperação para os voláteis avaliados. Entretanto, o método de SPE apresentou maior repetibilidade, menor tempo de extração e a possibilidade de utilização de menor quantidade de solvente orgânico para a extração dos voláteis dos vinhos.

A SPE, de forma semelhante à LLE, também requer uma etapa posterior de concentração para eliminar o excesso de solvente. Durante esta etapa, pode ocorrer perda de compostos voláteis e semi-voláteis com pontos de ebulição inferiores à temperatura utilizada para a evaporação do solvente. As limitações da SPE, que incluem a realização de várias etapas, perdas durante a evaporação e risco de contaminação, levaram ao desenvolvimento de técnicas miniaturizadas como a SBSE e a SPME.⁸⁸

A SBSE é feita através do uso de uma barra de agitação magnética recoberta por um polímero sorvente, que pode ser mergulhada na amostra líquida ou no caso da extração de compostos voláteis, esta pode ser mantida no *headspace* do frasco que contém a amostra. Os analitos podem ser desorvidos termicamente no injetor do cromatografo ou através do uso de uma pequena quantidade de solvente.⁸⁹ O polidimetilsiloxano (PDMS), em razão de suas propriedades de difusão e estabilidade térmica em ampla faixa de temperatura, tem sido utilizado como fase de extração sortiva para a extração de compostos voláteis de vinhos.⁹⁰⁻⁹³ Além disso, o PDMS é a única fase extratora disponível comercialmente.⁹⁴

Na SPME, uma pequena quantidade de fase sólida recobre uma fibra de sílica que está protegida no interior de uma agulha. Esta técnica se baseia na cinética de transferência de massa e nos princípios termodinâmicos que descrevem o equilíbrio de partição do analito entre as fases. A SPME, da mesma maneira que a SBSE, envolve dois processos: a sorção dos compostos voláteis da amostra no filme que recobre a fibra e a desorção térmica dos compostos no injetor do cromatógrafo. Para análise apenas dos compostos voláteis, a fibra é exposta ao *headspace* da amostra, a uma determinada temperatura (HS-SPME).⁴

A natureza química dos analitos determina o tipo de fase sorvente que deve ser utilizada na extração. Atualmente, vários tipos de fases estacionárias estão disponíveis comercialmente com diferentes espessuras e polaridades. A disponibilidade de fibras com diferentes polaridades oferece vantagens como seletividade, possibilidade de maior recuperação de analitos específicos e redução da extração de interferentes.⁹⁵

Desde a sua introdução, a SPME tem se mostrado promissora para a extração de voláteis de bebidas alcólicas, como vinhos^{34, 95}, lúpulo⁹⁶, malte⁹⁷, uísque³⁹, entre outras bebidas^{98, 99}. A SPME é uma técnica que não emprega solvente, é rápida, facilmente acoplada à cromatografia gasosa, apropriada para

análise direta de matrizes complexas e têm proporcionado limites de detecção mais baixos do que os de outras técnicas de extração, como por exemplo a LLE e SPE.^{82, 100} Bonino e colaboradores¹⁰¹ compararam as técnicas de LLE e SPME, na qual fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) foram utilizadas. A LLE permitiu a detecção de apenas 23 compostos de aroma de vinhos italianos analisados, enquanto, através da SPME foram extraídos 59 compostos, incluindo norisoprenóides, ácidos, álcoois, ésteres, fenóis e terpenos.

Perestelo e colaboradores⁹⁰ comparam as técnicas de SPME e SBSE em relação à extração de voláteis de vinhos de Portugal, elaborados com uvas *Vitis vinifera* L. das cultivares (i) Verdelho e Arnsburguer, (ii) Verdelho, Bual e Arnsburguer e (iii) Tinta Negra Mole. Os autores observaram que a SPME apresentou maior eficiência de extração e maior sensibilidade. Os limites de detecção e quantificação foram menores e as taxas de recuperação foram melhores, quando a SPME foi utilizada. O fato da SPME ter sido mais adequada para a extração dos voláteis pode ser explicado pela fase sorvente utilizada para a extração. Neste caso, foi empregada uma fase extratora tripla, constituída de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/carboxen (PDMS/DVB/CAR), em que a extração ocorre através de dois mecanismos diferentes (absorção e adsorção) e que apresenta afinidade para extração de compostos voláteis polares e apolares. Na SBSE a fase sorvente foi o PDMS, em que se tem apenas um mecanismo de extração (absorção).

Xi e colaboradores¹⁰² quantificaram 47 compostos responsáveis pelo aroma dos vinhos produzidos a partir de uvas *Vitis vinifera* da cultivar Cabernet Sauvignon, através da SPME-GC/qMS. Os voláteis foram extraídos empregando-se um filme de polidimetilsiloxano (PDMS) durante um período de extração de 30 min, a uma temperatura de 40°C por 30 min. Acetato de etila, acetato de isoamila, octanoato de etila, hexanoato de etila, acetato de feniletila, álcool isoamílico, linalol, citronelol, β -damascenona, α -ionona e 5-amil-dihidro-2(3H)-furanos foram os principais voláteis relacionados ao aroma deste vinhos. Voláteis de vinhos produzidos a partir de uvas da cultivar Pinotage foram extraídos por HS-SPME usando-se um filme de carboxen/polidimetilsiloxano (CAR-PDMS). Para a extração dos compostos voláteis foi adicionado NaCl no frasco que continha a amostra de vinho e este foi mantido mergulhado em água a 23°C por 10 min. Foram identificados 206 compostos que pertencem à classe dos ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, acetais, furanos

e lactonas, compostos sulfurados, compostos nitrogenados, terpenos, fenóis e piranos.¹⁰³

2.4 TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM VINHOS

2.4.1 Cromatografia Gasosa monodimensional

A cromatografia é uma técnica em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária e a outra é móvel. Na cromatografia gasosa (GC), a separação dos componentes é resultado de processos repetidos de sorção e dessorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária. Nesta técnica, fase móvel é um gás inerte, cujo papel é transportar a amostra ao longo do processo, sendo empregados comumente nitrogênio, hélio ou hidrogênio.^{104, 105}

A cromatografia gasosa-olfatometria (GC-O), também conhecida como *sniffing*, é utilizada para identificar os compostos voláteis que contribuem significativamente para o aroma dos vinhos, empregando o nariz humano como detector. A avaliação olfativa dos compostos eluídos da coluna é feita por um julgador, que, ao detectar um aroma, assinala o início e fim do mesmo, assim como sua intensidade, através de um sistema de registro.¹⁰⁶ Gurbuz e colaboradores⁴⁰ identificaram os compostos voláteis que mais contribuíram para o aroma de vinhos Merlot e Cabernet Sauvignon através da GC-O e GC/qMS. O aroma global destes vinhos foi caracterizado por notas relacionadas à frutas, caramelo e terra e os compostos mais importantes para o aroma foram 3-metil-1-butanol, 3-hidróxi-2-butanona, octanal, hexanoato de etila, 2-metilbutanoato de etila, β -damascenona, 2-metoxifenol, 4-etenil-2-metóxi-fenol, 3-metilbutanoato de etila, ácido acético e 2-feniletanol.

Na GC busca-se viabilizar a separação, identificação e quantificação, de maneira rápida, de constituintes de misturas que, muitas vezes, são de elevada complexidade. Neste cenário, existem possibilidades de aprimoramento da técnica, como a cromatografia gasosa rápida (do inglês, *fast-GC*) e o emprego de detector espectrométrico de massas. A cromatografia gasosa rápida é uma alternativa que

proporciona análises expeditas, combinando elevadas vazões do gás de arraste, rampas de aquecimento de até centenas de graus por segundo e sistemas digitais de controle e aquisição de dados, entretanto, há poucos registros de sua aplicação na análise de voláteis de vinhos.²⁸

O emprego de detectores espectrométricos de massas acoplados à GC pode proporcionar maior seletividade e detectabilidade. A cromatografia gasosa associada a detector quadrupolar de espectrometria de massas (GC/qMS) tem sido a técnica de referência para análise de compostos voláteis em vinhos e espumantes (**Tabela VIII**). Esta técnica apresenta bons resultados no campo dos vinhos e espumantes,^{26, 81, 107} entretanto, devido à complexidade da matriz, que envolve compostos de diferentes classes químicas e presentes em concentrações variadas (de ng L^{-1} até mg L^{-1}), nem sempre fornece suficiente resolução e sensibilidade para a caracterização de aromas. Frequentemente, a análise dos cromatogramas obtidos pela GC monodimensional (1D-GC) indica que alguns picos são resultado de dois ou mais compostos coeluídos, o que dificulta a sua identificação.⁸

A utilização de recursos para melhorar a resolução da GC já atingiu, em alguns casos, o limite máximo de aperfeiçoamento. A cromatografia multidimensional surgiu como uma nova alternativa para a análise de amostras complexas. Na cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (GC-GC, do inglês: *Heart cut two-dimensional gas chromatography*), pequenas frações do efluente da primeira coluna são transferidas para uma segunda coluna, onde a seletividade diferenciada desta segunda coluna fornece um aumento da resolução dos picos cromatográficos da zona que foi fracionada.¹⁰⁸ A literatura científica mostra que esta técnica é aplicada na análise de vinhos quando o objetivo é determinar alguns compostos voláteis específicos, que apresentam contribuição significativa para o aroma da bebida.^{109, 110} Falcão e colaboradores¹¹⁰ utilizaram a GC-GC/MS na análise de vinhos Bordeaux para a identificação de 2-hidróxi-4-metilpentanoato de etila que é o composto responsável pelas notas de aroma de amora destes vinhos.

Tabela VIII. Número de compostos extraídos através de diversas técnicas de extração de voláteis e análise de vinhos elaborados a partir de uvas das mesmas cultivares analisadas no presente trabalho.

Cultivar de uva	Local	Extração	Análise	Número compostos
Chardonnay	Itália	SPE	GC/MS	74 ¹¹¹
	China	SPME		41 ¹⁷
	EUA	LLE		60 ¹¹²
	China	HS-SPME		45 ¹¹³
	Macedônia e Hungria	LLE		34 ¹¹⁴
Merlot	Macedônia e Hungria	LLE	GC/MS	33 ¹¹⁴
	EUA	HS-SPME	GC/MS	58 ⁴⁰
Cabernet Sauvignon	Macedônia e Hungria	LLE	GC/MS	30 ¹¹⁴
	China	HS-SPME	GC/MS	42 ¹¹³
	EUA	HS-SPME	GC/MS	60 ⁴⁰
	Chile	HS-SPME	GC/MS	72 ¹¹⁵
	China	SPME	GC/MS	47 ¹⁰²
	Austrália	HS-SPME	GCxGC/TOFMS	303 ¹¹⁶
				361 ¹¹⁷
Pinot Noir	Canadá	<i>Headspace</i> dinâmico	GC/MS	70 ¹¹⁸
	Alemanha	HS-SPME	GCxGC/qMS	76 ¹¹⁹
	EUA	SBSE	GC/MS	25 ¹²⁰
Sauvignon Blanc	Nova Zelândia	LLE	GC/MS	29 ¹²¹
	Espanha	LLE	GC/MS	35 ¹²²
	Itália	LLE	GC/MS	67 ¹²³

SPE: extração em fase sólida, SPME: microextração em fase sólida, LLE: extração líquido-líquido, HS-SPME: microextração em fase sólida no modo *headspace*, SBSE: extração sortiva em barras de agitação, GC/MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, GCxGC/TOFMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo, GCxGC/qMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas quadrupolar.

Este procedimento aumenta em algumas horas o tempo de análise, uma vez que cada fração separada, que eluiu da primeira da primeira dimensão, é separada na segunda coluna durante o mesmo tempo de uma corrida cromatográfica convencional. A realização de análises cromatográficas mais rápidas em sistema bidimensional foi possível com a introdução da cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC).¹²⁴ A utilização da GCxGC na análise vinhos permite a identificação de um número consideravelmente maior de compostos do que quando a 1D-GC é utilizada (**Tabela VIII**). Em vinhos Cabernet Sauvignon da Austrália foram identificados 303 compostos voláteis com o uso da HS-SPME-GCxGC/TOFMS.¹¹⁶

Em vinhos da mesma variedade de uva, produzidos no Chile e analisados através de GC/MS, foram identificados 72 compostos voláteis extraídos através de HS-SPME.¹¹⁵

2.4.2 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GCxGC)

A GCxGC é uma técnica caracterizada pela combinação sequencial de duas colunas, uma de dimensões convencionais e outra mais curta (do tipo empregado para cromatografia rápida, *fast-GC*). O termo “abrangente” é utilizado para designar que todo o efluente da primeira dimensão, ou uma parte representativa do mesmo seja introduzido na segunda dimensão através de um modulador, sem perda das características da separação na 1^aD. Um dos moduladores mais empregados em equipamentos comerciais é o criogênico, onde a modulação entre as duas colunas fornece a compressão da banda cromatográfica que elui da primeira coluna e a rápida introdução da banda comprimida por criogenia na segunda coluna.¹²⁵

A ortogonalidade de um sistema multidimensional é verificada quando os mecanismos de separação das duas colunas são independentes. As colunas devem ter fases estacionárias diferentes, permitindo que a separação pouco eficiente, obtida na primeira coluna, seja melhorada na segunda. A forma mais tradicional em GCxGC de separação ortogonal é a utilização de uma coluna apolar, ou de baixa polaridade na primeira dimensão, o que caracteriza uma separação por ponto de ebulição e uma coluna polar na segunda dimensão, onde a separação ocorre por polaridade.¹²⁶ Entretanto, a eficiência da separação depende da adequação entre a natureza dos analitos e amostra e do conjunto de colunas empregado na primeira e segunda dimensão e não, necessariamente, da ortogonalidade do sistema.¹²⁷

A combinação de duas colunas cromatográficas com mecanismos de separação independentes confere aumento de seletividade, e, dessa forma, proporciona a separação de compostos muito semelhantes, minimizando os frequentes problemas de sobreposição de compostos, onde, muitas vezes, são observados sinais menos intensos para compostos de interesse superpostos a componentes majoritários da mistura.¹²⁸

A escolha de um conjunto de colunas mais adequado dentre vários diferentes conjuntos de colunas para a análise bidimensional abrangente é um dos parâmetros

avaliados durante a otimização do método analítico, juntamente com a escolha das condições de aquecimento do(s) forno(s), período de modulação, duração de jato quente, entre outras variáveis. Esta otimização visa alcançar maior capacidade de pico, seletividade, sensibilidade e minimização da ocorrência de picos fora de ciclo, juntamente com a obtenção de um cromatograma que apresente informações provenientes de efeitos de estruturação dos compostos eluídos no espaço de separação.¹²⁹

O fator de assimetria (2A_s) de um pico cromatográfico está diretamente relacionado à eficiência cromatográfica. Na GCxGC a assimetria de pico é avaliada levando-se em consideração o pico modulado mais intenso. Fatores de assimetria entre 0,8 e 1,2 são considerados satisfatórios, com pouca ou nenhuma influência de cauda nos picos cromatográficos. Esse fator é calculado utilizando-se a razão entre as larguras B e A à 10% da altura do pico, conforme **Figura 1** e pode ser empregado para verificar a eficiência dos diferentes tempos de duração dos jatos quentes.¹³⁰

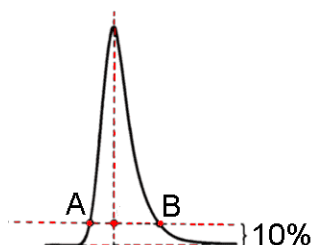


Figura 1. Desenho ilustrativo das partes de um pico cromatográfico que são levadas em consideração para o cálculo do fator de assimetria de pico (2A_s), que corresponde à razão entre as distâncias A e B a 10% da altura do pico.

Quando um composto apresenta tempo de retenção na segunda dimensão (2t_R) maior do que o período de modulação usado na análise cromatográfica, ocorre o fenômeno chamado *wraparound* ou pico fora de ciclo. Um pico fora de ciclo poderá representar um problema na interpretação dos dados, devido a sua eluição tardia, no próximo ciclo de modulação, juntamente com outros compostos que são introduzidos na 2D . Esse fenômeno pode ocasionar a coeluição do pico fora de ciclo com compostos de interesse, prejudicando o processo de separação e quantificação. Por outro lado, picos fora de ciclo podem ser convenientes quando existem regiões do espaço de separação que não se encontram ocupadas por outros componentes,

proporcionando um melhor uso do espaço 2D.¹³¹ Para verificar se um pico está fora de ciclo deve-se analisar a mesma amostra ou solução de padrões em dois diferentes períodos de modulação. Ao comparar os diagramas, picos que tiveram o 2t_R alterado são considerados fora de ciclo.^{132, 133}

A maior sensibilidade da GCxGC em relação à 1D-GC está relacionada com o aumento da resolução e é consequência do processo de modulação da banda cromatográfica, que resulta em picos mais estreitos e de maior intensidade. A vantagem desse processo é tornar visíveis picos que estão em baixa concentração e não seriam detectados em sistemas monodimensionais.^{134, 135} O ganho de sensibilidade pode chegar à ordem de 20 e este fator ganha importância na análise de compostos voláteis, uma vez que os componentes relacionados ao aroma podem ser encontrados em nível de traços em vinhos e espumantes.⁸

Em relação à estrutura cromatográfica, os compostos quimicamente relacionados se encontram dispostos ordenadamente nos cromatogramas, à medida em que existe uma relação adequada entre a dimensionalidade da amostra e do sistema. Esta característica é chamada de estruturação cromatográfica e pode ser observada nos diagramas GCxGC na forma de grupos de picos alinhados em determinadas regiões do cromatograma, sendo que os picos dispostos em uma dada região representam compostos quimicamente assemelhados. Esta disposição permite identificar a classe química de um composto, se informações estruturais sobre o mesmo, como por exemplo, seu espectro de massas, não estiverem disponíveis.¹³⁶

Estas e outras características fazem da GCxGC uma técnica muito apropriada para análise de matrizes complexas ou de outras amostras, onde a cromatografia monodimensional é incapaz de fornecer uma separação razoável. Por consequência, a GCxGC é uma técnica analítica adequada para análise de compostos responsáveis pelo *flavour* de alimentos e bebidas, como por exemplo, leite¹³⁷, café¹³⁸, cachaça¹³⁹ e frutas^{140, 141}.

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). A técnica de GCxGC-FID foi utilizada para a análise de voláteis em morangos e *trans*-resveratrol em vinho após a derivatização com bis-trimetilsilil trifluoroacetamida e anidrido acético¹⁴². A GCxGC/TOFMS foi empregada para identificação de

monoterpenos em uva⁸, metoxipirazinas em vinho¹⁴³, pesticidas em uvas¹⁴⁴, carbamato de etila em vinhos¹⁴⁵ e aminoácidos em vinho e cerveja¹⁴⁶.

Rocha e colaboradores⁸ mostraram de forma clara o potencial da técnica de GCxGC aplicado à análise de aromas de uvas, ao identificarem 56 monoterpenos em uvas *Vitis vinifera* L. através de GCxGC/TOFMS. Neste trabalho, foram encontrados centenas de compostos no aroma desta fruta, empregando-se HS-SPME, entretanto, apenas os monoterpenos foram investigados pormenorizadamente. A utilização de uma coluna apolar na primeira dimensão (¹D) e uma coluna polar na segunda dimensão (²D) permitiu que compostos com pressões de vapor similares tivessem tempos de retenção semelhantes na primeira dimensão e compostos com polaridades similares tivessem tempos de retenção semelhantes na segunda dimensão. Desta maneira, o potencial de separação dos analitos é aumentado, visto que quando as mesmas amostras foram analisadas por GC/MS, apenas 26 monoterpenos foram identificados.

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

A identificação de compostos deve ser feita comparando-se os tempos de retenção e espectros de massas dos compostos voláteis desconhecidos com aqueles de compostos padrão. Esta comparação é feita realizando-se a análise da amostra e dos padrões no GC em coluna polar e apolar. Entretanto, o número de compostos voláteis de uma análise pode ser muito grande, o que em muitos casos torna economicamente limitante o uso de compostos padrão para a identificação.¹⁴⁷

Através da análise por GC/MS é possível comparar os espectros de massas obtidos experimentalmente com aqueles reportados em biblioteca comercial de espectros de massas. Entretanto, este processo de identificação pode gerar incerteza na identificação dos compostos quando os espectros obtidos são semelhantes para diferentes compostos e, especialmente, quando se trata de isômeros presentes na amostra. A determinação dos índices de retenção, feita através da injeção de séries homólogas de compostos, é uma ferramenta auxiliar útil na identificação de compostos desconhecidos. A série de padrões de referência pode ser de alcanos, ésteres metílicos de ácidos graxos, álcoois ou outra série

homóloga. Os índices de retenção mais estudados e aceitos são os índices de Kovats (KI) índice de retenção com programação linear de temperatura, também chamado de índice de Van den Dool e Kratz (LTPRI, do inglês: *linear temperature programmed retention indexes*).¹⁴⁸

O KI é utilizado quando condições isotérmicas são empregadas na análise cromatográfica e o cálculo é feito segundo a equação:¹⁴⁹

$$KI = 100n + \left(\frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right) \quad (1)$$

Onde: $t'_{R(x)}$ é o tempo de retenção ajustado do composto desconhecido (x); $t'_{R(n)}$ é o tempo de retenção ajustado do alcano linear menos retido pela fase estacionária do que o composto x; $t'_{R(n+1)}$ é o tempo de retenção ajustado do alcano linear mais retido que o composto x.

O LTPRI é utilizado quando a corrida cromatográfica é realizada com programação linear de temperatura. O cálculo do LTPRI é feito de acordo com a equação de van den Dool e Kratz:¹⁵⁰

$$LTPRI = 100n + 100 \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{R(n+1)} - t_{Rn}} \right) \quad (2)$$

Onde: $t_{R(x)}$ é o tempo de retenção do composto desconhecido (x); $t_{R(n)}$ é o tempo de retenção do alcano linear menos retido pela fase estacionária do que o composto x; $t_{R(n+1)}$ é o tempo de retenção do alcano linear mais retido que o composto x.

As diferenças entre as equações empregadas para o cálculo do KI e LTPRI estão na presença da escala logarítmica e dos tempos de retenção ajustado na equação de Kovats.

Na 1D-GC, os índices de retenção estão bem estabelecidos, porém em GCxGC, a retenção é caracterizada por dois valores independentes, os tempos de retenção na primeira e segunda dimensão (1t_R e 2t_R , respectivamente), os quais

fornecem informações específicas sobre a interação dos analitos com as fases estacionárias da ^1D e ^2D , respectivamente.¹⁵¹

Esforços na pesquisa científica têm sido feitos para que as informações já existentes sobre índices de retenção obtidos na 1D-GC, durante décadas, possam ser utilizadas como referência também para dados de retenção obtidos na ^1D e ^2D em análises por GCxGC através de cálculos dos índices de retenção.^{131, 151, 152}

A comparação direta do LTPRI obtido na ^1D na análise através GCxGC com os valores de referência existentes na literatura para 1D-GC tem sido uma das alternativas usadas para a identificação de compostos voláteis.^{151, 152} Este procedimento foi adotado na análise de extratos de ginseng¹⁵¹ e óleo essencial de gerânio¹⁵². Para o ginseng, os autores observaram que 13 compostos apresentaram LTPRI com variação de até sete (7) unidades em relação aos dados da base de dados de índices de retenção da ^1D obtidos em coluna polar¹⁵³. No óleo essencial de gerânio, a variação observada foi de até nove (9) unidades quando os LTPRI obtidos experimentalmente foram comparados aos da literatura. Entretanto, em ambos os trabalhos a coinjeção de padrões para confirmar a identidade destes compostos não foi realizada.^{151, 152}

A validação do uso do tempo de retenção total ($^1t_R + ^2t_R$) ou do tempo de retenção equivalente (1t_R), para o cálculo do LTPRI foi proposto por Von Muhlen e colaboradores.¹³¹ Uma relação linear foi obtida a partir dos índices calculados através da GCxGC/TOFMS para 30 padrões de compostos voláteis e os índices apresentados na literatura para 1D-GC. Este procedimento foi adotado para a identificação de compostos voláteis de óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus dunnii*).¹³¹

A literatura mostra outras formas de abordar o cálculo de índices de retenção na GCxGC.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Na proposta de Beens e colaboradores¹⁵⁷ uma solução de *n*-alcanos foi injetada continuamente no sistema para a construção de curvas de isovolatilidade. Um injetor com programação de temperatura foi utilizado para que a liberação dos compostos para a coluna fosse lenta e contínua. Os dados obtidos na ^1D foram utilizados para o cálculo do LTPRI e os dados obtidos na ^2D foram empregados para a determinação do índice de Kovats, pois as separações dos compostos nesta dimensão podem ser consideradas isotérmicas. A dificuldade deste procedimento está na obtenção de índices de referência isotérmicos para diferentes temperaturas, o que dificulta a comparação dos dados experimentais obtidos com os

dados de literatura, já que a literatura científica apresenta um número limitado de índices de retenção para análises istoérmicas. Além disso, foi possível calcular o índice de retenção apenas para um número restrito de compostos, pois as curvas de isovolatilidade foram obtidas para os alcanos C9-C13.¹⁵⁷

Para identificar um maior número de compostos foram feitas injeções da mistura de padrões de referência em intervalos de tempo constantes para a obtenção de curvas de isovolatilidade. Esta estratégia permitiu englobar um maior número de compostos no espaço de separação, onde eluíram os alcanos. Entretanto, a limitação apresentada pelos autores para as injeções sequenciais foi a presença de picos do solvente ao longo de todo o cromatograma, que coeluíram com outros picos, impossibilitando a identificação de alguns compostos.¹⁵⁸

Na busca de superar o problema relacionado à presença de picos de solvente no cromatograma, a SPME foi empregada para a introdução sequencial dos padrões no sistema cromatográfico. No entanto, alguns compostos eluíram fora da região das curvas isovoláteis e os picos fora de ciclo não puderam ser determinados.¹⁵⁶

Vários estudos têm apresentado opções para o cálculo dos índices de retenção através do uso das curvas de isovolatilidade.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ Entretanto, os procedimentos para aquisição das informações necessárias para o cálculo dos índices de retenção é, invariavelmente complexo e demorado. O desenvolvimento de novas abordagens mais práticas é necessário para que os conhecimentos adquiridos ao longo das décadas de uso de índices de retenção da 1D-GC possam ser também empregados na GCxGC, desempenhando papel tão ou mais importante do que aquele já evidenciado nas aplicações destes índices em 1D-GC.

2.6 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE E PARA A DIFERENCIAÇÃO DE VINHOS DE ACORDO COM AS CULTIVARES DE UVA

A caracterização de alimentos e bebidas com base na composição volátil pode ser usada como uma ferramenta para proteger consumidores e/ou indústrias de fraudes.¹⁶⁰⁻¹⁶² No caso dos vinhos, a identificação dos compostos voláteis pode também ser útil para a diferenciação desta bebida com base nas diferentes

cultivares de uvas utilizadas para sua elaboração,^{29, 42, 48, 113, 163-165} local em que as uvas foram cultivadas^{8, 31, 166, 167} e também com base nas variantes utilizadas na produção do vinho produzido^{14, 30, 107, 163}. Na literatura científica existem alguns exemplos de diferenciação de vinhos com base na composição volátil dos mesmos, através da 1D-GC,^{29-31, 164, 168} mas nenhum trabalho que utilize dados de análise de voláteis de vinhos por GCxGC associados a métodos quimiométricos para diferenciação de vinhos de acordo com a cultivar de uva utilizada para sua elaboração.

Robinson e colaboradores¹⁶⁹ utilizaram ferramentas quimiométricas, incluindo análise de variância (ANOVA), análise dos componentes principais (PCA, do inglês: *Principal Component Analysis*) e método dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês: *Partial Least Squares*) para verificar a influência da cepa de levedura utilizada para a fermentação do mosto e do local de cultivo das uvas Cabernet Sauvignon na composição volátil dos vinhos analisados por GCxGC/TOFMS. Vestner e colaboradores¹⁷⁰ avaliaram o impacto da fermentação malolática, realizada por três diferentes cepas de *Oenococcus oeni*, na composição volátil de vinhos Pinotage analisados por GCxGC/TOFMS. Através da PCA foi possível verificar a diferenciação dos vinhos fermentados com diferentes culturas de bactérias e também os compostos voláteis originários da fermentação malolática e que são característicos de cada cepa de bactéria empregada.

A representação gráfica dos dados gerados através da GCxGC é diferente daquela feita para os dados gerados na 1D-GC e a quantidade de dados gerada pela GCxGC é muito maior do que a que se obtém com a técnica monodimensional, o que torna a interpretação destes diagramas e dados mais difícil. Por outro lado, o aumento de informação obtido na GCxGC pode ser vantajoso, quando se objetiva conhecer em maior detalhe a composição da amostra e/ou buscar diferenças e semelhanças entre amostras de distintas procedências ou processos de produção, entre outros aspectos, tendo em vista que a técnica bidimensional proporciona a separação e identificação/quantificação de um número maior de componentes. Nestes casos, o uso de ferramentas quimiométricas pode ser conveniente, dada a complexidade dos resultados obtidos, de forma a tornar o tratamento destes dados mais rápido e objetivo comparativamente ao tratamento manual.^{140, 171, 172}

A dificuldade de se extrair o máximo de informação a partir dos resultados disponíveis nas análises e de se chegar a conclusões a partir de dados complexos

motivou o desenvolvimento da quimiometria. Em termos de química analítica, os métodos de preparo, extração e análise de amostras complexas alcançaram um nível bastante sofisticado, havendo um esforço contínuo para a efetivação do acoplamento de diferentes técnicas de análise e um crescente desenvolvimento computacional. Assim, tem sido possível obter uma quantidade cada vez maior de informação a partir de uma análise.¹⁷³

A quimiometria se refere à aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas para o planejamento e otimização das condições experimentais e para a extração de informação de um conjunto de dados químicos multivariados. Os métodos estatísticos multivariados consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitindo extrair informações complementares que a análise univariada não consegue evidenciar. Assim, a análise quimiométrica contempla experimentos de reconhecimento de padrões, calibração multivariada e planejamento e otimização de experimentos. Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas, para determinar as condições ótimas de uma análise. No reconhecimento de padrões, a partir de uma vasta gama de informações (medidas químicas ou espectrais, por exemplo) sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras que são similares entre si e, assim, detectar tendências nos dados. Na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade.¹⁷⁴

Os métodos de análise exploratória são utilizados para extrair informação e detectar tendências nos dados, baseados nas medidas multivariadas das amostras. De maneira geral, eles podem ser classificados como métodos supervisionados como, por exemplo, Análise Discriminante Linear (LDA, do inglês: *Linear Discriminant Analysis*), Método dos K-vizinhos mais próximos (KNN, do inglês: *K-Nearest Neighbor*), Análise Discriminante com Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês: *Partial Least Square Discriminant Analysis*), ou não supervisionados como, por exemplo, Análise dos Componentes Principais (PCA, do inglês: *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA, do inglês: *Hierarchical Cluster Analysis*) e permitem a interpretação multivariada de conjuntos de dados complexos por meio de gráficos bi- ou tridimensionais. Nos métodos supervisionados é necessário que exista alguma

informação inicial sobre a identidade das amostras para a formação das classes e o objetivo é desenvolver um modelo baseado nas informações contidas nas amostras. Por outro lado, nos métodos não supervisionados, a separação de classes acontece sem a necessidade de informações iniciais sobre a natureza das amostras e o objetivo é identificar agrupamentos naturais entre as amostras.¹⁷⁵

2.6.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta quimiométrica que permite extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número reduzido de experimentos. O planejamento fatorial é usado para descobrir e interpretar as influências das variáveis sobre uma resposta analítica. Para realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas (fatores) e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores, os níveis. A seguir, são realizados experimentos com combinações dos níveis selecionados. Um planejamento fatorial completo com 2 níveis, necessita de 2^k ensaios para sua execução, onde k é o número de variáveis. Para planejamentos com $k > 4$, utiliza-se o planejamento fatorial fracionado (2^{k-1}), o que reduz o número de experimentos. Através do planejamento fatorial é possível avaliar a influência dos fatores sobre a resposta de interesse, assim como as possíveis interações entre os fatores, e então selecionar as variáveis que exercem influência significativa na análise.¹⁷⁶ Nos planejamentos fatoriais, os fatores, como por exemplo volume de amostra, tempo e temperatura de extração, são explorados em dois níveis que são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto. Os valores correspondentes a estes níveis são estabelecidos a partir de dados da literatura ou através de experimentos univariados realizados preliminarmente. Nos planejamentos experimentais, a estimativa do erro pode ser feita através da realização de experimentos no ponto central, que corresponde ao valor médio obtido a partir do nível mais baixo e mais alto para cada uma das variáveis. As respostas obtidas após a realização dos experimentos estabelecidos pelo planejamento fatorial são avaliadas através da ANOVA (**Tabela XIX**), que é utilizada para aceitar ou rejeitar, estatisticamente, as hipóteses investigadas, por meio da análise da variação média dos resultados dos ensaios experimentais.¹⁷⁷

Tabela IX. Parâmetros gerados na ANOVA para avaliação do planejamento fatorial.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Número de graus de liberdade	Média quadrática (MQ)	F
Regressão (regr)	SQ_{regr}	$p-1$	MQ_{regr}	MQ_{regr}/MQ_{res}
Resíduos	SQ_{res}	$n-p$	MQ_{res}	
Falta de ajuste	SQ_{faj}	$m-p$	MQ_{faj}	MQ_{faj}/MQ_{ep}
Erro puro	SQ_{ep}	$n-m$	MQ_{ep}	
Total	SQ_{total}	$n-1$		

Regressão: quantidade de variação explicada pelo modelo; Resíduo: estimativa do erro experimental; Falta de ajuste: medida da discrepância entre a resposta prevista pelo modelo estatístico e a média obtida das replicatas realizadas no conjunto de condições experimentais; Erro puro: erros aleatórios das replicatas; SQ_{regr} : soma quadrática da regressão; SQ_{res} : soma quadrática do resíduo; SQ_{faj} : soma quadrática da falta de ajuste; SQ_{ep} : soma quadrática do erro puro; p é o número de parâmetros do modelo; n é o número total de experimentos; m é o número de níveis do planejamento; MQ_{regr} : média quadrática da regressão; MQ_{res} : média quadrática do resíduo; MQ_{faj} : média quadrática da falta de ajuste; MQ_{ep} : média quadrática do erro puro.

Na ANOVA a variação total da resposta é definida pela soma quadrática (SQ) de dois componentes: SQ da regressão e SQ dos resíduos. O resíduo corresponde a uma estimativa do erro experimental. A SQ do resíduo corresponde à variabilidade que o modelo estatístico não consegue explicar. A SQ do erro puro está relacionada aos erros aleatórios das replicatas e a SQ da falta de ajuste diz respeito à medida da discrepância entre a resposta prevista pelo modelo estatístico e a média obtida das replicatas realizadas no conjunto de condições experimentais. A divisão da soma quadrática de cada fonte de variação pelo seu respectivo número de grau de liberdade fornece a média quadrática (MQ). Os graus de liberdade referem-se à medida da possibilidade de combinações ao acaso. Para cada fonte de variação (regressão, resíduos, falta de ajuste, erro puro e total) é necessário obter o número de graus de liberdade, em que p é o número de parâmetros (coeficientes) do modelo, n é o número total de observações (ensaios) e m é o número de níveis do planejamento. A razão entre a MQ da regressão e a MQ do resíduo, que corresponde a razão entre duas variâncias, pode ser usada para comparar tais fontes de variação através do teste F , levando em consideração seus respectivos números de graus de liberdade. O mesmo pode ser feito para a razão entre a MQ da falta de ajuste e a MQ do erro puro. Um bom modelo necessita ter uma regressão significativa ($F_{calculado} > F_{tabelado}$) e uma falta de ajuste não significativa ($F_{calculado} < F_{tabelado}$). Além disso, quando os dados estão bem ajustados a um modelo estatístico, o erro puro é uma parte da soma quadrática dos resíduos.¹⁷⁷

Para a otimização das condições a serem utilizadas na análise das amostras, os fatores significativos obtidos após os experimentos de triagem feitos através do planejamento experimental, são utilizados no delineamento composto central (CCD, do inglês: *Central Composite Design*) para a obtenção da superfície de resposta. Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores.¹⁷⁷ A metodologia de superfície de resposta se baseia na construção de modelos matemáticos que geralmente empregam funções polinomiais quadráticas para descrever o sistema estudado. O CCD é utilizado para ajustar modelos quadráticos em que as variáveis são estudadas em dois níveis (2^k). Para a construção do CCD, define-se o número de variáveis a serem estudadas (k), obtido através do planejamento fatorial fracionado realizado em uma etapa anterior. Além disso, define-se quantos experimentos são realizados no ponto central (0). O número de experimentos a ser realizado é dado por 2^k+2k+1 . No CCD, também são realizados experimentos nos pontos axiais (α), onde $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Por exemplo, se três variáveis forem estudadas, o valor de α é 1,68. Os níveis (+), (-), (0) e α utilizados na construção da matriz que estabelece a combinação de experimentos que devem ser realizados no CCD são decodificados para os valores que serão utilizados nos experimentos. Primeiramente, os valores correspondentes ao nível mais alto (+) e mais baixo (-) são estabelecidos de acordo com o que foi observado no planejamento factorial fracionado. O ponto central (0) corresponde ao valor médio e o nível α é calculado através da equação:¹⁷⁸

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}} \quad (3)$$

onde: x_i = valor codificado (se 3 variáveis forem estudadas $x_i=1,68$), z_i = valor experimental decodificado, \bar{z} = valor médio entre os níveis (+) e (-), corresponde ao valor do nível (0) e Δz = diferença entre os níveis (+) e (-).¹⁷⁸

Depois de realizados os experimentos conforme planejado no CCD, as respostas analíticas são avaliadas através da ANOVA. Se o modelo obtido for considerado significativo, a variável resposta (dependente) e as variáveis independentes (por exemplo: tempo e temperatura de extração) são relacionadas em um gráfico bidimensional. Através deste gráfico, é possível visualizar o

comportamento da resposta em função das variáveis tomadas duas a duas, permitindo analisar os fatores que afetam o resultado de um determinado procedimento analítico.^{176, 179}

2.6.2 Pré-processamento dos dados

Para a aplicação de métodos quimiométricos, os dados devem ser organizados na forma de uma matriz, onde as linhas representam as amostras e as colunas as variáveis, por exemplo. No caso de uma análise cromatográfica, os dados brutos obtidos podem apresentar variabilidade proveniente de várias fontes, havendo a necessidade de remoção destas variações.¹⁷³ Então, antes da aplicação da análise multivariada, propriamente dita, é necessário um pré-processamento dos dados. Este tratamento prévio dos dados é utilizado para ajustar as grandezas em valores equivalentes. Três tipos de pré-processamento podem ser aplicados às variáveis: (i) centralização das médias, que consiste na 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 escalonamento¹⁷⁸

Para reduzir as variações existentes entre as amostras, em função, por exemplo, da resposta do detector utilizado na análise cromatográfica, pode-se realizar a normalização dos dados. A normalização consiste na divisão de cada variável por uma constante que é escolhida a partir de uma análise preliminar dos dados. Pode-se adicionar em todas as amostras analisadas uma quantidade conhecida de um composto (padrão interno), que tenha características similares aos componentes de interesse na amostra e que não seja um composto naturalmente presente na matriz. A normalização é feita dividindo-se a área de cada analito pela área do padrão interno.^{175, 180}

2.6.3 Razão de Fisher

O fato da análise dos componentes principais (PCA) ser um método não-supervisionado torna esta técnica suscetível a falhas, quando as amostras apresentam variações dentro de uma classe, que podem mascarar as variações entre as diferentes classes de amostras analisadas, resultando no agrupamento incorreto das amostras.¹⁸¹ Além disso, a seleção das variáveis mais discriminantes é uma etapa preliminar usada na análise multivariada, particularmente, quando o número de variáveis independentes é relativamente pequeno em relação ao número de variáveis dependentes. Por estes motivos, é necessário utilizar um procedimento para selecionar as variáveis que apresentam variação entre as diferentes classes de amostras.¹⁸²

A análise de variância (ANOVA) pode ser empregada para avaliar se existe diferença significativa entre diferentes classes de amostras e tem sido utilizada em vários estudos para determinar quais os compostos voláteis apresentam diferenças qualitativas e/ou quantitativas significativas entre as amostras de vinho.^{30, 163, 164, 169} Entretanto, no caso da análise da composição volátil de vinhos pode existir uma grande variabilidade qualitativa ou quantitativa em relação aos voláteis dentro de cada classe de amostras. Com a utilização da ANOVA, as diferenças existentes dentro de uma mesma classe e aquelas entre as diferentes classes são consideradas da mesma maneira durante a análise que busca verificar quais são os fatores significativos. Esta abordagem pode ser problemática quando o objetivo é diferenciar grupos de amostras e, desta maneira, pretende-se minimizar as diferenças existentes dentro das classes.¹⁸²

A razão de Fisher também pode ser utilizada para selecionar as variáveis mais discriminantes que diferenciam grupos de amostras.^{181, 183, 184} 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 quando a ANOVA é utilizada.¹⁸⁵ A variação entre diferentes classes (σ_A^2) é calculada através da equação:

$$\sigma_A^2 = \frac{\sum(\bar{x}_i - \bar{x})^2 n_i}{(k-1)} \quad (4)$$

onde: n_i = número de medições de um determinado composto na classe i , \bar{x}_i = média do composto na classe i , \bar{x} = média geral do composto (considerando todas as classes), k = número de classes

A variação dentro de uma classe (σ_B^2) é calculada através da equação:

$$\sigma_B^2 = \frac{\sum(\sum(\bar{x}_{ij} - \bar{x})^2) - (\sum(\bar{x}_i - \bar{x})^2 n_i)}{(N - k)} \quad (5)$$

onde: \bar{x}_{ij} = média do número de i medições de um determinado composto da classe j e N = número total de amostras

A razão de Fisher é então calculada como a razão entre as duas variâncias:

$$\text{Razão de Fisher} = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_B^2} \quad (6)$$

2.6.4 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é uma ferramenta quimiométrica que visa evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. A PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados. Este conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz, onde as linhas podem ser amostras e as colunas são as variáveis.¹⁷⁸ Desta maneira, 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, e, portanto, de quantidade de informação, 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 e as de menor importância nas últimas. Dessa forma, as primeiras componentes principais são, geralmente, suficientes para descrever o sistema, possibilitando que seja facilmente interpretado.^{173, 177}

Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de escores (do inglês: *scores*) e

pesos (do inglês: *loadings*), cujos eixos são as PC, nos quais os dados são projetados (**Figura 2**). Os escores fornecem a composição das PC em relação às amostras, enquanto os pesos fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PC são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos escores e dos pesos. As amostras com valores positivos em uma determinada PC no gráfico de escores estão correlacionadas com as variáveis, referentes à mesma componente principal, que também possuem valores positivos no gráfico de pesos. Isto significa que tais amostras possuem maiores teores dos compostos representados por essas variáveis. Por exemplo, no gráfico de escores da **Figura 2** observa-se que as amostras “X” que estão localizadas no quadrante positivo tanto na PC1 quanto na PC2 do gráfico de scores, possuem os maiores teores dos compostos representados por essas variáveis (denominadas por “a, b e c”), que também possuem valores positivos no gráfico de pesos referentes à PC1 e PC2. Além disso, as amostras “X” apresentam os menores valores das variáveis denominadas por “d, e, f”, que estão localizadas nos quadrantes negativos.^{177, 178}

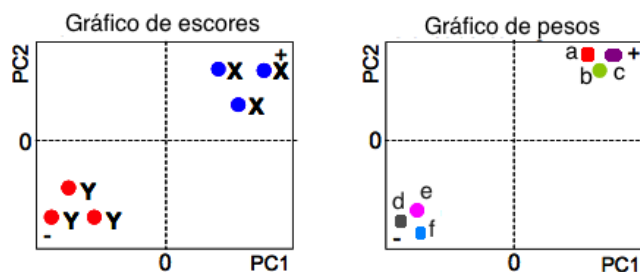


Figura 2. Representação de um gráfico de escores (relacionado às amostras) e seu respectivo gráfico de pesos (relacionado às variáveis que diferenciam as amostras). Figura modificada de Brereton.¹⁷⁵

A PCA possibilita, portanto, uma simplificação dos dados, pois um dos objetivos da utilização desta técnica não supervisionada de reconhecimento de padrões é reduzir a representação dimensional dos dados, organizando-os em uma estrutura mais simples, que facilita a visualização de todo o conjunto de dados. A PCA é uma técnica bastante utilizada como base para outras técnicas quimiométricas multivariadas, como por exemplo, a LDA, que é uma técnica de reconhecimento de padrão supervisionado.^{178, 180}

2.6.5 Análise Discriminante Linear (LDA)

A LDA é um método baseado na determinação de funções discriminantes lineares, as quais maximizam a variância entre as classes e minimizam a variância dentro de cada classe. Uma função discriminante é chamada de linear quando se assume que a variância entre os grupos de amostras são iguais. A LDA tenta encontrar uma função linear através da maximização da distância entre-classes e minimização da distância intra-classe. Este método procura encontrar a melhor separação dos dados, de maneira que quando os dados são projetados em um plano, as classes possam ser separadas (**Figura 3**).

