

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/09/2020.

JOÃO HENRIQUE PELISSARI

**Desenvolvimento de método robusto, eficiente e de baixo impacto ambiental para se obter perfil cromatográfico de vinhos brasileiros por CLAE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo  
Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Araraquara  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

P384d Pelissari, João Henrique  
Desenvolvimento de método robusto, eficiente e de baixo impacto ambiental para se obter perfil cromatográfico de vinhos brasileiros por CLAE / João Henrique Pelissari. – Araraquara : [s.n.], 2019  
85 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Daniel Rinaldo  
Coorientador: Cristiano Soleo de Funari

1. Vinho. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Quimiometria. 4. Química verde. 5. Planejamento experimental. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de método robusto, eficiente e de baixo impacto ambiental para se obter perfil cromatográfico de vinhos brasileiros por CLAE"

**AUTOR: JOÃO HENRIQUE PELISSARI****ORIENTADOR: DANIEL RINALDO****COORIENTADOR: CRISTIANO SOLEO DE FUNARI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANIEL RINALDO

Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. MARCIO ADRIANO ANDRÉO

Departamento de Ciências Exatas e da Terra / Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas - UNIFESP - Diadema

Araraquara, 01 de março de 2019

**DADOS CURRICULARES**  
**JOÃO HENRIQUE PELISSARI**

**Dados Pessoais**

Nascimento: 27/08/1993  
Nacionalidade: Brasileira  
Naturalidade: Fernandópolis-SP  
Estado Civil: Solteiro  
Filiação: Clério Alencar Pelissari  
          Cris Hellen Zacaron Pelissari  
Endereço: Rua Manoel Pereira Rolla, 11-45, Apt. 34 – Vila Universitária, Bauru-SP  
Telefone: (14) 996737792  
E-mail: pelissarijh@gmail.com

**Formação Acadêmica**

**Licenciado em Química**

Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)  
Concluído em 30/03/2017

**Mestre em Química**

Área de concentração: Química Orgânica  
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

**Disciplinas cursadas no Mestrado**

Métodos espectrométricos	Conceito A
Aplicações em Quimiometria – Módulo I	Conceito A
Aplicações em Quimiometria – Módulo II	Conceito A
Aplicações em Quimiometria – Módulo III	Conceito A
Análise Térmica	Conceito A

**Estágio de Docência**

Química Orgânica II (Licenciatura em Química – Faculdade de Ciências, Unesp-Bauru),  
2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais Cris e Clério e a minha avó Eliza, que sempre forneceram apoio e incentivo em minhas escolhas e à minha irmã Gabriela.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cris e Clério, por todo apoio a mim dedicado e ao grande incentivo para que fosse possível eu chegar até aqui.

À minha avó Eliza pelo incentivo ao meu crescimento profissional e pelo carinho a distância.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Rinaldo por todos os ensinamentos, paciência e atenção a mim dedicada desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes responsável pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru por ter disponibilizado o equipamento de CLAE.

A Profa. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira, por toda disponibilidade, atenção e ensinamentos de planejamentos fatoriais que muito contribuiu para que essa pesquisa fosse realizada.

Às minhas amigas Amanda, Aniele e Patrícia, por toda amizade e risada durante as viagens para Araraquara.

Ao meu namorado Murilo por todo incentivo, apoio, carinho e cumplicidade nos momentos difíceis.

À minha colega de grupo Maiara por toda ajuda, risada e desabafos durante esses anos.

A todos os funcionários do Instituto de Química pela contribuição na realização dessa pesquisa

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”. (Arthur Schopenhauer)*

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação, mas se você não fizer não existirão resultados”. (Mahatma Gandhi)*



## RESUMO

Diversos métodos já foram desenvolvidos para a identificação de compostos fenólicos em vinhos, contudo, tais métodos utilizam solventes tóxicos que podem prejudicar desde o meio ambiente até a saúde do analista. Diante disso, este trabalho descreve o desenvolvimento racional e eficiente de um método por cromatografia líquida de alta eficiência capaz de identificar os principais constituintes químicos em amostras dos vinhos brasileiros *merlot* e *cabernet sauvignon*, abordando os princípios da Química Analítica Verde. Para o desenvolvimento do método foi utilizado como solvente orgânico da fase móvel o etanol, solvente biodegradável e sustentável. Como etapa inicial foi utilizado um planejamento fatorial fracionário de dois níveis com 7 fatores ( $2^{7-2}$ ), do qual foi possível observar que a temperatura e a porcentagem inicial de etanol foram os parâmetros cromatográficos que mais influenciaram na separação dos compostos fenólicos. Após a identificação dos fatores mais influentes, os mesmos foram submetidos a um planejamento Doehlert para a obtenção da melhor condição cromatográfica. O método cromatográfico desenvolvido foi eficiente na separação dos principais constituintes dos vinhos, possibilitando a identificação de: ácido gálico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, resveratrol, kaempferol, catequina e epicatequina. O método também apresentou precisão na faixa de 0,19 a 0,95%, considerada adequada segundo os critérios estabelecidos pela ANVISA. Além disso, foi determinado o impacto ambiental utilizando a métrica HPLC-EAT da qual foi possível obter uma pontuação de 20,114, classificando o método como verde quando comparado com os da literatura, os quais obtiveram pontuações que variaram de 28,545 a 125,610. O método desenvolvido contemplou 8 princípios dos 12 da Química Analítica Verde.