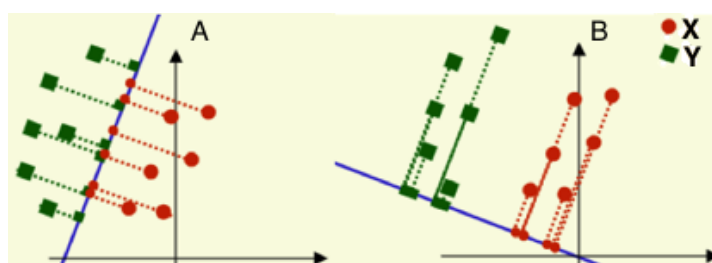


Figura 3. Representação da separação de amostras entre dois grupos (X e Y). Ao traçar uma linha (azul) e projetar as amostras sobre essa linha, as amostras pertencentes a cada grupo foram separadas apenas no exemplo **B**. Figura modificada de Brereton.¹⁷⁵

A LDA pode ser considerada, assim como a PCA, um método de redução de dimensionalidade. Contudo, enquanto a PCA seleciona um menor número de variáveis que representa e retêm a máxima variância dos dados, utilizando um número reduzido de variáveis representativas do total de variáveis do sistema, a LDA seleciona aquelas variáveis que representam a separação máxima entre as classes avaliadas.¹⁷⁴

A LDA é apropriada para conjuntos de dados de pequenas dimensões. Dessa forma, no uso da LDA para fins de classificação é necessário aplicar primeiramente um procedimento de redução da dimensionalidade e/ou seleção de variáveis. A PCA é uma das técnicas mais conhecidas e empregadas para selecionar a informação útil em um número menor de variáveis para ser utilizada na LDA.¹⁷⁸

Na LDA parte-se de dois ou mais grupos de amostras e das respectivas variáveis, selecionadas através da PCA, com o objetivo de encontrar uma combinação linear entre as variáveis que caracterize as diferenças entre os grupos de amostras. Essa combinação pode fornecer uma função discriminante capaz de classificar novas amostras em algum dos grupos utilizados na construção do modelo. Nesta técnica, o número de variáveis consideradas discriminantes é reduzido em relação ao número original de variáveis que são utilizadas para a construção do modelo. Desta maneira, quando se deseja classificar novas amostras é necessário determinar e identificar apenas aquelas variáveis estabelecidas como discriminantes. As novas variáveis estabelecidas pela LDA são chamadas de canônicas. A primeira variável canônica corresponde à combinação linear das variáveis que maximizam a diferenciação entre as amostras e a segunda variável canônica é traçada na direção de maior dispersão, ortogonalmente à primeira variável.^{174, 178}

3. EXPERIMENTAL

3. EXPERIMENTAL

3.1 AMOSTRAS

Os vinhos investigados participaram da Avaliação Nacional de Vinhos (ANV), evento promovido anualmente em Bento Gonçalves, no Rio Grande do Sul, pela Associação Brasileira de Enologia. Inicialmente foram empregados vinhos base Chardonnay da ANV 2009 para a otimização do método de extração. Os vinhos base Chardonnay foram elaborados em cinco vinícolas de quatro diferentes locais do estado do Rio Grande do Sul (2 amostra do Vale dos Vinhedos-VV, e 1 amostra de cada uma das demais vinícolas: Flores da Cunha-FC, Vacaria-VA, Pinto Bandeira-PB) localizadas em latitudes que variam de 28 a 29°S e foram fornecidos pela Embrapa Uva e Vinho. Posteriormente foram avaliados vinhos da ANV 2010 elaborados em cinco diferentes vinícolas (Vinícola Miolo, Vinícola Casa Perini, Aurora, Casa Valduga, Sanjo) provenientes de vários tipos de uvas Merlot (14 amostras), Chardonnay (16 amostras), Cabernet Sauvignon (10 amostras), Sauvignon Blanc (12 amostras) e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir (12 amostras). As amostras foram analisadas aleatoriamente.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÃO PADRÃO

Os compostos padrão (Aldrich, Steinheim, Alemanha) utilizados no preparo da solução padrão e suas respectivas concentrações foram acetato de etila ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), propanoato de etila ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), 2-metilpropanoato de etila (isobutirato de etila, $85 \mu\text{g L}^{-1}$), butanoato de etila ($60 \mu\text{g L}^{-1}$), 1-propanol ($150 \mu\text{g L}^{-1}$), acetato de isoamila ($50 \mu\text{g L}^{-1}$), hexanoato de etila ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), 2-hidróxiopropanoato de etila (lactato de etila, 20 mg L^{-1}), 1-hexanol ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), octanoato de etila ($50 \mu\text{g L}^{-1}$), 3-hidróxibutanoato de etila ($200 \mu\text{g L}^{-1}$), decanoato de etila ($200 \mu\text{g L}^{-1}$), butanodioato de dietila (succinato de dietila, $250 \mu\text{g L}^{-1}$), α -terpineol ($300 \mu\text{g L}^{-1}$), 2-acetato de 2-feniletila ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), ácido hexanóico ($700 \mu\text{g L}^{-1}$), 2-feniletanol (50 mg L^{-1}), ácido octanóico (10 mg L^{-1}), eugenol ($300 \mu\text{g L}^{-1}$), ácido decanóico (10 mg L^{-1}) e ácido dodecanóico (10 mg L^{-1}). O padrão interno utilizado foi o octanol na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

As soluções padrão estoque foram preparadas pesando-se os compostos padrão em balões volumétricos de 5 mL em balança analítica (precisão de 0,0001 g, Shimadzu, AY220, Kioto, Japão) e dissolvendo-os em etanol PA, bidestilado (Nuclear, São Paulo, Brasil). Soluções de vinho sintético foram preparadas com (+)-ácido tartárico (6 g L⁻¹) fornecido pela Synth (São Paulo, Brasil) e 10% de etanol em água MilliQ. O pH foi ajustado para 3,5 com hidróxido de sódio (Nuclear, São Paulo, Brasil). Embora muitos compostos contribuam para o aroma dos vinhos, uma seleção representativa de 22 compostos identificados como importantes para a qualidade do aroma do vinho foram usados para a otimização das condições de extração por GC×GC. Para isto, as soluções padrão foram diluídas na solução modelo de vinho com o objetivo de realizar a otimização dos métodos cromatográficos com uma matriz semelhante à da amostra real de vinho.

3.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO HEADSPACE

O procedimento de otimização das condições de extração dos voláteis de vinhos por HS-SPME pode ser feito estudando-se cada variável separadamente ou através de uma abordagem multivariada, que se baseia no uso de um delineamento experimental. Esse tipo de otimização multivariada permite a redução da quantidade de experimentos necessários, sem perda de informação. Foi realizada uma primeira etapa univariada de desenvolvimento de método, onde foi escolhido o filme polimérico mais apropriado e o uso ou não de agitação para a extração dos voláteis de vinho base.

3.3.1 Escolha do filme polimérico da SPME

A eficiência de sete diferentes filmes poliméricos foi avaliada através de extrações por HS-SPME de 5 mL de vinho base e 1,5 g de NaCl em frasco de vidro de 10 mL, com tampa provida de septo. As extrações foram realizadas em bloco de aquecimento à 35°C (±0,5°C) por 30 min. Os filmes poliméricos testados foram PDMS 7 µm StableFlex (polidimetilsiloxano), PDMS 100 µm, PA 85 µm (poliacrilato), CW(PEG) 60 µm metal (carbowax, polietilenoglicol), PDMS-DVB 65 µm StableFlex

(polidimetil siloxano-divinil benzeno), CAR-PDMS 85 μm StableFlex (carboxen-polidimetilsiloxano) e DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex (divinil benzeno-carboxen-polidimetilsiloxano). A área total e o número de picos cromatográficos foram usados para comparar a eficiência de extração de cada uma das fibras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.2 Otimização das condições de extração através de planejamento experimental

As condições de temperatura, tempo, concentração de sal e volume da amostra utilizados na extração foram avaliados através de planejamento fatorial, que consiste em uma abordagem onde as variáveis de interesse são avaliadas simultaneamente. As etapas deste planejamento estão indicadas na **Figura 4**.

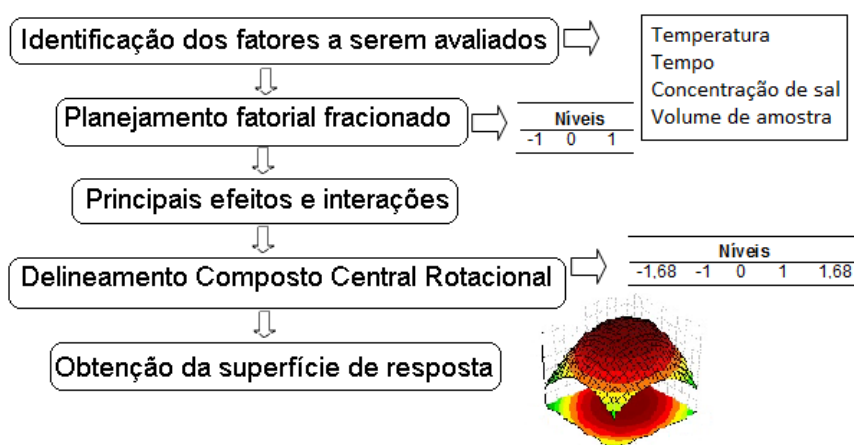


Figura 4. Etapas do planejamento experimental aplicado para otimização das condições de extração de compostos voláteis de vinho base Chardonnay, através da avaliação simultânea de vários fatores e seus respectivos níveis, os quais podem exercer influência na eficiência da extração e são verificados na obtenção da superfície de resposta.

Nos planejamentos experimentais onde as variáveis são exploradas em dois níveis é comum codificá-las usando-se os sinais (+) e (-). A atribuição desses sinais aos níveis superiores e inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, permitindo

esquematizar o planejamento na forma de matrizes (**Tabela X**). O programa Statistica (version 7.1, Statsoft, Tulsa, Oklahoma, EUA, 2005) foi utilizado para a construção do modelo e este foi avaliado através da ANOVA.

Tabela X. Matriz do planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}).

Experimento	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	Concentração de sal no vinho (%)	Volume de amostra de vinho (mL)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9 (C)*	0	0	0	0
10 (C)	0	0	0	0
11 (C)	0	0	0	0

*(C) refere-se as 3 repetições no ponto central do experimento

Os fatores que apresentam influência significativa na extração de compostos voláteis de vinhos por SPME foram estudados através de um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} . As quatro variáveis consideradas neste planejamento foram temperatura de extração, tempo de extração, concentração de cloreto de sódio no vinho base e volume da amostra de vinho utilizada na extração. Posteriormente, as variáveis que apresentaram influência significativa foram utilizadas em um delineamento composto central (CCD) para selecionar a combinação de níveis ótimos para a obtenção do maior número de picos e área cromatográfica total. Todos estes experimentos foram realizados com GC-FID, tendo sido sempre acompanhados por análises de branco da coluna, do filme polimérico de SPME e da solução sintética de vinho.

No planejamento foram atribuídos um nível baixo (-) e um nível alto (+) para cada uma das variáveis estudadas (**Tabela XI**). Para tornar possível a execução, ao menos aproximada, da inferência estatística, foram realizados ensaios no ponto central do espaço experimental. Os efeitos obtidos em cada um dos experimentos

avaliados foram utilizados para gerar informações a respeito das tendências de cada fator estudado.

Tabela XI. Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) para otimização das condições da HS-SPME de voláteis de vinho.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	30	45	60
Tempo (min)	10	35	60
Concentração de sal (%)	10	25	40
Volume amostra (mL)	1	3	5

3.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas por 1D-GC foram realizadas em equipamentos GC-FID (GC17A, Shimadzu) e GC/qMS (GCMS-QP5050, Shimadzu) equipados com colunas capilares DB-5 (fase estacionária contendo 95% de dimetil polisiloxano e 5% de grupamentos fenila, Agilent Technologies, Brasil) e DB-Wax (fase estacionária de 100% de polietilenoglicol, Agilent Technologies, Brasil), ambas de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. As condições de análise por 1D-GC e GCxGC estão expostas na **Tabela XII**. A dessorção dos analitos foi realizada no modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*). A fibra de SPME foi mantida por 5 min no injetor do cromatógrafo para garantir a ausência de efeito de memória.

Tabela XII. Condições empregadas nas análises cromatográficas.

	GC-FID	GC-qMS	GCxGC/TOFMS	GCxGC-FID
Temperatura do forno	35°C (5 min) - 3°C min ⁻¹ - 250°C (5 min)			
Temperatura do injetor	DB-Wax: 220°C DB-5: 250°C		DB-Wax na ¹ D: 220°C DB-5 na ¹ D: 250°C	
Temperatura do detector			DB-Wax na ² D: 220°C DB-1ms ou DB-17ms na ² D: 250°C	
Gás de arraste	Hélio			hidrogênio
	pureza analítica de 99,999%; vazão de 1 mL min ⁻¹ (White Martins, Brasil)			
Fonte de ionização de elétrons	-	70eV		-
Voltagem do detector	-	1250 V	1750 V	-
Faixa de varredura de massa	-	45 a 450 m/z		-

As análises por GCxGC-FID foram realizadas em um equipamento Agilent 6890N (Agilent Technologies, St Joseph, MI, EUA). Para as análises por GCxGC/TOFMS foi utilizado um cromatógrafo (Agilent 6890N) equipado com um detector de espectrometria de massas por tempo de voo (Pegasus IV, Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA). Ambos os equipamentos contam com forno secundário e um modulador criogênico com quatro jatos, sendo os jatos frios resfriados por nitrogênio líquido. A temperatura do modulador foi mantida 25°C acima da temperatura do forno primário e a temperatura da linha de transferência e fonte de íons foi de 250°C. A velocidade de aquisição do sinal foi de 100 Hz. A rampa de temperatura programada para o forno primário foi a mesma utilizada nas análises na 1D-GC. Um amostrador automático Combipal (CTC Analytics, Zwingen, Suíça) com agitador e estação de condicionamento de fibras foi usado para extrair os voláteis do *headspace* dos frascos que continham as amostras de vinho.

Todos os experimentos referentes à otimização das análises bidimensionais foram realizados no GCxGC-FID. A primeira etapa consistiu em escolher o conjunto de colunas mais apropriado para a análise de voláteis de vinhos. Os conjuntos de colunas testados estão listados na **Tabela XIII**. Após esta etapa, cada uma das seguintes variáveis foi otimizada individualmente: o período de modulação (condições testadas 4, 6 e 7 s), diferença de temperatura entre o forno primário e secundário (ΔT , condições testadas: 10, 20, 40 e 50°C), e duração do jato quente de

modulação (condições testadas: 0,7; 1,4 e 2,1 s). Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata.

Tabela XIII. Conjuntos de colunas cromatográficas utilizadas nos sistemas GC×GC.

¹ D			² D		
Fase		Dimensões	Fase		Dimensões
DB-5	95% PDMS e 5% fenila	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	DB-Wax	100% PG	1,00 m x 0,10 mm x 0,10 µm
DB-Wax	100% PG	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	DB-1ms	100% PDMS	1,70 m x 0,10 mm x 0,10 µm
DB-Wax	100% PG	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	DB-17ms	50% PDMS-50% fenil	1,70 m x 0,18 mm x 0,18 µm

PDMS: polidimetilsiloxano; PG: polietilenoglicol

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

A identificação dos compostos foi realizada através da comparação do tempo de retenção e espectros de massas dos compostos desconhecidos com aqueles dos compostos padrão listados no **item 3.4**. Os demais compostos foram tentativamente identificados através de comparação entre o LTPRI obtido experimentalmente com aqueles reportados na literatura.^{7, 23, 40, 58, 65, 165, 186-253} Para isto, foram feitas análises de uma solução de alcanos lineares (nonano, C9 até tetracosano, C24), preparada em hexano bidestilado, na concentração de 1% v/v) e também dos voláteis do vinho, nas mesmas condições cromatográficas no GC-FID e GC×GC/TOFMS. O LTPRI foi calculado de acordo com a equação de van den Dool e Kratz¹⁵⁰, utilizando-se o tempo de retenção total ($^1t_R + ^2t_R$; método 1) e o tempo de retenção equivalente da primeira dimensão, que se obtém subtraindo-se o 2t_R do tempo de retenção total (1t_R , método 2).¹³¹ Para os compostos que eluíram nos primeiros cinco minutos de análise utilizou-se a equação do KI para o cálculo do índice de retenção, pois neste período a análise ocorreu em condição isotérmica.

Os espectros de massa obtidos para os demais compostos foram comparados com os espectros da biblioteca NIST 2005. Os compostos considerados tentativamente identificados apresentaram uma similaridade espectral superior a 75%, quando comparados aos espectros de massas das bibliotecas comerciais.

3.6 ANÁLISE SENSORIAL

Os vinhos foram avaliados por provadores treinados, da Embrapa Uva e Vinho através da análise descritiva quantitativa (QDA, do inglês: *quantitative descriptive analysis*). Os vinhos foram submetidos à avaliação sensorial imediatamente após as garrafas serem abertas. Os provadores realizaram a avaliação visual, olfativa e degustativa. A intensidade de cada atributo foi mensurada na escala de 0 a 5, onde 0 indica que o avaliador não percebeu o atributo, 1 = muito baixo, 2 = baixo, 3 = médio, 4 = alto e 5 = muito alto. Os painelistas também atribuíram uma nota para a qualidade sensorial global, considerando a percepção organoléptica dos vinhos avaliados.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o programa Statistica (version 7.1, Statsoft, Tulsa, Oklahoma, EUA, 2005). O planejamento fatorial fracionado, delineamento composto central e as superfícies de resposta foram geradas na etapa de otimização das condições de extração dos voláteis do vinho por HS-SPME. O teste empregado para determinar a significância das variáveis utilizadas na extração e a validação do modelo construído no planejamento experimental, contendo as condições mais adequadas para a extração dos voláteis, foram avaliados através da ANOVA ($p < 0,05$).

As notas obtidas na análise sensorial global de cada amostra foram avaliadas através da ANOVA, usando-se o programa Statistica, seguida do teste de diferença mínima significativa (LSD, do inglês: *least significant difference*). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

O programa LECO Chromatof versão 4.22 foi utilizado para a aquisição e processamento dos dados obtidos através da GC×GC. A razão de Fisher foi calculada através deste programa para selecionar os compostos voláteis mais discriminantes entre os vinhos elaborados a partir de diferentes variedades de uva. Os compostos voláteis em ordem decrescente da razão de Fisher foram exportados pelo programa Chromatof para o Excel, onde foram organizados em uma matriz contendo 480 colunas (analitos) e 54 linhas (amostras). Esta matriz que continha os

valores de área cromatográfica de cada composto volátil em cada amostra foi normalizada efetuando-se a divisão da área de cada composto volátil pela área do padrão interno (octanol) que foi adicionado a cada amostra antes da extração dos voláteis. Este procedimento visa reduzir as variações entre as amostras. A matriz foi também submetida ao procedimento de centralização das médias, que consiste da subtração dos elementos de cada linha pela média de sua respectiva coluna para ajustar as grandezas em valores equivalentes. Posteriormente, a matriz contendo os dados de área cromatográfica de cada composto volátil foi utilizada na PCA que foi feita no programa Statistica. Os componentes principais (PC) foram determinados através da regra de kaiser, que seleciona os PC com autovalores maiores do que um. Os componentes principais foram utilizados na LDA para construção de um modelo de diferenciação das amostras de vinho elaboradas a partir de diferentes cultivares de uvas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do método de extração foi realizado em duas etapas: na primeira três parâmetros foram otimizados através de uma abordagem univariada e na segunda, os demais parâmetros foram otimizados por planejamento fatorial fracionado.

4.1 OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DOS VOLÁTEIS DE VINHO BASE NO MODO *HEADSPACE*

4.1.1 Escolha do filme polimérico de SPME

A **Figura 5** apresenta os cromatogramas obtidos após a extração dos voláteis de vinho por HS-SPME, utilizando-se diferentes revestimentos poliméricos e a **Figura 6** mostra a eficiência destes filmes poliméricos, tendo por base o número de picos cromatográficos detectados e a área total obtida ao se utilizar cada revestimento de SPME.

Na extração de voláteis pela fibra PDMS observou-se um aumento da capacidade de extração com o aumento da espessura do revestimento. Esse resultado é esperado, visto que ocorreu um aumento da área de sorção no revestimento mais espesso (100 μm) em relação ao revestimento de espessura 7 μm . A absorção é o mecanismo principal no processo de extração que envolve as fases poliméricas PDMS (polidimetilsiloxano) e PA (poliacrilato) e baseia-se em princípios termodinâmicos e de transferência de massa. A PDMS é uma fase apolar que apresenta grande afinidade por compostos não polares, entretanto, ela pode ser utilizada para extrair compostos moderadamente polares e a PA é uma fase adequada para extrair compostos polares como os álcoois, ácidos graxos voláteis e compostos fenólicos.⁹⁵ Entretanto, esta fibra não apresentou bons resultados para a extração de voláteis de vinho, embora vários destes compostos apresentem grupos funcionais que lhes conferem certa polaridade (cetonas, álcoois, ácidos, etc). Um fato digno de nota é que as áreas cromatográficas de compostos como os ácidos carboxílicos foram maiores quando se utilizou o recobrimento polimérico de PA,

quando comparadas às áreas obtidas através do emprego de outros filmes poliméricos (PDMS 100 μm , CAR-PDMS, PDMS-CAR-DVB). Este resultado seria esperado, já que a fibra é polar e os ácidos carboxílicos se encontram entre os compostos mais polares da mistura.

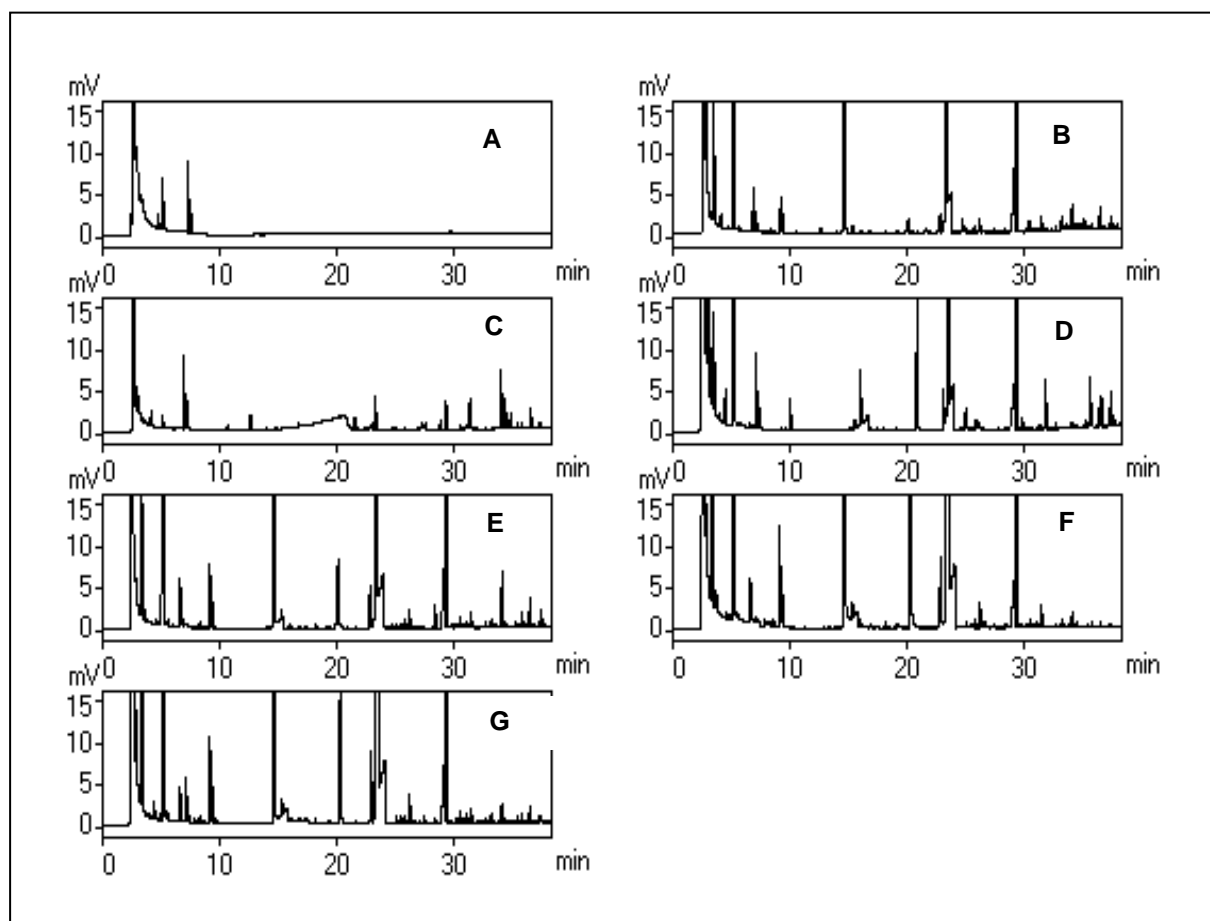


Figura 5. Cromatogramas de análises em GC-FID, obtidos após a extração do *headspace* de vinho base de uva *Chardonnay* com os revestimentos (A) PDMS 7 μm StableFlex, (B) PDMS 100 μm , (C) PA 85 μm , (D) CW(PEG) 60 μm metal, (E) PDMS-DVB 65 μm StableFlex, (F) CAR-PDMS 85 μm StableFlex e (G) DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex. As condições das análises cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**.

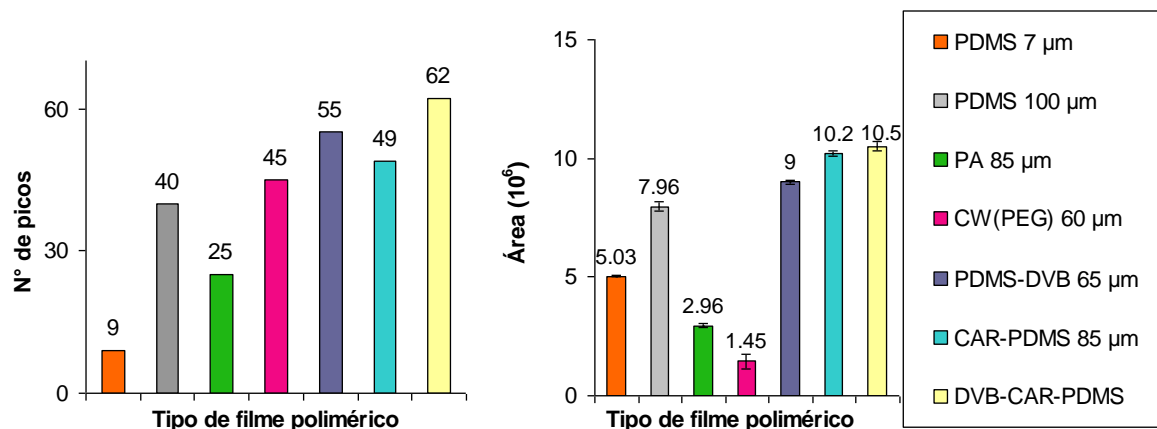


Figura 6. Diagramas de barras que indicam a eficiência dos diferentes filmes poliméricos de SPME para extração de compostos voláteis de vinhos, através da média do total de picos cromatográficos e dos percentuais de área obtidos nas triplicatas da extração. As barras indicam o erro padrão da média.

A extração de voláteis de vinho através da fibra PDMS-DVB foi superior a dos revestimentos anteriormente citados. Entretanto, o desempenho deste revestimento mostrou-se inferior ao demonstrado pela fibra tripla DVB-CAR-PDMS. A CAR-PDMS, que também é uma fibra mista e apresenta uma fase porosa que determina o tamanho dos analitos retidos, sendo indicada para análises em que os compostos de interesse apresentam entre 2 e 12 carbonos. Moléculas maiores ficam fortemente retidas, dificultando sua dessorção, enquanto que analitos pequenos difundem-se rapidamente pelos poros e, por isso, são facilmente dessorvidos.¹⁴² A capacidade de extração desse filme polimérico mostrou-se moderada (**Figura 6**).

A DVB-CAR-PDMS, considerada de polaridade intermediária, tem sido freqüentemente empregada para a extração de voláteis de diversas matrizes devido à sua performance superior em relação aos demais filmes poliméricos. Essa maior capacidade de sorção deve-se à presença de três camadas de filme polimérico, cada uma com composição distinta. Desta forma, o filme polimérico DVB-CAR-PDMS foi escolhido para as etapas posteriores desse estudo, pois apresentou maior capacidade de extração. A literatura científica mostra que tanto este filme, como o PDMS-DVB já foram utilizados com sucesso no estudo de compostos voláteis de vinhos e outras bebidas alcólicas.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Entretanto, os estudos que apresentam o revestimento PDMS-DVB como adequado para a extração de voláteis de bebidas

alcólicas não comparam este revestimento com o revestimento triplo (DVB-CAR-PDMS).

4.1.2 Uso de agitação

A eficiência da extração depende da distribuição do analito entre a amostra e o filme utilizado para a extração. A agitação normalmente aumenta a transferência do analito para a fibra, reduzindo assim o tempo de extração. Entretanto, o uso de agitação excessiva pode afetar negativamente a precisão entre as replicatas de extração.⁵ A agitação da amostra favoreceu a extração dos compostos menos voláteis, o que pode ser observado através do número e intensidade dos picos com tempo de retenção superior a 25 minutos (**Figura 7**). Em relação aos compostos mais voláteis, que correspondem aos compostos com tempo de retenção inferior a 25 minutos, a extração sem o uso da agitação se mostrou mais eficiente (**Figura 7**). Como a área total correspondente à soma da área de cada pico do cromatograma e o número de compostos extraídos foi bastante semelhante nos experimentos feitos com e sem agitação (**Tabela XIV**), aplicou-se o teste t-Student para determinar se as diferenças observadas eram significativas. Ao considerar a área total obtida, o uso da agitação magnética não contribuiu para a melhoria da eficiência da extração ($p=0,001$) ao nível de significância de $p=0,05$. Entretanto, quando o número de picos foi considerado, observou-se diferença significativa entre os testes com e sem agitação ($p=0,15$). Quando a agitação da amostra foi empregada, a área do pico correspondente ao etanol aumentou, o que prejudicou a identificação de outros compostos e também o número de picos de outros voláteis diminuiu. Sendo assim, os experimentos seguintes foram realizados sem agitação.

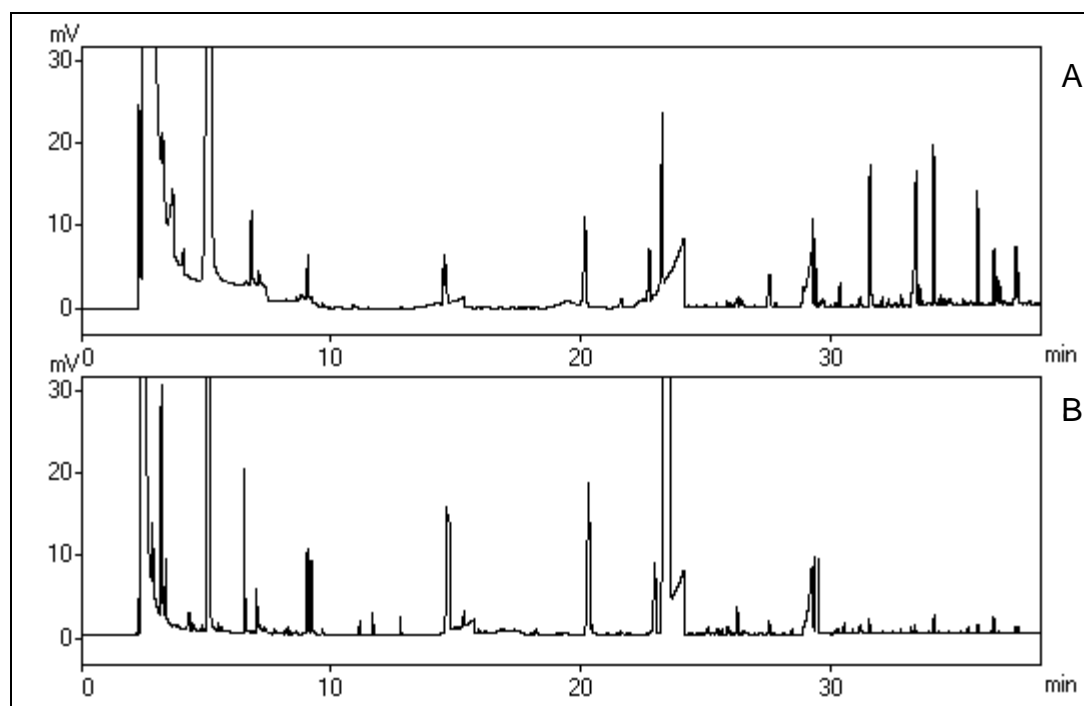


Figura 7. Cromatogramas resultantes de análises em GC-FID, obtidos após a extração de voláteis do *headspace* de vinho base de uva Chardonnay com a fibra DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex (A) com agitação e (B) sem agitação. As condições das análises cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**.

Tabela XIV. Número de picos e área total obtidos através da extração de voláteis do *headspace* de vinho base espumante com e sem agitação da amostra de vinho.

Modo extração	Nº de picos	CV (%)*	Área total	CV (%)*
Com agitação	62	2	$4,8 \cdot 10^6$	9
Sem agitação	69	4	$4,3 \cdot 10^6$	12

* CV: coeficiente de variação

4.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DOS DEMAIS PARÂMETROS DO MÉTODO DE MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO *HEADSPACE*

Um planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}), com três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos, foi empregado com o objetivo de detectar as variáveis que apresentam influência positiva na extração dos voláteis de vinho. As variáveis resposta foram: números de picos e área total (**Tabela XV**). As amostras

foram preparadas a 4°C para evitar a perda dos compostos mais voláteis e para que o equilíbrio gás-líquido fosse atingido antes de ocorrer a extração, as amostras permaneceram à 40°C por 10 min. As extrações foram feitas com a fibra DVB/CAR/PDMS.

Tabela XV. Experimentos realizados com base no planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) com os valores reais e as respostas obtidas através do número de picos e área total, para a otimização das condições de SPME de voláteis de vinho.

Experimento	Variáveis independentes			Respostas		
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de sal (%)	Volume amostra (mL)	Número de picos	Área total ^a (10^6)
1	30	10	10	1	31	4,9
2	60	10	10	5	28	6,1
3	30	60	10	5	50	11
4	60	60	10	1	61	19
5	30	10	40	5	43	9,3
6	60	10	40	1	42	15
7	30	60	40	1	51	10
8	60	60	40	5	86	19
9 (C)	45	35	25	3	50	18
10 (C)	45	35	25	3	53	14
11 (C)	45	35	25	3	49	17

^a Área total expressa em unidades arbitrárias de unidades de área.

As respostas obtidas foram avaliadas através da ANOVA ao nível de significância de 5%. Os resultados podem ser visualizados nos diagramas de Pareto (**Figura 8**), onde se apresenta a importância de cada parâmetro estudado, bem como suas interações.

A temperatura e o tempo de extração apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) para ambas as respostas obtidas (**Figura 8**). Para a variável número de picos, observou-se que a concentração de sal e a interação entre temperatura e tempo mostraram-se significativas ($p < 0,05$). O volume de amostra utilizado na extração não apresentou influência positiva na extração dos voláteis ao nível de 95% de confiança.

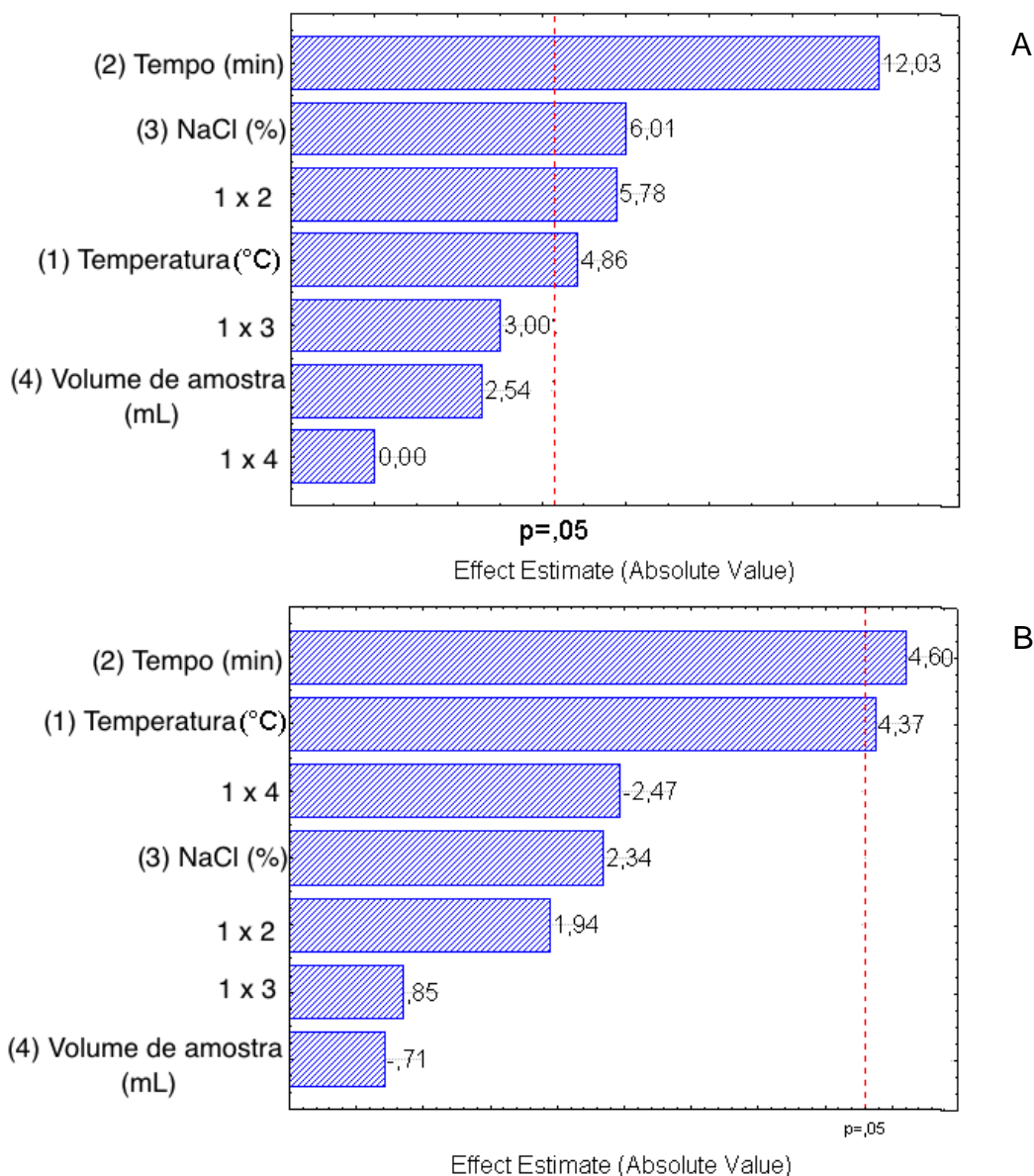


Figura 8. Diagrama de Pareto com a estimativa dos efeitos das variáveis estudadas no planejamento experimental para (A) área total dos compostos e (B) número de picos cromatográficos detectados por GC-FID. As condições utilizadas nas análises cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**.

Para estabelecer as condições ótimas de extração foram considerados os principais fatores que influenciam na sorção dos analitos na amostra, no filme polimérico e sua transferência para o *headspace* e fibra. Assim, a concentração de sal, a temperatura e o tempo de extração foram utilizados no delineamento composto central (CCD 2³) (**Tabela XVI**). O volume de amostra utilizado nos experimentos foi de 1 mL. A análise dos coeficientes de regressão e ANOVA foram

feitas para a resposta referente ao número de picos (**Tabelas XVII e XVIII**) e área total (**Tabelas XIX e XX**) obtidos em cada um dos experimentos realizados no CCD 2^3 .

Tabela XVI. Experimentos realizados pelo delineamento composto central e resultados para as respostas número de picos e área total.

Experimento	Variáveis independentes			Respostas	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de sal (%)	Número de picos	Área total (10^6)
1	50 (-1)	40 (-1)	25 (-1)	58	10
2	50 (-1)	40 (-1)	35 (1)	63	16
3	50 (-1)	60 (1)	25 (-1)	54	14
4	50 (-1)	60 (1)	35 (1)	45	17
5	70 (1)	40 (-1)	25 (-1)	49	9,8
6	70 (1)	40 (-1)	35 (1)	46	1,7
7	70 (1)	60 (1)	25 (-1)	43	3,3
8	70 (1)	60 (1)	35 (1)	42	1,7
9	43 (-1,68)	50 (0)	30 (0)	63	11
10	77 (1,68)	50 (0)	30 (0)	43	31
11	60 (0)	33 (-1,68)	30 (0)	51	13
12	60 (0)	67 (1,68)	30 (0)	46	19
13	60 (0)	50 (0)	22 (-1,68)	50	14
14	60 (0)	50 (0)	38 (1,68)	51	17
15 (C)	60 (0)	50 (0)	30 (0)	59	18
16 (C)	60 (0)	50 (0)	30 (0)	64	16
17 (C)	60 (0)	50 (0)	30 (0)	60	15

Na **Tabela XVII** é possível verificar que para a resposta número de picos obtidos foram significativos os fatores tempo de extração e concentração de sal ($p < 0,05$).

Tabela XVII. Coeficientes de regressão para a resposta número de picos obtidos após os experimentos do delineamento composto central.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	T(2)	p^*
Média	-235,88	75,76	-3,11	0,08
(1)Temperatura (°C)(L)	2,12	1,19	1,76	0,21
Temperatura (°C)(Q)	-0,03	0,01	-3,60	0,07
(2)Tempo (min)(L)	4,13	1,12	3,68	0,06
Tempo (min)(Q)	-0,04	0,01	-5,61	0,03
(3)Concentração de sal (°)(L)	10,34	2,39	4,31	0,05
Concentração de sal (°)(Q)	-0,15	0,03	-4,72	0,04
1L by 2L	0,01	0,01	1,60	0,25
1L by 3L	-0,00	0,02	-0,00	1,00
2L by 3L	-0,03	0,02	-1,60	0,25

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabela XVIII. Valores da ANOVA para a resposta número de picos obtidos após os experimentos do delineamento composto central.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	860,98	9	95,66	8,87	3,68
Resíduo	75,48	7	10,78		
Falta de ajuste	61,48	5	12,29	1,75	2,12
Erro puro	14,00	2	7,00		
Total	936,47	16			

Através da ANOVA (**Tabela XVIII**) observou-se que o modelo está ajustado aos dados, pois a soma quadrática do erro puro ($SQ_{\text{erro puro}} = 14$), que está relacionada aos erros aleatórios das replicatas feitas no planejamento experimental, é uma parte da soma quadrática dos resíduos, que corresponde à variabilidade que o modelo não consegue explicar: ($SQ_{\text{resíduos}} = 75,48$; $SQ_{\text{resíduos}} = SQ_{\text{erro puro}} + SQ_{\text{falta de ajuste}}$). O quociente da variação explicada ($SQ_{\text{regressão}}$) pela variação total (SQ_{total}) é a porcentagem de variação explicada (r^2), ou seja, $860/936 = 0,919$, que corresponde a 91,9%. Considerando que na regressão o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que do F_{tabelado} e a porcentagem de variação explicada pelo modelo é de 91,9%, o modelo mostrou-se adequado e foi possível construir as superfícies e curvas de resposta.

Tabela XIX. Coeficientes de regressão para a resposta área total obtida após os experimentos do delineamento composto central.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	T(2)	p^*
Média	$-2,8 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^7$	-7,97	0,01
(1)Temperatura (°C)(L)	$6,5 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^5$	11,84	0,00
Temperatura (°C)(Q)	$-4,1 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^3$	-11,23	0,00
(2)Tempo (min)(L)	$1,5 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^5$	2,96	0,09
Tempo (min)(Q)	$-9,1 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$	-2,49	0,13
(3)Concentração de sal (%) (L)	$4,7 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	4,26	0,05
Concentração de sal (%) (Q)	$-3,9 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	-2,72	0,11
1L by 2L	$-1,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^3$	-3,20	0,08
1L by 3L	$-4,5 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^3$	-5,23	0,03
2L by 3L	$8,7 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^3$	1,00	0,42

* fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Para a resposta área total, observa-se na **Tabela XIX** que a temperatura e a interação temperatura e concentração de sal foram significativas.

Tabela XX. Valores da ANOVA para a resposta área total obtida após os experimentos do delineamento composto central.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (10 ¹²)	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	$481 \cdot 10^{14}$	9	$5,34 \cdot 10^{13}$	3,78	3,68
Resíduo	$98,9 \cdot 10^{13}$	7	$1,41 \cdot 10^{13}$		
Falta de ajuste	$95,9 \cdot 10^{13}$	5	$1,91 \cdot 10^{13}$		
Erro puro	$3,01 \cdot 10^{12}$	2	$1,50 \cdot 10^{12}$		
Total	$580 \cdot 10^{14}$	16			

% variação explicada (R^2) = 82,94

$F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} e, portanto, é possível construir a superfície de resposta. A análise dessas figuras (**Figuras 9 e 10**) permite a definição das condições mais adequadas para a extração de voláteis de vinho base por SPME.

No que diz respeito à temperatura, supostamente, temperaturas altas liberam mais analitos para o *headspace*, permitindo uma extração maior dos analitos. No entanto, temperaturas elevadas também podem afetar adversamente a sorção dos analitos pela fibra de SPME.²⁵⁷ Nos experimentos observou-se que a extração dos voláteis em temperaturas entre 50 e 60°C possibilitou resultados significativamente melhores tanto para área total, como para o número de compostos extraídos do que

quando a extração foi realizada acima de 70°C. Isto provavelmente ocorre devido ao fato que o uso de temperaturas mais altas (acima de 60°C) aumenta a liberação dos analitos que já foram adsorvidos pela fibra, novamente para o *headspace*.

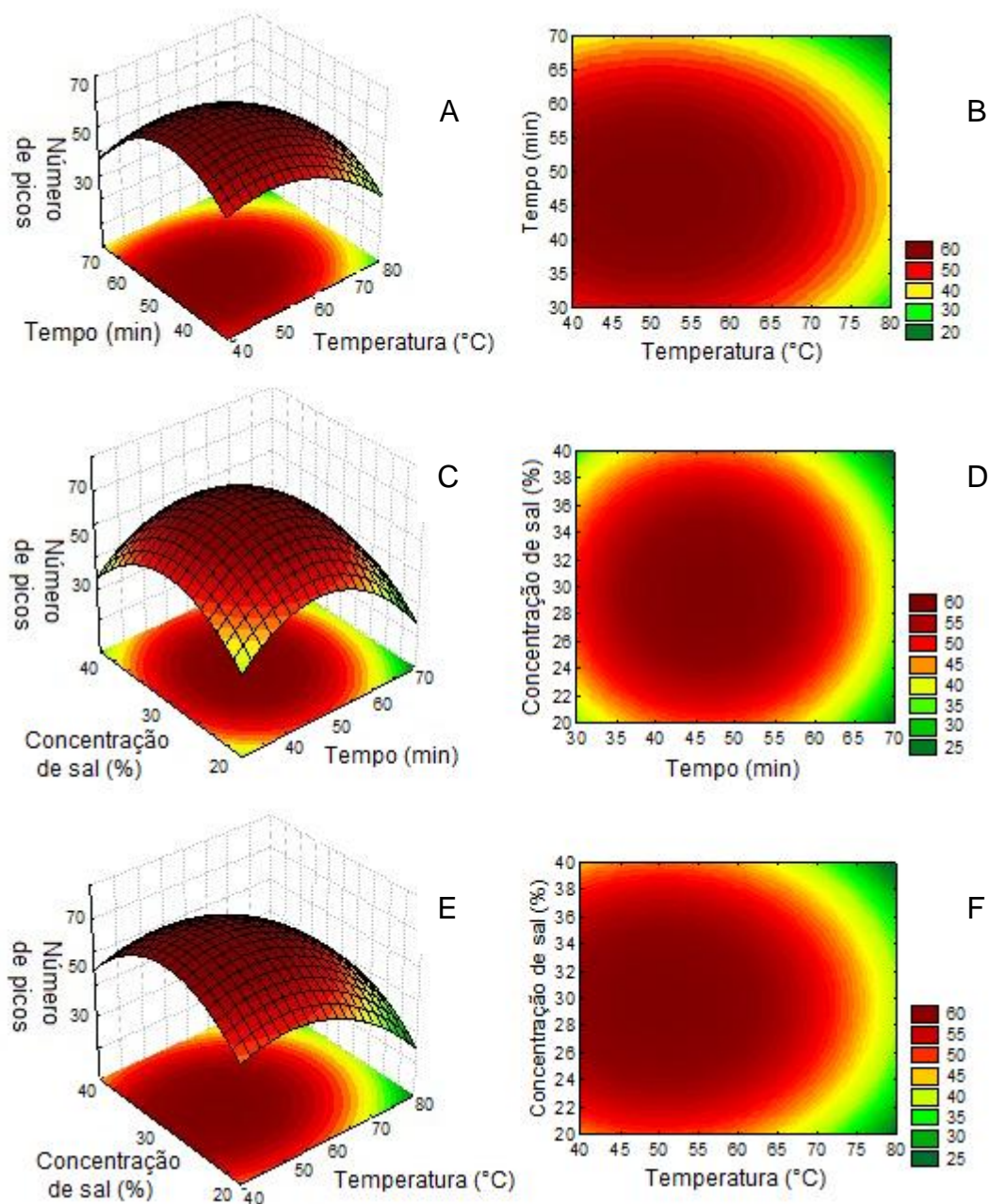


Figura 9. Superfícies de resposta e curvas de contorno para: o número de picos em função do tempo e temperatura de extração **(A)** e **(B)**; o tempo de extração e a concentração de sal **(C)** e **(D)** e para a temperatura de extração e concentração de sal **(E)** e **(F)**.

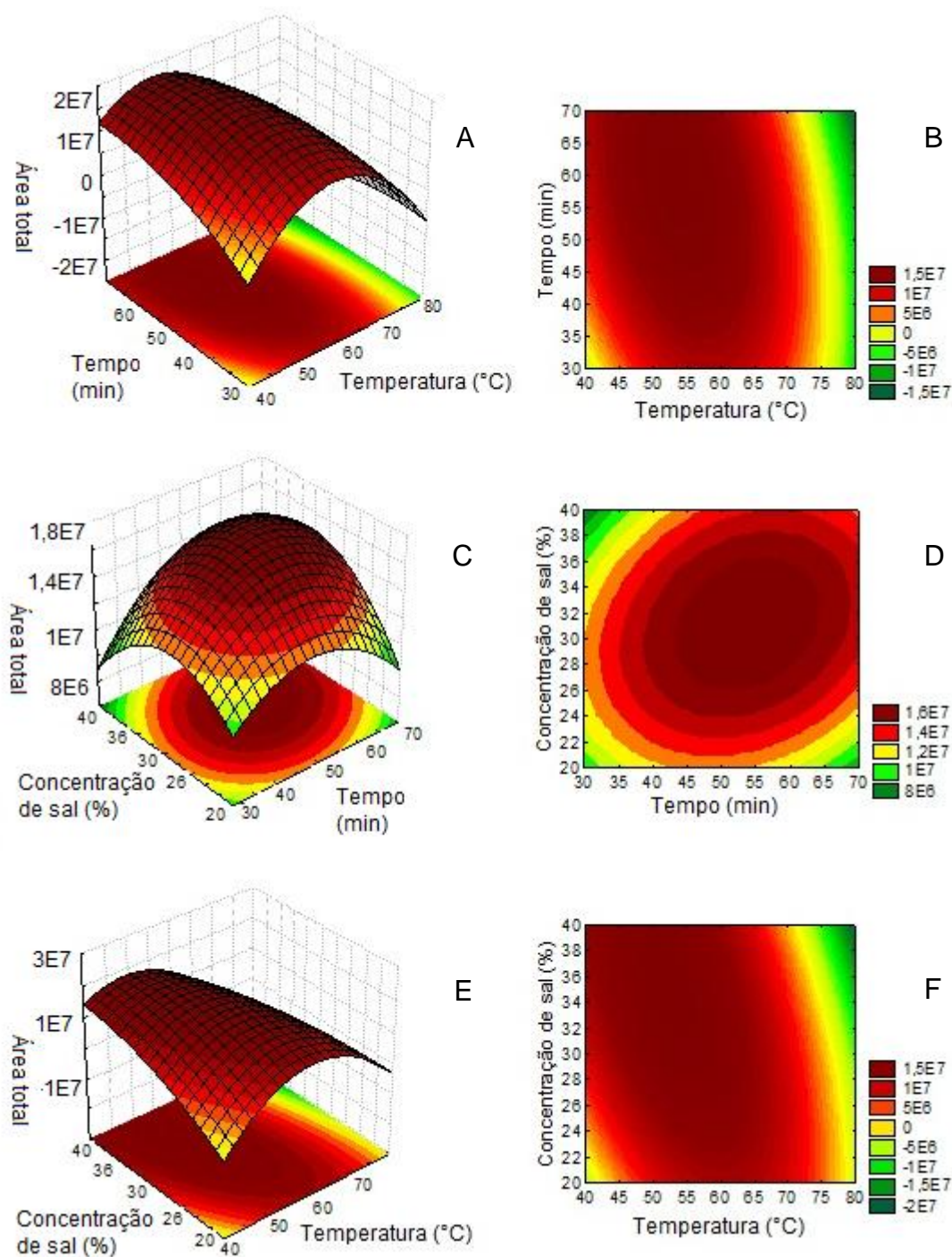


Figura 10. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a área total em função do tempo e temperatura de extração (A) e (B), do tempo de extração e concentração de sal (C) e (D) e da temperatura de extração e concentração de sal (E) e (F).

O tempo de extração depende da difusão dos analitos desde a matriz até a superfície do revestimento polimérico e do equilíbrio entre os analitos e a fase polimérica empregada na SPME. A SPME consiste em uma técnica de equilíbrio

entre amostra, *headspace* e filme polimérico, e, portanto, o tempo ótimo de extração é o tempo de equilíbrio dos analitos entre estas três fases. Após 60 minutos de extração observou-se que a quantidade de compostos extraídos diminuiu (número de compostos e área cromatográfica), provavelmente devido a efeitos de competição entre os analitos pelos sítios do revestimento da fibra.

A transferência dos analitos da amostra para o *headspace* pode ser melhorada através do aumento da força iônica do meio, o que pode ser feito pela adição de cloreto de sódio.^{257, 258}

A análise das superfícies de respostas, **Figuras 9 e 10**, mostra que as condições de extração que favorecem a obtenção de um maior número de picos são: temperatura de extração de 45-55°C, tempo de extração de 40-50 min e concentração de sal de 26-32%. Para a obtenção de maior área total, as condições de extração mais favoráveis são: temperatura de 50-60°C, tempo de 45-60 min e concentração de sal de 26-34%. A partir desses valores foram escolhidas as condições ótimas para a extração dos voláteis de vinhos: 1 mL de amostra, uso de 30% de cloreto de sódio, 45 min de extração a 55°C.

4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO *HEADSPACE* A AMOSTRAS DE VINHO BASE GAÚCHO

O método de extração otimizado foi aplicado na análise de amostras de vinho base utilizando-se GC/qMS. Vinhos elaborados a partir de uvas da cultivar Chardonnay de cinco vinícolas localizadas em quatro diferentes locais do estado do Rio Grande do Sul foram avaliados (Vale dos Vinhedos-VV, Flores da Cunha-FC, Vacaria-VA, Pinto Bandeira-PB). Esta regiões foram avaliadas em função da situação em que se encontram em relação à certificação de Indicação Geográfica. O Vale dos Vinhedos, localizado entre os municípios de Bento Gonçalves, Garibaldi e Monte Belo do Sul, foi a primeira região do Brasil a obter, em 2002, a Indicação de Procedência (IP) junto ao INPI, exibindo o selo de controle nos vinhos finos e espumantes elaborados. Pinto Bandeira, que é um distrito de Bento Gonçalves, foi a segunda região do Brasil a receber, em 2010, o registro de IP para os vinhos produzidos neste local. Os vinhos de Flores da Cunha estão em processo de

obtenção deste certificado e os vinhos produzidos em Vacaria não possuem pedido de certificação ao INPI. O cromatograma de corrente iônica total (TIC do inglês, *total ion current*) para os compostos presentes no *headspace* de vinho base elaborado a partir de uvas da cultivar Chardonnay está apresentado na **Figura 11**. Dezoito compostos foram identificados e 14 foram tentativamente identificados (**Tabela XXI**). A maior parte dos compostos (56%) são ésteres, na maioria ésteres etílicos, os quais são responsáveis pelas propriedades sensoriais frutadas e florais dos vinhos. Os demais compostos identificados pertencem à classe dos álcoois e ácidos. Estes últimos podem contribuir tanto positivamente, quanto negativamente para o *flavour* do vinho, a depender do composto em questão.

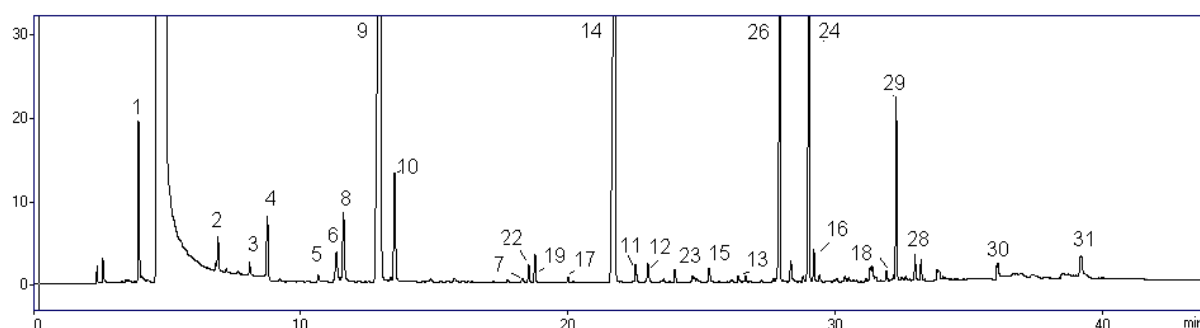


Figura 11. Cromatograma de corrente iônica total (TIC) para os compostos presentes no *headspace* de vinho base elaborado a partir de uvas da cultivar Chardonnay. O número de cada pico corresponde a composto apresentado na **Tabela XXI**. As condições utilizadas na análises dos vinhos estão descritas na **Tabela XII**.

Li e colaboradores¹⁷ também encontraram ésteres etílicos entre os ésteres predominantes nos vinhos Chardonnay. No estudo do impacto sensorial deste compostos, os autores destacaram o butanoato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila, lactato de etila e decanoato de etila como os compostos mais importantes para o aroma dos vinhos produzidos a partir de uvas Chardonnay. Jiang e Zhang¹¹³ utilizaram a HS-SPME-GC/qMS para analisar vinhos Chardonnay produzidos na China. Neste vinhos, a maior parte dos compostos identificados foram álcoois (38%), seguidos de ésteres (33%) e ácidos (13%).

Tabela XXI. Identificação tentativa dos compostos voláteis de vinhos base elaborados a partir de uvas da cultivar Chardonnay.

	Composto	LTPRI OV5	LTPRI FFNSC	LTPRI Wax	LTPRI Lit	VV^a	VV	FC	VA	PB
1	Acetato de etila ^b	577 ^d	588	879 ^d	885 ¹⁷	*	*	*	*	*
2	Propanoato de etila ^b	717 ^d	708	949 ^d	946 ⁴⁰	*		*		
3	Butanoato de etila ^b	809 ^d	803	1037	1033 ⁴⁰	*		*	*	
4	Propanol ^b	547 ^d	536	1045	1046 ⁸¹	*		*	*	
5	2-Metil butanoato de etila ^b	848 ^d	842	1050	1055 ⁸¹	*			*	
6	Isovalerato de etila ^b	855 ^d	850	1060	1061 ⁸¹	*			*	
7	Acetato de isoamila ^b	879 ^d	873	1118	1123 ⁸¹	*		*	*	*
9	Álcool isoamílico ^c	719 ^d	729	1220	1210 ⁸¹	*	*	*	*	*
8	Hexanotato de etila ^b	1001	1003	1222	1232 ⁸¹	*	*	*	*	*
10	Butanoato de isoamila ^c	1050	1057	1249	1255 ²⁵⁹			*	*	
11	Hexenoato de etila ^c	1010	1003	1330	1336 ⁸¹				*	
12	Lactato de etila ^b	810 ^d	814	1348	1349 ⁸¹	*	*	*	*	
13	Hexanol ^b	868 ^d	871	1355	1351 ⁸¹	*	*	*	*	*
14	Octanoato de etila ^b	1206	1202	1441	1430 ⁸¹	*	*	*	*	*
15	Ácido acético ^c	-	-	1463	1452 ⁴⁰	*	*	*	*	*
16	Hidróxibutanoato de dietila ^b	937 ^d	936	1520	1527 ¹⁸⁸			*	*	*
17	Nonanoato de etila ^c	1290	1297	1549	1581 ¹⁷		*	*		
18	2,3-Butanodiol ^c	780 ^d	789	1550	1545 ⁴⁰	*	*	*	*	*
19	Malonato de dietila ^c	1271	1268	1587	1582 ⁸¹	*				
20	Decanoato de etila ^c	1398	1399	1635	1639 ⁸¹	*	*	*	*	*
21	Octanoato de isoamila ^c	1441	1449	1644	1649 ⁸¹	*	*	*	*	*
22	Succinato de dietila ^b	1185	1183	1679	1678 ⁸¹	*	*	*	*	*
23	9-Decenoato de etila ^c	-	-	1694	1691 ⁸¹	*			*	
24	Acetato de 2-feniletila ^b	1254	1257	1799	1795 ⁸¹	*		*	*	*
25	Dodecanoato de etila ^c	1597	1598	1832	1827 ⁸¹	*		*	*	*
26	Ácido hexanóico ^b	-	-	1883	1885 ⁸¹		*			
27	2-Feniletanol ^b	1116	1113	1896	1888 ⁸¹	*	*	*	*	*
28	Dodecanol ^c	1478	1476	1971	1981 ¹⁷	*	*	*	*	
29	Ácido octanóico ^b	1199	1192	2068	2072 ¹⁸⁸	*	*	*	*	*
30	Ácido nonanóico ^c	1278	1289	2168	2164 ¹⁸⁷		*			
31	Ácido decanóico ^b	1398	1399	2257	2261 ¹⁸⁸		*	*		*
32	Ácido dodecanóico ^b	1569	1581	2509	2517 ¹⁷	*		*	*	*

^a = amostras provenientes de: VV: Vale dos Vinhedos; FC: Flores da Cunha; VA: Vacaria; PB: Pinto Bandeira; ^b: compostos identificados através de co-injeção com padrões; ^c: compostos tentativamente identificados pelo emprego de LTPRI; ^d: LTPRI calculado por extrapolação; FFNSC: refere-se à biblioteca de compostos naturais e sintéticos de aromas e fragrâncias; Lit: valores retirados da literatura; OV5 e Wax: referem-se às fases estacionárias das colunas cromatográficas. Os LTPRI cujos valores foram inferiores a 950 e superiores a 2400 foram obtidos por extrapolação.

As notas obtidas para a percepção da qualidade organoléptica global dos vinhos estão apresentadas na **Figura 12**. As amostras do Vale dos Vinhedos e Flores da Cunha apresentaram os maiores valores para os atributos relacionados à qualidade dos vinhos, enquanto que as amostras de Vacaria obtiveram os menores valores.

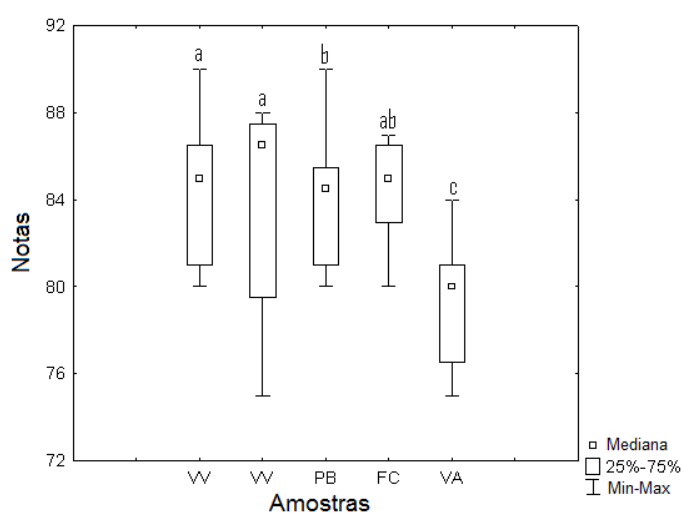


Figura 12. Avaliação sensorial global dos vinhos produzidos em quatro diferentes locais da Serra Gaúcha e avaliados pela ANOVA e teste LSD ao nível de 95% de confiança. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras. Amostras provenientes de: VV: Vale dos Vinhedos; FC: Flores da Cunha; VA: Vacaria; PB: Pinto Bandeira.

As notas de cada atributo avaliado na análise sensorial estão apresentadas na **Tabela XXII**. Para as amostras provenientes de Vacaria foram designados os mais altos valores para atributos que influenciam negativamente a qualidade do vinho, como a nota herbácea, aroma indesejável, adstringência e amargor. A melhor qualidade sensorial dos vinhos pode ser explicada pela predominância de alguns compostos responsáveis pelo aroma frutado, como por exemplo, acetato de etila, hexanoato de etila e octanoato de etila no caso dos vinhos elaborados no Vale dos Vinhedos e do decanoato de etila para os vinhos de Pinto Bandeira. Além disso, os vinhos de Pinto Bandeira foram caracterizados por quantidades significativas de succinato de dietila, 2-feniletanol e acetato de 2-feniletila, que conferem aroma frutado ao vinho. Os vinhos provenientes de Vacaria foram os menos apreciados provavelmente devido à baixa contribuição de ésteres e altos níveis de ácido

octanóico e álcool isoamílico, que atribuem aos vinhos características aromáticas desagradáveis.

Tabela XXII. Média dos atributos sensoriais dos vinhos base Chardonnay.

Atributo	Amostras				
	VA ^a	VV	FC	PB	VV
Avaliação visual					
Intensidade da cor	2,9 a	2,9 a	2,3 b	2,6 a,c	2,8 a,c
Avaliação olfativa					
Intensidade de aroma	3,4 a	2,8 b	2,8 b	2,6 b	2,9 b
Nota de frutas cítricas	1,9 a	2,4 b	2,5 b	2,4 b	2,6 b
Nota de frutas tropicais	1,6 a	1,7 a	1,6 a	1,4 b	1,8 a,d
Nota floral	1,3 a	1,3 a	1,9 b	1,5 c	1,1 a,d
Nota herbácea	1,1 a	0,9 a	0,4 b	1,6 c	0,4 b,d
Aroma indesejável	2,1 a	0,1 b	0,0 b	0,3 b	0,1 b
Avaliação gustativa					
Intensidade de paladar	3,6 a	3,0 b	2,9 b	2,8 b	3,1 b
Corpo	3,0 a	2,8 a	2,9 a	2,4 b	3,0 a,d
Doçura	2,8 a	1,4 b	1,8 c	1,3 b,d	2,4 e
Acidez	2,5 a	3,6 b	3,3 c	3,7 b,d	3,1 e
Adstringência	0,8 a	0,6 a	0,2 b	0,6 a,c	0,4 a,b
Amargor	1,1 a	0,3 b	0,3 b	0,4 b	0,3 b
Persistência	3,0 a	2,8 a	2,9 a	2,5 b	3,2 a,c

^aamostras provenientes de: VA: Vacaria; VV: Vale dos Vinhedos; FC: Flores da Cunha; PB: Pinto Bandeira; Médias seguidas de mesma letra, na mesma linha não são significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE

4.4.1 Conjunto de colunas

Três conjuntos de colunas foram avaliados com o objetivo de se obter a melhor separação entre os analitos e interferentes da matriz: (i) DB-5 × DB-Wax; (ii) DB-Wax × DB-1ms e (iii) DB-Wax × DB-17ms (maiores detalhes sobre estas colunas

no **item 3.4**). Embora os sistemas ortogonais convencionais sejam os sistemas mais frequentemente utilizados em GC×GC, outros têm se mostrado melhores na caracterização de compostos polares que constituem a maior parte do aroma do vinho.²⁶⁰ As combinações de colunas foram testadas usando-se uma solução padrão contendo 23 compostos, incluindo ésteres, álcoois, terpenos e ácidos (**item 3.2**). O uso do sistema ortogonal convencional (coluna apolar × polar) resultou em ocupação deficiente do espaço de separação. O mesmo foi observado quando o conjunto de colunas ortogonal inverso (polar × apolar) foi utilizado. Entretanto, quando a combinação de colunas polar na ¹D e medianamente polar na ²D foi empregada (DB-Wax×DB-17ms), observou-se uma melhor distribuição dos compostos no espaço de separação, conforme **Figura 13**. O mesmo foi observado por Zhu e colaboradores²⁶⁰, que constataram que o uso de um conjunto de colunas polar × medianamente polar (HP-Innowax, 100% polietilenoglicol × DB-1701, 14% cianopropilfenilmetilpolisiloxano) é mais adequado para a determinação de compostos polares de licor. Robinson e colaboradores¹¹⁷ usaram uma coluna apolar na ¹D e uma coluna medianamente polar na ²D (Varian VF-5MS, 5% difenil/95% dimetil polisiloxano × VF-17MS, 50% difenil/50% dimetil arileno polisiloxano) e os autores justificaram esta escolha devido à menor possibilidade de ocorrência de sangramento das fases estacionárias de ambas as colunas. Entretanto, no diagrama de contorno apresentado por eles pode ser observada uma maior retenção dos compostos polares na segunda coluna, evidenciada pela presença de caudas.

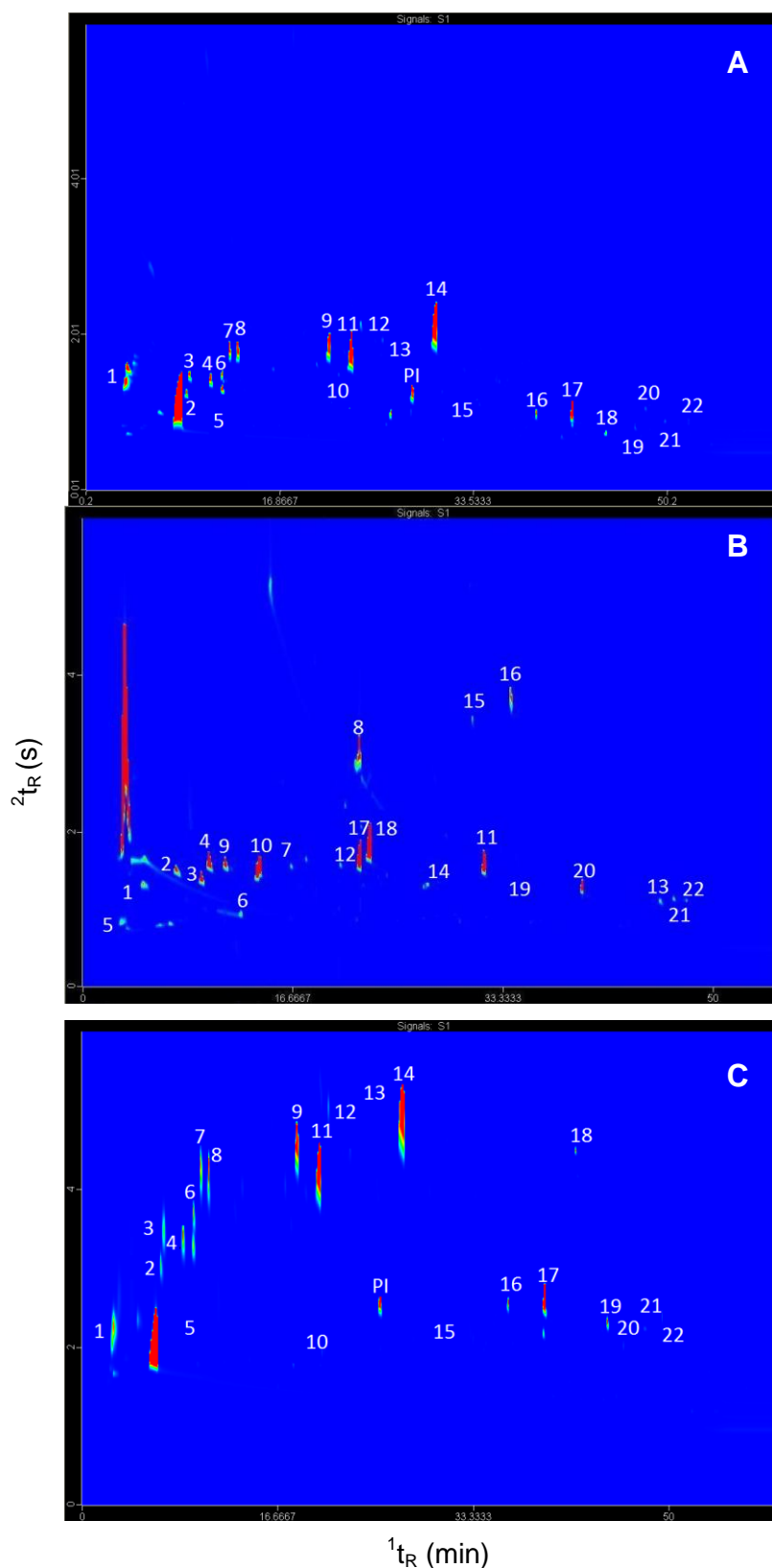


Figura 13. Separação de compostos voláteis de vinho utilizando-se a cromatografia gasosa bidimensional abrangente e os seguintes conjuntos de colunas: **(A)** DB-5 x DB-Wax, **(B)** DB-Wax x DB-1ms e **(C)** DB-Wax x DB-17ms. As condições utilizadas na análises cromatográficas dos padrões estão descritas na **Tabela XII**. Os compostos estão listados na **Tabelas XXIII**; PI: padrão interno (3-octanol).

4.4.2 Período de modulação

Foram testados três diferentes períodos de modulação (P_M): 4, 6 e 7 s (**Tabela XXIII**). Destes, os P_M de 6 s e de 7 s, proporcionaram melhor distribuição de picos no diagrama de cores, bem como a minimização da ocorrência de picos fora de ciclo, conforme se verifica na **Figura 14A, B e C** e na **Tabela XXIII**. Entretanto, quando o P_M de 6 s foi empregado verificou-se que vários picos eluíram em tempo próximo ao final do término da análise na 2D . Desta forma o P_M de 7 s foi escolhido para o restante dos trabalhos.

Tabela XXIII. Tempo de retenção dos compostos padrão nos períodos de modulação de 4, 6 e 7 s.

		Período de modulação (s)		
		4	6	7
Composto		2t_R (s)		
1	Acetato de etila	2,8	2,8	2,8
2	Propanoato de etila	3,7	3,7	3,7
3	2-Metilpropanoato de etila (Isobutirato de etila)	0,3	4,3	4,3
4	Butanoato de etila	0,2	4,1	4,1
5	1-Propanol	2,2	2,2	2,2
6	2-Metilbutanoato de etila	0,4	4,5	4,5
7	Acetato de 3-metilbutila (Acetato de isoamila)	1,2	5,2	5,2
8	Hexanoato de de etila	1,1	5,1	5,1
9	2-Hidróxipropanoato de etila (Lactato de etila)	1,5	5,5	5,5
10	1-Hexanol	2,0	2,0	2,0
11	Octanoato de etila	1,0	5,0	5,0
12	3-Hidróxibutanoato de etila	0,1	4,1	4,1
13	Decanoato de etila	1,2	5,1	5,1
PI	3-Octanol	2,8	2,8	2,8
14	Butanodioato de dietila (succinato de dietila)	1,8	5,8	5,8
15	α -Terpineol	2,2	2,2	2,2
16	Acetato de 2-feniletila	1,1	5,1	5,1
17	Ácido hexanóico	1,1	1,1	1,1
18	2-Feniletanol	2,9	2,9	2,9
19	Ácido octanóico	1,8	1,8	1,8
20	Eugenol	2,8	2,8	2,8
21	Ácido decanóico	1,7	1,7	1,7
22	Ácido dodecanóico	1,9	1,9	1,9

PI = padrão interno

O período de modulação deve ser ajustado para que este seja compatível com o tempo de separação dos componentes na segunda coluna, o que minimiza o alargamento das bandas cromatográficas que foram comprimidas pelo uso do modulador. Desta forma, pode ocorrer incremento da sensibilidade e aumento da resolução na GCxGC, se comparada à 1D-GC. Além disso, a investigação de diferentes períodos de modulação também busca a melhor distribuição dos analitos, bem como dos interferentes, no espaço de separação, o que diminui a probabilidade de coeluição entre os analitos e dos analitos com os constituintes da matriz.^{261, 262}

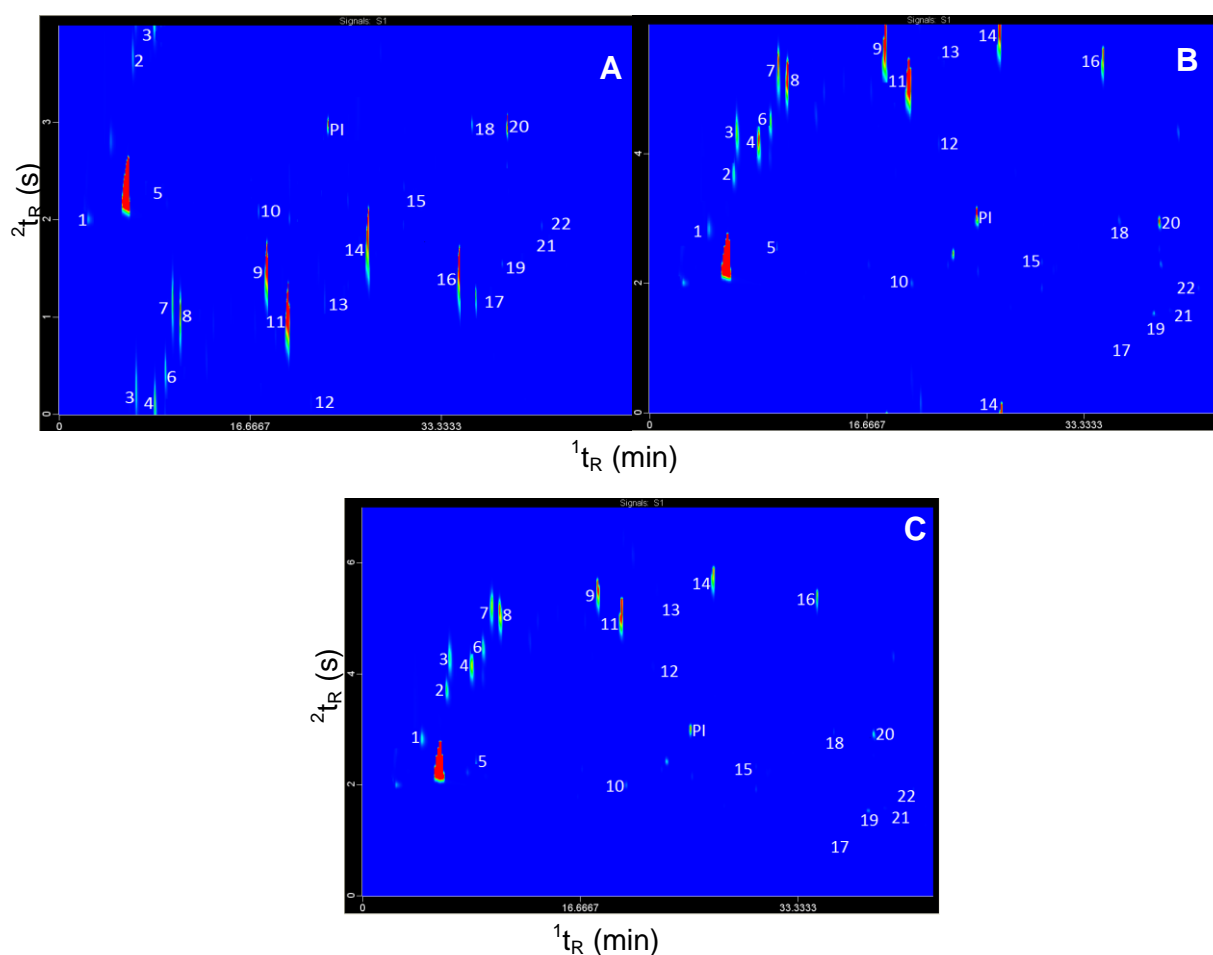


Figura 14. Distribuição de 22 compostos voláteis de vinho empregando-se o conjunto de colunas DB-Wax x DB-17ms em diferentes períodos de modulação **(A)** 4 s, **(B)** 6 s e **(C)** 7 s. As condições utilizadas na análises cromatográficas dos padrões estão descritas na **Tabela XII**. Os compostos estão listados na **Tabela XXIII**; PI: padrão interno (3-Octanol).