**Palavras-chave:** Vinhos, cromatografia verde, planejamentos fatoriais, química analítica verde, *fingerprint*.

## ABSTRACT

Several methods have already been developed for the identification of phenolic compounds in wines. However, such methods employ toxic solvents that can harm from the environment to the health of the analyst. At that, this work describes the rational and efficient development of a High Performance Liquid Chromatography method capable of identify the main chemical constituents in samples of brazilian wines *merlot* and *cabernet sauvignon*, approaching the principles of Green Analytical Chemistry. To the development of the method, ethanol was used as the organic solvent for the mobile phase, a biodegradable and sustainable solvent. A fractional factorial design with 2 levels and 7 factors ( $2_{V}^{7-2}$ ) was used as the initial step, from which it was possible to observe that the temperature and the initial percentage of ethanol were the chromatographic parameters that most influenced in the separation of the phenolic compounds. Once the most important factors were identified, they were submitted to Doehlert design to obtain the best chromatographic condition. The chromatographic method developed was efficient in separating the main constituents of the wines, allowing the identification of: gallic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, resveratrol, kaempferol, catechin and epicatechin. The method also presented precision in the range of 0.19 to 0.95%, considered adequate according to the criteria established by ANVISA. In addition, the environmental impact was determined using the HPLC-EAT metric from which it was possible to obtain a score of 20.114, classifying the method as green when compared to the literature, which obtained scores that ranged from 28.545 to 125.610. The method developed contemplated 8 principles of the 12 of the Green Analytical Chemistry.

**Keywords:** Wines, green chromatography, factorial design, green analytical chemistry, fingerprint.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\lambda$	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
BB	Planejamento Box-Behnken
CCD	Planejamento Composto Central ( <i>Central Composite Design</i> )
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos ( <i>Diode array detector</i> )
DoE	Planejamento Doehlert
DPR	Desvio Padrão Relativo
EAT	<i>Environmental Assessment Tool</i> (Ferramenta de Avaliação Ambiental)
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
EtOH	Etanol
GAC	Química Analítica Verde ( <i>Green Analytical Chemistry</i> )
GL	Graus de Liberdade
Hac	Ácido acético
MeOH	Metanol
MQ	Média Quadrática
SQ	Soma Quadrática
$t_R$	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Determinação do número de experimentos no CCD.....	27
Equação 2. Determinação do número de experimentos no BB.....	28
Equação 3. Determinação do número de experimentos no DoE.....	28
Equação 4. Porcentagem de contribuição dos contrastes.....	45
Equação 5. Determinação do número total de experimentos em um Planejamento DoE..	49
Equação 6. Relação entre valores experimentais e codificados do Planejamento DoE....	50
Equação 7. Equação do Método dos Mínimos Quadrados.....	55
Equação 8. Modelo matemático obtido pelo Planejamento DoE.....	57
Equação 9. Determinação da Soma Quadrática da Regressão.....	58
Equação 10. Desvio Padrão Relativo (%DPR).....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura característica dos flavonóides.....	17
Figura 2. Estrutura molecular dos Flavonóis.....	18
Figura 3. Estrutura molecular da catequina e epicatequina.....	18
Figura 4. Estrutura molecular das Antocianinas.....	19
Figura 5. Estrutura molecular dos ácidos hidroxibenzóicos (A) e hidroxicinâmicos (B)....	19
Figura 6. Estruturas moleculares: taninos hidrolisáveis (A) e taninos condensados (B)....	20
Figura 7. Estruturas moleculares: (A) <i>trans</i> -resveratrol e (B) <i>cis</i> -resveratrol.....	21
Figura 8. Cromatogramas referentes a análise exploratória da amostra [Sistema CLAE; coluna XBridge (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,5% HAc, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-100% B (30 min). Vazão: 1,0 mL.min <sup>-1</sup> , 40 °C].....	35
Figura 9. Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 6 da etapa de triagem.....	39
Figura 10. Cromatogramas referentes aos experimentos 7 a 12 da etapa de triagem.....	40
Figura 11. Cromatogramas referentes aos experimentos 13 a 18 da etapa de triagem.....	41
Figura 12. Cromatogramas referentes aos experimentos 19 a 24 da etapa de triagem....	42
Figura 13. Cromatogramas referentes aos experimentos 25 a 30 da etapa de triagem....	43
Figura 14. Cromatogramas referentes aos experimentos 31 e 32 da etapa de triagem....	44
Figura 15. Porcentagem de contribuição dos contrastes.....	46
Figura 16. Gráfico normal para os valores de contrastes obtidos do planejamento $2v^{7-2}$ ...47	47
Figura 17. Domínio experimental circular para o planejamento DoE com 2 variáveis.....	52
Figura 18. Cromatogramas referentes aos experimentos do Ponto Central, 2, 3 e 4 do DoE.....	53
Figura 19. Cromatogramas referentes aos experimentos 5 a 7 do DoE.....	54
Figura 20. Matriz X (Represente dos coeficientes, 9 linhas e 6 colunas).....	55
Figura 21. Matrix X <sup>t</sup> (6 linhas e 9 colunas).....	56
Figura 22. Matrix (X <sup>t</sup> X) <sup>-1</sup> (6 linhas e 6 colunas).....	56