4.4.3 Diferença de temperatura (ΔT) entre o forno primário e secundário

Diferenças de temperatura de 10, 20, 40 e 50°C entre o forno primário e o secundário foram testadas para o conjunto de colunas DB-Wax x DB-17ms. Na **Figura 15** observa-se que quanto menor a diferença de temperatura entre os dois fornos, melhor é a distribuição dos picos cromatográficos no espaço de separação. O emprego de 40 e 50°C (**Figura 15C e D**) acelerou a eluição dos compostos, fazendo com que a separação dos mesmos na 2D se restringisse a um espaço menor, diminuindo a qualidade da separação. Desta forma, foi escolhida uma diferença de temperatura entre os fornos de 10°C para as análises subsequentes.

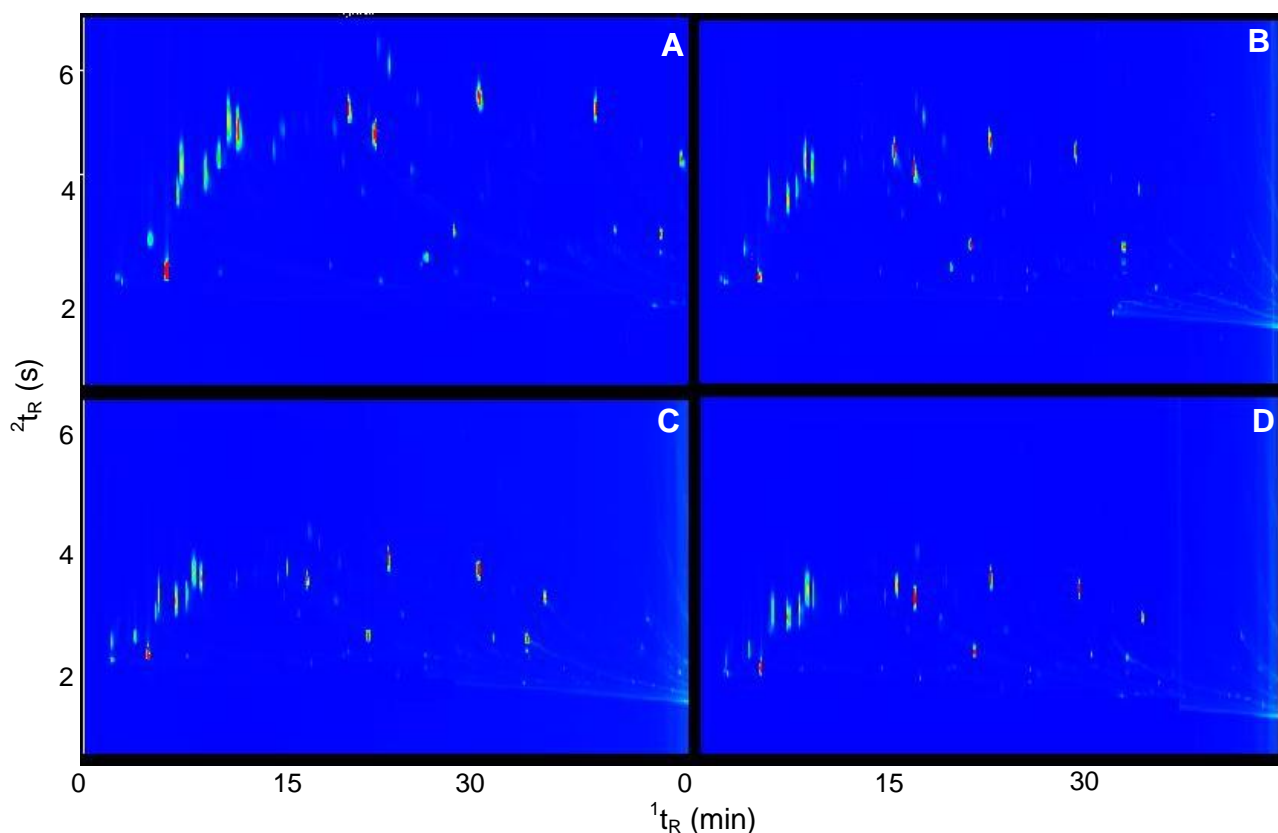


Figura 15. Distribuição de 22 compostos voláteis de vinho no espaço de separação empregando-se o conjunto de colunas DB-Wax x DB-17ms e diferenças de temperatura de **(A)** 10, **(B)** 20, **(C)** 40 e **(D)** 50°C entre os dois fornos. As condições utilizadas na análises cromatográficas dos padrões estão descritas na **Tabela XII**.

4.4.4 Duração do jato quente

A duração do jato quente e do jato frio é um fator importante na análise, pois pode influenciar no formato e intensidade dos picos. Para os analitos mais voláteis, deve-se ajustar o jato frio de forma que este seja suficientemente longo para amostrar e concentrar a banda cromatográfica deste tipo de composto. Neste contexto, poucos artigos científicos reportam o uso de diferentes jatos quentes para otimização da condição cromatográfica.¹⁴⁴ O manual do equipamento recomenda a utilização de um jato quente, cuja duração seja 20 a 25% do período de modulação, sendo que este tempo deve ser obrigatoriamente menor do que 50% do P_M .²⁶³ Um menor tempo de duração de jato quente pode implicar na retenção de analitos e conseqüente aparecimento de caudas. Por isso, a otimização do tempo de duração dos jatos traz vantagens analíticas e pode ser feita para os diferentes tipos de compostos. O tempo de duração do jato frio é automaticamente determinado pela escolha do tempo de duração do jato quente.

Diferentes durações do jato quente foram testadas, tais como: 0,7; 1,4 e 2,1 segundos, sendo que o valor máximo dentre os valores investigados corresponde a 30% do P_M .

A **Tabela XXIV** apresenta os fatores de assimetria na 2D (2A_s) para os picos cromatográficos referentes aos compostos estudados. Os valores de 2A_s menores ou iguais a 0,8 ou maiores ou iguais que 1,2 estão destacados em negrito e itálico. Para uma duração de 2,1 s de jato quente, o formato dos picos correspondentes a 8 compostos pode ser considerado distorcido: 2-metilbutanoato de etila, 1-hexanol, decanoato de etila, acetato de 2-feniletila, ácido hexanóico, eugenol, ácido decanóico e ácido dodecanóico. Sete décimos de segundo para o jato quente resultou em 4 picos cromatográficos fora do intervalo ideal de valores para o fator de assimetria: hexanoato de etila e ácidos hexanóico, decanóico e dodecanóico. O menor número de picos cromatográficos (2) distorcidos e, portanto, melhor simetria dos picos, foi obtido com um jato quente de 1,4 s. Neste caso, apenas os ácidos decanóico e dodecanóico mostraram fatores de assimetria fora do intervalo de valores recomendados.

Tabela XXIV. Fator de assimetria (2A_s) e respectivo desvio padrão (entre parênteses) para os picos na 2D , com a utilização de diferentes durações de jato quente e do conjunto de colunas DB-Wax × DB-17ms. Os compostos voláteis que apresentaram picos cromatográficos com 2A_s fora do intervalo considerado satisfatório (0,8 -1,2) estão destacados em negrito e em itálico.

Composto	0,7	1,4	2,1
Acetato de etila	1,1 (0,08)	1,2 (0,00)	1,1 (0,03)
Propanoato de etila	1,1 (0,05)	1,1 (0,04)	1,1 (0,05)
2-Metilpropanoato de etila (Isobutirato de etila)	1,1 (0,12)	1,0 (0,06)	1,1 (0,04)
Butanoato de etila	1,0 (0,06)	1,2 (0,03)	1,1 (0,10)
1-Propanol	1,0 (0,29)	1,1 (0,00)	0,9 (0,87)
2-Metilbutanoato de etila	1,0 (0,48)	1,0 (0,21)	0,6 (0,16)
Acetato de 3-metilbutila (Acetato de isoamila)	1,1 (0,12)	1,1 (0,06)	1,0 (0,11)
Hexanoato de etila	0,7 (0,23)	1,0 (0,36)	0,9 (0,20)
2-Hidróxipropanoato de etila (Lactato de etila)	0,9 (0,08)	1,0 (0,03)	1,0 (0,08)
1-Hexanol	0,9 (0,11)	1,0 (0,08)	0,7 (0,21)
Octanoato de etila	1,0 (0,87)	0,9 (0,28)	1,0 (0,87)
3-Hidróxi-butanoato de etila	1,1 (0,02)	0,9 (0,00)	1,1 (0,01)
Decanoato de etila	0,7 (0,04)	1,0 (0,02)	0,8 (0,04)
Butanodiato de dietila (Succinato de dietila)	0,9 (0,05)	1,0 (0,01)	1,0 (0,02)
α-Terpineol	0,9 (0,00)	1,1 (0,01)	1,0 (0,05)
Acetato de 2-feniletila	1,0 (0,03)	1,1 (0,02)	0,6 (0,01)
Ácido hexanóico	0,8 (0,02)	1,0 (0,00)	0,7 (0,06)
2-Feniletanol	1,2 (0,18)	1,0 (0,20)	1,1 (0,18)
Ácido octanóico	1,0 (0,02)	1,0 (0,05)	1,0 (0,03)
Eugenol	1,0 (0,03)	1,0 (0,03)	0,6 (0,07)
Ácido decanóico	1,9 (0,04)	1,5 (0,02)	2,2 (0,01)
Ácido dodecanóico	2,0 (0,05)	1,9 (0,03)	2,1 (0,05)

4.5 APLICAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS OBTIDAS PARA GC×GC À ANÁLISE DE VINHOS CHARDONNAY

As condições otimizadas para a análise das amostras de vinho base Chardonnay por GC×GC são as seguintes: conjunto de colunas DB-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) × DB-17ms (1 m x 0,18 mm x 0,18 μm), diferença de

temperatura entre os fornos de 10°C, período de modulação de 7 s e 1,4 s de duração do jato quente.

A **Figura 16A** mostra a estruturação das classes de compostos observada com a utilização da mistura de compostos padrão. Os ácidos eluem por último na ¹D, a temperaturas mais altas, devido a sua maior interação com a fase estacionária, localizando-se na região inferior do plano de separação. Por outro lado, a maior parte dos ésteres apresenta maior retenção na ²D, enquanto para os álcoois verificam-se tempos de retenção intermediária entre estes dois grupos de compostos.

A estruturação das classes observada para os compostos padrão (**Figura 16A**) foi observada também para as diferentes classes de compostos voláteis (ésteres, aldeídos e cetonas, álcoois, ácidos tióis e lactonas) de vinhos elaborados a partir de uvas da cultivar Chardonnay ao se utilizar o conjunto de colunas polar x medianamente polar (**Figura 16B**). Esta distribuição organizada de compostos, de acordo com suas estruturas moleculares, não foi verificada quando outros conjuntos de colunas foram testados (apolar x polar e polar x apolar, conforme **Figura 13A e 13B**). Da mesma forma como ocorreu com a mistura de padrões (**Figura 16A**), os ácidos foram bastante retidos na ¹D, enquanto os ésteres eluíram em ²t_R maiores e os álcoois em ²t_R intermediários. As linhas apresentadas na **Figura 17** representam a tendência de distribuição destes compostos de acordo com a sua estrutura molecular. Zhu e colaboradores²⁶⁰ verificaram a presença de compostos estruturalmente similares distribuídos ordenadamente no diagrama de cores ao utilizar o conjunto de colunas polar (HP-innowax) x medianamente polar (DB-1701 x 14% cianopropilfenilmetilpolisiloxano) na análise de licores. A presença de cinco tipos de séries homólogas, incluindo etil-ésteres, metil-cetonas, álcoois primários, álcoois secundários e ácidos, foi observada.²⁶⁰ Na análise dos vinhos do Rio Grande do Sul, em que a coluna utilizada na segunda dimensão (DB-17ms: 50% fenil-50% dimetil polisiloxano), difere daquela empregada para o estudo dos compostos voláteis de licor (DB-1701: 14% cianopropilfenilmetilpolisiloxano).²⁶⁰

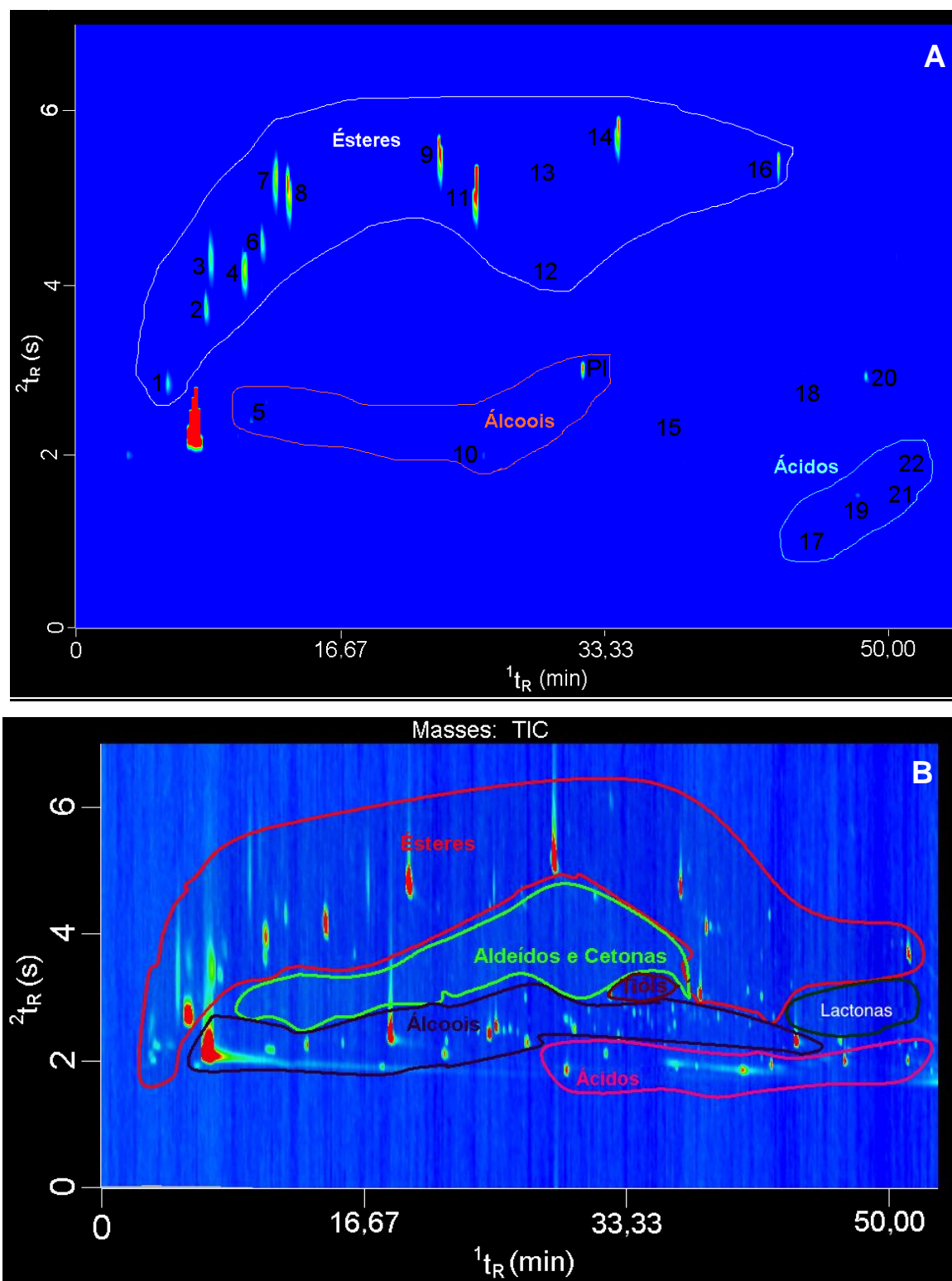


Figura 16. Diagrama de cores que demonstra a distribuição estruturada das classes de **(A)** compostos padrão listados na **Tabela XXIII** e **(B)** compostos voláteis de vinhos Chardonnay obtidos com um conjunto de colunas DB-Wax (polar) × DB17ms (medianamente polar). Demais condições de análise constam do **item 3.4**.

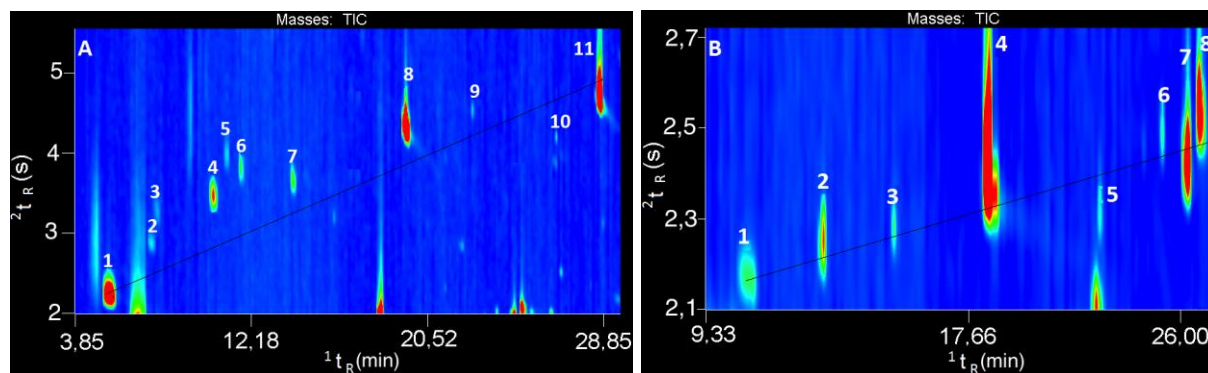


Figura 17. Distribuição de alguns compostos voláteis do *headspace* de vinho Chardonnay no diagrama de cores de **(A)** ésteres estruturalmente similares: (1) *acetato de etila*, (2) *propanoato de etila*, (3) 2-metil propanoato de etila, (4) *butanoato de etila*, (5) 2-metil butanoato de etila, (6) *pentanoato de etila*, (7) acetato de isoamila (3-metil etanoato de etila), (8) *hexanoato de etila*, (9) *heptanoato de etila*, (10) octanoato de metila, (11) *octanoato de etila* e **(B)** álcoois estruturalmente similares: (1) *1-propanol*, (2) 2-metil-propanol, (3) *1-butanol*, (4) 3-metil-1-butanol, (5) *1-pentanol*, (6) 3-metil-1-pentanol, (7) *1-hexanol*, (8) etil-hexanol. As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**.

Em torno de 30 a 60 compostos voláteis e semi-voláteis têm sido tentativamente identificados através do uso da GC/qMS na análise de vinhos provenientes de diferentes cultivares de uva, quando técnicas de extração tais como HS-SPME^{40, 264} ou extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês: *stir bar sorptive extraction*)^{91, 265} são utilizadas. Neste trabalho, a utilização da GC/qMS para a análise de vinhos Chardonnay elaborados no Rio Grande do Sul possibilitou a identificação tentativa de 32 compostos voláteis relacionados ao aroma destes vinhos. Entretanto, sabe-se que o número de compostos tentativamente identificados em outros vinhos, quando do uso de HS-SPME-GCxGC/TOFMS é bem maior. A exemplo disto, foram tentativamente identificados 350 compostos no *headspace* de amostras de vinho *Cabernet Sauvignon* da Austrália.¹¹⁷

O método otimizado no presente estudo, em que utilizou-se a GCxGC/TOFMS, possibilitou a identificação tentativa de 313 compostos extraídos pela HS-SPME de vinho Chardonnay (**Anexos - Tabela XXXI**). A comparação dos espectros de massas com aqueles da biblioteca de espectros de massas NIST (versão 2005) e dos LTPRI experimentalmente obtidos com dados de literatura^{40, 190, 201, 205, 207, 259} permitiu a identificação tentativa de 273 compostos e para os demais

(40), a classe de compostos foi tentativamente identificada pela comparação dos espectros de massas dos compostos desconhecidos com aqueles da biblioteca de espectros de massas. Entre os grupos de compostos tentativamente identificados (**Anexos - Tabela XXXI**) observou-se que os ésteres estão presentes em maior número (95), seguido pelos álcoois (72), ácidos (27), cetonas (24), terpenos (22), lactonas (20), aldeídos (19), furanos (11), fenóis (8), compostos sulfurados (8), pirróis (5) e C13-norisoprenóides (3). Outros estudos baseados no uso da GC/qMS também identificaram tentativamente os ésteres como os compostos mais abundantes em vinhos Chardonnay da Macedônia e Hungria¹¹⁴ e de vinhos de variedades como Merlot e Cabernet Sauvignon^{40, 266}. Contudo, este é o primeiro trabalho que utiliza a GC×GC para a análise de vinhos Chardonnay. Os ésteres contribuem principalmente com notas frutais para o aroma destes produtos, com destaque para os ésteres etílicos e acetatos, cujas concentrações são frequentemente mais altas do que seu valor olfativo limiar, definido como a menor quantidade necessária para que um indivíduo detecte seu aroma.²⁶⁷ Os ésteres investigados neste trabalho e presentes em maiores quantidades nos vinhos Chardonnay elaborados no Rio Grande do Sul analisados são os seguintes (os números que se seguem aos nomes indicam os mesmos compostos na **Tabela XXXI - Anexos**: 2-hidróxi-propanoato de etila (lactato de etila, 161), octanoato de etila (169), succinato de dietila (191), 2-hidróxi-butanodioato de dietila (maleato de dietila, 210) e 2-hidróxi-propanoato de 3-metilbutila (lactato de isoamila, 185). Estes compostos estão relacionados ao aroma frutado dos vinhos, com exceção do succinato de dietila (191), que pode contribuir com notas florais ao aroma.²⁸ Jiang e Zhang¹¹³ verificaram que o acetato de etila, acetato de isoamila e o octanoato de etila estão entre os ésteres predominantes de vinhos Chardonnay elaborados na região de Loess Plateau na China.

Uma parte da distribuição dos compostos no espaço bidimensional de separação está mostrada no diagrama tridimensional da **Figura 18**. Esta imagem confirma, sob um outro ângulo, que a 1D-GC não foi suficiente para que se obtivesse a separação dos compostos voláteis do vinho Chardonnay. Nas amostras de vinhos Chardonnay, por exemplo, 161 compostos apresentam possibilidade de coeluição na ¹D. A **Figura 19** mostra em detalhe uma parte do cromatograma bidimensional, onde se observa a importância da coluna da 2ª dimensão para a separação do undecanoato de etila (195) e da 5H-2-furanona (279), que contribuem

com aroma de coco e amanteigado, respectivamente.²⁸ Estes compostos apresentam o mesmo 1t_R na coluna polar, mas devido às diferentes volatilidades, foram separados na coluna da segunda dimensão que possui polaridade média.

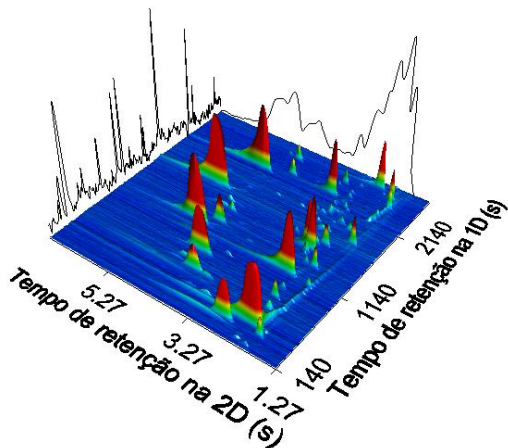


Figura 18. Diagrama tridimensional de parte do diagrama de cores mostrado na **Figura 16B**, apresentando também a reconstrução dos cromatogramas da 1D e 2D de amostra de vinho Chardonnay. As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**.

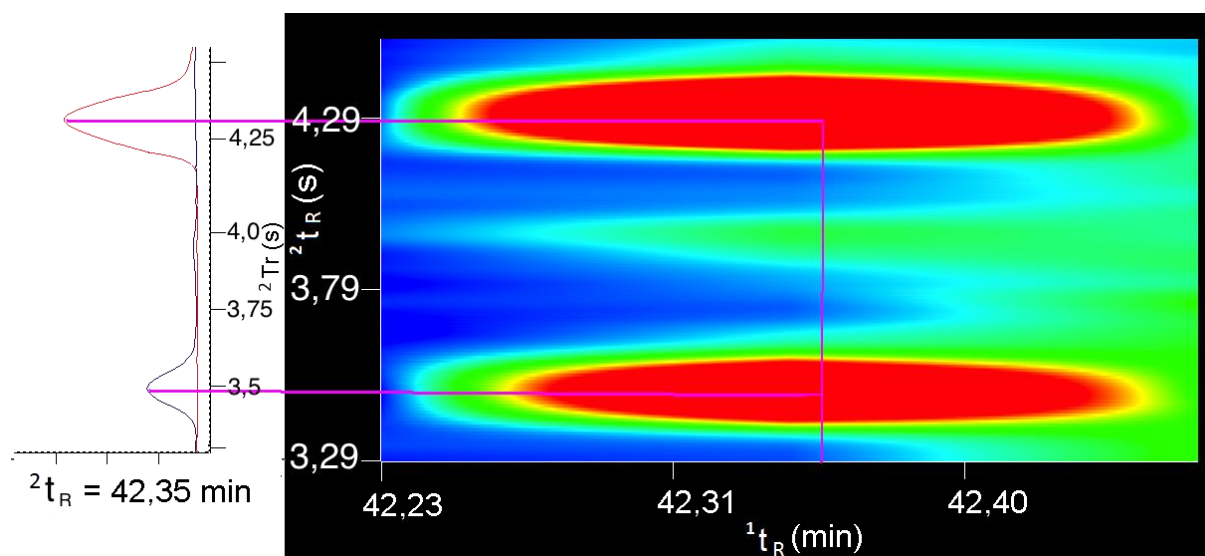


Figura 19. Parte do diagrama de cores apresentado na **Figura 16B** mostrando a coeluição de undecanoato de etila ($^1t_R = 42,35$ min, $^2t_R = 4,30$ s, 195 na **Tabela XXXI-Anexos**) e 5H-2-furanona ($^1t_R = 42,35$ min, $^2t_R = 3,50$ s, 279 na **Tabela XXXI-Anexos**). As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**.

A **Figura 20** mostra que quatro picos estão sobrepostos na ¹D. A deconvolução espectral baseada nas diferenças no espectro de massas é útil nesse caso, especialmente para o 4-etil-2-metóxi-fenol (4-etil-guaicol, 296) e miristato de isopropila (206), pois estes compostos também coeluíram na ²D. O 4-etilguaiaicol, quando presente em elevadas concentrações (>600 µg L⁻¹) atribui ao vinho aroma de fumaça.²⁸ Em relação à contribuição do miristato de isopropila para o aroma, nenhuma informação foi encontrada na literatura científica, embora sua descrição organoléptica em site comercial da área da perfumaria seja a de um aroma oleoso suave, sendo reportado como solvente para fragrâncias.²⁶⁸ Na **Figura 20B**, os espectros de massas dos quatro compostos foram comparados com espectros de massas da biblioteca NIST 2005. Outros 20 compostos também apresentaram o mesmo tempo de retenção tanto na ¹D, quanto na ²D e foram identificados apenas com o uso da deconvolução espectral.

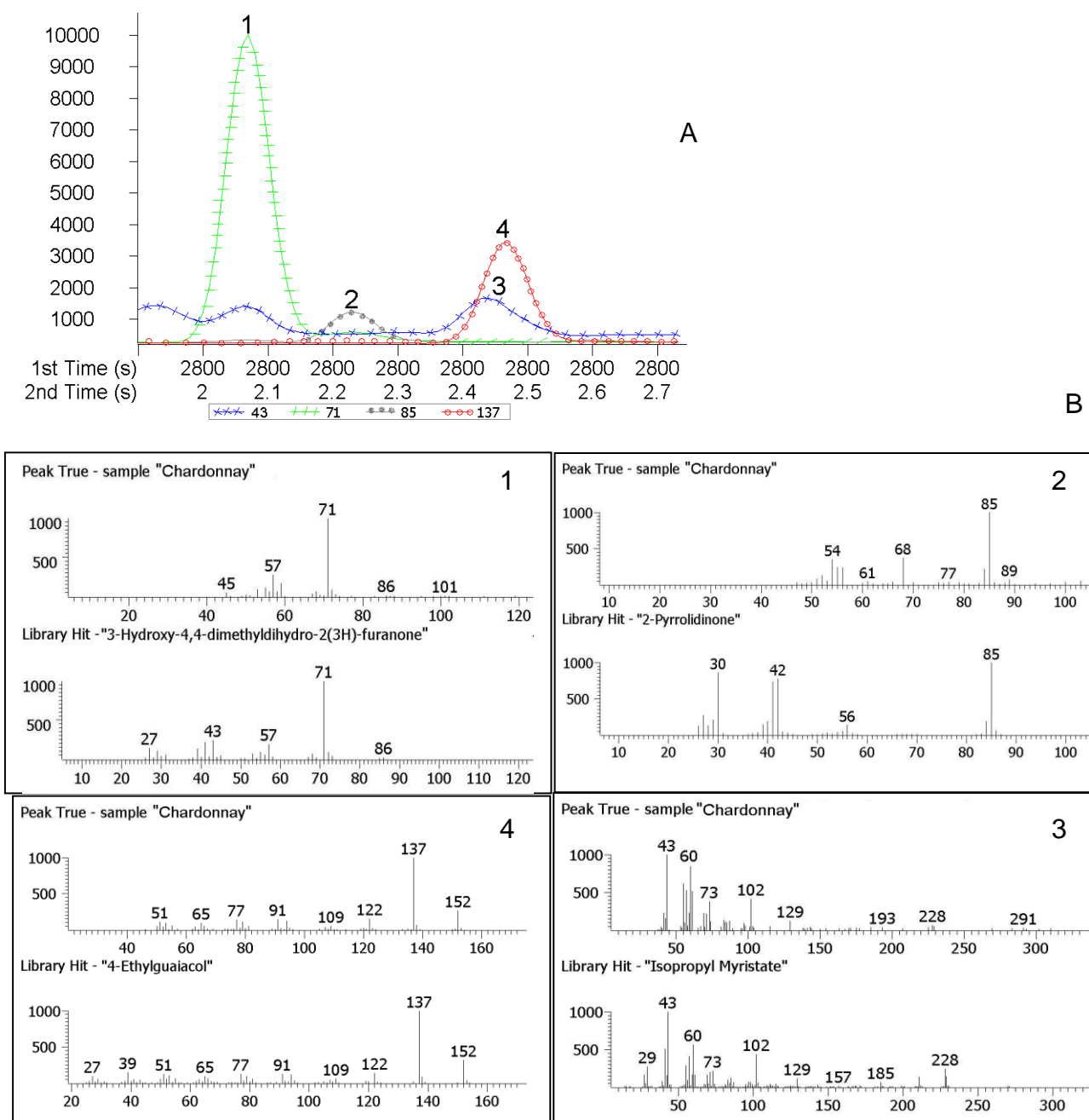


Figura 20. Coeluição de picos cromatográficos de compostos voláteis de vinhos Chardonnay determinados por HS-SPME-GC×GC/TOFMS: **(A)** parte do cromatograma dos picos modulados de quatro compostos que coeluíram na 1D : (1) linha verde, 3-hidróxi-4,4-dimetil-2(5H)-furanona (284), m/z 71; (2) linha cinza, 2-pirrolidinona (304), m/z 85; (3) linha azul, miristato de isopropila (206), m/z 43; (4) linha vermelha, 4-etil-guaicol (296), m/z 137. **(B)** espectros de massas deconvoluídos dos compostos e os respectivos espectros de massas da biblioteca NIST 2005 na **Figura 20A**. As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**.

4.6 ÍNDICE DE RETENÇÃO COM PROGRAMAÇÃO LINEAR DE TEMPERATURA OBTIDO EM CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE EM COLUNA DB-WAX (POLAR) × DB-17MS (MEDIANAMENTE POLAR)

Neste trabalho, os LTPRI calculados a partir de dados obtidos para 22 compostos padrão em conjunto de colunas polar (100% polietilenoglicol) × medianamente polar (50% fenil-50% dimetil polisiloxano), por GC×GC/TOFMS, foram comparados com os valores de LTPRI de referência de 1D-GC da literatura científica e estão apresentados na **Tabela XXV**. Os dados evidenciam que foi possível obter LTPRI polares semelhantes aos que foram determinados experimentalmente, a partir de várias fontes de literatura. É interessante observar que, na maior parte das vezes, as diferenças observadas entre valores experimentais e de literatura para os LTPRI podem ser criticamente examinadas, descartando-se o que não segue uma lógica dentro do quadro global de dados sob avaliação em um dado trabalho. Para exemplificar, pode-se observar as diferenças encontradas entre os LTPRI experimentais (**Tabela XXV**) e os encontrados por Verzera e colaboradores,¹⁸⁷ que estão listados entre parênteses logo após os LTPRI que se seguem: 943 (5), 1029 (8), 1225 (5), 1356 (5), 1430 (zero), 1915 (26), 2268 (14). Os cinco primeiros compostos listados (propanoato de etila, butanoato de etila, hexanoato de etila, 1-hexanol e octanoato de etila) apresentam diferenças de LTPRI menores do que 10 unidades, enquanto o 2-feniletanol apresenta uma diferença de 26 e o ácido decanóico, de 14 unidades. A fase estacionária empregada por estes pesquisadores também se constituía de polietilenoglicol, entretanto foram usadas diferentes rampas de aquecimento do forno (temperatura inicial de 45°C mantida 5 min, depois o forno foi aquecido até 80°C a 10°C/min, até 240°C a 2°C/min),¹⁸⁷ o que pode prejudicar a qualidade dos dados obtidos.^{269, 270} De forma semelhante, Tao e colaboradores¹⁸⁶ empregaram diferentes taxas de aquecimento durante a análise: temperatura inicial de 40°C mantida 4 min, depois o forno foi aquecido até 50°C a 3°C/min, até 120°C a 5°C/min, até 175°C a 7°C/min, e finalmente até 230°C a 10°C/min, onde permaneceu por 8 minutos). Neste caso foram observadas diferenças menores do que 20 unidades entre os LTPRI experimental e os obtidos por aqueles autores: 984 (9), 1038 (2), 1225 (19), 1430 (16), 1644 (7), 1699 (1), 1862 (1), 1915 (16), 2068 (16).

Tabela XXV. Índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI) de 22 compostos padrão, obtidos experimentalmente através da GCxGC, utilizando-se o t_R e os LTPRI reportados pela literatura científica para 1D-GC.

Composto	CAS	LTPRI _{exp} ^a	LTPRI _{lit} ^b
Acetato de etila	141-78-6	894	882 [*] , 884 ²⁰² ♦, 885 ^{*186} ♦, 888 [*] , 889 ²⁰⁵ , 890 ^{*189} ♦, <u>898</u> ²⁰⁹ , 900 ²¹¹ , 926 ¹⁹⁶
Propanoato de etila	105-37-3	943	915 ²⁰⁷ , <u>938</u> ¹⁸⁷ , 953 ²⁰² ♦, 205, 956 ¹⁸⁹ ♦
2-Metilpropanoato de etila (Isobutirato de etila)	97-62-1	962	955 ²⁰⁷ , <u>962</u> ²⁰⁵ , 965 ^{40,189} ♦
Butanoato de etila	105-54-4	1029	984 ²⁰² ♦, 1022 ²⁰⁷ , <u>1032</u> ^{204,165} , 1037 ¹⁸⁷ , 1039 ²⁰⁵ , 1040 ²¹⁴ ♦, 1041 ⁴⁰
1-Propanol	71-23-8	1033	1029 ²⁰⁷ , <u>1035</u> ²⁵⁹ , 1036 ¹⁸⁶ ♦
2-Metilbutanoato de etila	7452-79-1	1050	1035 ²⁰⁷ , 1040 ¹⁹⁹ , 1045 ^{200,165} , 1047 ²⁷¹ ♦, 1048 ²⁰² ♦, 204, <u>1051</u> [*] , 1055 ²⁰⁵ , 1056 ²¹⁴ ♦, 1057 ⁴⁰
Acetato de 3-metilbutila (Acetato de Isoamila)	123-92-2	1135	1121 ²²⁷ , 1125 ¹⁸⁸ , <u>1127</u> ²⁰⁴ , 1145 ²³⁵
Hexanoato de etila	123-66-0	1225	<u>1223</u> ²⁰⁷ , 1230 ^{187,202} ♦, 201, 165, 1231 ^{203,217} ♦, 1232 ^{*193} ♦, 206♦, 211, 1235 ²⁵⁹ , 1236 ^{205,214} ♦, 1237 ^{188,204} , 1238 [*] , 1239 ⁴⁰ , 1240 ²²² , 1244 ¹⁸⁶ ♦
2-Hidróxipropanoato de etila (Lactato de etila)	97-64-3	1354	1317 ²¹⁸ ♦, 1331 ²⁰⁷ , 1334 ²⁵⁹ , 1339 ²⁰² ♦, <u>1353</u> ^{188,201} , 1363 ²¹⁷ ♦
1-Hexanol	111-27-3	1356	1332 ²²³ , 1341 ²⁵⁹ , 1342 ²⁰⁷ , 1343 ²⁰⁴ , 1344 ^{191,211} , 1347 ²²⁰ , 1348 ²⁰⁵ , 1350 ^{195,219} , 1351 ^{187,272} , 1353 ^{199,218} ♦, 1354 ^{165,271} ♦, 23♦, 1355 ^{212,226} , <u>1356</u> ²⁰¹ , 1357 ²⁰⁶ ♦, 1358 ¹⁹³ ♦, 1360 ^{273,222} , 1368 ¹⁸⁸ , 1371 [*] , 1392 ¹⁸⁶ ♦, 1425 ⁴⁰
Octanoato de etila	106-32-1	1430	1424 ²⁰⁷ , 1429 ²⁰⁴ , <u>1430</u> ^{187,217} ♦, 201, 1431 ²⁰² ♦, 165, 1435 ²⁰⁶ ♦, 23♦, 1436 ^{*203} , 1446 ^{40,186} ♦
3-Hidróxibutanoato de etila	52089-54-0	1517	1475 ²⁰² ♦, <u>1524</u> ²⁰¹
Decanoato de etila	110-38-3	1644	1610 ²⁵⁹ , 1629 ²⁰⁷ , 1634 [*] , 1633 ¹⁶⁵ , 1635 ^{201,211} , 1637 ²⁰² ♦, 203, 1638 ²⁰⁶ ♦, 1639 ¹⁸⁷ , 1641 ²³ ♦, <u>1645</u> ²²⁷ , 1648 ⁴⁰ , 1651 ¹⁸⁶ ♦, 1662 ²⁰⁴ , 1684 ¹⁸⁸
Butanodiato de dietila (succinato de dietila)	123-25-1	1686	1667 ²⁰⁷ , 1670 ²⁰³ , 1672 ²⁰⁶ ♦, 1673 ²³ ♦, 1675 ²⁰² ♦, 1677 ²²⁹ , <u>1687</u> ⁴⁰ , 1689 ²²⁷ , 1690 ²⁰¹ , 1701 ¹⁸⁶ ♦

Continuação Tabela XXV

Composto	CAS	LTPRI _{exp} ^a	LTPRI _{lit} ^b
Acetato de 2-feniletila	103-45-7	1799	1796 ²²⁰ , <u>1800²⁰⁴</u> , 1801 ²⁵⁹ , 1805 ²⁰⁷ , 1810 ²³ ♦, 1815 ¹⁸⁸ , 1829 ²⁰⁵ , 1847 ⁴⁰
Ácido hexanóico	142-62-1	1862	1733 ²²¹ ♦, 1802 ²⁷³ , 1814 ²⁷¹ ♦, 1820 ¹⁶⁵ , 1823 ²¹⁸ ◦, 1825 ²⁷⁴ ♦, 1838 ²⁰¹ , 1840 ¹⁹³ ♦, 203, 207, 1841 ²⁰² ♦, 1842 ²²⁷ , 1845 ¹⁸⁸ , 1846 ^{200, 204} , 1849 ²⁷⁵ ♦, 1851 ^{187, 222} , 1858 ²¹⁵ , <u>1861⁴⁰</u> , 1863 ¹⁸⁶ ♦, 1871 ²¹⁷ ♦, 1873 ²²⁰ , 1875 ^{195, 219}
2-Feniletanol	60-12-8	1915	1888 ²²⁴ ♦, 1891 ¹⁹⁹ , 1896 ²⁰⁷ , 1898 ¹⁶⁵ , 1902 ²¹⁸ ◦, 1905 ²⁰¹ , 1906 ²⁰⁰ , <u>1914²²²</u> , 1923 ¹⁸⁸ , 1931 ^{40, 186} ♦, 1941 ¹⁸⁷ , 1950 ²²⁰
Ácido octanóico	124-07-2	2068	2011 ²⁷³ , 2039 ²¹⁸ , 2050 ²⁰³ , 2051 ^{193, 192} , 2053 ²¹¹ , 2056 ²⁰² , 2057 ¹⁶⁵ , 2058 ²⁰⁴ , 2060 ^{259, 201} , 2064 ¹⁸⁷ , <u>2067²²²</u> , 2072 ²¹⁵ , 2076 ^{188, 206} ♦, 2083 ^{40, 186} ♦, 209, 227, 2091 ²²⁰ , 2092 ²¹⁹
2-Metóxi-4-(2-propenil)fenol (Eugenol)	97-53-0	2184	2139 ²²⁴ , 2149 ²³ ♦, 2153 ²¹² , 2157 ²⁰⁶ ♦, 2175 ²⁰⁹ , <u>2184¹⁹⁰</u> , 2192 ¹⁹⁴
Ácido decanóico	334-48-5	2262	2258 ²¹⁸ ◦, <u>2261¹⁸⁸</u> , 2264 ²¹¹ , 2269 ²⁰² ♦, 2270 ²⁷³ , 2276 ¹⁸⁷ , 2281 ²²² , 2282 ²⁵⁹ , 2294 ²¹⁵ , 2296 ¹⁸⁶ ♦, 2314 ⁴⁰
Ácido dodecanóico	143-07-7	2486	2439 ²³⁵ , 2471 ²³⁴ ♦, <u>2485²²⁹</u> , 2517 ²³⁹ ♦

^aLTPRI_{exp}: Índices de retenção com programação linear de temperatura obtidos experimentalmente no conjunto de colunas polar (DB-Wax, 100% polietilenoglicol) x medianamente polar (DB17ms, 50% fenil-50% polidimetilsiloxano)

^bLTPRI_{lit}: LTPRI da literatura obtidos em coluna polar através da GC/qMS; LTPRI sublinhados são os que mais se aproximam dos valores experimentais

◦ Não especifica como os índices de retenção foram calculados

♦ Trabalhos nos quais se fez menção ao uso da equação de Kováts para o cálculo dos índices de retenção e foi utilizada temperatura programada para separação dos compostos no GC.

No que diz respeito aos índices de retenção obtidos a partir de colunas polares, a variabilidade dos resultados é grande, o que dificulta comparações com diferentes fontes da literatura.¹⁴⁸ As diferenças observadas podem atingir entre 10 e 50 unidades, ao passo que nas colunas apolares, a reprodutibilidade fica restrita a poucas unidades.¹⁰⁵ As grandes diferenças observadas em índices de retenção obtidos de colunas polares são atribuídas à pouca solubilidade dos alcanos lineares em fases polares, bem como à adsorção interfacial dos mesmos na fase estacionária.^{276, 277} Os desvios nos dados obtidos podem também estar relacionados à heterogeneidade entre as colunas produzidas por diferentes fabricantes, erros na utilização da cromatografia gasosa (taxa inadequada de aquecimento da coluna, análises que misturam períodos de programação de temperatura e outros de temperatura constante, quantidade de amostra injetada inadequada, etc), a possível reatividade entre o analito e a fase estacionária, ao tempo de uso da coluna cromatográfica, a diferenças no fluxo do gás de arraste, na espessura da fase estacionária ou na rampa de programação de temperatura.^{148, 243, 278} Na literatura, também se observa que muitos trabalhos empregam temperatura programada para a separação dos compostos, mas utilizam o cálculo do índice de Kováts para determinação do RI, o que pode levar a resultados equivocados.^{23, 58, 165, 186, 189, 192, 202, 206, 208, 214, 217, 221, 224, 234, 241, 242, 244, 249, 251, 252, 271, 274, 279, 280}

A consulta aos trabalhos científicos reportados na **Tabela XXV**, possibilitou que se obtivesse diversos valores de LTPRI de coluna polar, sendo que, para os LTPRI de referência mais próximos aos dados experimentais deste trabalho, a maior diferença de valores foi de oito unidades para o índice 1035 do acetato de isoamila e de sete unidades para o índice 1029 do butanoato de etila, determinados neste trabalho. O que se verifica, portanto, é que existe a necessidade de consulta a um número maior de trabalhos na literatura científica, sendo a variabilidade dos LTPRI de colunas polares associada a escassez de bancos de dados disponíveis destes índices, dois fatores que dificultam a utilização bem sucedida dos mesmos. No entanto, à medida que bancos de dados mais completos estiverem disponíveis, esta tarefa poderá ser facilitada.

A relação linear entre os LTPRI obtidos experimentalmente por GCxGC/TOFMS (conjunto de colunas: DB-Wax, 100% polietilenoglicol x DB17ms, 50% fenil-50% polidimetilsiloxano) e os LTPRI de referência de 1D-GC em coluna

polar constam na **Figura 21**. O coeficiente de determinação (r^2) para esta reta foi de 0,998, de forma que este gráfico valida a relação linear entre os LTPRI determinados experimentalmente a partir de GCxGC/TOFMS e aqueles obtidos por 1D-GC da literatura para 22 compostos representativos do aroma de vinho, em sistemas cromatográficos polares do tipo usado neste trabalho. Os dados de índices de retenção da literatura científica empregados nesta relação entre GCxGC/TOFMS e 1D-GC/MS são todos de LTPRI (não são relativos a KI), obtidos a partir do uso de fase estacionária polietilenoglicol.

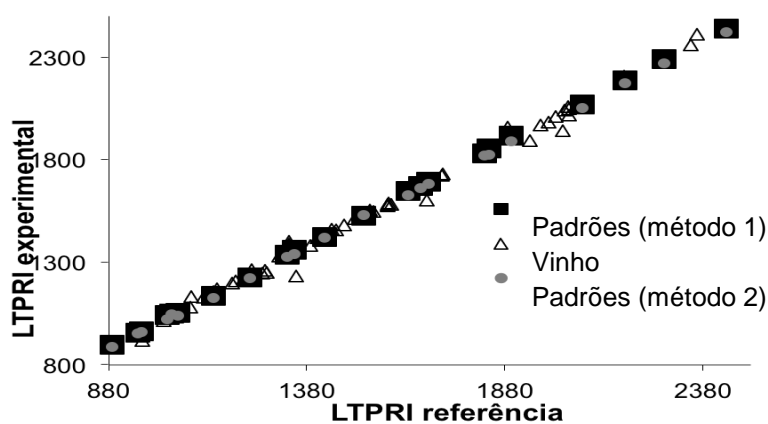


Figura 21. Comparação entre os LTPRI obtidos experimentalmente por GCxGC/TOFMS para 22 compostos voláteis de uma mistura padrão (listados na **Tabela XXV**) por dois métodos de cálculo, utilizando o 1t_R ou $^1t_R + ^2t_R$, bem como dos LTPRI obtidos através da GCxGC/TOFMS para os mesmos compostos de uma amostra de vinho Chardonnay e os LTPRI da literatura^{190, 200, 201, 205, 207, 235} obtidos por 1D-GC.

Tendo em vista que os índices de retenção obtidos estão relacionados ao mecanismo de retenção dos compostos escolhidos como padrão para o seu cálculo, muitas vezes são empregadas outras séries homólogas de compostos polares para a determinação dos LTPRI, como por exemplo a dos ésteres etílicos,²⁸¹ entre outras.²⁸²⁻²⁸⁶ Entretanto, a busca de um sistema universal de dados de retenção é conveniente, pois possibilita comparações diretas entre dados experimentais e um único banco de dados, mesmo que alguma variabilidade nos resultados precise ser tolerada. Neste caso, a conversibilidade entre diferentes escalas de índices de retenção, que utilizam séries homólogas distintas é uma característica importante

para facilitar o uso de bancos de dados genéricos de índices de retenção.²⁷⁷ Desta forma, apesar da variabilidade observada nos índices de retenção provenientes de colunas polares, estes dados são convenientemente empregados para identificação tentativa da identidade de compostos orgânicos voláteis de várias matrizes.

A **Tabela XXV** apresenta os LTPRI calculados através do método 2, em que o t_R foi utilizado para a determinação dos índices de retenção dos compostos voláteis dos vinhos Chardonnay no conjunto de colunas polar x medianamente polar, por GCxGC/TOFMS, juntamente com os valores de LTPRI em 1D-GC de vários trabalhos científicos. As diferenças entre os LTPRI da literatura e os experimentais foi de no máximo 20 para a grande maioria dos compostos (97%), sendo que para 3% dos compostos [(27) 2,5,5-trimetil-2,6-heptadien-4-ol; (63) 2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol, (160) 2-hexenoato de etila, (179) 2-hidróxi-4-metil-pentanoato de etila, (206) tetradecanoato de 2-propanila, (213) 2-fenil hexanoato de etila, (227) octadecanoato de etila, (228) linoleato de etila, (304) 2-pirrolidinona, (306) 3-isotiocanato-1-propeno] este desvio foi maior, tendo atingido um máximo de 33 unidades. À luz do que já foi comentado anteriormente, pode-se dizer que estes resultados mostram-se razoáveis, dada a simplificação da abordagem empregada no cálculo dos LTPRI a partir dos dados de GCxGC/TOFMS. Estes dados constituem-se em uma compilação de LTPRI que pode auxiliar a comunidade científica, visto que os valores publicados para LTPRI polares são poucos. Além disso, estes resultados trazem um incentivo à utilização de uma abordagem simples de comparação de LTPRI de 1D-GC e de GCxGC para identificação tentativa de compostos por GCxGC/TOFMS.

Von Muhlen e colaboradores,¹³¹ compararam os LTPRI de 30 compostos padrão, obtidos experimentalmente em um jogo de colunas apolar x polar (5% fenil polisilfenileno-siloxano, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m) e polietilenoglicol, 1,5 m x 0.1 mm, 0,1 μ m) com os LTPRI dos mesmos compostos de uma amostra do óleo volátil de *Eucalyptus dunnii*, analisada por GCxGC/TOFMS e com os LTPRI da literatura obtidos através da 1D-GC. Desta forma, verificaram uma relação linear entre os LTPRI de compostos padrão encontrados experimentalmente por GCxGC/TOFMS neste conjunto de colunas e aqueles reportados para 1D-GC-FID em coluna apolar, validando o uso dos índices LTPRI calculados experimentalmente com dados de GCxGC/TOFMS.¹³¹

Zhu e colaboradores²⁶⁰ identificaram compostos voláteis de licor usando uma coluna polar na ¹D (HP-innowax) e uma coluna de polaridade média na ²D (DB-1701), mas os índices de retenção não foram apresentados. Além disso, trabalhos que empregam este conjunto de colunas para outros tipos de matrizes são escassos. O presente estudo é o primeiro a usar o LTPRI obtido em conjunto de colunas polar × medianamente polar para identificação de compostos voláteis de vinho.

4.7 COMPOSTOS VOLÁTEIS DE VINHO MERLOT INVESTIGADOS ATRAVÉS DA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO HEADSPACE E CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE COM DETECÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE MASSAS POR TEMPO DE VÔO

Vinhos elaborados a partir de uva da cultivar Merlot foram pela primeira vez analisados usando-se HS-SPME-GC×GC/TOFMS, o que resultou em 179 compostos tentativamente identificados pela comparação de espectros de massas e dos índices de retenção experimentais com aqueles da literatura para 1D-GC, bem como de espectros de massas da biblioteca NIST 2005. As classes químicas de outros 155 compostos foram também tentativamente identificadas através da comparação dos dados espectrométricos dos componentes da amostra com aqueles da biblioteca NIST 2005. Observou-se que 138 compostos coeluíram na ¹D, sendo que destes, 33 compostos coeluíram tanto na ¹D quanto na ²D e sua identificação tentativa foi possível apenas com o uso de deconvolução espectral.

O comportamento dos quatro compostos apresentados na **Figura 20**, que coeluíram na ¹D, sendo que dois destes coeluíram também na ²D, foi o mesmo tanto no *headspace* de vinhos Chardonnay, como no dos vinhos Merlot. O número de compostos tentativamente identificados em vinhos através de 1D-GC por Gürbüz e colaboradores⁴⁰, que utilizaram HS-SPME-GC/qMS foi de 58 compostos em vinhos Merlot produzidos nos Estados Unidos da América (EUA), o que indica que a aplicação da GC×GC/TOFMS resultou em um número maior de compostos voláteis neste vinho varietal gaúcho.

De forma semelhante, o que foi observado para os vinhos Chardonnay (**Figuras 16 e 17**) no que diz respeito a compostos distribuídos de forma ordenada no diagrama de cores, de acordo com suas estruturas químicas, também foi verificado para os vinhos Merlot, quando da utilização do conjunto de colunas polar (DB-Wax) × medianamente polar (DB-17ms). A **Figura 22** mostra a distribuição ordenada das várias classes de compostos químicos no diagrama de cores e a **Figura 23** mostra a tendência de distribuição organizada de alguns ésteres e álcoois de vinhos Merlot, de acordo com a sua estrutura molecular, em uma região menor do espaço 2D, que foi ampliada.

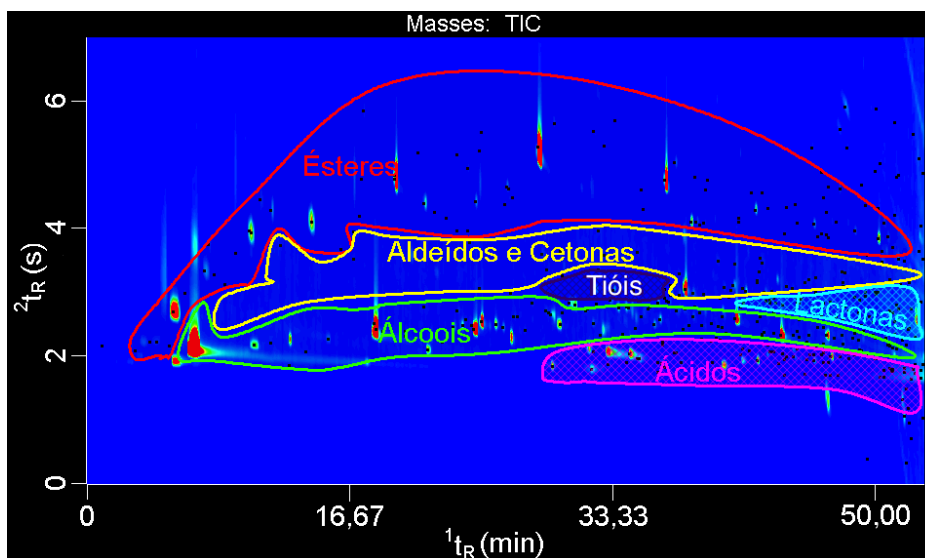


Figura 22. Diagrama de cores demonstrando a distribuição estruturada das classes de compostos voláteis de vinhos Merlot obtido com um conjunto de colunas DB-Wax (polar) × DB-17ms (polaridade média). Demais condições de análise constam do **item 3.4.**

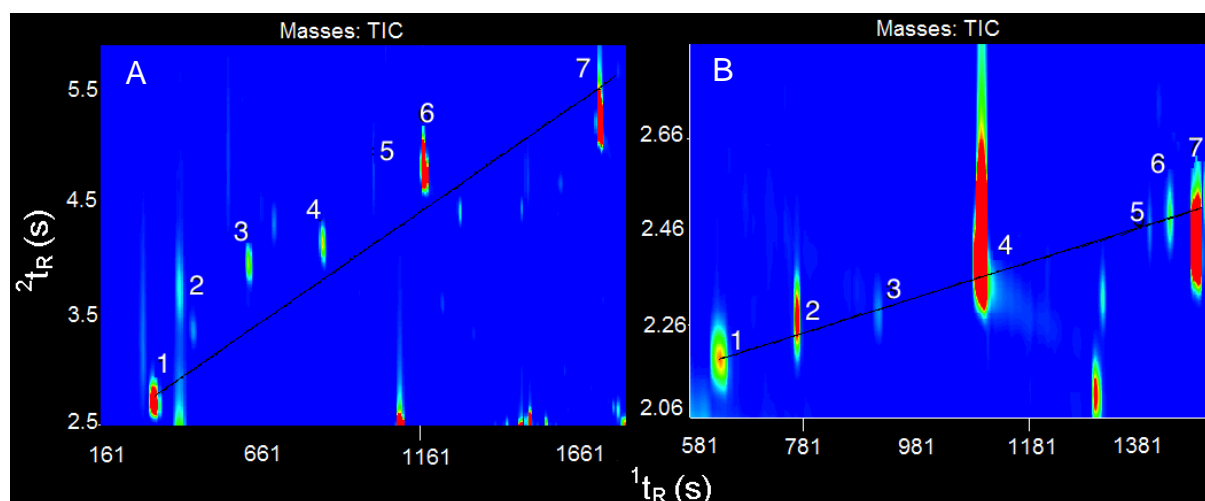


Figura 23. Distribuição no diagrama de cores de **(A)** ésteres estruturalmente similares: (1) propanoato de etila, (2) butanoato de etila, (3) 2-metil-butanoato de etila, (4) butanoato de 3-metila, (5) hexanoato de etila, (6) hexanoato de propila, (7) octanoato de etila e **(B)** álcoois: (1) 1-propanol, (2) 1-butanol, (3) 3-metil-1-butanol, (4) 4-metil-1-pentanol, (5) 1-hexanol, (6) 3-etóxi-1-propanol, (7) 3-hexen-1-ol. As condições das análises cromatográficas utilizadas estão apresentadas na **Tabela XII**.

Os ésteres estão presentes em maior número (94) no *headspace* do vinho Merlot, seguidos pelos álcoois (80), cetonas (29) ácidos (29) aldeídos (23), terpenos (23), lactonas (16), furanos (14), compostos sulfurados (9), fenóis (7), pirrois (5), C13-norisoprenóides (3) e piranos (2). A proporção de compostos voláteis pertencentes às classes citadas foi semelhante ao que foi verificado para os vinhos Chardonnay. Os vinhos Merlot têm sido estudados, comumente, usando-se a 1D-GC^{40, 165, 266, 287-291}

Nos vinhos Merlot da Serra Gaúcha, os ésteres, que contribuem para o aroma frutado foram os componentes presentes em maior número (94) e os compostos que apresentaram maior área cromatográfica foram 2-hidróxiopropanoato de etila, succinato de dietila, maleato de dietila, decanoato de etila, octanoato de etila e 2-hidróxiopropanoato de isopentila. A presença predominante de ésteres, incluindo octanoato de etila, decanoato de etila, acetato de etila, hexanoato de isopentila e succinato de dietila foi verificada nos vinhos Merlot produzidos em 2005 na Califórnia (EUA).⁴⁰ Butanoato de etila, hexanoato de etila e octanoato de etila foram os ésteres majoritários nos vinhos Merlot elaborados entre os anos de 2002 à

2004 no estado de Idaho (EUA).²⁶⁶ Entretanto, os compostos que estão presentes em maior quantidade não são, necessariamente, os que mais contribuem para o aroma.^{28, 106} No caso dos vinhos Merlot dos EUA,⁴⁰ os mais importantes para o aroma destes vinhos são: β -damascenona, hexanoato de etila, 2-metilbutanoato de etila e 2-feniletanol. Em vinhos Merlot produzidos na China,¹⁶⁵ os compostos voláteis mais importantes para o aroma foram 2,6-nonadienal, β -damascenona, β -ionona, hexanal, hexanoato de etila, (*Z*)-3-hexen-1-ol, octanoato de etila, benzaldeído, 4-terpineol, álcool benzílico, linalool, α -terpineol e naftaleno.

4.8 DIFERENCIAÇÃO DOS VINHOS DE ACORDO COM O PERFIL VOLÁTIL

Alguns estudos têm se dedicado a verificar a possibilidade do uso do perfil volátil de vinhos para sua classificação de acordo com o local de origem das uvas utilizadas para a vinificação,^{31, 70, 166, 167} com o tipo de vinho produzido, incluindo vinhos brancos, rosés e tintos³⁰ e com a variedade de uva tinta (Cabernet Sauvignon, Merlot e Cabernet Gernischt) empregada para a elaboração do vinho.¹⁶³ Entretanto, pela primeira vez a análise multivariada foi empregada para o tratamento dos dados complexos gerados a partir das análises de vinhos por GC \times GC/TOFMS para a diferenciação de vinhos de acordo com a cultivar de uva utilizada para a sua elaboração, incluindo variedades de uvas Merlot, Chardonnay, Sauvignon Blanc e Chardonnay/Pinot Noir.

Os dados do cromatograma dos compostos voláteis dos vinhos obtidos através da GC \times GC/TOFMS foram organizados em uma matriz composta por 480 colunas (analitos) e 54 linhas (amostras), a qual continha os valores de área cromatográfica de cada composto volátil em cada amostra. As amostras de vinho de cada uma das cultivares de uva utilizadas neste procedimento foram: 14 amostras de vinhos Chardonnay, 12 de Merlot, 8 de Cabernet Sauvignon, 10 de Sauvignon Blanc e 10 amostras de vinho 50% Chardonnay/50% Pinot Noir. Considerando-se que o número de amostras foi relativamente pequeno quando comparado ao número de variáveis (compostos voláteis), uma redução do número de variáveis foi necessária antes da aplicação de técnicas estatísticas multivariadas (PCA e LDA), o que foi efetuado através do emprego das razões de Fisher, que foram calculadas através do programa ChromaTOF. Em função disso, os vinhos foram agrupados em

cinco classes (C: Chardonnay, C+PN: 50% Chardonnay/50% Pinot Noir, CS: Cabernet Sauvignon, M: Merlot e SB: Sauvignon Blanc) a fim de que se obtivesse as razões de Fisher de cada um dos componentes voláteis dos vinhos, levando-se em consideração todas as amostras. As variáveis (compostos voláteis) foram ordenadas de acordo com a sua contribuição (valor da razão de Fisher) para a diferenciação dos vinhos produzidos com uvas de distintas variedades. Quanto maior o valor da razão de Fisher, maior é a contribuição que um dado composto volátil exerce para a diferenciação dos vinhos. Os 77 compostos com os maiores valores de razão de Fisher (> 970) foram utilizados na PCA (**Tabela XXVI**). Estes dados foram exportados pelo programa Chromatof para o Excel.

Tabela XXVI. Pesos obtidos na PCA feita com os compostos voláteis tentativamente identificados em vinhos analisados por GCxGC/TOFMS, cujas razões de Fisher foram maiores do que 970.

Composto	CAS	LTPRI exp ^a	LTPRI lit ^b	PCA cluster ^c	PC1	PC2
Álcoois						
2-Metilpropanol	75-65-0	1098	1090 ²²⁸	32/C+PN	-0,03	-0,71
2-Metilbutan-1-ol	137-32-6	1191	1196 ²³⁰	35/C	0,37	-0,53
3-Metilbutan-1-ol	123-51-3	1200	1208 ⁵⁸	70/C+PN	0,02	0,28
1-Hexanol ^d	111-27-3	1375	1392 ²²⁷	15/M	-0,08	0,01
1-Octanol	111-87-5	1554	1561 ²²⁷	66/C	0,09	-0,28
2,3-Butanodiol	513-89-3	1563	1583 ²²⁷	52/SB	0,68	0,41
Diol C4		1578	Nf	62/M	-0,22	0,22
(E)-2-Octen-1-ol	18409-17-1	1649	1639 ²²⁷	28/C+PN	0,86	0,38
Álcool C9		1862	Nf	4/M	-0,23	0,01
2-Feniletanol	60-12-8	1900	1898 ¹⁶⁵	58/C	0,71	-0,11
Ácidos						
Ácido 2-metilpropanóico (Ácido isobutírico)	79-31-2	1568	1566 ²⁰⁴	2/C	0,11	-0,72
Ácido octanóico	124-07-2	2096	2092 ²⁴²	53/C	0,34	-0,39
Aldeídos						
Acetaldeído	75-07-0	715 ^e	735 ²²⁸	40/C	0,19	-0,11
Hexanal	66-25-1	1107	1092 ²³³	59/C	0,40	-0,06
Octanal	124-13-0	1272	1270 ²⁴¹	50/C+PN	-0,64	0,55
Nonanal	124-19-6	1388	1390 ²⁷⁴	34/M	-0,36	0,14
Decanal	112-31-2	1500	1499 ⁷	48/C	0,65	-0,57
Dodecanal	112-54-9	1733	1720 ⁷	64/C+PN	0,32	0,51

Continuação Tabela XXVI

Composto	CAS	LTPRI ^a exp	LTPRI ^b lit	PCA cluster ^c	PC1	PC2
3-Fenilpropen-2-al (Cinamaldeído)	104-55-2	1971	1970 ²³⁸	47/C	0,59	-0,57
Tetradecanal	124-25-4	2051	2034 ²²⁵	75/CS	-0,54	0,53
Ésteres						
Acetato de etila ^d	141-78-6	870 ^e	885 ²²⁷	55/C+PN	0,48	0,25
Pentanoato de etila	539-82-2	1116	1127 ²²⁹	22/C+PN	-0,11	-0,35
Hexanoato de etila ^d	123-66-0	1238	1236 ²⁴⁵	41/C	0,61	-0,07
2-Hidróxiopropanoato de etila (Lactato de etila) ^d	97-64-3	1339	1334 ²³¹	25/SB	-0,29	-0,11
2-Hexenoato de etila	27829-72-7	1357	1360 ²²⁷	42/C	0,54	-0,46
2-Hidróxi-3-metilbutanoato de etila	2441-06-7	1403	1399 ²³¹	72/C	0,41	-0,16
Octanoato de etila ^c	106-32-1	1430	1424 ²²⁶	1/C+PN	-0,33	-0,22
Dietoxiacetato de etila	6065-82-3	1475	1487 ²⁰⁶	9/C	0,28	-0,25
3-Hidróxi-butanoato de etila ^d	5405-41-4	1514	1513 ²²⁸	46/C+PN	0,29	0,26
Nonanoato de etila	123-29-5	1520	1526 ²²⁶	24/C	0,12	-0,50
3-Hidróxi-pentanoato de etila	54074-85-0	1552	1552 ²²⁸	74/C	-0,12	-0,19
Propanedioato de dietila (Malonato de dietila)	105-53-3	1571	1572 ²²⁶	7/C	0,81	0,39
Lactato de isoamila	19329-89-6	1619	1614 ²³⁶	18/C+PN	-0,22	-0,06
Decanoato de etila ^d	110-38-3	1644	1638 ²³⁸	49/C	0,47	-0,44
3-Metiloctanoato de butila (Octanoato de isoamila)	2035-99-6	1668	1655 ¹⁹⁸	26/SB	0,77	0,30
3-Hidróxi-hexanoato de etila	2305-25-1	1674	1675 ²²⁸	71/C+PN	0,21	0,40
Succinato de dietila ^d	123-25-1	1686	1690 ²³⁵	56/SB	0,71	0,46
Dec-9-enoato de etila	67233-91-4	1708	1711 ²²⁷	57/C	0,23	-0,56
Éster C12	-	1715	Nf	13/C	0,08	-0,68
Pentanedioato de dietila	818-38-2	1780	1768 ²²⁶	27/C+PN	0,70	0,25
Acetato de 2-feniletila ^d	103-45-7	1799	1800 ²⁰⁴	20/CS	-0,48	0,40
Tetradecanoato de 2-propanila (Miristato de isopropila)	110-27-0	1845	1823 ²³³	68/C	0,52	-0,53
Dodecanoato de etila	106-33-2	1856	1835 ²²⁶	10/SB	-0,25	-0,27
3-Metil decanoato de butila (Decanoato de isopentila)	2306-91-4	1868	1871 ⁵³	77/SB	-0,20	0,15
2-Hidróxi-butanedioato de dietila	626-11-9	2038	2041 ²³⁵	23/C+PN	0,78	0,17
Éster C13	-	2433 ^e	Nf	12/C+PN	0,35	0,13
Cetonas						
Propan-2-ona (acetona)	67-64-1	800 ^e	818 ²²⁸	44/M	-0,30	0,03
2,3-Butanediona	431-03-8	1000	975 ²¹⁸	36/C+PN	0,68	0,41

Continuação Tabela XXVI

Composto	CAS	LTPRI exp ^a	LTPRI lit ^b	PCA cluster ^c	PC1	PC2
(E)-3-Penten-2-ona	625-33-2	1117	1128 ⁵⁸	33/SB	0,63	0,25
Ciclopentanona	120-92-3	1146	1154 ⁶⁷	43/C	0,43	-0,13
3-Hidróxibutan-2-ona	513-86-0	1309	1304 ²³¹	76/C+PN	0,55	0,23
2-Metilciclopentanona	1120-72-5	1390	1395 ²⁴⁹	61/C	0,05	-0,83
Terpenos						
4-Careno	29050-33-7	1119	1128 ²⁹²	6/C+PN	0,58	0,54
p-Cimeno	99-87-6	1301	1282 ²⁴³	11/C+PN	0,81	0,48
Ho-trienol	53834-70-1	1424	1449 ²¹⁶	60/M	-0,02	0,34
(Z)-Óxido de linalool	68780-91-6	1430	1442 ⁵⁸	21/C+PN	0,80	0,31
Linalool	78-70-6	1554	1554 ²³²	14/C+PN	0,71	0,31
Terpinen-4-ol ^d	562-74-3	1608	1602 ²³⁸	17/C+PN	0,85	0,30
Nerol	106-25-2	1798	1804 ¹⁹⁰	63/C+PN	0,64	0,29
α-Calacoreno	21391-99-1	1920	1928 ¹⁹²	3/C+PN	0,61	0,42
Geraniol	7392-19-0	1864	1862 ²⁰⁹	65/CS	-0,54	0,41
Óxido de nerol	1786-08-9	2377	2385 ²⁰⁹	16/C	0,11	-0,59
β-Santalol	77-42-9	2430	2434 ¹⁹⁷	31/C+PN	0,53	0,46
C13-Norisoprenóides						
(E)-1-(2,6,6-Trimetil-1- ciclohexa-1,3- dienil)but-2-en-1-ona (β-damascenona)	23726-93-4	1839	1831 ²⁰⁶	67/CS	-0,52	0,51
Fenóis						
4-Metóxiifenol de etila (4-etilguaiacol)	2785-89-9	2030	2033 ²³⁸	19/C	0,09	-0,75
4-Etilfenol	123-07-9	2204	2185 ²³¹	5/C+PN	0,40	0,22
Piranos						
Pirano	-	2001	*	45/C+PN	0,53	0,12
Lactonas						
δ- Valerolactona (tetrahydro-2H-piran-2-ona)	542-28-9	1589	1609 ¹⁹⁹	39/CS	-0,20	0,65
Butirolactona (Dihidro-(3H)-furan-2-ona)	96-48-0	1690	1673 ²⁴¹	54/M	0,17	-0,57
3-Metil-(5H)-furan-2-ona	22122-36-7	1700	1683 ²²⁶	38/CS	0,59	-0,57
γ-Decalactona (5-Hexildihidro-(3H)-furan-2-ona)	706-14-9	2145	2138 ²⁷	69/CS	-0,53	0,50
Furanos						
Furfural	98-01-1	1465	1460 ²³⁸	8/CS	-0,63	0,51

Continuação Tabela XXVI

Composto	CAS	LTPRI ^a _{exp}	LTPRI ^b _{lit}	PCA cluster ^c	PC1	PC2
5-(Hidróximetil)furan-2-carbaldeído	67-47-0	2480	2485 ²²⁸	51/CS	-0,07	0,22
Furano	-	2564	*	29/C+PN	0,58	0,55
Compostos sulfurados						
3-Metil-sulfanil-propanoato de etila	13327-56-5	1580	1584 ²³²	30/C+PN	0,73	0,45
Dihidro-2(3H)-tiofenona	1003-10-7	1585	1593 ²²⁴	37/CS	-0,41	0,45
Tiofeno-2-carbaldeído	98-03-3	1689	1702 ²⁴⁶	73/C+PN	0,62	0,45

^aLTPRI: Índices de retenção com programação linear de temperatura obtidos experimentalmente no conjunto de colunas polar (DB-Wax, 100% polietilenoglicol) x medianamente polar (DB17ms, 50% fenil-50% polidimetilsiloxano)

^bLTPRI_{lit}: LTPRI da literatura obtidos em coluna polar através da GC/qMS

^c o número refere-se aos grupamentos da PCA observados na **Figura 25B**; C: Chardonnay, C+PN: 50% Chardonnay/50% Pinot Noir, CS: Cabernet Sauvignon, M: Merlot e SB: Sauvignon Blanc.

* LTPRI não encontrado na literatura; CX indica que a molécula apresenta X carbonos na sua estrutura.

A PCA foi utilizada para visualizar as possíveis semelhanças entre os vinhos elaborados a partir da mesma cultivar de uva e diferenças dos vinhos de diferentes cultivares, a partir dos dados obtidos por GCxGC/TOFMS e suas razões de Fisher. Assim, foi possível identificar as direções do espaço em que a maior parte da informação é retida. Além disso, através da PCA foram determinadas as variáveis (componentes voláteis) que contribuem para as diferenças observadas em cada uma das classes de amostras de vinhos. A nova matriz contendo 77 analitos de 54 amostras foi submetida à centralização dos dados na média, que consiste na subtração dos valores de cada linha da matriz pela média de sua respectiva coluna. Os autovalores (do inglês: *eigenvalues*) correspondem à variância de cada componente principal. O número de autovalores significativos pode ser determinado pela regra de Kaiser, em que considera-se apenas os componentes principais com autovalor maior que 1.²⁹³ Na **Figura 24** observa-se que os 14 primeiros componentes principais possuem autovalor maior que 1 e que a partir do PC15 os autovalores são pequenos. Este tipo de gráfico ilustra como a variabilidade dos dados está distribuída entre os eixos da ordenação, permitindo identificar o número de eixos mais significativos. Desta maneira, existe uma variação pouco expressiva em relação à variância explicada a partir do PC15. Os 14 componentes principais com autovalores maiores do que 1 contribuem para 85,8% da variância total (**Tabela**

XXVII). A aplicação da PCA tornou possível reduzir a dimensão original dos dados de 77 (77 variáveis = dimensões) para 14 (14 componentes principais).

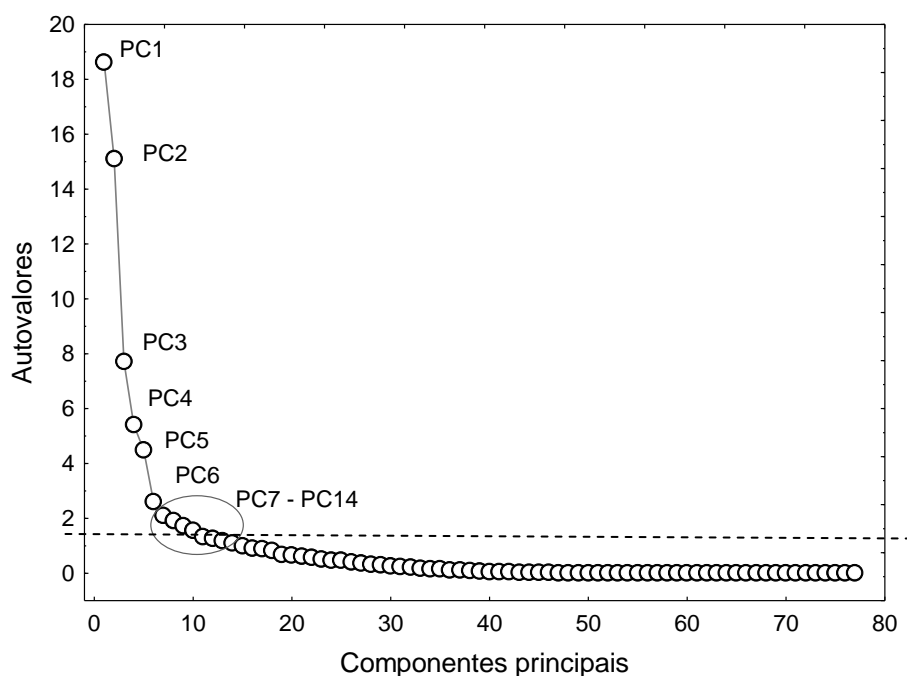


Figura 24. Autovalores para cada componente principal obtidos após a PCA de 77 compostos voláteis de 54 amostras de vinho de diferentes cultivares de uvas. A linha pontilhada ilustra o critério de Kaiser (autovalor >1).

Tabela XXVII. Porcentagens de variância individual e acumulada explicadas pelos 14 principais componentes.

Componente	Variância individual explicada (%)	Variância acumulada (%)
1	24,17	24,17
2	19,62	43,79
3	10,00	53,80
4	7,02	60,82
5	5,82	66,65
6	3,38	70,04
7	2,72	72,76
8	2,48	75,25
9	2,22	77,48
10	2,02	79,50
11	1,72	81,22
12	1,65	82,88
13	1,53	84,42
14	1,43	85,85

Os componentes principais 1 (PC1) e PC2 explicam ou contêm 24,2% e 19,6% da variância dos dados, respectivamente (**Figura 25**). Na **Figura 25A** observa-se a diferenciação de cinco grupos, sendo que os vinhos tintos: Cabernet Sauvignon e Merlot foram agrupados no mesmo quadrante. Os vinhos Chardonnay e Sauvignon Blanc foram separados dos demais pelo PC2, enquanto os vinhos Merlot, Cabernet Sauvignon e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir foram mais influenciados pelas variáveis relacionadas com o PC1.

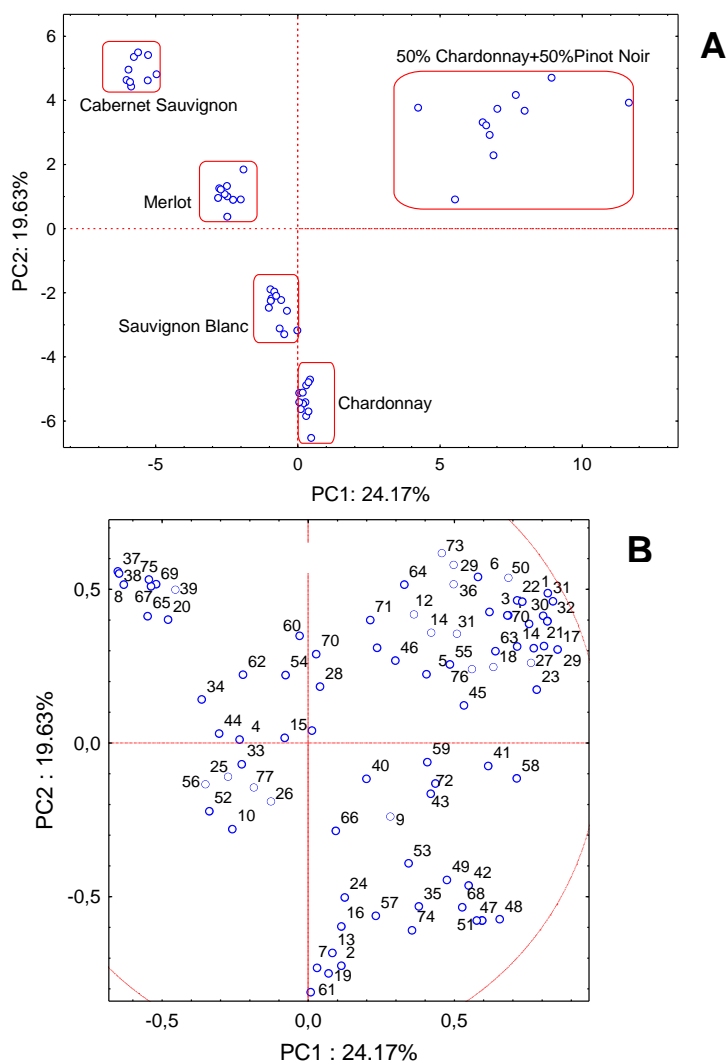


Figura 25. Gráficos da PCA dos 77 compostos voláteis de 54 amostras de vinhos Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir; **(A)** gráfico de escores que apresenta a distinção entre as amostras e **(B)** gráfico de pesos que mostra os compostos voláteis dispostos no plano definido pela PC1 e PC2 de acordo com a diferenciação das cultivares de uva. Os números que constam do gráfico designam compostos tentativamente identificados, conforme a **Tabela XXVI**.

A numeração usada na **Figura 25B** corresponde aos compostos da **Tabela XXVI**. A **Figura 25** mostra que os vinhos Cabernet Sauvignon são caracterizados por compostos voláteis que incluem, por exemplo, 3-metil-(5H)-furan-2-ona, tetrahydro-2H-piran-2-ona, furfural, tetradecanal, γ -decalactona, geraniol, β -damascenona, e acetato de 2-feniletila. Os vinhos Merlot estão associados com álcool C9 (álcool com nove átomos de carbono), diol C4 (álcool com quatro átomos de carbono), dihidro-2(3H)-tiofenona, 1-hexanol, 5-(hidróximetil)furan-2-carbaldeído e hotrienol. Em relação aos vinhos Sauvignon Blanc, observou-se que os voláteis associados à este tipo de vinho são dodecanoato de etila, succinato de dietila, 2,3-butanodiol, octanoato de isoamila, 3-metildecanoato de butila, 3-penten-2-ona, lactato de etila e lactato de isoamila. Aos vinhos Chardonnay estão associados compostos como o 9-decenoato de etila, 2-metilciclopentanona, malonato de dietila, ácido isobutírico e óxido de nerol. É interessante destacar que a maioria dos terpenos (4-careno, p -cimeno, óxido de linalool, β -santalol, terpinen-4-ol, nerol, linalool e α -calacoreno), para os quais foram obtidos valores altos de razão de Fisher, também são reportados na literatura como compostos que contribuem positivamente para o aroma do vinho^{40, 41, 46} e estão todos relacionados com os vinhos 50% Chardonnay/50% Pinot Noir. Além disso, uma grande dispersão é observada no PC1 para este tipo de vinho e respectivos compostos relacionados. Assim, a fim de obter parâmetros de classificação adequados para relacionar os principais e mais importantes compostos voláteis que caracterizam determinado grupo de amostras, foi aplicado um método de reconhecimento/classificação supervisionado.

Os componentes principais foram utilizados na análise discriminante linear (LDA) para selecionar as variáveis que são mais úteis para a diferenciação dos vinhos elaborados a partir de diferentes cultivares de uvas. Enquanto, a PCA seleciona a direção que retém o máximo de informação, a LDA seleciona a direção que consegue o máximo de separação entre as classes de amostras.¹⁸² O método de classificação LDA foi desenvolvido através da aplicação de um algoritmo de seleção, usando Wilks' Lambda como critério e um fator estatístico F para determinar a significância das mudanças em Lambda, quando a influência de uma variável é avaliada (**Tabela XXVIII**). O algoritmo de seleção Wilks' Lambda é uma medida de discriminação entre os grupos. Quanto maior a dispersão entre os grupos,

menor o valor do Wilks' Lambda e maior a significância daquele composto para o método de classificação. O 9-decenoato de etila apresentou maior valor de F (17,63) e, conseqüentemente, menor valor de Wilks' Lambda (0,34), sendo essa primeira variável selecionada para o modelo de dicriminação. À medida que uma variável é selecionada e retirada da matriz, nova combinação é realizada, alterando os valores de F e, conseqüentemente, a ordem de seleção. Esta estratégia resultou em uma considerável redução da dimensionalidade da informação, pois levou a seleção de apenas 12 variáveis que são consideradas como as mais importantes para a diferenciação das amostras de vinho.

Tabela XXVIII. Teste de seleção de variáveis discriminantes entres os 14 PC através da utilização de Wilks' Lambda e fator estatístico F para construção de um modelo de diferenciação de vinhos de acordo com a cultivar de uva utilizada para a elaboração dos mesmos.