Figura 23. Vetor de respostas.....	56
Figura 24. Vetor de Coeficientes (b).....	57
Figura 25. Matriz de Covariância (6 linhas e 6 colunas).....	60
Figura 26. Cromatograma referente ao experimento 6 do DoE [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	61
Figura 27. Cromatograma referente à análise da amostra submetida a EFS utilizando cartucho C <sub>18</sub> [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	62
Figura 28. Cromatograma referente à análise da amostra submetida a ELL. [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C.....	63
Figura 29. Espectros UV das bandas cromatográficas 1 à 9 da amostra submetida a ELL. 64	
Figura 30. Espectros UV das bandas cromatográficas 10 à 17 da amostra submetida a ELL.....	65
Figura 31. Espectros UV das bandas cromatográficas 18 e 19 da amostra submetida a ELL.....	66
Figura 32. Cromatograma referente à análise de epicatequina (Padrão Analítico) a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	67
Figura 33. Cromatograma referente à análise de ácido cafeico (Padrão Analítico) a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	67
Figura 34. Cromatograma referente à análise do padrão ácido <i>p</i> -cumárico a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	68
Figura 35. Cromatograma referente à análise do padrão ácido gálico a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	68

Figura 36. Cromatograma referente à análise do padrão ácido siríngico a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	69
Figura 37. Cromatograma referente à análise do padrão kaempferol a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	69
Figura 38. Cromatograma referente à análise do padrão catequina a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	70
Figura 39. Cromatograma referente à análise do padrão resveratrol a 0,05 mg.mL <sup>-1</sup> . [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 5-55% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	70
Figura 40. Cromatograma referente ao experimento utilizando EtOH grau alimentício como fase móvel [Sistema CLAE; coluna XSelect (150 x 4,60 mm d.i. x 5 µm, Waters®); Solvente A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ac. Acético, Solvente B: EtOH. Gradiente: 4,8-52,7% B (30 min). Vazão: 0,75 mL.min <sup>-1</sup> , 51,8 °C].....	74
Figura 41. Avaliação da similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos da análise de amostras de vinhos <i>cabernet sauvignon</i> , da qual foi possível identificar os compostos fenólicos: AG (ácido gálico), C (Catequina), E (Epicatequina), AC (ácido cafeico), AS (ácido siríngico), Ap-C (ácido <i>p</i> -cumárico), R (resveratrol) e K (kaempferol).....	76
Figura 42. Avaliação da similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos da análise de amostras de vinhos <i>merlot</i> , da qual foi possível identificar os compostos fenólicos: AG (ácido gálico), C (Catequina), E (Epicatequina), AC (ácido cafeico), AS (ácido siríngico), Ap-C (ácido <i>p</i> -cumárico), R (resveratrol) e K (kaempferol).....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos na triagem para desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de vinhos brasileiros (Planejamento Fatorial Fracionário com 2 níveis e 7 fatores: $2\sqrt{7-2}$ ).....	32
Tabela 2. Fatores (variáveis) e níveis inferior, superior e central, estabelecidos a partir da triagem para o Planejamento Doehlert.....	32
Tabela 3. Condições cromatográficas da análise exploratória.....	33
Tabela 4. Planejamento experimental de 2 níveis e 7 fatores de um fatorial completo $2\sqrt{7-2}$ e as respostas obtidas para cada análise.....	38
Tabela 5. Contrastes calculados para o planejamento $2\sqrt{7-2}$ .....	44
Tabela 6. Contrastes calculados sem repetições para o planejamento $2\sqrt{7-2}$ .....	45
Tabela 7. Valores de probabilidade acumulada e z para cada contraste do planejamento $2\sqrt{7-2}$ .....	47
Tabela 8 – Eficiência dos Planejamentos Doe, CCD e Box-Behnken para 2 variáveis.....	49
Tabela 9. Matriz Experimental Doehlert com 2 variáveis e as respostas obtidas.....	50
Tabela 10. Valores fixados para as variáveis de menor importância estatística na etapa de triagem.....	51
Tabela 11. Respostas obtidas no Planejamento Doehlert.....	52
Tabela 12. Valores Previstos, observados e Resíduos deixados pelo modelo.....	57
Tabela 13. Análise de Variância (ANOVA).....	58
Tabela 14. Determinação da significância estatística dos coeficientes.....	60
Tabela 15. Condição cromatográfica do Experimento 6 (DoE).....	61
Tabela 16. Comparação das bandas cromatográficas da amostra e dos padrões analíticos.....	71
Tabela 17. Valores de %DPR referentes à precisão do método cromatográfico.....	72
Tabela 18. Valores das pontuações calculadas pela métrica de HPLC-EAT de métodos encontrados na literatura e do método desenvolvido.....	73