Variável	Wilks' Lambda	F	p^b
2,3-Butanodiol	0,73	3,32	0,02
4-Careno	0,58	8,76	0,00
3-Penten-2-ona	0,78	2,52	0,05
Succinato de dietila	0,89	1,03	0,40
β -Santalol	0,36	16,42	0,00
Malonato de dietila	0,45	11,18	0,00
Dihidro-2(3H)-tiofenona	0,93	0,68	0,60
Tetrahidro-2H-piran-2-ona	0,80	2,24	0,08
Furfural	0,99	0,05	0,00
Álcool C9 ^a	0,60	6,01	0,34
3-Metil-(5H)-furan-2-ona	0,96	0,29	0,87
9-Decenoato de etila	0,34	17,63	0,00
Nerol	0,93	0,6693	0,61
Octanal	0,98	0,0984	0,30

^aC9: 9 átomos de carbono na estrutura da molécula

^b p : nível de significância. As variáveis são discriminantes quando $p < 0,05$

Os compostos voláteis selecionados pela LDA foram tentativamente identificados como 2,3-butanodiol, 4-careno, (*E*)-3-penten-2-ona, succinato de dietila, β -santalol, malonato de dietila, dihidro-2(3H)-tiofenona, tetrahidro-2H-piran-2-ona, 6-metiloctan-1-ol, 3-metil-(5H)-furan-2-ona, 9-decenoato de etila e nerol. Cada um dos compostos voláteis selecionados como discriminantes constitui uma nova

variável chamada variável canônica, que representa a direção com o máximo de separação entre os tipos de vinhos. A confiabilidade do modelo de classificação obtido através da LDA foi confirmada através do gráfico obtido quando as amostras foram projetadas no espaço definido pelas duas primeiras variáveis canônicas (**Figura 26**). Uma clara separação entre os cinco tipos de vinhos foi observada, sendo que os vinhos brancos (Chardonnay e Sauvignon Blanc) foram separados dos demais vinhos pela primeira variável canônica, enquanto que os vinhos tintos (Merlot e Cabernet Sauvignon) e as amostras de vinho produzidas com a mistura de uvas brancas e tintas (50% Chardonnay/50% Pinot Noir) foram separados pela segunda variável canônica.

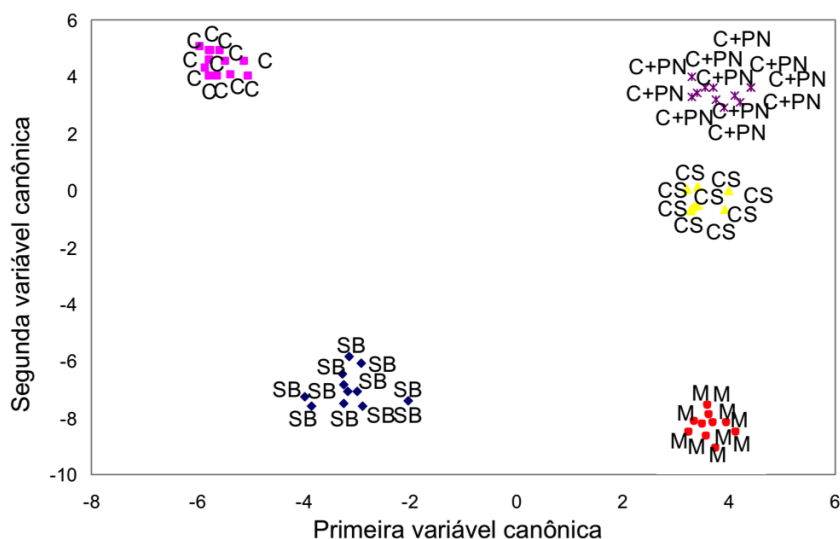
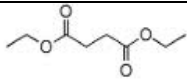
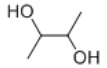
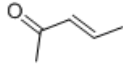
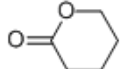
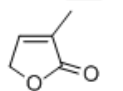
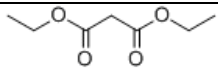
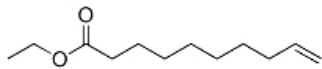
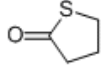
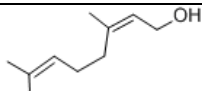
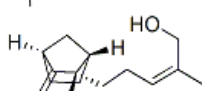
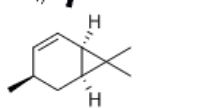


Figura 26. Gráfico das amostras de vinho distribuídas no plano definido pelas duas variáveis canônicas, após a aplicação da LDA. As amostras de vinho estão agrupadas de acordo com a variedade de uva utilizada na sua produção: C (Chardonnay), M (Merlot), CS (Cabernet Sauvignon), SB (Sauvignon Blanc) e C+PN (50% Chardonnay/50% Pinot Noir).

Os doze compostos voláteis indicados pela análise multivariada como os mais discriminantes dos vinhos elaborados a partir de cinco diferentes cultivares de uvas estão apresentados na **Tabela XXIX**. Os três terpenos considerados importantes para a diferenciação dos vinhos foram relacionados aos vinhos 50% Chardonnay/50% Pinot noir. As duas furanonas mais discriminantes são responsáveis pela diferenciação de vinhos Cabernet Sauvignon. Outro aspecto

interessante observado é que apenas ésteres foram considerados como os compostos mais discriminantes para vinhos Chardonnay.

Tabela XXIX. Compostos voláteis apontados pela análise multivariada como os mais discriminantes para cada um dos cinco tipos de vinho elaborados com uvas Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir.

Cultivar de uva	Composto	Fórmula estrutural
Sauvignon blanc	Succinato de dietila	
	2,3-Butanodiol	
	3-Penten-2-ona	
Cabernet Sauvignon	Tetrahydro-2H-piran-2-ona	
	3-Metil-(5H)-furan-2-ona	
Chardonnay	Malonato de dietila	
	Dec-9-enoato de etila	
Merlot	Dihidro-2(3H)-tiofenona	
	Álcool com 9 átomos de carbono	-
50% Chardonnay/Pinot noir	Nerol	
	β -Santalol	
	4-Careno	

A predição da capacidade do modelo de discriminação desenvolvido foi determinada através de um procedimento de validação cruzada, no qual o modelo foi testado utilizando-se amostras de cada uma das variedades de vinho em estudo, as quais não foram usadas na sua construção. A utilização dos doze compostos voláteis selecionados pela LDA resultou na classificação correta de 100% das amostras de vinho de acordo com o tipo de uva.

Um outro modelo foi desenvolvido para discriminar vinhos chineses com base na relação entre a composição volátil elucidada através da HS-SPME-GC/qMS e a variedade de uva utilizada na elaboração dos vinhos. Para isto, foram empregados

métodos quimiométricos incluindo a razão de Fisher, PCA e LDA. O modelo desenvolvido mostrou habilidade de reconhecer 65% das amostras de vinhos tintos das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Cabernet Gernischt.¹⁶³ Câmara e colaboradores¹⁶⁴ também utilizaram os mesmos procedimentos para diferenciar vinhos elaborados a partir de uvas de variedades brancas, relacionando a composição volátil e o tipo de uva. O modelo desenvolvido com 19 compostos voláteis possibilitou a diferenciação de 96,4% das amostras de vinhos elaborados em Portugal a partir de uvas das variedades Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho.

A contribuição dos compostos voláteis para o aroma dos vinhos também é objeto de estudo em vários trabalhos, que buscam estabelecer uma relação entre compostos voláteis e as percepções positivas ou negativas dos atributos sensoriais desta bebida.^{41, 265, 294, 295} Sabe-se que a avaliação precisa da influência de compostos voláteis no aroma do vinho passa pela análise quantitativa destes compostos, entretanto, a **Tabela XXX** apresenta a possível contribuição dos doze mais importantes compostos voláteis indicados pela análise multivariada, mesmo considerando-se apenas os resultados qualitativos das investigações realizadas.

Tabela XXX. Contribuição para o aroma dos doze compostos voláteis apontados pela análise multivariada como os mais importantes para a diferenciação dos vinhos Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc e 50% Chardonnay/50% Pinot Noir.

Composto	Aroma	Coeluição
Succinato de dietila	Frutado ²³⁵	Não
2,3-Butanodiol	Frutado ²³⁵	3-Hidróxi-pentanoato de etila
Nerol	Flor de laranja ⁴¹ , rosa ³	Dodecanoato de metila
3-Penten-2-ona	frutado ou picante ¹⁶³	Não
Malonato de dietila	fruta madura, pêssego ou de grama cortada ²³⁵	5-Metil-2-furfural
β -Santalol	Amadeirado ²⁹⁵	(E)-4-Metilhept-3-en-2-ona
9-Decenoato de etila	Frutado ²⁹⁶	5-Etilhidro-2(3H)-furanona, 2-Etilhexanal
Álcool C9 ^a	-	Acetato de 2-feniletila, 2-Metoxifenol
4-Careno ^b	-	Não
Tetrahydro-2H-piranona ^b	-	Não
Dihidro-2(3H)-tiofenona ^b	-	Não
3-Metil-2(5H)-furanona ^b	-	Não

LTPRI obtidos experimentalmente e os da literatura científica estão na **Tabela XVII**; ^aC9: 9 átomos de carbono na estrutura da molécula; ^bnenhuma informação sobre o aroma foi encontrada na literatura.

A contribuição do nerol para o aroma depende de sua configuração enantiomérica no vinho (**Tabela XXX**). A identificação da forma racêmica presente nos vinhos analisados não foi feita, pois não foi empregada uma coluna cromatográfica quiral apropriada para este fim. Para cinco dos compostos da **Tabela XXX** não foram encontradas informações sobre seu aroma na literatura científica e, dentre estes, quatro foram tentativamente identificados pela primeira vez em vinhos, sendo que apenas o 4-careno havia sido identificado anteriormente em vinhos elaborados com uvas da cultivar Falanghina (*Vitis vinifera* L.) na região da Campânia (Itália)¹⁶⁸

Seis dos doze compostos considerados discriminantes pelo modelo de diferenciação obtido coeluíram com outros compostos na ¹D e foram tentativamente identificados através do uso da GC×GC/TOFMS. O propanodiato de dietila (malonato de dietila, ¹t_R = 37,92 min e ²t_R = 3,63 s), por exemplo, foi separado do 5-metil-2-furfural (¹t_R = 37,92 min, ²t_R = 2,04 s) na segunda dimensão cromatográfica. O mesmo foi observado para o β-santalol (¹t_R = 53,10 min, ²t_R = 2,17 s) que coeluiu na primeira dimensão com o (*E*)-4-metilhept-3-en-2-ona (¹t_R = 53,10 min, ²t_R = 3,45 s). A identificação do 9-decenoato de etila (aroma frutado) só foi possível com o uso da deconvolução spectral, pois este composto coeluiu na primeira dimensão e coeluiu parcialmente na segunda dimensão com outros dois compostos: 5-etildihidro-2(3H)-furanona e 2-etilhexanal (**Figura 27**).

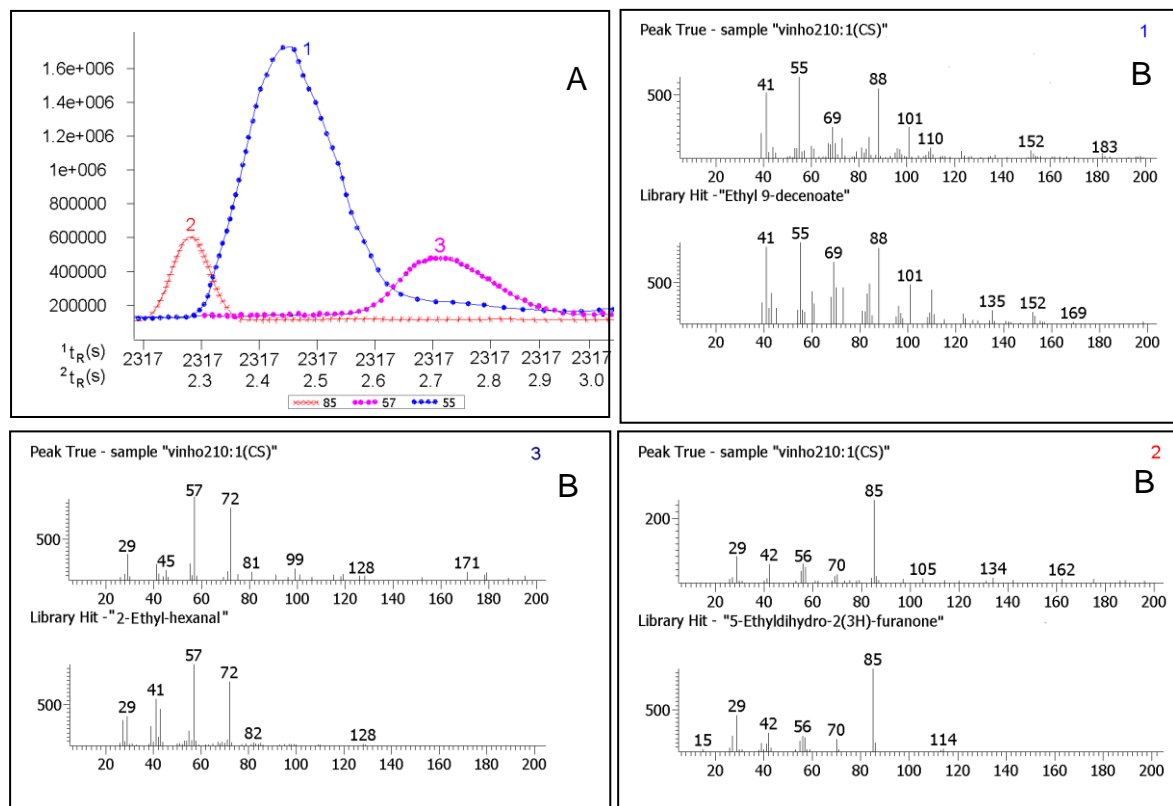


Figura 27. Exemplo da necessidade do emprego da deconvolução espectral para identificação de compostos voláteis extraídos por HS-SPME de vinhos Cabernet Sauvignon, analisados através da GC×GC/TOFMS: **(A)** Parte do cromatograma referente aos picos modulados de três compostos voláteis que coeluíram na 1D e coeluíram parcialmente na 2D : **(1)** linha azul: decen-9-oato de etila, m/z 55; **(2)** linha vermelha: 5-etildihidro-2(3H)-furanona, m/z 85; **(3)** linha preta, 2-etilhexanal, m/z 57; **(B)** espectro de massas deconvoluído dos compostos da **Figura 27A** e os respectivos espectros de massas dos mesmos da biblioteca NIST 2005. As condições cromatográficas utilizadas nas análises estão na **Tabela XII**.

4.9. RESUMO DOS RESULTADOS

✓ Foi desenvolvido um método de HS-SPME para os compostos dos vinhos base Chardonnay gaúchos através da otimização univariada, onde foi escolhido o filme polimérico mais apropriado e o uso ou não de agitação para a extração dos voláteis de vinho e da otimização multivariada para os parâmetros tempo de extração, temperatura de extração, concentração de cloreto de sódio e volume de amostra. As

condições ótimas obtidas para este método foram: filme polimérico constituído de DVB-CAR-PDMS, extração dos voláteis sem agitação, uso de 1 mL de amostra, 30% de cloreto de sódio, 45 min de extração a 55°C.

✓O método de extração otimizado foi aplicado com êxito a cinco amostras de vinho base Chardonnay, tendo os voláteis sido submetidos à análise por GC/qMS, bem como à análise sensorial. Houve concordância entre os resultados obtidos por 1D-GC/MS e a análise sensorial.

✓As melhores condições cromatográficas para HS-SPME-GC×GC/TOFMS foram conjunto de colunas: DB-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) × DB-17ms (1 m x 0,18 mm x 0,18 µm), diferença de temperatura entre os fornos de 10°C, período de modulação de 7 s e 1,4 s de duração do jato quente.

✓Uma relação linear (coeficiente de determinação, $r^2 = 0,998$) foi verificada entre os LTPRI obtidos experimentalmente para uma mistura padrão de 22 compostos característicos de aroma de vinho em um conjunto de colunas DB-Wax × DB-17ms, por GC×GC/TOFMS e os LTPRI de referência para 1D-GC.

✓As diferenças entre os LTPRI obtidos experimentalmente por GC×GC/TOFMS (conjunto de colunas DB-Wax × DB-17ms) para os compostos voláteis do *headspace* de vinhos Chardonnay e Merlot e os LTPRI reportados na literatura para 1D-GC (coluna polar) foram inferiores a 20 unidades para 97% dos compostos tentativamente identificados e para 3% dos compostos, este desvio foi maior, tendo atingido um máximo de 33 unidades.

✓Foram tentativamente identificados 313 compostos voláteis no vinho Chardonnay, sendo que 273 foram tentativamente identificados através de comparação dos LTPRI e espectros de massas obtidos experimentalmente com aqueles reportados pela literatura científica, sendo que para os demais (40), apenas a classe química foi tentativamente identificada pelos seus espectros de massas.

✓Foram verificadas no *headspace* do vinho Chardonnay 69 coeluições em ¹D (161 compostos), sendo que destas, 20 foram resolvidas na ²D. Os demais compostos coeluíram total ou parcialmente na ²D e foram portanto, também distinguidos por deconvolução espectral.

✓Os compostos tentativamente identificados no *headspace* dos vinhos Chardonnay foram: ésteres (95), álcoois (72), ácidos (27), cetonas (24), terpenos (22), lactonas (20), aldeídos (19), furanos (11), fenóis (8), compostos sulfurados (8), pirróis (5) e C13-norisoprenóides (3).

✓ Foram tentativamente identificados 334 compostos voláteis no vinho Merlot, sendo que 179 foram tentativamente identificados através de comparação dos LTPRI e espectros de massas obtidos experimentalmente com aqueles reportados pela literatura científica, sendo que para os demais (155), apenas a classe química foi tentativamente identificada pelos seus espectros de massas.

✓ Os compostos tentativamente identificados no *headspace* dos vinhos Merlot foram: ésteres (94) no *headspace* do vinho Merlot, álcoois (80), cetonas (29) ácidos (29) aldeídos (23), terpenos (23), lactonas (16), furanos (14), compostos sulfurados (9), fenóis (7), pirrois (5), C13-norisoprenóides (3) e piranos (2).

✓ Foram verificados no vinho Merlot que 138 compostos coeluíram em 1D , sendo que destes, 105 compostos foram resolvidos na 2D . Os demais compostos coeluíram total ou parcialmente na 2D e foram, portanto distinguidos também por deconvolução espectral (33).

✓ A diferenciação de vinhos de acordo com as uvas empregadas no processo de vinificação foi realizada empregando-se as áreas cromatográficas dos compostos voláteis dos vinhos em estudo, obtidas por HS-SPME-GC \times GC/TOFMS, suas razões de Fisher, PCA e LDA, sendo indicados doze (12) compostos como os mais discriminatórios das diferentes cultivares, entre os 480 compostos tentativamente identificados em vinhos elaborados a partir de cinco diferentes cultivares de uvas.

✓ Os doze (12) compostos indicados pela análise multivariada como os mais discriminatórios das diferentes cultivares dos cinco (5) tipos de vinhos são: succinato de dietila, 2,3-butanodiol e 3-penten-2-ona para Sauvignon Blanc; nerol, β -santalol, e 4-careno para 50% Chardonnay/Pinot Noir; malonato de dietila e 9-decenoato de etila para Chardonnay, um álcool com nove átomos de carbono em sua estrutura e dihidro-2(3H)-tiofenona para vinho Merlot; tetrahydro-2H-piranona e, 3-metil-2(5H)-furanona para Cabernet Sauvignon.

✓ Dentre os doze compostos mais importantes para a discriminação entre os cinco vinhos distintos investigados, sete apresentam potencial para contribuir para o aroma dos vinhos. Entre os demais, quatro ainda não haviam sido reportados em aroma de vinho na literatura anteriormente (4-careno, tetrahydro-2H-piranona, dihidro-2(3H)-tiofenona e 3-metil-2(5H)-furanona). Seis compostos dentre os doze coeluíram na 1D e sua separação na 2D foi parcial, tendo a sua identificação tentativa sido feita com a contribuição da deconvolução espectral.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através de GC×GC/TOFMS abrem horizontes promissores para o estudo dos compostos voláteis de uma forma mais completa e detalhada do que aquela que emprega apenas 1D-GC/MS, tanto para vinhos e espumantes brasileiros, como para outras bebidas, alimentos, óleos essenciais, perfumes, amostras de interesse ambiental, forense, etc.

A técnica de GC×GC/TOFMS aplicada a amostras de vinho Chardonnay e Merlot mostrou um número maior de compostos tentativamente identificados, bem como a separação de compostos não resolvidos na ¹D. O ganho de seletividade obtido com a ²D, o uso da deconvolução espectral, bem como a obtenção de uma distribuição organizada de grupamentos de compostos assemelhados no espaço 2D demonstraram a superioridade da técnica bidimensional para a análise de compostos voláteis de vinhos e matrizes correlatas. Em contrapartida às vantagens já mencionadas relativamente ao grande número de dados obtidos por GC×GC/TOFMS, o tratamento destes dados, após a realização das análises, é trabalhoso e demorado para amostras complexas. Sendo assim o uso de ferramentas estatísticas, como razão de Fisher, PCA e LDA permitiu redução da dimensionalidade dos dados obtidos através da GC×GC/TOFMS, de forma que foi possível diferenciar vinhos elaborados a partir de cinco cultivares de uvas. Doze compostos foram indicados pela análise multivariada como os mais discriminatórios das diferentes cultivares de uva dos cinco tipos de vinhos. Os compostos que diferenciam os vinhos Sauvignon Blanc foram succinato de dietila, 2,3-butanodiol e 3-pentenona. Os terpenos nerol, β-santalol, e 4-careno foram considerados discriminantes para os vinhos 50% Chardonnay/Pinot Noir. Os vinhos Chardonnay foram diferenciados dos demais vinhos através dos ésteres: malonato de dietila e do 9-decenoato de etila. Um álcool com nove átomos de carbono em sua estrutura e a dihidro-2(3H)-tiofenona foram responsáveis pela diferenciação dos vinhos Merlot e as furanonas tetrahydro-2H-piranona e 3-metil-2(5H)-furanona foram apontadas como os compostos mais discriminantes para os vinhos Cabernet Sauvignon.

A maior riqueza de informações proporcionada pela GC×GC/TOFMS, a qual se traduz na separação e identificação tentativa de um número maior de compostos (inclusive de compostos anteriormente não detectados e/ou separados e identificados) aliada à redução de dimensionalidade proporcionada pela análise

multivariada destes dados são resultados de máximo interesse para a indústria vitivinícola, visto que apontam para uma possível simplificação do controle de qualidade dos vinhos através da simples análise de compostos voláteis específicos de variedades de uvas (marcadores), bem como para a distinção de diferentes formas de produção, adulteração ou de *terroir*. A escolha de um pequeno número de marcadores de qualidade e/ou *terroir* pode tornar possível o emprego rotineiro da 1D-GC/MS, através de colunas capilares seletivas, de forma a direcionar a análise para compostos marcadores, tornando o controle de qualidade mais econômico. Neste caso, a GCxGC/TOFMS abre os caminhos para uma caracterização mais abrangente da composição volátil dos voláteis de vinhos e outras bebidas e alimentos e a 1D-GC/MS pode ser aplicada na rotina das indústrias, a partir dos resultados previamente alcançados por GCxGC/TOFMS.

O fato de as diferenças entre os LTPRI calculados experimentalmente para compostos voláteis de vinhos Chardonnay e Merlot em um conjunto de colunas DB-Wax x DB-17ms, por GCxGC/TOFMS terem se mostrado inferiores a 20 unidades para 97% dos compostos tentativamente identificados nestes vinhos demonstra que a simples comparação entre os dados de retenção obtidos na 1D-GC pode ser usada para a identificação tentativa de compostos voláteis de bebidas, em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. Este tipo de comparação pode, provavelmente ser estendida para outras matrizes, como óleos essenciais, perfumes, compostos voláteis de alimentos industrializados ou não, plantas, frutas, feromônios, amostras de interesse ambiental, geoquímico, forense, etc, o que representa uma avanço em termos de praticidade e simplicidade da análise qualitativa em GCxGC/TOFMS, quando do uso de conjunto de colunas polar x medianamente polar. Uma relação linear entre os LTPRI de referência da 1D-GC e aqueles LTPRI calculados para 22 compostos presentes em aroma de vinhos no jogo polar x medianamente polar valida a identificação tentativa destes compostos voláteis por GCxGC/TOFMS no jogo de colunas supracitado através da simples comparação dos dados obtidos com aqueles LTPRI de referência da 1D-GC. Além disso, a coletânea de LTPRI apresentada neste trabalho auxiliará pesquisadores e profissionais relacionados a este tema, na investigação da identidade de compostos voláteis separados por fases estacionárias polares, as quais são reconhecidas como fases mais difíceis no que tange à obtenção de dados de retenção reprodutivos.

O método de HS-SPME desenvolvido para os voláteis de vinhos Chardonnay gaúchos, juntamente com a análise destes compostos por 1D-GC/MS, foi aplicado com êxito a cinco amostras de vinho base, trazendo elucidação da composição qualitativa do aroma deste vinho através de GC/qMS. Verificou-se também concordância entre as características de aroma dos compostos majoritários encontrados e os atributos sensoriais dos vinhos em estudo, os quais foram avaliados por um painel de provadores. O mesmo método de HS-SPME serviu para a investigação dos compostos voláteis por GC×GC/TOFMS de Chardonnay e outros vinhos gaúchos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INAO - Institut National des Appellations d'Origine; *Le goût de l'origine*; Hachette: Paris, **2005**.
2. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Complementação de Padrões de Identidade e Qualidade de Vinho. Diário Oficial da União de 31 de outubro de 1988.
3. Ribéreau-Gayon P.; Glories Y.; Maujean A.; D., D.; *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*; John Wiley & Sons: Bordeaux, **2000**.
4. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145.
5. Kataoka, H.; Lord, H.L.; Pawliszyn, J.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 35.
6. Schoenmakers, P.; Marriott, P.; Beens, J.; *LC GC Eur.* **2003**, *16*, 335.
7. Bianchi, F.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 563.
8. Rocha, S.M.; Coelho, E.; Zrostlikova, J.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1161*, 292.
9. Beens, J.; Brinkman, U.A.T.; *Analyst* **2005**, *130*, 123.
10. Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S.; *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 310.
11. Lona, A.A.; *Vinhos e Espumantes - Degustação, Elaboração e Serviço*; Age: Porto Alegre, **2009**.
12. Guerra, C.C.; Mandelli, F.; Tonietto, J.; Zanus, M.C.; Camargo, U.A.; *Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos*; Documentos/Embrapa Uva e Vinho; Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, 2009.
13. Mello, L.M.R.; *Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial – Panorama 2011*; Comunicado Técnico da Embrapa Uva e Vinho; Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, 2012.
14. Vannier, A.; Brun, O.X.; Feinberg, M.H.; *Food Qual. Pref.* **1999**, *10*, 101.
15. Shepherd, G.M.; *Nature* **2006**, *444*, 316.
16. Marti, M.P.; Mestres, M.; Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7861.
17. Li, H.; Tao, Y.-S.; Wang, H.; Zhang, L.; *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 287.
18. Saenz-Navajas, M.-P.; Campo, E.; Cullere, L.; Fernandez-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5574.
19. Yanniotis, S.; Kotseridis, G.; Orfanidou, A.; Petraki, A.; *J. Food Eng.* **2007**, *81*, 399.
20. Chira, K.; Jourdes, M.; Teissedre, P.-L.; *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *234*, 253.
21. He, F.; Liang, N.-N.; Mu, L.; Pan, Q.-H.; Wang, J.; Reeves, M.J.; Duan, C.-Q.; *Molecules* **2012**, *17*, 1571.
22. Comuzzo, P.; Tat, L.; Fenzi, D.; Brotto, L.; Battistutta, F.; Zironi, R.; *Food Chem.* **2011**, *127*, 473.
23. Robinson, A.L.; Ebeler, S.E.; Heymann, H.; Boss, P.K.; Solomon, P.S.; Trengove, R.D.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10313.
24. Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F.F.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 1145.
25. Polaskova, P.; Herszage, J.; Ebeler, S.E.; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2478.
26. Lorenzo, C.; Pardo, F.; Zalacain, A.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R.; *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 777.
27. Escudero, A.; Campo, E.; Farina, L.; Cacho, J.; Ferreira, V.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4501.

28. Clarke, R.J.; Bakker, J.; *Wine flavour chemistry*; Blackwell Publishing: Oxford, **2004**.
29. Bueno, J.E.; Peinado, R.; Moreno, J.; Medina, M.; Moyano, L.; Zea, L.; *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 158.
30. Cabredo-Pinillos, S.; Cedron-Fernandez, T.; Saenz-Barrio, C.; *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 1317.
31. Falque, E.; Darriet, P.; Fernandez, E.; Dubourdiou, D.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 464.
32. Belancic, A.; Agosin, E.; Ibacache, A.; Bordeu, E.; Baumes, R.; Razungles, A.; Bayonove, C.; *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 181.
33. Gomez-Miguez, M.J.; Gomez-Miguez, M.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J.; *J. Food Eng.* **2007**, *79*, 758.
34. Fang, Y.; Qian, M.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8567.
35. Dennis, E.G.; Keyzers, R.A.; Kalua, C.M.; Maffei, S.M.; Nicholson, E.L.; Boss, P.K.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2638.
36. Hernandez-Orte, P.; Cersosimo, M.; Loscos, N.; Cacho, J.; Garcia-Moruno, E.; Ferreira, V.; *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 773.
37. Pogorzelski, E.; Wilkowska, A.; *Flavour Frag. J.* **2007**, *22*, 251.
38. McCaskill, D.; Croteau, R.; *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 349.
39. Camara, J.S.; Marques, J.C.; Perestrelo, R.M.; Rodrigues, F.; Oliveira, L.; Andrade, P.; Caldeira, M.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1150*, 198.
40. Gurbuz, O.; Rouseff, J.M.; Rouseff, R.L.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3990.
41. Genovese, A.; Gambuti, A.; Piombino, P.; Moio, L.; *Food Chem.* **2007**, *103*, 1228.
42. Ferreira, V.; Lopez, R.; Cacho, J.F.; *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1659.
43. Fang, Y.; Qian, M.; *Flavour Frag. J.* **2005**, *20*, 22.
44. Ong, P.K.C.; Acree, T.E.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 665.
45. Miller, G.C.; Amon, J.M.; Simpson, R.F.; *Food Technol. Aust.* **1987**, *39*, 246.
46. Aznar, M.; Arroyo, T.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1165*, 151.
47. Tao, Y.-S.; Li, H.; *Natural Science* **2009**, *1*, 176.
48. Guth, H.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3027.
49. Lacey, M.J.; Allen, M.S.; Harris, R.L.N.; Brown, W.V.; *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 103.
50. de Boubee, D.R.; Van Leeuwen, C.; Dubourdiou, D.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4830.
51. Falcao, L.D.; de Revel, G.; Perello, M.C.; Moutsiou, A.; Zanus, M.C.; Bordignon-Luiz, M.T.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3605.
52. Winterhalter, P.; Schreier, P.; *Flavour Frag. J.* **1994**, *9*, 281.
53. Enzell, C.; *Pure App. Chem.* **1985**, *57*, 693.
54. Baumes, R.; Wirth, J.; Bureau, S.; Gunata, Y.; Razungles, A.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 3.
55. Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 331.
56. Goldner, M.C.; Zamora, M.C.; Di Leo Lira, P.; Gianninoto, H.; Bandon, A.; *J. Sens. Stu.* **2009**, *24*, 243.
57. Nykanen, L.; Nykanen, I.; *J. Inst. Brewing* **1977**, *83*, 30.
58. Garcia, C.V.; Quek, S.-Y.; Stevenson, R.J.; Winz, R.A.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8358.
59. Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S.; *South African J. Enol. Vitic.* **2000**, *21*, 97.
60. Swiegers, J.H.; Pretorius, I.S. In *Advances in Applied Microbiology*; Laskin, A.I. (Edt.); Elsevier: Londres, **2005**, p. 131.

61. Rapp, A.; Mandery, H.; *Experientia* **1986**, *42*, 873.
62. Pretorius, I.S.; Hoj, P.B.; *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 83.
63. Ferreira, A.C.S.; Rodrigues, P.; Hogg, T.; De Pinho, P.G.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 727.
64. Baena-Ruano, S.; Santos-Duenas, I.M.; Mauricio, J.C.; Garcia-Garcia, I.; *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 2675.
65. Cullere, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1653.
66. Saerens, S.M.G.; Delvaux, F.; Verstrepen, K.J.; Van Dijck, P.; Thevelein, J.M.; Delvaux, F.R.; *Ap. Env. Microbiol.* **2008**, *74*, 454.
67. San Juan, F.; Cacho, J.; Ferreira, V.; Escudero, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5045.
68. Gomez-Miguez, M.J.; Cacho, J.F.; Ferreira, V.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J.; *Food Chem.* **2007**, *100*, 1464.
69. Tominaga, T.; des Gachons, C.P.; Dubourdieu, D.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5215.
70. Noguerol-Pato, R.; Gonzalez-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gandara, J.; *Food Chem.* **2009**, *117*, 473.
71. Ferreira, V.; Ortin, N.; Escudero, A.; Lopez, R.; Cacho, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4048.
72. de Revel, G.; Martin, N.; Pripis-Nicolau, L.; Lonvaud-Funel, A.; Bertrand, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4003.
73. Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 569.
74. Romero, C.; Bakker, J.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, *35*, 129.
75. Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *96*, 235.
76. Ferreira, A.C.S.; Barbe, J.C.; Bertrand, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4356.
77. Gomez Garcia-Carpintero, E.; Gomez Gallego, M.A.; Sanchez-Palomo, E.; Gonzalez Vinas, M.A.; *Food Chem.* **2012**, *134*, 851.
78. Saez, J.S.; Lopes, C.A.; Kirs, V.C.; Sangorrin, M.P.; *Let. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 170.
79. Parker, M.; Osidacz, P.; Baldock, G.A.; Hayasaka, Y.; Black, C.A.; Pardon, K.H.; Jeffery, D.W.; Geue, J.P.; Herderich, M.J.; Francis, I.L.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2629.
80. Boutou, S.; Chatonnet, P.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1141*, 1.
81. Bosch-Fuste, J.; Riu-Aumatell, M.; Guadayol, J.M.; Calxach, J.; Lopez-Tamamaes, E.; Buxaderas, S.; *Food Chem.* **2007**, *105*, 428.
82. Andujar-Ortiz, I.; Moreno-Arribas, M.V.; Martin-Alvarez, P.J.; Pozo-Bayon, M.A.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7351.
83. Castro, R.; Natera, R.; Benitez, P.; Barroso, C.G.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 141.
84. Hernanz, D.; Gallo, V.; Recamales, A.F.; Melendez-Martinez, A.J.; Heredia, F.J.; *Talanta* **2008**, *76*, 929.
85. Ortega-Heras, M.; Gonzalez-SanJose, M.L.; Beltran, S.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 85.
86. Mamede, M.E.O.; Pastore, G.M.; *Food Chem.* **2006**, *96*, 586.
87. Simpson, N.J.K.; *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*; Marcel Dekker: New York, **2000**.
88. Castro, R.; Natera, R.; Durán, E.; García-Barroso, C.; *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 1.

89. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; *J. Microcol. Separ.* **1999**, *11*, 737.
90. Perestrelo, R.; Nogueira, J.M.F.; Camara, J.S.; *Talanta* **2009**, *80*, 622.
91. Tredoux, A.; de Villiers, A.; Majek, P.; Lynen, F.; Crouch, A.; Sandra, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4286.
92. Coelho, E.; Perestrelo, R.; Neng, N.R.; Camara, J.S.; Coimbra, M.A.; Nogueira, J.M.F.; Rocha, S.M.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, *624*, 79.
93. Weldegergis, B.T.; Crouch, A.M.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10225.
94. Costa, R.; Dugo, P.; Mondello, L.; *LC GC Europe* **2012**, *1*, 8.
95. Demyttenaere, J.C.R.; Dagher, C.; Sandra, P.; Kallithraka, S.; Verhe, R.; De Kimpe, N.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *985*, 233.
96. Kovacevic, M.; Kac, M.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *918*, 159.
97. De Schutter, D.P.; Saison, D.; Delvaux, F.; Derdelinckx, G.; Rock, J.-M.; Neven, H.; Delvaux, F.R.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1179*, 75.
98. Butkhup, L.; Jeenphakdee, M.; Jorjong, S.; Samappito, S.; Samappito, W.; Chowtivannakul, S.; *Food Sci. Biotechnol.* **2011**, *20*, 1021.
99. Pizarro, C.; Perez-del-Notario, N.; Gonzalez-Saiz, J.M.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6013.
100. Kataoka, H.; *Cur. Pharmac. Anal.* **2005**, *1*, 65.
101. Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C.; *Food Chemistry* **2003**, *80*, 125.
102. Xi, Z.-m.; Tao, Y.-s.; Zhang, L.; Li, H.; *Food Chem.* **2011**, *127*, 516.
103. Weldegergis, B.T.; de Villiers, A.; McNeish, C.; Seethapathy, S.; Mostafa, A.; Gorecki, T.; Crouch, A.M.; *Food Chem.* **2011**, *129*, 188.
104. Heftmann, E.; *Chromatography*; Elsevier: Amsterdam, **2004**.
105. Poole, C.F.; *The Essence of Chromatography*; Elsevier: Amsterdam, **2003**.
106. Taylor, A.J.; Linfoth, R.; *Food Flavour Technology*; Wiley-Blackwell: Sinagura, **2010**.
107. Riu-Aumatell, M.; Bosch-Fuste, J.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S.; *Food Chem.* **2006**, *95*, 237.
108. Rangunathan, N.; Krock, K.A.; Wilkins, C.L.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1012.
109. Ochiai, N.; Sasamoto, K.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3180.
110. Falcao, L.D.; Lytra, G.; Darriet, P.; Barbe, J.C.; *Food Chem.* **2012**, *132*, 230.
111. Liberatore, M.T.; Pati, S.; Del Nobile, M.A.; La Notte, E.; *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 996.
112. Lee, S.J.; Noble, A.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8036.
113. Jiang, B.; Zhang, Z.; *Molecules* **2010**, *15*, 9184.
114. Ivanova, V.; Stefova, M.; Vojnoski, B.; Stafilov, T.; Bíró, I.; Bufa, A.; Felinger, A.; Kilár, F.; *Food Biopr. Technol.* **2012**, *in press*.
115. Lee, D.-H.; Kang, B.-S.; Park, H.-J.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11657.
116. Robinson, A.L.; Adams, D.O.; Boss, P.K.; Heymann, H.; Solomon, P.S.; Trengove, R.D.; *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2011**, *17*, 327.
117. Robinson, A.L.; Boss, P.K.; Heymann, H.; Solomon, P.S.; Trengove, R.D.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 504.
118. Girard, B.; Yuksel, D.; Cliff, M.A.; Delaquis, P.; Reynolds, A.G.; *Food Research International* **2001**, *34*, 483.
119. Schmarr, H.-G.; Bernhardt, J.; Fischer, U.; Stephan, A.; Mueller, P.; Durner, D.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *672*, 114.
120. Moreno, J.J.; Cerpa-Calderon, F.; Cohen, S.D.; Fang, Y.; Qian, M.; Kennedy, J.A.; *Food Chem.* **2008**, *109*, 755.

121. Makhotkina, O.; Pineau, B.; Kilmartin, P.A.; *Austr. J. Grape Wine Res.* **2012**, 18, 91.
122. Rodriguez-Nogales, J.M.; Fernandez-Fernandez, E.; Vila-Crespo, J.; *J. Sci. Food Agric.* **2009**, 89, 1927.
123. Sonni, F.; Chinnici, F.; Natali, N.; Riponi, C.; *Food Chem.* **2011**, 129, 1193.
124. Liu, Z.; Phillips, J.B.; *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, 29, 227.
125. Semard, G.; Gouin, C.; Bourdet, J.; Bord, N.; Livadaris, V.; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 3146.
126. Ryan, D.; Morrison, P.; Marriott, P.J.; *J. Chromatogr. A* **2005**, 1071, 47.
127. Von Muhlen, C.; Zini, C.A.; Caramão, E.B.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 682.
128. Cordero, C.; Bicchi, C.; Rubiolo, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 7655.
129. Mondello, L.; Tranchida, P.Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, 27, 101.
130. Schure, M.R.; *J. Microcol. Separ.* **1997**, 9, 169.
131. von Muhlen, C.; Zini, C.A.; Caramao, E.B.; Marriott, P.J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1200, 34.
132. Górecki, T.; Harynuk, J.; Pani, O.; *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 359
133. von Muhlen, C.; Alcaraz Zini, C.; Caramao, E.B.; Marriott, P.J.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 682.
134. Edwards, M.; Mostafa, A.; Gorecki, T.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 2335.
135. Cortes, H.J.; Winniford, B.; Luong, J.; Pursch, M.; *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 883.
136. Marriott, P.J.; Massil, T.; Hugel, H.; *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 1273.
137. Adahchour, M.; van Stee, L.L.P.; Beensa, J.; Vreulsa, R.J.J.; Batenburgb, M.A.; Brinkmana, U.A.T.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 1019, 157.
138. Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P.Q.; Dugo, P.; Costa, R.; Saverio, F.; Dugo, G.; *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 442.
139. Souza, P.P.; Cardeal, Z.D.; Augusti, R.; Morrison, P.; Marriott, P.J.; *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 2881.
140. Pedroso, M.P.; Ferreira, E.C.; Hantao, L.W.; Bogusz, S., Jr.; Augusto, F.; *J. Sep. Sci.* **2011**, 34, 1547.
141. Schmarr, H.-G.; Bernhardt, J.; *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 565.
142. Shao, Y.; Marriott, P.; Hugel, H.; *Chromatographia* **2003**, 57, S349.
143. Ryan, D.; Watkins, P.; Smith, J.; Allen, M.; Marriott, P.J.; *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1075.
144. Banerjee, K.; Patil, S.H.; Dasgupta, S.; Oulkar, D.P.; Patil, S.B.; Savant, R.; Adsule, P.G.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1190, 350.
145. Perestrelo, R.; Petronilho, S.; Camara, J.S.; Rocha, S.M.; *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 3441.
146. Mayadunne, R.; Nguyen, T.; Marriott, P.J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 836.
147. Rowe, D.; *Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances*: Cornwall, **2005**.
148. Zellner, B.d.A.; Bicchi, C.; Dugo, P.; Rubiolo, P.; Dugo, G.; Mondello, L.; *Flavour Frag. J.* **2008**, 23, 297.
149. Kovats, E.; *Helv. Chim. Acta* **1958**, 41, 1915.
150. Van den Dool, H.; Kratz, P.D.; *J. Chromatogr. A* **1963**, 11, 463.
151. Shellie, R.A.; Marriott, P.J.; Huie, C.W.; *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 1185.
152. Shellie, R.A.; Marriott, P.J.; *Analyst* **2003**, 128, 879.
153. Adams, R.P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*; Allured Publishing Corp: Carol Stream, **1995**.
154. von Muehlen, C.; Marriott, P.J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 2351.