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Vinhos.....	16
1.2. Compostos Fenólicos em Vinhos.....	17
1.3. Química Analítica Verde.....	23
1.4. Planejamentos Experimentais: Abordagem Multivariada.....	25
2. OBJETIVO.....	29
2.1. Etapas realizadas para o alcance do objetivo.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Reagentes utilizados.....	30
3.2. Materiais e Instrumentação utilizados.....	30
3.3. Soluções Padrão.....	30
3.4. Obtenção das amostras.....	31
3.5. Preparação da amostra.....	31
3.5.1. Preparação da amostra para análise Exploratória e Planejamentos Experimentais.....	31
3.5.2. Extração em Fase Sólida para avaliação do <i>clean-up</i> .....	31
3.5.3. Extração Líquido-Líquido para avaliação do <i>clean-up</i> .....	31
3.5.4. Preparação da amostra para análise de co-injeção com padrões.....	31
3.6. Planejamentos Experimentais.....	31
4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Análise exploratória da amostra.....	33
4.2. Desenvolvimento do método cromatográfico.....	36
4.2.1. Triagem de variáveis.....	36
4.2.3. Determinação da melhor condição cromatográfica (Planejamento Fatorial - DoE).....	48
4.2.4. Determinação do modelo matemático.....	54
4.2.5. Análise de Variância (ANOVA).....	58
4.3. Otimização do perfil cromatográfico.....	62
4.4. Validação do método desenvolvido.....	66
4.4.1. Seletividade e identificação dos constituintes presentes no perfil dos vinhos analisados.....	66
4.5. Medida do “verde” do método desenvolvido e comparação com métodos da literatura utilizando a métrica HPLC-EAT.....	72
4.6. Aumento do caráter verde do método utilizando EtOH grau alimentício como fase móvel.....	73
4.7. Avaliação da similaridade de perfis cromatográficos de vinhos tintos.....	74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERENCIAS.....	80

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Vinhos

Não há relatos precisos de quando o vinho foi elaborado pela primeira vez, mas segundo historiadores, o vinho foi descoberto pelo homem ao perceber que o suco de uva, que esquecera em uma vasilha, havia sofrido fermentação mudando seu sabor, odor e coloração e, a partir de então, o mercado vitivinícola passou a progredir (ARSEGO, 2004).

Obtido a partir da fermentação do suco de uvas frescas, o vinho é um produto com uma porcentagem alcoólica mínima de 7% (v/v) e está entre as bebidas mais consumidas pela população (RIZZON, DALLAGNOL, 2007).

A uva se originou na Ásia e se espalhou por todo mundo se tornando uma das frutas mais consumidas pela população. No Brasil, o cultivo da videira teve impulso no século XIX com a chegada de imigrantes italianos no estado do Rio Grande do Sul com o cultivo da espécie *Vitis labrusca* L. (THE...2018), classificada como uvas americanas. Com o avanço da tecnologia e o surgimento de novos fungicidas, o Brasil passou a cultivar uvas da variedade europeia, as chamadas *Vitis vinifera* L. (THE...2018), classificadas como uvas finas (GUERRA et al., 2005; SILVA; LAGO-VANZELA ; BAFFI, 2015).

Em 2012, o cultivo da uva no Brasil ultrapassava uma área superior a 80 mil hectares classificando o país como 14º produtor mundial de uva (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2018). Em decorrência da extensa área de cultivo e da grande diversidade ambiental, existem vários centros produtores de uvas no Brasil, divididos de acordo com a peculiaridade climática de cada região (SILVA; LAGO-VANZELA ; BAFFI, 2015).

De acordo com dados estatísticos obtidos em 2008, aproximadamente 55% do cultivo total de uvas no Brasil são destinados ao consumo *in natura* e exportação e 45% destinados a produção de sucos e vinhos, posicionando o Brasil como o 16º produtor mundial de vinho (GUERRA et al., 2009)

A partir de 1995 o Brasil passou a ser membro da OIV (*Office International de la Vigne e du Vin*), organismo que regula as normas internacionais de produção do vinho, cujo cumprimento resulta, obrigatoriamente, em elevação do padrão dos vinhos evidenciando que a vitivinicultura brasileira evoluiu em larga escala, passando a produzir vinhos de boa qualidade (ARSEGO, 2004).

A qualidade da uva é o principal fator para a obtenção de um bom vinho. A maturação é um dos aspectos que mais interferem na qualidade da uva. Abrangendo o período que vai da mudança de cor até a colheita, o processo de maturação envolve as mudanças físico-químicas como diminuição da acidez, aumento de pH, síntese de substâncias aromáticas e a modificação do sabor. Contudo, muitos fatores podem influenciar a maturação das uvas, tais como temperatura, adubação, solo, umidade, irrigação, seca, granizo, entre outros (GRIS, 2010).

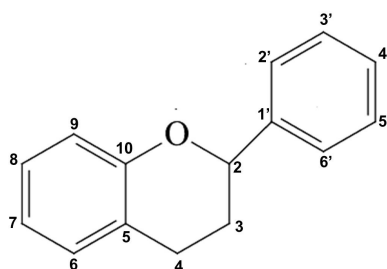
Quando se analisa a qualidade de um vinho, não só os parâmetros físico-químicos de maturação são importantes, mas também o grau de extração de compostos fenólicos da uva (LINS; SARTORI, 2012).

## 1.2. Compostos Fenólicos em Vinhos

Caracterizados por apresentarem um ou mais grupos hidroxilas ligados a um anel benzênico, os compostos fenólicos contribuem diretamente para as características organolépticas do vinho, sendo os principais responsáveis pelos parâmetros de qualidade, como a cor e o sabor (HERNANDEZ et al., 2006).

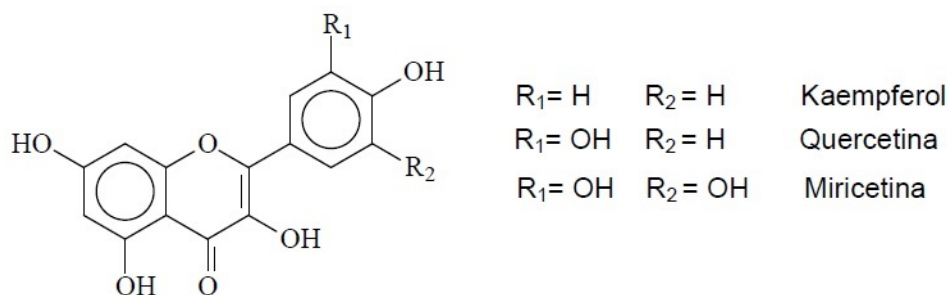
Os compostos fenólicos presentes nos vinhos são originários da uva, considerada uma das frutas com a maior concentração desses compostos. Em decorrência da grande variabilidade estrutural, os compostos fenólicos mais encontrados nas uvas se dividem em duas classes principais: Flavonoides e não flavonoides (ABE et al., 2007; SILVA; LAGO-VANZELA; BAFFI, 2015).

Os flavonoides possuem uma estrutura molecular característica composta por três anéis, sendo dois deles aromáticos, assumindo um esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 1). As variações na estrutura molecular pode subdividir os flavonoides em subclasses sendo os principais grupos encontrados nos vinhos: flavonóis, flavan-3-óis e antocianinas (HIRUMA-LIMA et al., 2017; ABE et al., 2007).



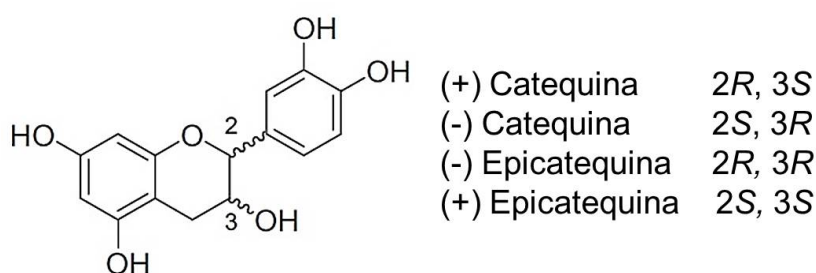
**Figura 1.** Estrutura característica dos flavonóides

Os flavonóis são produzidos na casca da uva e, junto as antocianinas, contribuem para a coloração dos vinhos através do processo de copigmentação. O esqueleto estrutural dos flavonóis possui um grupo hidroxila substituído na posição 3 do terceiro anel. Os flavonóis mais encontrados nas uvas e, conseqüentemente, nos vinhos são canferol, miricetina e quercetina (Figura 2), sendo essa última a que possui maior concentração em uvas tintas (MATTIVI et al., 2006).



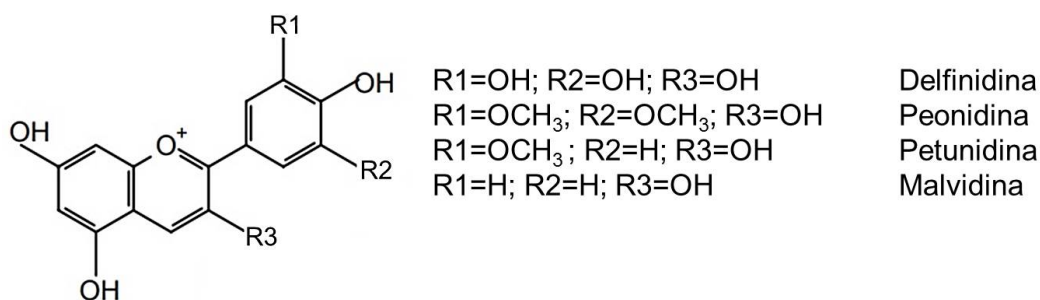
**Figura 2.** Estrutura molecular dos Flavonóis

Os flavan-3-óis mais presentes nos vinhos tintos são catequina e epicatequina (Figura 3), ambos encontrados nas sementes das uvas (SILVA; LAGO-VANZELA; BAFFI, 2015) e contribuem para o sabor, brilho e estrutura dos vinhos (DIAS et al., 2010).