155. Shellie, R.A.; Xie, L.; Marriott, P.J.; *J. Chromatogr. A* **2002**, 968, 161.
156. Bieri, S.; Marriott, P.J.; *Anal. Chem.* **2006**, 78, 8089.
157. Beens, J.; Tijssen, R.; Blomberg, J.; *J. Chromatogr. A* **1998**, 822, 233.
158. Western, R.J.; Marriott, P.J.; *J. Sep. Sci.* **2002**, 25, 832.
159. Vendeuvre, C.; Bertoncini, F.; Thiebaut, D.; Martin, M.; Hennion, M.C.; *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1129.
160. Krist, S.; Stuebiger, G.; Bail, S.; Unterweger, H.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6385.
161. McCallum, N.K.; Rothbaum, H.P.; Otlet, R.L.; *Food Technol. Austr.* **1986**, 38, 318.
162. Mildner-Szkudlarz, S.; Jelen, H.H.; *Food Chem.* **2008**, 110, 751.
163. Zhang, J.; Li, L.; Gao, N.; Wang, D.; Gao, Q.; Jiang, S.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, 662, 137.
164. Camara, J.S.; Alves, M.A.; Marques, J.C.; *Talanta* **2006**, 68, 1512.
165. Fan, W.; Xu, Y.; Jiang, W.; Li, J.; *J. Food Sci.* **2010**, 75, S81.
166. Green, J.A.; Parr, W.V.; Breitmeyer, J.; Valentin, D.; Sherlock, R.; *Food Res. Int.* **2011**, 44, 2788.
167. Saenz, C.; Cedron, T.; Cabredo, S.; *J. AOAC Int.* **2010**, 93, 1916.
168. Nasi, A.; Ferranti, P.; Amato, S.; Chianese, L.; *Food Chem.* **2008**, 110, 762.
169. Robinson, A.L.; Boss, P.K.; Heymann, H.; Solomon, P.S.; Trengove, R.D.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 3273.
170. Vestner, J.; Malherbe, S.; Du Toit, M.; Nieuwoudt, H.H.; Mostafa, A.; Gorecki, T.; Tredoux, A.G.J.; de Villiers, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 12732.
171. Pierce, K.M.; Hoggard, J.C.; Mohler, R.E.; Synovec, R.E.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1184, 341.
172. Synovec, R.E.; Prazen, B.J.; Johnson, K.J.; Fraga, C.G.; Bruckner, C.A.; *Adv. Chromatogr.* **2003**, 42, 1.
173. Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O.; *Quim. Nova* **1999**, 22, 724.
174. Kowalski, B.R.; *Chemometrics, Mathematics and Statistics in Chemistry*; Springer: Cosenza, **1983**.
175. Brereton, R.; *Chemometrics for Pattern Recognition*; John Wiley & Sons: Chichester, **2007**.
176. Reddy, T.A.; *Applied Data Analysis and Modeling for Energy Engineers and Scientists*; Springer: Arizona, **2011**.
177. Teófilo, R.F.; Ferreira, M.M.C.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 338.
178. Beebe, K.R.; Pell, R.J.; Seasholtz, M.B.; *Chemometrics: A practical guide* John Wiley & Sons: New York, **1998**.
179. Hinkelmann, K.; O., K.; *Design and Analysis of Experiments*; Austem: Hoboken, **1994**.
180. Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, S.J.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J.; *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Parte B*; Elsevier: Amsterdam, **1997**.
181. 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.* **2006**, 78, 5068.
182. Berrueta, L.A.; Alonso-Salces, R.M.; Heberger, K.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1158, 196.
183. Schale, S.P.; Le, T.M.; Pierce, K.M.; *Talanta* **2012**, 94, 320.
184. Humston, E.M.; Knowles, J.D.; McShea, A.; Synovec, R.E.; *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 1963.
185. Fisher, R.A.; *Ann. Eugenics* **1936**, 7, 179.

186. Tao, Y.; Li, H.; Wang, H.; Zhang, L.; *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 689.
187. Verzera, A.; Ziino, M.; Condurso, C.; Romeo, V.; Zappala, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 930.
188. Boido, E.; Lloret, A.; Medina, K.; Farina, L.; Carrau, F.; Versini, G.; Dellacassa, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5408.
189. Kumazawa, K.; Itobe, T.; Nishimura, O.; Hamaguchi, T.; *Food Sci. Technol. Res.* **2008**, *14*, 269.
190. Lin, J.M.; Rouseff, R.L.; *Flavour Frag. J.* **2001**, *16*, 457.
191. Yu, E.J.; Kim, T.H.; Kim, K.H.; Lee, H.J.; *Flavour Frag. J.* **2004**, *19*, 74.
192. Ferretti, G.; Maggi, F.; Tirillini, B.; *Flavour Frag. J.* **2005**, *20*, 295.
193. Sun, S.Y.; Jiang, W.G.; Zhao, Y.P.; *Flavour Frag. J.* **2010**, *25*, 206.
194. Laribi, B.; Bettaieb, I.; Kouki, K.; Sahli, A.; Mougou, A.; Marzouk, B.; *Ind. Crops Prod.* **2009**, *30*, 372.
195. Lammers, M.; Dietze, K.; Ternes, W.; *J. Muscle Foods* **2009**, *20*, 255.
196. Lee, G.H.; Shin, Y.; Oh, M.J.; *J. Food Sci.* **2008**, *73*, C500.
197. Watcharananun, W.; Cadwallader, K.R.; Huangrak, K.; Kim, H.; Lorjaroenphon, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 996.
198. Werkhoff, P.; Guntert, M.; Krammer, G.; Sommer, H.; Kaulen, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1076.
199. Morales, A.L.; Duque, C.; *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 221.
200. Fan, W.L.; Qian, M.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2695.
201. Selli, S.; Canbas, A.; Cabaroglu, T.; Erten, H.; Gunata, Z.; *Food Chem.* **2006**, *94*, 319.
202. Umano, K.; Hagi, Y.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 599.
203. Verzera, A.; Ziino, M.; Scacco, A.; Lanza, C.M.; Mazzaglia, A.; Romeo, V.; Condurso, C.; *Food Anal. Met.* **2008**, *1*, 144.
204. Sampaio, K.L.; Garruti, D.S.; Franco, B.R.B.; Janzantti, N.S.; Da Silva, M.A.A.P.; *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 1801.
205. Kourkoutas, D.; Elmore, J.S.; Mottram, D.S.; *Food Chem.* **2006**, *97*, 95.
206. Zhao, Y.; Xu, Y.; Li, J.; Fan, W.; Jiang, W.; *J. Food Sci.* **2009**, *74*, C90.
207. Ferrari, G.; Lablanquie, O.; Cantagrel, R.; Ledauphin, H.; Payot, T.; Fournier, N.; Guichard, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5670.
208. Wu, S.M.; Krings, U.; Zorn, H.; Berger, R.G.; *Food Chem.* **2005**, *92*, 221.
209. Choi, H.S.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2687.
210. Selli, S.; Cayhan, G.G.; *Microchem. J.* **2009**, *93*, 232.
211. Condurso, C.; Verzera, A.; Romeo, V.; Ziino, M.; Conte, F.; *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 819.
212. Kim, T.H.; Thuy, N.T.; Shin, J.H.; Baek, H.H.; Lee, H.J.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2877.
213. Cai, J.B.; Lin, P.; Zhu, X.L.; Su, Q.D.; *Food Chem.* **2006**, *99*, 401.
214. Takeoka, G.R.; Guntert, M.; Flath, R.A.; Wurz, R.E.; Jennings, W.; *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 576.
215. Mahajan, S.S.; Goddik, L.; Qian, M.C.; *J. Dairy Sc.* **2004**, *87*, 4057.
216. Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desiobert, J.-M.; Bernardini, A.-F.; Costa, J.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 132.
217. Chyau, C.C.; Chen, S.Y.; Wu, C.M.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 846.
218. Frohlich, O.; Duque, C.; Schreier, P.; *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 421.
219. Lammers, M.; Dietze, K.; Ternes, W.; *J. Food Proc. Preser.* **2011**, *35*, 850.
220. Selli, S.; Bagatar, B.; Sen, K.; Kelebek, H.; *Chem. Biodiv.* **2011**, *8*, 1776.
221. Lee, K.G.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4290.

222. Pozo-Bayon, M.A.; Ruiz-Rodriguez, A.; Pernin, K.; Cayot, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1418.
223. Schindler, S.; Wittig, M.; Zelena, K.; Krings, U.; Bez, J.; Eisner, P.; Berger, R.G.; *Food Chem.* **2011**, *128*, 330.
224. de Simon, B.F.; Esteruelas, E.; Munoz, A.M.; Cadahia, E.; Sanz, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3217.
225. Escudero, A.; Etievant, P.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3303.
226. Chung, H.Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2690.
227. Dall'Asta, C.; Cirlini, M.; Morini, E.; Galaverna, G.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7557.
228. Saidana, D.; Mahjoub, S.; Boussaada, O.; Chriaa, J.; Mahjoub, M.A.; Cheraif, I.; Daami, M.; Mighri, Z.; Helal, A.N.; *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 817.
229. Ledauphin, J.; Saint-Clair, J.F.; Lablanquie, O.; Guichard, H.; Fournier, N.; Guichard, E.; Barillier, D.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5124.
230. Annan, N.T.; Poll, L.; Plahar, W.A.; Jakobsen, M.; *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 53.
231. Cayhan, G.G.; Selli, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 654.
232. Du, X.; Song, M.; Rouseff, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1293.
233. Varlet, V.; Prost, C.; Serot, T.; *Food Chem.* **2007**, *105*, 1536.
234. Takahashi, T.; Mizuib, K.; Miyazawa, M.; *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 489.
235. Garcia-Carpintero, E.G.; Sanchez-Palomo, E.; Gonzalez-Vinas, M.A.; *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 61.
236. Brunton, N.P.; Cronin, D.A.; Monahan, F.J.; *Flavour Frag. J.* **2002**, *17*, 327.
237. Liu, X.; Jin, Q.; Liu, Y.; Huang, J.; Wang, X.; Mao, W.; Wang, S.; *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C404.
238. Meret, M.; Brat, P.; Mertz, C.; Lebrun, M.; Guenata, Z.; *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 54.
239. Shiratsuchi, H.; Shimoda, M.; Imayoshi, K.; Noda, K.; Osajima, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 984.
240. Pino, J.; González, M.; Ceballos, L.; Centurión-Yah, A.R.; Trujillo-Aguirre, J.; Latournerie-Moreno, L.; Sauri-Duch, E.; *Food Chem.* **2007**, *104*, 1682.
241. Sanz, C.; Ansorena, D.; Bello, J.; Cid, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1364.
242. Umano, K.; Hagi, Y.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3463.
243. Davies, N.W.; *J. Chromatogr. A* **1990**, *503*, 1.
244. Vekiari, S.A.; Oreopoulou, V.; Kourkoutas, Y.; Kamoun, N.; Msallem, M.; Psimouli, V.; Arapoglou, D.; *Grasas Y Aceites* **2010**, *61*, 221.
245. Mayorga, H.; Knapp, H.; Winterhalter, P.; Duque, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1904.
246. Peng, C.T.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *903*, 117.
247. Guo, L.; Wu, J.-Z.; Han, T.; Cao, T.; Rahman, K.; Qin, L.-P.; *Molecules* **2008**, *13*, 2114.
248. Whetstine, M.E.C.; Karagul-Yuceer, Y.; Avsar, Y.K.; Drake, M.A.; *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2441.
249. Moon, J.-K.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5465.
250. Klesk, K.; Qian, M.; Martin, R.R.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5155.
251. Iwaoka, W.; Hagi, Y.; Umano, K.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 975.
252. Lee, S.J.; Umano, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.G.; *Food Chem.* **2005**, *91*, 131.

253. Kosar, M.; Demirci, B.; Demirci, F.; Baser, K.H.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2260.
254. Miller, M.E.; Stuart, J.D.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 23.
255. Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C.; *Food Chem.* **2003**, *80*, 125.
256. Yang, C.; Wang, Y.; Wu, B.; Fang, J.; Li, S.; *Food Chem.* **2011**, *128*, 823.
257. Camara, J.S.; Alves, M.A.; Marques, J.C.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 188.
258. Mestres, M.; Marti, M.; Busto, O.; Guasch, J.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 293.
259. Fan, W.; Qian, M.C.; *Flavour Frag. J.* **2006**, *21*, 333.
260. Zhu, S.; Lu, X.; Ji, K.; Guo, K.; Li, Y.; Wu, C.; Xu, G.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *597*, 340.
261. Dalluge, J.; Beens, J.; Brinkman, U.A.T.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 69.
262. Marriott, P.J.; Shellie, R.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 573.
263. Leco, in *Book Pegasus HT and ChromaTOF Software Instruction Manual*, ed., ed. by Editor, City, **2007**, Vol. Version 3.3, Chap. Chapter.
264. Perestrelo, R.; Caldeira, M.; Rodrigues, F.; Camara, J.S.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1841.
265. Forde, C.G.; Cox, A.; Williams, E.R.; Boss, P.K.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2573.
266. Qian, M.C.; Fang, Y.; Shellie, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7459.
267. Etiévant, P.X. In *Wine*; Maarse, H. (Edt.); Marcel Dekker: New York, **1991**, p. 483.
268. The Good Cents Company; Flavour and Fragrances; <http://www.thegoodscent.companhy.com>; acessado em 06/06/2012.
269. Tarjan, G.; Nyiredy, S.; Gyor, M.; Lombosi, E.R.; Lombosi, T.S.; Budahegyi, M.V.; Meszaros, S.Y.; Takacs, J.M.; *J. Chromatogr. A* **1989**, *472*, 1.
270. Budahegyi, M.V.; Lombosi, E.R.; Lombosi, T.S.; Meszaros, S.Y.; Nyiredy, S.; Tarjan, G.; Timar, I.; Takacs, J.M.; *J. Chromatogr. A* **1983**, *271*, 213.
271. Fu, S.G.; Yoon, Y.; Bazemore, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 549.
272. Ruther, J.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *890*, 313.
273. Weckerle, B.; Bastl-Borrmann, R.; Richling, E.; Hor, K.; Ruff, C.; Schreier, P.; *Flavour Frag. J.* **2001**, *16*, 360.
274. Buttery, R.G.; Orts, W.J.; Takeoka, G.R.; Nam, Y.L.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4353.
275. Umamo, K.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3702.
276. Bemgard, A.; Blomberg, L.; *J. Chromatogr. A* **1989**, *473*, 37.
277. Castello, G.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *842*, 51.
278. Richmond, R.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *758*, 319.
279. Pino, J.A.; Marbot, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5880.
280. Lee, K.G.; Shibamoto, T.; *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 1573.
281. Shibamoto, T.; Harada, K.; Yamaguchi, K.; Aitoku, A.; *J. Chromatogr. A* **1980**, *194*, 277.
282. Mjos, S.A.; Meier, S.; Boitsov, S.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1123*, 98.
283. Korany, K.; Amtmann, M.; *J. Food Comp. Anal.* **2006**, *19*, 813.
284. Verevkin, S.P.; *J. Chem. Thermodyn.* **2006**, *38*, 1111.
285. Rasanen, I.; Ojanpera, I.; Vuori, E.; Hase, T.A.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1993**, *16*, 495.
286. Rasanen, I.; Ojanpera, I.; Vuori, E.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1995**, *18*, 66.

287. Ou, C.; Du, X.; Shellie, K.; Ross, C.; Qian, M.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12890.
288. Louw, L.; Roux, K.; Tredoux, A.; Tomic, O.; Naes, T.; Nieuwoudt, H.H.; van Rensburg, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2623.
289. Robinson, A.L.; Mueller, M.; Heymann, H.; Ebeler, S.E.; Boss, P.K.; Solomon, P.S.; Trengove, R.D.; *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 337.
290. Weldegergis, B.T.; de Villiers, A.; Crouch, A.M.; *Food Chem.* **2011**, *128*, 1100.
291. Cejudo-Bastante, M.J.; Hermosin-Gutierrez, I.; Soledad Perez-Coello, M.; *Food Chem.* **2011**, *124*, 738.
292. Quere, J.L.L.; Latrasse, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *38*, 3.
293. Kaiser, H.F.; *Psychometrika* **1958**, *23*, 187.
294. Gomez Garcia-Carpintero, E.; Sanchez-Palomo, E.; Gomez Gallego, M.A.; Gonzalez-Vinas, M.A.; *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1549.
295. Brenna, E.; Fuganti, C.; Serra, S.; *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, *14*, 1.
296. Zhao, Y.P.; Wang, L.; Li, J.M.; Pei, G.R.; Liu, Q.S.; *South Afr. J. Enol. Vitic.* **2011**, *32*, 9.
297. Zheng, C.H.; Kim, K.H.; Kim, T.H.; Lee, H.J.; *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 161.
298. Pino, J.A.; Marbot, R.; Vazquez, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5883.
299. Peng, C.T.; Yang, Z.C.; Ding, S.F.; *J. Chromatogr. A* **1991**, *586*, 85.

7. ANEXOS

Tabela XXXI. Compostos tentativamente identificados no *headspace* de vinhos Chardonnay através da GCxGC/TOFMS.

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
Álcoois							
1	2-Propanol; (isopropanol)	67-63-5	6,18	2,45	0,091	946	938 ²¹⁸
2	Butan-2-ol	78-92-2	10,62	2,53	0,084	1013	988 ²⁷¹ , 994 ²⁷⁹ , 1020 ²⁰⁰ , 1026 ²⁴¹ , 1028 ²⁰⁶ , 1035 ⁷
3	Propan-1-ol	71-23-8	11,57	2,14	3,304	1038	1029 ²⁰⁷ , 1035 ²⁰⁰ , 1036 ¹⁸⁶ , 1052 ⁷
4	2-Metilpropan-1-ol	75-65-0	18,32	2,25	0,025	1091	1077 ²⁰³ , 1081 ²⁰⁸ , 1083 ¹⁹⁹ , 1091 ²⁴⁵ , 1093 ^{7,40,188} , 1096 ²⁰⁴ , 1097 ⁷ , 1103 ²⁴¹ , 1125 ⁶⁵
5	Butan-1-ol	71-36-3	19,25	2,56	0,015	1116	1111 ²⁷³ , 1116 ⁴⁰ , 1119 ¹⁹⁸ , 1133 ²⁰⁸ , 1136 ^{199,207,218} , 1137 ^{200,165} , 1138 [*] , 1144 ²²⁶ , 1148 ²⁴⁴ , 1149 ^{*,199} , 1152 ^{187,206,211} , 1154 ²²² , 1155 ¹⁸⁸ , 1156 ¹⁹³ , 1159 ²⁰⁴ , 1165 ¹⁸⁶
6	Pentan-3-ol	584-02-1	20,18	2,28	0,212	1128	1110 ²⁷³ , 1112 ⁷ , 1118 ¹⁹³ , 1119 ²⁰⁴
7	2-Propen-1-ol	107-18-6	20,30	3,58	0,020	1138	1124 ²⁴¹
8	1-Penten-3-ol	616-25-1	21,35	2,49	0,021	1162	1112 ²⁷³ , 1149 [*] , 1154 ²²³ , 1155 ²⁵² , 1158 ²⁴² , 1160 ²²⁶ , 1163 ²⁴⁴ , 1164 [*] , 1170 ²¹⁰ , 1173 ²⁰⁴ , 1176 ⁷
9	2-Metil-1-butanol	137-32-6	22,17	2,47	0,059	1200	1196 ^{199,203} , 1204 [*]
10	3-Metil-1-butanol	123-51-3	22,52	2,57	0,036	1208	1201 ²⁰⁰ , 1203 ²²³ , 1208 ^{193,202} , 1209 ⁴⁰ , 1213 ¹⁶⁵ , 1229 ²⁰⁶ , 1230 ¹⁸⁶ , 1247 ⁶⁵
11	3-Metil-3-buten-1-ol	763-32-6	23,57	4,01	0,015	1235	1220 ²⁴¹ , 1232 ²⁷³ , 1235 ²⁰⁷ , 1236 ¹⁹⁹ , 1240 ²⁰¹ , 1245 ^{193,252} , 1254 ²⁰⁶ , 1263 ⁷
12	1-Pentanol	71-41-0	23,80	2,49	0,017	1243	1233 ²⁷³ , 1249 ¹⁹³ , 1250 ^{226,242} , 1252 ^{195,219,*} , 1253 [*] , 1255 ^{222,206} , 1256 ¹ , 1257 [*] , 1260 ¹⁸⁸ , 1262 ²⁰⁴ , 1268 ²⁰⁰
13	4-Metil-1-pentanol	626-89-1	26,37	2,24	0,324	1329	1261 ²²¹ , 1301 ²⁰¹ , 1314 ²⁰⁶ , 1318 ²⁰⁴ , 1328 ¹⁸⁸ , 1330 ¹⁸⁶
14	3-Metil-1-pentanol	589-35-5	26,60	3,12	0,114	1330	1313 ²⁰¹ , 1314 ²⁰⁷ , 1318 ²⁰⁶ , 1330 ²⁰⁴ , 1331 ⁴⁰ , 1341 ¹⁸⁸ , 1343 ¹⁸⁶
15	(Z)-2-Penten-1-ol	20273-24-9	26,72	2,47	0,012	1333	1312 ¹⁹⁸ , 1314 ²⁰⁴ , 1317 [*] , 1321 ²⁴⁴ , 1324 ²²⁰ , 1326 ²⁷³ , 1335 ⁷

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
16	1-Hexanol	111-27-3	26,95	2,50	8,349	1341	1332 ²²³ , 1341 ²⁰⁰ , 1342 ^{207,199} , 1343 ²⁰⁴ , 1344 ^{211,191} , 1347 ²²⁰ , 1348 ²⁰⁵ , 1350 ^{195,219} , 1351 ^{272,187,252} , 1353 ^{218,199,*} , 1354 ^{165,23,271,7} , 1355 ^{212,226,226,245} , 1356 ²⁰¹ , 1357 ^{206,*} , 1358 ¹⁹³ , 1360 ^{222,273,244,*} , 1361 [*] , 1368 ¹⁸⁸ , 1371 ^{*,250} , 1379 ⁶⁵ , 1392 ¹⁸⁶ , 1425 ⁴⁰
17	2-Heptanol	543-49-7	27,07	2,14	0,050	1345	1273 [*] , 1303 [*] , 1310 ²⁰⁷ , 1316 ^{189,206} , 1318 ^{200,218,*} , 1320 ²⁴⁵ , 1321 ²⁷¹ , 1332 ²⁴¹ , 1334 ⁷ , 1335 ¹⁸⁶
18	1-Hepten-3-ol	4938-52-7	29,28	3,86	0,011	1355	1341 ¹⁹⁸
19	3-Etóxi-1-propanol	111-35-3	29,40	3,97	0,600	1373	1364 ²⁰¹ , 1377 ²²⁶ , 1378 ¹⁸⁸ , 1409 ¹⁸⁶
20	(E)-3-Hexen-1-ol	928-97-2	29,40	4,06	0,019	1375	1352 ²⁰⁷ , 1361 ¹⁶⁵ , 1364 ²⁷⁹ , 1365 ^{275,242} , 1366 ^{204,206} , 1369 ²⁷³ , 1370 ²¹⁴ , 1374 ¹⁸⁸ , 1377 ²⁰³ , 1384 ²⁰¹ , 1387 ²⁵¹ , 1401 ¹⁸⁶
21	(Z)-3-Hexen-1-ol	928-96-1	29,98	1,86	0,190	1377	1367 ²⁷⁹ , 1371 ⁷ , 1372 ²³⁸ , 1373 ^{193,191} , 1375 ²⁹⁷ , 1376 ²⁰³ , 13 ²⁵² , 1382 ^{165,202} , 1383 ²¹⁰ , 1385 ^{280,244} , 1386 ^{206,242} , 1387 ²⁰¹ , 1388 ²⁰⁴ , 1389 ^{273,214} , 1391 ²¹⁸ , 1392.5 ²¹⁷ , 1358 ²²¹ , 1407 ⁶⁵⁷ , 1415 ¹⁸⁶
22	3-Metil-4-penten-1-ol	763-89-3	31,73	2,84	0,012	1393	1390 ⁵⁸
23	(E)-2-Hexen-1-ol	928-95-0	32,78	4,67	0,059	1416	1390 [*] , 1405 ¹⁹³ , 1406 ^{212,245} , 1407 ²⁰¹ , 1410 ¹⁸⁸ , 1412 ²⁷³ , 1420 ⁷ , 1429 ¹⁸⁶
24	(Z)-2-Hexen-1-ol	928-94-9	33,13	2,51	0,019	1425	1389 ²⁷⁹ , 1403 ²⁷⁵ , 1419 ²⁷³
25	6-Metil-5-hepten-2-ol	110-93-0	35,00	3,88	0,017	1470	1462 ¹⁹⁸ , 1467 [*] , 1469 [*]
26	2-Etil-hexan-1-ol	104-76-7	35,23	2,82	1,108	1478	1461 ¹⁹⁶ , 1470 ²¹⁰ , 1473 [*] , 1474 ²⁰⁰ , 1476 ²⁰⁸ , 1483 ¹⁶⁵ , 1491 ^{202,271,234} , 1492 ^{242,7} , 1502 ²⁰⁴ , 1504 ²⁴⁴
27	2,5,5-Trimetil-2,6-heptadien-4-ol	57590-19-9	35,58	2,82	0,011	1480	1509 ²⁴²
28	2-Nonanol	628-99-9	36,28	2,98	0,018	1525	1510 ¹⁸⁹ , 1515 ¹⁸⁷ , 1530 ^{206,198}
29	3-Etil-4-metil-1-pentanol	100431-87-6	36,63	3,43	0,031	1519	1531 ¹⁸⁶
30	2-Butil-1-octanol	3913-02-8	36,97	2,23	0,010	1533	1528 ²⁴⁷
31	2-(2-Metóxi-propóxi)-1-propanol	83730-60-3	37,22	3,05	0,010	1541	1532 ²²²

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
32	1-Octanol	111-87-5	37,33	2,36	0,246	1545	1533 ¹⁹⁵ , 1543 ²⁰⁸ , 1547 ²¹¹ , 1553 ²¹⁰ , 1556 ²⁷³ , 1558 ^{193,206,271} , 1561 ⁷ , 1562 [*] , 1564 ²⁴⁴ , 1565 [*] , 1568 [*] , 1605 ¹⁸⁶ , 1552 ²⁰⁵ , 1566 ²⁰⁴ , 1539 ²⁰⁰
33	2,4-hexadienol	111-28-4	37,33	3,01	0,018	1553	1523 ²²¹ , 1570 ²⁷⁵
34	2-(2-metóxi-etóxi) etanol	111-77-3	37,58	4,49	0,011	1568	1576 ²⁴⁴
35	2,3-Butanodiol	513-89-3	38,38	3,07	1,978	1586	1539 ²⁷⁴ , 1542 ⁵⁸ , 1580 ⁴⁰ , 1583 ²⁰¹ , 1598 ¹⁸⁶
36	2-Undecenol	37617-03-1	38,62	2,70	0,010	1600	1590 ²³⁰
37	1,2-Propano-diol	57-55-6	39,08	2,78	0,018	1608	1603 ²⁰¹
38	Álcool	-	39,18	2,47	0,023	1613	--
39	2-(2-Etóxi-etóxi) etanol	111-90-0	39,32	3,10	0,281	1622	1636 ²⁴⁴
40	2,7-Dimetil-1-octanol	15-250-22-3	39,42	3,12	0,018	1630	1625 ²²¹
41	(E)-2-Octen-1-ol	18409-17-1	39,67	2,98	0,017	1635	1605 [*] , 1615 ²⁴² , 1620 [*] , 1628 ²²² , 1639 ¹⁸⁶
42	1-Nonanol	143-08-8	40,13	2,07	0,035	1656	1619 ²⁷³ , 1645 ¹⁶⁵ , 1652 ²⁰³ , 1653 ¹⁹³ , 1654 ²⁰⁵ , 1656 ¹⁹⁵ , 1661 ²⁰⁶ , 1667 [*] , 1668 ⁷ , 1671 [*]
43	(E)-2-Nonen-1-ol	31502-14-4	40,25	2,67	0,033	1700	1697 ²³⁰
44	4-Butóxi-1-butanol	4161-24-4	40,52	2,60	0,024	1706	1701 ²⁴⁴
45	(E)-3-Decenol	10339-60-3	42,30	2,78	0,018	1757	1759 ¹⁹⁸
46	Álcool	-	42,70	2,17	0,015	1769	--
47	1-Decanol	112-30-1	42,82	2,46	0,077	1778	1746 [*] , 1748 [*] , 1761 ²⁰⁶ , 1769 ¹⁹⁸ , 1771 ²⁴⁸ , 1781 ¹⁸⁶
48	Diol aromático	-	43,87	2,64	1,921	1825	--
49	2-(2-butóxi-etóxi) etanol	112-34-5	43,98	2,01	0,010	1827	1823 ²⁴⁴
50	Álcool	-	44,27	4,60	0,018	1833	--
51	1-Undecanol	112-42-5	44,45	2,73	0,013	1841	1840 ²³⁶
52	Fenil-metanol (benzilálcool)	100-51-6	45,27	2,88	0,038	1875	1842 ¹⁶⁵ , 1853 ¹⁹⁹ , 1860 ¹⁹³ , 1865 ²⁴⁵ , 1867 ²¹⁸ , 1868 ²⁰² , 1869 ²⁰¹ , 1870 ^{211,252} , 1879 ^{206,222} , 1882 ^{188,274} , 1890 ²⁴⁴ , 1896 ^{186,227} , 1904 ⁴⁰ , 1912 ²²⁰
53	3-Metóxi-2-butanol	53778-72-6	45,62	3,97	0,028	1900	1903 ²⁷¹
54	2-Feniletanol	60-12-8	45,85	2,05	4,362	1917	1888 ²²⁴ , 1891 ¹⁹⁹ , 1896 ²⁰⁷ , 1898 ¹⁶⁵ , 1902 ¹⁹⁹ , 1905 ^{201,252} , 1906 ²⁰⁰ , 1914 ²²² , 1922 ²⁴⁴ , 1923 ¹⁸⁸ , 1931 ^{40,186} , 1940 ⁶⁵ , 1941 ¹⁸⁷ , 1950 ²²⁰
55	(3E)-2,6-Dimetil-3,7-octa-dieno-2,6-diol	13741-21-4	46,32	3,16	0,012	1948	1951 ⁵⁸
56	1-Dodecanol	112-53-8	46,90	4,57	0,018	1984	1956 ²⁰⁸ , 1957 ¹⁹³ , 1969 ²⁴² , 1977 [*] , 1978 [*] , 1981 ⁴⁰
57	1-Tridecanol	112-70-9	48,07	2,01	0,011	2066	2063 ²⁰³
58	Álcool	-	48,07	2,03	0,015	2070	--

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
59	2-Pentadecanol	1653-34-5	48,42	2,16	0,010	2100	2097 ²⁹⁸
60	Álcool	-	48,65	2,48	0,019	2132	--
61	1-Hexadecanol	36653-82-4	48,65	2,69	0,018	2152	2152 ^{210,231} , 2194 ¹⁸⁶
62	Álcool	-	49,35	2,64	0,011	2191	--
63	2,6-Dimetil-2,7- octadieno- 1,6-diol	103619-06-3	49,47	4,27	0,017	2229	2258 ²¹⁸
64	5-(2-Propiniloxi)-2-pentanol	55702-67-5	50,40	2,79	0,018	2272	2273 ²²¹
65	2-Hexadecanol	14852-31-4	51,22	3,11	0,027	2320	2312 ²²¹
66	Álcool	-	51,80	3,90	0,010	2353	--
67	1-Fenil-1,2-propanodiol	1855-09-0	52,02	1,87	0,014	2444	2455 ²⁴⁵
68	1-Heptadecanol	1454-85-9	52,22	2,31	0,015	2459	2475 ²⁹⁹
69	Álcool	-	52,85	2,38	0,038	2667	--
70	Álcool	-	53,25	2,39	0,023	2760	--
	Cetonas						
71	2-Propanona; (acetona)	67-64-1	4,08	2,25	0,167	815	753 ²⁴¹ , 812 ²¹¹ , 814 ⁷ , 816 ²⁴⁴ , 818 ²⁰² , 846 ²⁴²
72	5-Metil-hexan-2-ona	110-12-3	4,67	2,83	0,010	832	825 ²¹¹
73	2-Butanona	78-93-3	5,98	2,54	0,017	900	866 ²⁴¹ , 875 [*] , 893 [*] , 900 [*] , 901 ⁷ , 903 ²¹¹
74	2,3-Butanediona	431-03-8	10,50	3,00	0,044	970	943 ²⁰⁷ , 955 [*] , 962 ²⁴¹ , 970 ⁴⁰ , 975 ²¹¹ , 976 [*] , 983 ⁶⁵ , 986 ⁷ , 999 ²⁵⁰
75	1-Penten-3-ona	1629-58-9	11,22	2,91	0,014	1028	1008 ²⁴⁴ , 1019 [*] , 1020 ²¹⁴ , 1021 ¹⁹⁷ , 1024 ⁷
76	Ciclopentanona	120-92-3	20,42	2,38	0,054	1146	1144 ²¹⁸ , 1154 ²⁷¹
77	5-Metil-3-heptanona (etil amil cetona)	541-85-5	24,27	5,08	0,017	1260	1236 ²⁰⁸ , 1253 ²¹⁶ , 1255 ^{195,219} , 1258 ²²⁶ , 1264 ¹⁸⁹ , 1266 ¹⁸⁶
78	1-Hidróxi-2-propanona (4)	116-09-6	24,62	2,32	0,010	1277	1295 ²⁷⁴
79	3-Hidróxi-2-butanona (acetoina)	513-86-0	24,62	2,62	0,019	1279	1262 ¹⁹⁹ , 1270 ²⁵² , 1276 ²⁰² , 1277 ^{210,245} , 1282 ²⁰⁴ , 1287 ^{211,206,222} , 1289 ⁷ , 1291 ⁴⁰ , 1295 ⁶⁵ , 1305 ²⁴⁹ , 1307 ²⁴¹ , 1314 ²⁴⁷
80	Ciclohexanona	108-94-1	24,62	4,19	0,011	1291	1275 ²⁷⁹ , 1282 ⁷ , 1285 ¹⁹⁸
81	6-Metil-5-hepten-2-ona	110-93-0	25,20	2,73	0,019	1314	1312 ¹⁹⁶ , 1317 ²⁰⁸ , 1324 ¹⁹³ , 1329 ^{271,252} , 1335 ²⁴² , 1338 ²¹¹ , 1340 ⁷

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
82	4-Hidróxi-4-metil-2-pentanona	123-42-2	29,17	2,77	0,016	1372	1339 ²⁰⁸ , 1351 ⁷
83	3-Decanona	928-80-3	35,93	3,23	0,010	1499	1491 ²³⁶
84	2,3-Dimetil-2-ciclopenten-1-ona	1121-05-7	37,47	2,09	0,011	1570	1582 ²⁴¹
85	3-Metil-2-ciclohexen-1-ona	1193-18-6	38,62	2,15	0,018	1592	1579 ¹⁹⁸
86	1-Fenil-etanona (acetofenona)	98-86-2	40,37	5,03	0,062	1665	1619 ²⁰⁷ , 1620 ²²⁴ , 1628 ²⁰⁴ , 1629 ²¹² , 1639 ¹⁶⁵ , 1642*, 1643*, 1645 ²²² , 1649 ²¹¹ , 1652*, 1655*, 1660 ¹⁸⁷
87	Cetona cíclica	-	41,65	2,59	0,013	1713	--
88	2-Hidróxi-2-ciclopenten-1-ona	21835-01-8	42,82	2,93	0,018	1782	1784 ²²⁴
89	2-Dodecanona	6175-49-1	43,52	2,29	0,016	1811	1809 ²¹⁰
90	2-Hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona	765-70-8	43,63	2,77	0,010	1823	1822 ²³⁷ , 1860 ²⁴⁹
91	4-Fenil-3-buten-2-ona	-	48,42	2,13	0,011	2103	--
92	4-Hidróxi-2-ciclohexen-1-ona	53005-18-8	49,93	2,53	0,014	2258	2277 ²⁴⁹
93	Cetona	-	52,03	4,06	0,049	2427	--
94	Cetona	-	53,08	1,76	0,018	2744	--
Ácidos							
95	Ácido 4-metil-2-oxopentanóico (4-metil-2-oxovalérico)	816-66-0	33,37	3,36	0,060	1434	1421 ²²⁹
96	Ácido acético	64-19-7	34,07	2,56	4,561	1447	1419 ²¹⁸ , 1422 ¹⁹⁶ , 1424 ²⁰⁰ , 1433 ²⁷¹ , 1435 ^{193,*} , 1438 ¹⁹⁹ , 1441 ²⁰⁶ , 1442 ^{165,*} , 1445 ^{207,204} , 1448 ²¹³ , 1450 ²⁰³ , 1451 ³³ , 1452 ²²² , 1459 ⁷ , 1461 ⁴⁰ , 1463 ²¹¹ , 1470 ^{195,219} , 1473 ²²⁰ , 1484 ²⁰²
97	Ácido propanóico	79-09-4	36,87	2,89	0,062	1534	1480 ¹⁸⁸ , 1525 ^{200,271} , 1528 ²⁰⁷ , 1535 ²⁰² , 1548 ¹⁸⁷ , 1550 ⁷
98	Ácido 2-metil-propanóico (ácido isobutírico)	79-31-2	38,15	2,75	0,075	1573	1545 ¹⁹⁹ , 1555 ^{165,200} , 1556 ²⁰⁷ , 1566 ²⁰⁴ , 1569 ²⁴⁵ , 1579 ²⁰⁸ , 1580 ²¹⁵ , 1588 ⁶⁵ , 1608 ¹⁸⁸ , 1618 ¹⁸⁶

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
99	Ácido	-	39,08	4,43	0,058	1611	--
100	Ácido butanóico	107-92-6	40,02	1,85	0,562	1651	1602 ^{259,218} , 1616 ²⁵² , 1617 ¹⁶⁵ , 1620 ²⁰⁷ , 1622 ²⁰¹ , 1623 ²⁰³ , 1625 ²¹¹ , 1629 ²⁴⁵ , 1630 [*] , 1635 ¹⁸⁷ , 1636 ²²⁰ , 1637 ²²² , 1638 ^{195,219} , 1642 ²⁰⁸ , 1645 ²¹⁵ , 1650 ⁶⁵
101	Ácido 3-metil-butanóico (ácido isovalérico)	503-74-2	41,07	2,70	0,264	1684	1649 ¹⁶⁵ , 1655 ²⁰⁰ , 1660 ^{193,207} , 1667 ²⁰⁴ , 1682 ²¹⁵ , 1686 ^{40,220} , 1690 ²⁴⁹ , 1691 ⁶⁵ , 1694 ¹⁸⁷ , 1705 ¹⁸⁸
102	Ácido pentanóico	109-52-4	42,38	2,03	0,075	1732	1712 ²⁷¹ , 1728 ¹⁹³ , 1768 ²¹⁹ , 1745 ¹⁸⁷ , 1755 ²¹⁵ , 1730 ²⁷⁴ , 1742 ²¹¹ , 1679 ²⁰⁸ , 1729 ²⁰⁷ , 1727 ²⁰⁰ , 1768 ²⁰⁵ , 1728 ¹⁹³ , 1744 ²²²
103	Ácido	-	43,52	2,92	0,011	1818	--
104	Ácido hexanóico	142-62-1	45,03	2,76	3,962	1861	1733 ²²¹ , 1802 ²⁷³ , 1814 ²⁷¹ , 1820 ¹⁶⁵ , 1823 ²¹⁸ , 1825 ²⁷⁴ , 1838 ²⁰¹ , 1839 ²⁴⁵ , 1840 ^{193,203,207} , 1841 ²⁰² , 1842 ²²⁷ , 1844 ²⁵¹ , 1845 ¹⁸⁸ , 1846 ^{200,204} , 1849 ²⁷⁵ , 1851 ^{187,222} , 1858 ²¹⁵ , 1861 ⁴⁰ , 1863 ^{40,186} , 1871 ^{217,249} , 1872 ⁶⁵ , 1873 ²²⁰ , 1875 ^{195,219}
105	Ácido (<i>E</i>)-2-hexenóico	13419-69-7	46,08	3,13	0,010	1931	1929 ²³⁵ , 1990 ⁵⁸
106	Ácido 2-etil-hexanóico	149-57-5	46,55	2,49	0,121	1953	1950 ^{228,239}
107	Ácido heptanóico	111-14 -8	46,75	2,42	0,058	1964	1936 ²⁰⁷ , 1942 [*] , 1943 [*] , 1950 [*] , 1955 ²⁰⁰ , 1958 ¹⁸⁷ , 1960 ²²² , 1971 ²¹⁵ , 1976 ²²⁰ , 1990 ²¹⁹
108	Ácido octanóico	124-07-2	48,07	2,86	6,094	2077	2011 ²⁷³ , 2039 ²¹⁸ , 2050 ^{203,245} , 2051 ^{193,207} , 2053 ²¹¹ , 2056 ^{202,252} , 2057 ¹⁶⁵ , 2058 ²⁰⁴ , 2060 ^{200,201} , 2063 ²⁵¹ , 2064 ¹⁸⁷ , 2067 ²²² , 2072 ²¹⁵ , 2076 ^{188,206} , 2083 ^{40,186,209,227} , 2091 ²²⁰ , 2092 ²¹⁹ , 2152 ²⁴⁴
109	Ácido nonanóico	112-05-0	49,23	2,03	0,084	2160	2133 ¹⁶⁵ , 2149 ²⁷³ , 2157 ²²⁰ , 2158 ^{*,201} , 2162 ²¹¹ , 2164 ¹⁸⁷ , 2168 ²⁰⁰ , 2174 ²²² , 2176 ^{204,208} , 2202 ²⁰⁹
110	Ácido 4-metil octanóico	54947-74-9	50,05	2,27	0,010	2184	2173 ²⁴⁸
111	Ácido decanóico	334-48-5	50,40	1,91	1,947	2262	2258 ²¹⁸ , 2261 ¹⁸⁸ , 2264 ²¹¹ , 2268 ²⁵² , 2269 ²⁰² , 2270 ^{273,245} , 2276 ¹⁸⁷ , 2281 ²²² , 2282 ²⁰⁰ , 2294 ²¹⁵ , 2296 ¹⁸⁶ , 2307 ⁶⁵ , 2313 ²⁴⁴ , 2314 ⁴⁰
112	Ácido 9-decenóico	14436-32-9	50,75	3,35	0,240	2356	2348 ²¹⁵
113	Ácido undecanóico	112-37-8	51,80	2,23	0,077	2409	2365 ²⁰⁷ , 2405 ¹⁹⁰ , 2407 ²⁰⁹ , 2484 ²⁰⁴
114	Ácido dodecanóico	143-07-7	52,15	3,89	0,010	2489	2439 ²³⁵ , 2471 ²³⁴ , 2485 ²²⁹ , 2517 ^{239,65}