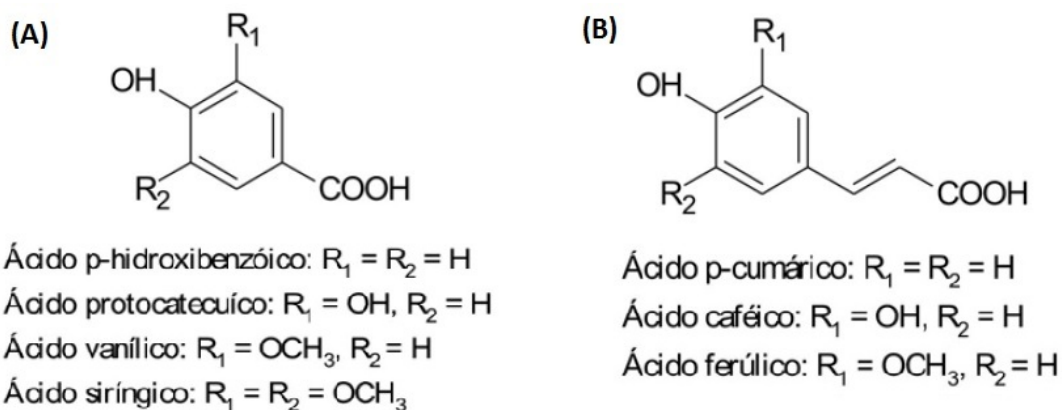
**Figura 3.** Estrutura molecular da catequina e epicatequina

As antocianinas, outra classe de flavonóides, são provenientes das cascas das uvas e estão intimamente ligadas a coloração dos vinhos. A sua estrutura é constituída por três anéis: um anel pirano heterocíclico e dois anéis fenólicos. As antocianinas mais encontradas nas uvas são peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Figura 4). Nos vinhos provenientes das uvas *V. vinifera*, as antocianinas são encontradas na forma monoglicosiladas (SILVA; LAGO-VANZELA ; BAFFI, 2015).



**Figura 4.** Estrutura molecular das Antocianinas

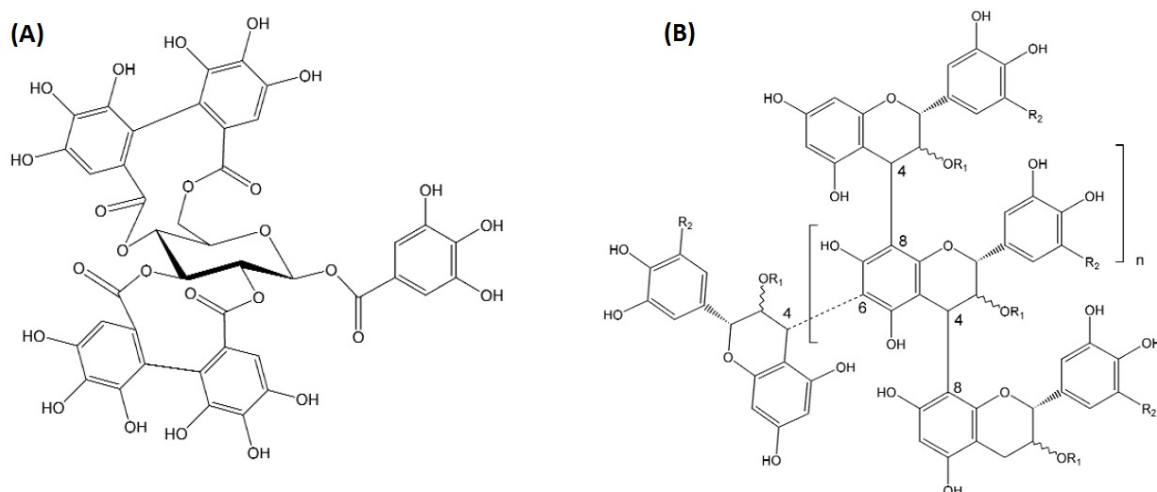
Na classe dos não flavonoides destacam-se os ácidos fenólicos e os taninos. Com uma estrutura molecular constituída por um anel benzênico, um grupo carbonila e um ou mais grupos hidroxilas, os ácidos fenólicos são subdivididos em dois grupos: ácidos benzoicos (C6-C1) e cinâmicos (C6-C3) (Figura 5; SOARES, 2002). Os ácidos cinâmicos são mais comumente encontrados nas cascas e polpas das uvas, enquanto que os ácidos benzoicos estão presentes apenas nas cascas. Tais compostos não possuem nenhuma contribuição direta para as características organolépticas dos vinhos, porém, são antecessores de outros fenólicos voláteis que afetam com grande influência no odor (SILVA; LAGO-VANZELA ; BAFFI, 2015).



**Figura 5.** Estrutura molecular dos ácidos hidroxibenzoicos (A) e hidroxicinâmicos (B).

Os taninos são os responsáveis pelo sabor adstringente característico do vinho, devido à capacidade dos mesmos se ligarem a proteínas. Os taninos são divididos em duas categorias: hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são derivados de ácidos fenólicos contendo em suas estruturas ligações entre uma molécula de açúcar e um ácido fenólico. Os taninos condensados são derivados dos flavonoides, sendo formados pela

polimerização de uma ou mais unidades de catequina ou epicatequina (Figura 6; HERDERICH; SMITH, 2005, HIRUMA-LIMA et al., 2017).



**Figura 6.** Estruturas moleculares: taninos hidrolisáveis (A) e taninos condensados (B)

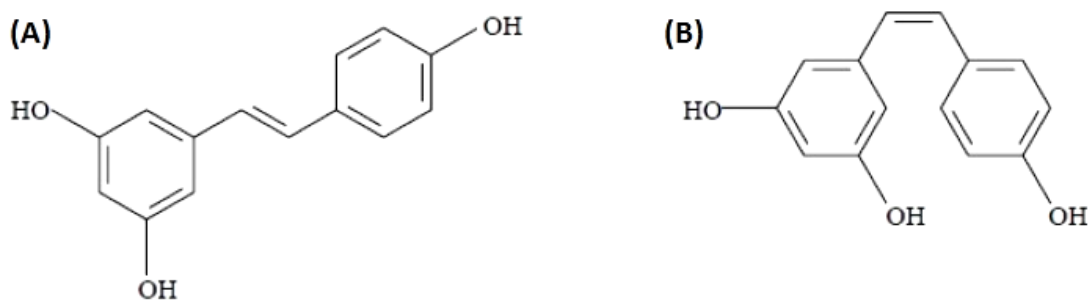
Além de todas as características organolépticas, os compostos fenólicos possuem atividades antioxidantes, o que lhes atribui efeitos benéficos para a saúde humana. (DALL'ANTONIA; ARCHELA, 2013; SOARES et al., 2008).

Os antioxidantes são divididos em primários e secundários. Aqueles atuam através da reação de hidrogênios com radicais livres, interrompendo a reação radicalar, convertendo-os em produtos mais estáveis e, os antioxidantes secundários, retardam a formação dos radicais livres por meio de diferentes mecanismos. Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes primários (ANGELO; JORGE, 2006).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos confere aos vinhos benefícios à saúde tais como, atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória e cardioprotetora (MORAES; LOCATELLI, 2010). Esta última ganhou atenção na área científica com o surgimento do Paradoxo Francês em 1992, no qual a diminuição de doenças cardiovasculares da população era atribuída ao elevado consumo de vinho (SOUZA et al., 2006).

De todos os compostos com efeitos benéficos presentes nos vinhos, o resveratrol é o que tem maior destaque. Pertencente à classe dos não flavonoides, o resveratrol (3,4,5-triidroxiestilbeno) é uma fitoalexina sintetizada nas cascas das uvas e encontra-se nas formas *cis* e *trans* (Figura 7), no qual, o primeiro é uma isomerização do segundo na presença de luz (SAUTTER et al., 2005; VIAN et al., 2005). Além da prevenção contra doenças

cardiovasculares, o resveratrol possui ação anti-carcinogênica, anti-inflamatória, antioxidante e hepatoprotetora (FRÉMONT, 1999).



**Figura 7.** Estruturas moleculares: (A) *trans*-resveratrol e (B) *cis*-resveratrol

A concentração de compostos fenólicos é dependente de inúmeros fatores como as condições de clima, o solo e o sistema de plantio da uva. Além do mais, as reações enzimáticas e químicas que ocorrem durante o processo de produção do vinho favorecem a formação de outros compostos de modo que a composição fenólica nos vinhos torna-se mais complexa que nas uvas (SILVA; LAGO-VANZELA; BAFFI, 2015).

É visto, portanto, que uma avaliação dos constituintes químicos dos vinhos se faz necessária para assegurar a sua confiabilidade e, se possível, identificar adulterações no controle de qualidade dos mesmos. Devido à alta variabilidade estrutural de compostos fenólicos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada para a identificação dos mesmos através de uma “impressão digital cromatográfica” ou *fingerprint*.

As impressões digitais cromatográficas são aceitas desde a década de 90 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para análise de produtos naturais e foram introduzidas com o objetivo de avaliar os constituintes químicos de amostras complexas e fornecer um controle de qualidade rápido e eficiente (ALAERTS et al., 2007; GAN; YE, 2006).