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
115	Ácido 2-fenil-lático	103-82-2	52,33	2,19	0,019	2578	2585 ⁶⁵
116	Ácido fenil-propanóico	501-52-0	52,50	2,00	0,015	2619	2603 ²⁰⁰
117	Ácido tetradecanóico	544-63-8	52,97	1,70	0,017	2695	2692 ²⁰¹ , 2675 ^{187,211} , 2847 ¹⁸⁶
118	Ácido	-	53,20	3,37	0,032	2749	--
119	Ácido	-	53,32	1,07	0,006	2765	--
120	Ácido pentadecanóico	1002-84-2	53,35	1,00	0,018	2813	2789 ²³⁴ , 2821 ²³⁹
121	Ácido hexadecanóico	57-10-3	53,63	2,79	0,135	2910	2433 ¹⁸⁶ , 2862 ²²⁰ , 2912 ²²⁸ , 2959 ²³⁵
	Aldeídos						
122	Etanal (acetaldeído)	75-07-0	3,92	2,99	0,013	732	645 ²⁴¹ , 677 ²⁷¹ , 694 ²³⁶ , 700, 735 ²¹¹
123	2-Propenal	-	5,13	2,99	0,019	859	840 ⁷
124	3-Metil-butanal (isovaleraldeído)	590-86-3	8,25	2,78	0,110	965	884 ²⁴¹ , 914 ²⁷⁴ , 915 ²⁰⁰ , 917 ⁷ , 971 ¹⁹² , 974 ¹⁶⁵
125	1-Hexanal	66-25-1	18,08	4,19	0,031	1077	1020 ²⁴⁸ , 1024*, 1064*, 1068 ¹⁹⁶ , 1069 ²⁰⁸ , 1073*, 193, 244, 252, 1074 ^{191,204} , 1075*, 1076 ²⁷¹ , 1077 ^{202,274} , 1078*, 165, 1079*, 1080 ^{211,273,242,7} , 1081 ^{197,214} , 1084 ^{187,195} , 1087 ²⁰⁵ , 1089*, 1091 ¹⁸⁹ , 1092 ²¹⁰ , 1097 ²¹⁵ , 1103 ²⁵⁰
126	2,3-Dimetil-pentanal	32749-94-3	21,28	4,23	0,013	1260	1258 ²²¹
127	Octanal	124-13-0	24,97	4,32	0,020	1300	1270 ²⁰⁸ , 1279 ^{279,271,223} , 1280 ²²² , 1282 ^{193,197} , 1284 ²⁷⁴ , 1286 ⁷ , 1287 ²¹⁰ , 1288 ^{195,219} , 1292 ²¹¹ , 1299 ¹⁸⁹ , 1300 ⁶⁵ , 1301 ¹⁸⁷ , 1 306 ⁴⁰ , 1329 ¹⁹⁰
128	Nonanal	124-19-6	30,10	4,45	0,114	1383	1370 ²⁹⁷ , 1379 ²⁰⁷ , 1382 ²²³ , 1384 ²²⁴ , 1386 ^{271,193,203} , 1387 ²⁰² , 1388 ¹⁹⁷ , 1390 ²⁷⁴ , 1391 ^{187,242} , 1392 ^{210,273} , 1395 ²¹¹ , 1396 ^{227,222,219,195,7} , 1399 ²⁴⁴ , 1401 ²⁰⁵ , 1406 ²¹⁵ , 1408 ⁴⁰ , 1421 ¹⁹⁰

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
129	Decanal	112-31-2	36,05	3,78	0,118	1500	1485 ²⁰⁷ , 1488 ^{193,165} , 1494 ¹⁹⁵ , 1495 ¹⁹⁷ , 1497 ²¹⁰ , 1498 ²⁰⁶ , 1499 ¹⁹⁰ , 1500 ²²² , 1502 ⁷¹ , 1515 ⁴⁰ , 1538 ²⁰⁹
130	4-Etil-benzaldeído	4748-78-1	36,17	4,06	0,011	1518	1521 ²⁷¹
131	Undecanal	112-44-7	39,67	2,74	0,011	1630	1600 ¹⁹⁷ , 1604 ¹⁹⁵ , 1622 ⁴⁰ , 1659*, 2444 ²⁰⁹
132	2-Fenil-acetaldeído (benzenoacetaldeído)	122-78-1	39,67	3,35	0,143	1638	1631 ²²⁹ , 1671 ⁶⁵
133	4-Metilbenzaldeído	104-87-0	40,37	2,83	0,047	1661	1654 ²³³
134	Dodecanal	112-54-9	42,38	4,28	0,013	1730	1701 ¹⁹⁷ , 1708 ¹⁹⁵ , 1718 ²⁰⁹ , 1720 ¹⁹⁰ , 1722 ²²⁷ , 1729 ⁴⁰ , 1765 ²⁴⁸
135	Tridecanal	10486-19-8	44,10	3,02	0,014	1830	1816*, 1821*, 1824 ²⁰⁹
136	Tetradecanal	124-25-4	46,20	4,72	0,016	1933	1927 ²³⁹ , 1888 ²³⁶
137	3-Fenil-2-propenal (cinamaldeído)	104-55-2	46,72	4,56	0,014	1971	1970 ²³⁸
138	4-Metóxi-benzaldeído; (p-anisaldeído)	123-11-5	46,77	4,25	0,013	1980	1986 ²²⁴
139	Pentadecanal	2765-11-9	46,90	4,29	0,016	1986	1980 ²³⁶ , 2024 ²³⁴ , 2132 ¹⁸⁹
140	Hexadecanal	629-80-1	48,18	3,27	0,017	2097	2094 ²³⁶ , 2137 ²³⁹ , 2143 ²³¹
141	4-Hidróxi-benzaldeído	123-08-0	51,85	4,65	0,013	3070	3072 ²³⁵
	Ésteres						
142	Acetato de metila	79-20-9	5,02	2,42	0,019	834	825 ²⁵¹ , 826 ²⁰⁵ , 827 ²⁰² ,
143	Acetato de etila	141-78-6	5,42	2,71	0,106	893	715 ¹⁹⁶ , 882*, 884 ²⁰² , 885 ^{186,*} , 887 ²⁵¹ , 888*, 889 ^{205,*} , 890 ¹⁸⁹ , 895 ²⁴⁴ , 898 ²⁰⁹ , 900 ²¹¹ , 904 ²⁵⁰
144	Propanoato de etila	105-37-3	6,15	2,70	0,079	942	915 ²⁰⁷ , 924 ²⁵⁰ , 938 ¹⁸⁷ , 953 ^{202,205} , 956 ¹⁸⁹
145	2-Metil-propanoato de etila, (isobutirato de etila)	97-62-1	6,42	2,34	0,055	960	955 ²⁰⁷ , 962 ²⁰⁵ , 965 ^{40,189} , 972 ⁶⁵
146	Butanoato de etila	105-54-4	11,67	2,90	0,024	1048	984 ²⁰² , 1022 ²⁰⁷ , 1032 ^{204,165} , 1033 ²⁴² , 1037 ^{187,251} , 1039 ²⁰⁵ , 1040 ²¹⁴ , 1041 ⁴⁰ , 1047 ^{65,250}
147	2-Metil-butanoato de etila	7452-79-1	12,25	2,63	0,020	1050	1035 ²⁰⁷ , 1040 ¹⁹⁹ , 1045 ^{201,165} , 1047 ²⁷¹ , 1048 ^{202,204} , 1040 ¹⁹⁹ , 1051*, 1052 ²⁵⁰ , 1055 ²⁰⁵ , 1056 ²¹⁴ , 1057 ⁴⁰ , 1060 ⁶⁵ , 1063 ²⁴⁴
148	Etanoato de butila, (acetato de butila)	123-86-4	16,92	2,34	0,017	1063	1059*, 1066 ²¹⁸ , 1072*, 1074 ¹⁸⁹

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
149	Pentanoato de etila	539-82-2	19,37	3,69	0,054	1132	1087 ²¹⁴ , 1089 ²⁰⁵ , 1128 ²⁰¹ , 1139 ⁴⁰ , 1142 ²⁰⁶
150	3-Metil-etanoato de butila (acetato de isoamila)	123-92-2	20,30	4,98	0,052	1142	1121 ²²⁷ , 1125 ¹⁸⁸ , 1127 ²⁰⁴ , 1145 ²³⁵
151	2-Butenoato de etila	10544-63-5	21,82	3,53	0,026	1175	1153 ^{206,207} , 1162 ²⁰³ , 1179.9 ²¹⁷
152	3-Metilbutanoato de propila, (isovalerato de isobutila)	557-00-6	21,82	2,77	0,012	1170	1175 ⁷
153	2-Metil-propanoato de butila	2438-20-2	22,05	4,64	0,015	1195	1192 ²⁰⁵
154	Butanoato de butila	109-21-7	22,52	5,40	0,018	1218	1212 ²¹⁸ , 1214 ¹⁸⁷ , 1219 ¹⁸⁹ , 1221 ²⁰⁵
155	Hexanoato de etila	123-66-0	23,22	4,81	0,117	1226	1223 ²⁰⁷ , 1230 ^{201,165} , 1231 ²⁰³ , 1231.3 ²¹⁷ , 1232 ^{211,193,206,*} , 1235 ²⁰⁰ , 1236 ^{214,205} , 1237 ^{188,204} , 1238*, 1239 ⁴⁰ , 1240 ²²² , 1244 ¹⁸⁶ , 1251 ²⁵⁰ , 1258 ²⁴⁴ , 1270 ⁶⁵
156	Acetato de hexila	142-92-7	24,15	3,64	0,432	1258	1235 ²⁷³ , 1254 ²⁰⁰ , 1263 ²⁰⁷ , 1264 ^{279,272} , 1265 ²¹⁸ , 1269 ²³ , 1270 ^{206,220} , 1275*, 1275 ^{188,203,205} , 1279 ⁴⁰ , 1283 ²⁴⁴
157	2-Oxopropanoato de etila (piruvato de etila)	617-35-6	24,50	3,71	0,041	1263	1242 ²⁰¹ , 1253 ¹⁸⁸
158	Hexanoato de propila	626-77-7	25,43	3,97	0,013	1322	1293 ²⁰⁰ , 1316 ¹⁸⁷ , 1321 ¹⁸⁹ , 1324 ¹⁹⁸
159	Heptanoato de etila	106-30-9	26,83	6,08	0,007	1340	1310 ²⁰⁰ , 1317 ^{186,206} , 1331 ^{187,203} , 1336 ²⁰⁵ , 1341 ⁴⁰
160	(E)-2-Hexenoato de etila	27829-72-7	29,05	5,88	0,014	1358	1335 ²⁰⁶
161	2-Hidróxi-propanoato de etila; (lactato de etila)	97-64-3	29,90	5,30	22,585	1360	1317 ²¹⁸ , 1331 ²⁰⁷ , 1533 ¹⁹² , 1334 ²⁰⁰ , 1339 ²⁰² , 1341*, 1353 ^{188,201} , 1363 ¹⁸⁶
162	Octanoato de metila	111-11-5	30,10	4,56	0,026	1381	1375*, 1378 ²⁰⁷ , 1386 ²⁰² , 1387 ²³ , 1388 ²⁰³ , 1391 ²²⁷ , 1392*, 1396 ²⁰⁵ , 1417 ¹⁸⁶
163	2-Hidróxi-butanoato de etila	52089-54-0	32,32	4,49	0,011	1405	1400 ²⁰⁰

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
164	Éster	-	32,32	4,64	0,016	1410	--
165	2-Hidróxi-3-metil-butanoato de etila	2441-06-7	32,78	4,64	0,045	1420	1399 ²⁰⁰ , 1411 ²⁰⁷ , 1421 ²⁰² , 1426 ²⁰⁶
166	3-Hexil-butanoato de metila (isovalerato de hexila)	10032-13-0	33,95	5,19	0,086	1442	1425 ²¹⁸
167	2-(1-etóxi-etóxi) propanoato de etila	37101-80-7	34,03	3,56	0,023	1447	1442 ²²⁹
168	2-Propil-2-hidróxi-propanoato de metila (2-hidróxi-propanoato de isobutila)	73523-02-1	34,18	2,51	0,076	1452	1455 ²²⁹
169	Octanoato de etila	106-32-1	34,18	3,01	11,006	1452	1409 ²⁰⁰ , 1424 ²⁰⁷ , 1429 ^{204,*} , 1430 ^{187,201} , 1430.2 ²¹⁷ , 1431 ^{202,165} , 1435 ^{206,65} , 1436 ^{188,203} , 1444 ^{40,250} , 1449 ²⁰⁸ , 1466*, 1486 ¹⁸⁶
170	6-Oxononanoato de etila	4144-59-6	34,68	3,35	0,061	1455	1488 ²²⁹
171	(Z)-3-Octenoato de metila	69668-85-5	35,12	2,72	0,044	1475	1483 ²¹⁶
172	2,2-Dietóxi-acetato de etila	6065-82-3	35,12	4,01	0,015	1477	1487 ²⁰⁶
173	4-Octenoato de etila	34495-71-1	35,70	2,82	0,018	1496	1491 ²⁰⁶
174	3-Hidróxi-2-metil-propanoato de metila	72657-23-9	36,00	2,11	0,016	1515	1507 ²¹⁷
175	3-Hidróxi-butanoato de etila	5405-41-4	36,17	3,78	0,069	1520	1475 ²⁰² , 1524 ²⁰¹
176	2-Hidróxi-propanoato de butila (lactato de butila)	138-22-7	36,63	4,76	0,012	1522	1520 ²²⁹
177	Nonanoato de etila	123-29-5	36,98	3,59	0,018	1536	1509 ²⁰⁰ , 1526 ²⁰⁷ , 1530 ²²⁹ , 1535 ^{206,203} , 1581 ¹⁸⁶
178	2-Hidróxi-hexanoato de etila	6946-90-3	37,33	2,37	0,011	1544	1527 ²⁰⁰ , 1533 ²⁰⁷ , 1542 ²⁰⁶ , 1592 ²⁰² , 1596 ²⁰⁴
179	2-Hidróxi-4-metil-pentanoato de etila	10348-47-7	37,57	3,04	0,290	1554	1547 ²⁰⁴
180	Éster	-	37,92	3,51	0,010	1560	--
181	Propanodioato de dietila (malonato de dietila)	105-53-3	37,92	3,63	0,013	1571	1572 ²⁰⁷ , 1580 ²²⁹

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
182	3-Hidróxi-pentanoato de etila	54074-85-0	38,38	4,07	0,010	1589	1587 ²⁰²
183	Decanoato de metila	110-42-9	38,73	5,55	0,018	1601	1585 ²⁰⁷ , 1593 ²⁰³ , 1594 ¹⁸⁷ , 1599 ²⁰⁶ , 1628 ¹⁸⁶
184	4-Oxo-pentanoato de etila	539-88-8	39,08	2,78	0,011	1614	1607 ²⁰⁶
185	3-Metilbutil 2-hidróxi-propanoato (lactato de isoamila ou lactato de isopentila)	19329-89-6	39,32	4,91	0,696	1619	1614 ¹⁸⁸ , 1615 ¹⁸⁶
186	Butanedioato de dimetila (succinato de dimetila)	106-65-0	39,43	4,7	0,031	1624	1631 ^{202,206}
187	Decanoato de etila	110-38-3	39,90	5,06	0,120	1644	1610 ²⁰⁰ , 1629 ²⁰⁷ , 1633 ¹⁶⁵ , 1635 ^{201,211} , 1637 ^{202,203} , 1638 ²⁰⁶ , 1639 ¹⁸⁷ , 1641 ²³ , 1645 ²²⁷ , 1648 ⁴⁰ , 1651 ¹⁸⁶ , 1652 ²⁰⁸ , 1662 ²⁰⁴ , 1684 ¹⁸⁸
188	Benzoato de etila	93-89-0	40,25	1,92	0,020	1659	1640 ^{200,165} , 1643 ²¹⁷ , 1649 ²⁰⁷ , 1650 ¹⁹⁸ , 1651 ²⁷⁹ , 1653 ²¹³ , 1660 ²¹⁴ , 1664 ²⁰⁶ , 1682 ²²⁷
189	3-Metil-butil octanoato (octanoato de isoamila, octanoato de isopentila)	2035-99-6	40,48	5,72	0,022	1668	1651 ²⁰⁷ , 1655 ²⁰³ , 1670 ⁴⁰ , 1674 ¹⁸⁶
190	(Z)-4-Decenoato de etila	7367-84-2	40,72	4,01	0,012	1675	1687 ²⁰³
191	Butanedioato de dietila (succinato de dietila)	123-25-1	41,30	3,11	8,334	1686	1667 ²⁰⁷ , 1670 ²⁰³ , 1672 ²⁰⁶ , 1673 ²³ , 1675 ²⁰² , 1677 ²²⁹ , 1683 ²⁰⁸ , 1687 ⁴⁰ , 1689 ²²⁷ , 1690 ²⁰¹ , 1701 ¹⁸⁶ , 1705 ²²⁵ , 1714 ¹⁸⁸
192	Undecanoato de metila	1731-86-8	41,42	5,62	0,011	1703	1694 ²²⁹
193	9-Decenoato de etila	67233-91-4	41,53	4,91	0,028	1708	1689 ²³ , 1703 ⁴⁰ , 1709 ²⁰⁸ , 1711 ¹⁸⁶
194	Decanoato de propila	30673-60-0	41,53	5,82	0,019	1711	1720 ²⁰⁶
195	Undecanoato de etila	627-90-7	42,35	4,30	0,010	1739	1732 ²⁰⁷
196	2-Hidróxi-benzoato de metila	9041-28-5	42,70	3,04	0,017	1755	1756 ¹⁶⁵
197	Pentanedioato de dietila	818-38-2	42,82	5,12	0,026	1770	1768 ²⁰⁷

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
198	Dodecanoato de metila	111-82-0	43,40	2,89		1800	1793 ²⁰⁷
199	Acetato de 2-feniletila	103-45-7	43,52	3,85	0,008	1808	1796 ²²⁰ , 1800 ²⁰⁴ , 1801 ²⁰⁰ , 1805 ²⁰⁷ , 1810 ²³ , 1815 ¹⁸⁸ , 1829 ²⁰⁵ , 1845 ²⁴⁴ , 1847 ⁴⁰
200	Éster	-	43,52	2,25	0,018	1812	--
201	Dodecanoato de 2-propanila (dodecanoato de isopropila)	10233-13-3	43,63	4,30	0,019	1820	1821 ²⁰⁸
202	3,3-Dietóxi propionato de etila	10601-80-6	44,80	2,81	0,018	1845	1829 ²⁰⁶
203	Éster	-	44,80	4,25	0,132	1856	--
204	Dodecanoato de etila	106-33-2	45,03	2,10	0,367	1859	1828 ²⁰⁰ , 1835 ²⁰⁷ , 1840 ²⁰³ , 1850 ²⁴⁴ , 1856 ⁴⁰
205	Decanoato de 3-metil-butila (decanoato de isopentila)	2306-91-4	45,03	2,32	0,033	1860	1857 ²⁰³ , 1858 ²²⁹ , 1864 ²⁰⁶
206	Tetradecanoato de 2-propanila (miristato de isopropila) (110-27-0	46,67	2,43	0,017	1855	1823 ²¹⁰
207	3-Hidróxi-octanoato de etila	20257-95-8	47,00	2,86	0,020	1882	1880 ²⁴⁵
208	Tridecanoato de etila	28267-29-0	47,25	5,67	0,535	1951	1943 ²²⁹
209	Tetradecanoato de metila	124-10-7	47,60	5,18	0,045	2021	2034 ²⁰⁹
210	2-Hidróxi-butanedioato de dietila (maleato de dietila)	7554-12-3	47,83	2,05	2,424	2048	2041 ²⁰¹ , 2048 ²⁰⁶ , 2058 ¹⁸⁸
211	Benzoato de hexila	6789-88-4	47,95	2,09	0,018	2057	2056 ¹⁹⁸
212	Tetradecanoato de etila	124-06-1	47,95	2,38	0,037	2059	2040 ²⁰⁷ , 2045 ²⁰³ , 2048 ¹⁸⁷ , 2054 ²⁰⁶ , 2065 ¹⁸⁶ , 2070 ⁴⁰ , 2094 ²⁴⁴
213	2-Fenil hexanoato de etila	6290-37-5	49,23	5,03	0,018	2138	2160 ²⁰⁰
214	Pentadecanoato de etila	41114-00-5	49,48	4,41	0,017	2149	2151 ²⁰⁶
215	Decanedioato de dimetila	106-79-6	49,82	5,33	0,018	2234	2220 ²⁰⁶
216	Hexadecanoato de etila	628-97-7	50,05	3,78	0,071	2250	2253 ¹⁹³ , 2261 ²⁰⁶ , 2271 ²⁴⁴

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
217	Éster	-	50,17	4,09	0,033	2258	--
218	9-Hexadecenoato de etila	54546-22-4	50,75	5,59	0,012	2287	2283 ²⁰⁶
219	Éster	-	50,87	6,82	0,017	2297	--
220	Éster	-	50,98	5,34	0,011	2313	--
221	Éster	-	51,10	5,04	0,017	2318	--
222	Éster	-	51,22	2,08	0,084	2329	--
223	Éster	-	51,03	3,88	0,017	2367	--
224	Éster	-	51,10	5,21	0,017	2373	--
225	2-Fenil-octanoato de etila	5457-70-5	51,45	5,13	0,015	2378	2376 ²²⁹
226	Éster	-	51,80	4,25	0,010	2400	--
227	Octadecanoato de etila	111-61-5	52,03	4,10	0,027	2433	2458 ²²⁹
228	Linoleato de etila	544-35-4	52,17	3,96	0,026	2564	2532 ²⁰⁶
229	Decanoato de decila	1654-86-0	52,25	4,36	0,058	2568	2565 ²¹¹
230	Éster	-	52,33	2,01	0,196	2577	--
231	Éster	-	52,43	5,45	0,013	2593	--
232	Éster	-	52,50	2,04	0,018	2598	--
233	Éster	-	52,62	5,32	0,018	2624	--
234	Benzoato de benzila	120-51-4	52,73	3,87	0,014	2629	2636 ²⁰⁶
235	4-Hidróxi-3-metóxi-benzoato de etila (vanilato de etila)	617-05-0	52,85	5,48	0,020	2651	2665 ⁶⁵
236	Éster	-	53,08	4,76	0,016	2733	--
	Terpenos						
237	6,6-Dimetil-5-metilidenebicyclo [2.2.1] heptano (camfeno)	79-92-5	15,40	2,75	0,018	1057	1053 ¹⁹¹ , 1056 ²¹² , 1064 ²⁴² , 1066 ²¹⁶ , 1077 ²⁰⁹ , 1086 ¹⁹⁴ , 1115*, 1131*
238	3,7,7-trimetilbicyclo [4.1.0] hept-3-eno (3-careno)	13466-78-9	20,88	4,12	0,035	1155	1010 ²¹⁶ , 1144 ¹⁹¹ , 1146 ²¹⁸
239	1-metil-4-(1-metiletil)benzeno (<i>p</i> -cimeno)	99-87-6	23,45	2,32	0,012	1247	1244 ¹⁹¹ , 1250 ²¹⁸ , 1254 ²⁹⁷ , 1257 ²⁵² , 1258 ^{279,212} , 1262 ²⁰² , 1263 ^{214,*} , 1264 ²⁷⁵ , 1265 ^{78,*} , 1266 ²⁴² , 1268 ^{216,*} , 1275 ¹⁹² , 1279 ²⁰⁵ , 1280 ¹⁹⁴ , 1282 ²⁰⁹
240	3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-one; (isoforona)	78-59-1	30,92	2,00	0,018	1389	1381 ²²⁹

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
241	5-Etenil-5-metil-2-oxolanil]propan-2-ol; [(Z)-óxido de linalol]	5989-33-3	34,30	4,46	0,050	1456	1438 ²⁰² , 1446*, 1453 ²⁰⁹ , 1474 ¹⁸⁸
242	Dihidro-mircenol; (2,6-Dimetil-7-octen-2-ol)	18479-58-8	35,70	3,28	0,017	1488	1473 ²⁴³
243	3,7-Dimetil-octa-1,5,7-trien-3-ol; (hotrienol)	29957-43-5	36,40	2,50	0,014	1574	1449 ²⁰¹ , 1585 ²¹⁸ , 1607 ²⁵² , 1620 ¹⁸⁸ ,
244	3,7-Dimetil-octa-1,6-dien-3-ol (linalool)	78-70-6	37,33	3,67	0,014	1547	1519 ¹⁹¹ , 1530 ^{297,279} , 1536 ²⁰⁸ , 1537 ²⁰¹ , 1540 ²⁰⁷ , 1543 ²¹⁹ , 1544 ^{216,218} , 1545 ¹⁹⁴ , 1546 ^{40, 165,206} , 1548 ²¹² , 1549 ^{213, 227,202} , 1550 ^{189,190,252} , 1551 ^{193, 23} , 1552 ²⁷¹ , 1554 ²⁷³ , 1555 ¹⁹² , 1558 ¹⁸⁸ , 1570 ⁶⁵ , 1584 ¹⁶⁵ , 1586 ¹⁹¹ , 1593 ²¹² , 1596 ²⁰² , 1597 ²⁵² , 1601 ²⁴² , 1602 ²⁰⁶ , 1608 ²²⁷
245	4-Metil-1-propanil-2—ciclohex-3-en-1-ol; (4-terpineol)	562-74-3	38,50	4,80	0,121	1590	1580 ²⁹⁷ , 1600 ¹⁹⁴
246	1-Etenil-1-metil-2,4-bis(1-propenil-2) ciclohexano (β-elemeno)	515-13-9	38,62	1,91	0,011	1598	1580 ²⁹⁷ , 1600 ¹⁹⁴
247	5-Metil-2-(metil-etil) ciclohexan-1-ol (mentol)	89-78-1	39,78	2,85	0,016	1642	1626 ²⁰⁹ , 1633 ¹⁹³ , 1636 ^{212,213} , 1637 ²⁰² , 1639 ²⁵² , 1642 ²⁵¹ , 1645 ¹⁸⁹
248	2-(4-Metil-1-ciclohex-3-enil)propan-2-ol (α-terpineol)	98-55-5	41,88	4,36	0,018	1690	1668 ¹⁹¹ , 1675 ²⁴⁵ , 1681 ²¹⁸ , 1688 ²⁰¹ , 1691 ²⁵² , 1697 ^{216,242} , 1692 ²⁰² , 1700 ¹⁴⁹ , 1706 ¹⁸⁹ , 1709 ²²⁷ , 1710 ²¹⁷ , 1720 ⁶⁵ , 1731 ¹⁹²
249	2-Metil-5-(metil-etil)-1-ciclohexan-1-ol (dihidrocarveol)	38049-26-2	42,00	2,81	0,010	1723	1720 ^{194,252}
250	1-metil-4-(6-metil-1,5-heptadienila) 1-ciclohexeno; (β-bisaboleno)	495-61-4	42,12	2,64	0,017	1725	1714 ¹⁹² , 1720 ²¹⁶
251	5,8a-dimetil-3-prop-1-en-2-il-2,3,4,4a,7,8-hexahidro-1H-naftaleno (α-selineno)	473-13-2	42,35	2,07	0,019	1749	1745 ¹⁹⁴

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
252	3,7-dimetiloct-6-en-1-ol (citronelol)	106-22-9	42,82	2,12	0,031	1772	1761 ²⁵² , 1769 ²⁴² , 1771 ²⁰⁹ , 1786 ¹⁸⁶
253	(2Z)-3,7-dimetil-octa-2,6- dien-1-ol (nerol)	106-25-2	43,40	2,22	0,013	1802	1731 ²¹⁸ , 1795 ²¹³ , 1797 ^{194,206,69,252} , 1798 ²¹² , 1802 ²³ , 1804 ¹⁹⁰ , 1810 ¹⁸⁸ , 1875 ¹⁸⁸
254	(2E)-3,7-dimetil-octa-2,6- dien-1-ol (geraniol)	106-24-1	45,03	2,86	0,138	1864	1840 ²¹⁸ , 1842 ²⁷³ , 1844 ²¹³ , 1847 ^{201,212,252} , 1850 ²⁴² , 1853 ¹⁹⁰ , 1854 ²⁰⁶ , 1856 ¹⁸⁶ , 1860 ¹⁸⁸ , 1862 ²⁰⁹ , 1869 ²⁵⁰
255	(2,6,6-Trimetil-1- ciclohexenila)-2-propenal	4951-40-0	47,93	2,66	0,021	1942	1952 ²⁰⁶
256	Espatuleno	6750-60-3	48,65	3,38	0,019	2130	2109 ²¹² , 2120 ^{213,252} , 2125 ¹⁹⁴ , 2129 ²⁰⁹ , 2153 ¹⁹²
257	3,7,11-trimetil-2,6,10- dodecatrien-1-ol [(E)- farnesol]	4602-84-0	51,33	2,60	0,018	2346	2330 ¹⁹⁹ , 2345 ⁶⁵
258	5-(2,3-dimetil- tríciclo[2.2.1.0 ^{2,6}]hept-3-il)- 2-metil-pent-2-en-1-ol; [(Z)- α-santalol]	115-71-9	51,33	2,89	0,018	2351	2350 ¹⁹⁷
C13-norisoprenóides							
259	(E)-1-(2,6,6-trimetil-1- ciclohexa-1,3-dienil)-2- buten-1-ona (β- damascenona)	23696-85-7	44,22	2,07	0,017	1839	1809 ²²³ , 1816 ²³ , 1830 ¹⁸⁸ , 1832 ^{40,186,187} , 1834 ²⁴⁴ , 1836 ⁶⁵ , 1841 ^{201,*} , 1842 ¹⁸⁹ , 1852 ²⁵⁰
260	(5E)-6,10-Dimetil-undeca- 5,9-dien-2-one [(E)-geraniol- acetona]	3796-70-1	44,80	1,90	0,058	1850	1856 ²⁰⁶
261	Metil 3-oxo-2-pentil ciclopentano-acetato (metil- dihidro-jasmonato)	24851-98-7	50,63	2,24	0,016	2280	1678 ²³⁵ , 2276 ²²⁰
Furanos							
262	2-Metil-furano	534-22-5	4,30	2,14	0,054	819	815 ²⁷⁹ , 817*, 858 ²⁴¹ , 876'
263	2-Pentil-furano	3777-69-3	24,03	2,79	0,019	1249	1215 ²⁷¹ , 1222 ²²³ , 1226 ²⁷⁴ , 1230 ²¹⁹ , 1231 ²⁷³ , 1240 ^{222,7} , 1275 ¹⁹³

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
264	2,5-Dihidro-furano	1708-29-8	24,97	3,33	0,018	1305	1300 ²⁸⁰
265	Furfuraldeído, furfural	98-01-1	34,65	2,89	3,192	1465	1427 ²⁴⁹ , 1444 ²²⁴ , 1451 ²⁰² , 1455 ²⁷⁴ , 1456 ²⁰⁰ , 1460 ^{222,206} , 1467 ²⁰³ , 1474 ⁷ , 1475 ²²⁷ , 1476 ⁴⁰ , 1485 ⁶⁵ , 1486 ²⁴⁴ , 1490 ²⁴¹
266	5-Metil-furan-2-carbaldeído (5-metil-2-furfural)	620-02-0	37,92	2,04	0,080	1565	1555 ²⁰⁰ , 1578 ²⁴⁴ , 1589 ⁷ , 1597 ²⁴⁹
267	Etil furan-2-carboxilato (etil 2-furoato)	614-99-3	39,55	1,99	0,317	1627	1603 ²⁰⁰ , 1618 ²⁰⁶
268	Furan-2-ilmetanol; (2-furanmetanol)	98-00-0	40,83	2,04	0,019	1680	1573*, 1647 ^{200,224} , 1659*, 1661 ²¹⁰ , 1667*
269	Furan-2,5-dicarbaldeído; (2,5-furandi- carboxaldeído)	823-82-5	46,32	2,35	0,010	1940	1944 ²²⁴
270	Furano	-	46,90	3,44	0,044	1996	--
271	Furano	-	49,00	2,41	0,443	2174	--
272	5-(Hidróximetil)furan-2- carbaldeído; (2-hidróximetil-5-furfural)	67-47-0	52,15	3,49	0,014	2480	2485 ²⁰²
	Lactonas						
273	Lactona	-	33,72	2,78	0,016	1439	--
274	4-Metóxi-2,5-dimetilfuran-3- ona	4077-47-8	38,27	2,84	0,105	1578	1584 ²⁰² , 1591 ²¹⁴
275	2-Oxolanona (γ- butirolactona, dihidro- 2(3H)-furanona)	96-48-0	38,97	1,90	0,254	1606	1593 ²²⁴
276	5-Metil-2-oxolanona; [5-metildihidro-2(3H)- furanona, γ-valerolactona]	108-29-2	39,27	3,09	0,020	1614	1600 ¹¹⁴ , 1626 ²⁵²
277	3-Metil-2,5-dihidrofuran-2- ona; (3-metil-2(5H)- furanona)	22122-36-7	40,95	3,84	0,018	1683	1683 ²²⁴
278	5-Etóxi-2- tetrahidrofuranona; 5-etóxi- dihidro-2(3H)-furanona	932-85-4	41,42	3,57	0,016	1706	1696 ²²⁴

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
279	5H-2-furanona; (2(5H)-furanona)	497-23-4	42,35	3,50	0,034	1742	1716 ²²⁴ , 1740 ²³¹
280	5-Etil-2-oxolanona; (5-etil-tetrahydro-2-furanona; hexalactone)	695-06-7	43,80	3,13	0,028	1749	1751 ²⁵⁰
281	4-Metil-5H-2-furanona	6124-79-4	45,50	2,69	0,018	1895	1892 ²²⁰
282	(E)-5-Butil-4-metil-dihidro-2(3H)-furanona; [(E) whiskey lactona]	39212-23-2	45,73	2,85	0,081	1915	1910 ⁴⁰ , 1915 ⁶⁵ , 1928 ²²⁴
283	3-Acetil-5-butil-oxolan-2-ona; [5-Butil-dihidro-2(3H)-furanona, p-jasmona]	40010-99-9	46,08	2,47	0,018	1923	1915 ¹⁹⁵
284	3-Hidróxi-4,4-dimetil-2-oxolanona [3-hidróxi-4,4-dimetil-dihidro-2(3H)-furanona]	599-04-2	46,67	2,09	0,018	2011	1842 ¹⁹⁹ , 2013 ²²⁴ , 2028 ²³⁷ , 2041 ⁵⁸
285	5-Acetil-2-oxolanona; [5-acetil-dihidro-2(3H)-furanona]	29393-32-6	47,13	4,08	0,047	2023	2026 ²²⁴ , 2098 ²⁴⁹
286	4-Hidróxi-2,5-dimetil-3-furanona	3658-77-3	47,32	2,09	0,015	2053	2056 ²⁵⁰
287	5-Octil-2-oxolanona;(γ-decalactona)	706-14-9	48,65	2,30	0,018	2127	2110 ²⁰⁰ , 2125 ²⁷³ , 2127 ²⁰² , 2136 ²²² , 2138 ²¹⁸ , 2175 ⁶⁵
288	3-Hidróxi-4,5-dimetil-2-oxolanona [3-hidróxi-4,5-dimetil-2(3H)-furanona; sotolon]	28664-35-9	49,35	2,23	0,074	2195	2186 ²¹⁵ , 2190 ⁴⁰
289	5-Etil-3-hidróxi-4-metil-5H-furan-2-ona	698-10-2	49,58	2,76	0,013	2238	2244 ²⁵⁰
290	4-Hidróxi-2-oxolanona; [dihidro-4-hidróxi-2(3H)-furanona]	5469-16-9	49,93	2,53	0,144	2246	2244 ²⁷⁴
291	3,6-Dimetil-3a,4,5,7a-tetrahydro-3H-1-benzofuran-2-ona; (wine lactona)	182699-77-0	50,28	3,97	0,108	2265	2264 ¹⁹⁰

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
292	5-Heptil-2-oxolanona; heptil-butirolactona (γ- undecalactona)	104-67-6	50,44	3,49	0,018	2276	2270 ⁶⁵
Fenóis							
293	2-Metóxi-fenol (guaiacol)	90-05-1	45,03	2,77	0,018	1870	1833 ²²⁴ , 1853 ²⁴⁵ , 1855 ²⁷⁴ , 1860 ²²² , 1862 ¹⁹⁷ , 1875 ⁴⁰ , 1883 ⁶⁵ , 1888 ²⁴⁹
294	2-Metóxi-4-metil-fenol (4- metilguaiacol)	93-51-6	46,17	2,43	0,019	1965	1928 ²²⁴ , 1956 ^{219,*} , 1959 ²⁰⁶
295	Fenol	108-95-2	46,30	2,25	0,104	2009	1996 ²⁰² , 2007 ²⁰⁰ , 2008 ²²² , 2011 ^{195,219} , 2015 ^{187,211}
296	4-Etil-2-metóxi-fenol; (4-etil-guaiacol)	2785-89-9	46,67	2,46	0,021	2039	1989 ²⁷¹ , 2002 ²²⁴ , 2031 ²⁰⁰ , 2033 ²⁰⁶ , 2054 ⁶⁵
297	2-Metóxi-4-(2-propenil) fenol (eugenol)	97-53-0	49,27	1,98	0,018	2183	2139 ²²⁴ , 2149 ²³ , 2153 ²¹² , 2157 ²⁰⁶ , 2161 ²⁵² , 2175 ²⁰⁹ , 2184 ¹⁹⁰ , 2192 ¹⁹⁴
298	4-Etil-fenol	123-07-9	49,27	2,35	0,046	2188	2144 ¹⁶⁵ , 2167 ^{202,206,227} , 2185 ²⁰⁰ , 2202 ²⁴⁹ , 2205 ⁶⁵ , 2210 ⁴⁰
299	4-Etenil-2-metóxi-fenol (4- vinil-guaiacol)	7786-61-0	49,47	1,05	0,017	2204	2165 ²²⁴ , 2180 ^{188,274} , 2190 ²⁴⁵ , 2200 ¹⁹⁰
300	5-Isopropil-3-metil-fenol	3228-03-3	50,63	2,24	0,019	2282	2287 ²⁵²
Pirróis							
301	1-etil-pirrol	617-92-5	21,93	2,83	0,015	1188	1184 ²³¹ , 1194 ²⁴¹
302	1-(1H-pirrolila-2)-etanona (2-acetil pirrol)	1072-83-9	33,03	2,04	0,013	1968	1970 ²⁷⁴ , 2006 ²⁴⁹
303	1-H-pirrol-2-carboxaldeído	1003-29-8	33,28	2,84	0,013	1982	1990 ²²⁴
304	2-Pirrolidinona	616-45-5	46,67	2,25	0,012	2017	2041 ²³⁷
305	Aldeído pirrólico	-	47,60	3,30	0,014	2087	--
Compostos sulfurados							
306	3-Isotiocanato-1-propeno (isotiocianato de alila)	57-06-7	26,77	3,10	0,011	1331	1353 ²⁰²
307	Acetato de 2-metil- sulfaniletila (acetato de metiltioetila)	4455-13-4	36,05	4,60	0,013	1510	1502 ²⁰⁵

	Composto	Número CAS	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área (% da área total)	LTPRI (cal)	IR* (lit)
308	2-Metil-tiolan-3-ona; (dihidro-2-metil-3(2H)- tiofenona)	13679-85-1	36,63	5,30	0,101	1528	1518 ²²⁹
309	3-metil-sulfanil-propanoato de etila (etil 3-metil-tio- propanoato)	13327-56-5	38,27	4,56	0,013	1580	1584 ²³²
310	Tiofeno-2-carbaldeído	98-03-3	41,07	2,99	0,014	1689	1680 ²⁰⁶ , 1734 ²⁴¹
311	Ni	-	42,00	3,45	0,011	1724	--
312	3-Metil-sulfanil-propan-1-ol [3-(metil-tio)-1-propanol (metionol)]	505-10-2	42,12	2,98	0,017	1727	1738 ¹⁸⁶ , 1723 ²⁰¹
313	Benzotiazol	95-16-9	46,55	1,92	0,015	1956	1887 ²²² , 1915 ²²⁴ , 1937 ¹⁶⁵ , 1948 ²²² , 1962 ²³⁹

Nas referências ^{58, 165, 186, 189, 192, 193, 202, 206, 208, 214, 217, 221, 224, 234, 239, 241-244, 249-252, 271, 274, 275, 279, 280} foi empregado o cálculo para o índice de Kovats, embora a análise cromatográfica tenha utilizado programação de temperatura; Ni: Não identificado; --: não foi encontrado índice de retenção na literatura, que seja compatível com o espectro de massas do composto; * www.odour.org.uk