Mais de 15 moléculas fenólicas incluindo flavan-3-ols, antocianinas, derivados de ácido cinâmico, derivados de flavonol e *trans*-resveratrol que apresentam diferentes atividades antioxidante foram identificadas por injeção direta do vinho tinto. Esse método desenvolvido por Revilla e Ryan (2000) também pode ser usado para análise de vinhos brancos, bem como para cascas e sementes de uvas. O método consistiu de uma fase

móvel composta por acetonitrila e água com pH ajustado para 1,8 com ácido perclórico em vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

No ano seguinte, Revilla et al., (2001) desenvolveram outro método para a separação de antocianinas em uvas e vinhos tintos utilizando ACN e água como fase móvel e uma coluna de fase estacionária C<sub>18</sub>. O pH da fase móvel foi ajustado para 1,3 e a vazão estabelecida em 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. Nesse método, o perfil de antocianinas do vinho se mostrou diferente daquele das uvas com a quantidade de malvidina 3-*O*-glicosídeo maior no primeiro. Em contrapartida, a concentração de outras antocianinas se mostrou maior nas uvas.

Um método simples por CLAE acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e massas, para análises rotineiras, foi apresentado por Dias, David e David (2016) para a determinação de quercetina, ácido gálico, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico em vinhos brasileiros. Nesse método a fase móvel foi composta por metanol (MeOH) e água acidificada com ácido fórmico com uma vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e uma fase estacionária C<sub>18</sub>.

Outro método desenvolvido por Padilha et al., (2017), teve o objetivo de determinar a composição fenólica de vinhos produzidos na região do Vale São Francisco, considerada de clima atípico para a produção de uvas. A fase móvel utilizada pelos autores foi composta por solução de dihidrogenofosfato de potássio com pH ajustado para 2,05, MeOH e ACN. O método utilizou uma vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, uma temperatura de 40 °C e uma fase estacionária C<sub>18</sub>. O método foi capaz de quantificar 20 compostos fenólicos.

Com vinhos produzidos na mesma região, outro método foi utilizado por Dias et al., (2010), para a determinação da concentração de catequina e epicatequina. O método faz uso de uma fase móvel composta por MeOH, ácido acético e água com uma vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e coluna de fase estacionária C<sub>18</sub>.

Dois métodos de análise por CLAE foram utilizados por Ivanova-Petropulos et al., (2015) para a análise de 65 compostos fenólicos em três diferentes tipos de vinhos (um de variedade típica da Macedônia e dois populares). O método para a análise de antocianinas foi realizada utilizando uma coluna de fase estacionária C<sub>18</sub> em uma temperatura de 40 °C. A fase móvel foi constituída por ACN, água e ácido fórmico com uma vazão de 0,63 mL.min<sup>-1</sup>. Para a análise de outros compostos fenólicos foi utilizado um segundo método com a mesma vazão, mesma fase estacionária e fase móvel composta pelos mesmos solventes, porém, em proporções diferentes de eluição.



Um método, desenvolvido por Garcia-Beneytez et al.,(2003), foi capaz de identificar vinte antocianinas em amostras diferentes de uvas e vinhos. O método foi desenvolvido para análises rotineiras com intuito de evitar fraudes na produção de vinhos.

Para a determinação de resveratrol, um método foi desenvolvido por Ratola, Faria, Alves (2004), no qual utilizaram um detector por arranjo de fotodiodos. Os autores analisaram 41 vinhos tintos e 21 brancos por injeção direta e comprovaram a presença do isômero *trans*-resveratrol em apenas 8 vinhos brancos e em todos os vinhos tintos. O método utilizou uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> e uma fase móvel composta por água e ACN em uma vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Bem como os trabalhos citados, Archela; Dall'Antonia (2013) e Dias (2010) apresentam outros enfatizando que muito já foi estudado para análise de compostos fenólicos em vinhos. No entanto, é possível perceber que tais trabalhos fazem uso dos solventes acetonitrila e metanol, considerados tóxicos, que podem prejudicar desde o meio ambiente até a saúde do analista.

Assim, a preocupação com o meio ambiente junto com a pressão sobre as indústrias no que se refere a gerações de subprodutos tóxicos têm levado pesquisadores a desenvolver novas estratégias que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente (PRADO, 2003).

Sendo a CLAE a técnica mais utilizada nos estudos químicos citados, uma estratégia válida para a diminuição dos impactos negativos na análise de vinhos seria a utilização da cromatografia verde, ou seja, a aplicação dos conceitos de Química Analítica Verde no desenvolvimento de *fingerprints*.

### **1.3. Química Analítica Verde**

A química verde é a ciência que visa prevenir ou reduzir os impactos ambientais negativos através de uma abordagem eficaz baseada em 12 princípios básicos, propostos por Anastas e Warner (1998), que quando aplicados, garantem benefícios à saúde e ao meio ambiente, através da diminuição de resíduos tóxicos, baixas contaminações e queda de gastos durante processos industriais.

A química verde se tornou de fundamental importância nos Estados Unidos com a publicação da Lei de Prevenção da Poluição no ano de 1990 que visava gerenciar as questões ambientais no meio industrial, de modo que não houvesse a formação de subprodutos tóxicos que necessitassem de um tratamento especial (ANASTAS, 1999).

Com o surgimento dos doze princípios (PRADO, 2003), a química verde ganhou força não apenas na área acadêmica, mas também nas grandes indústrias farmacêuticas que visavam maximizar a eficiência de um processo químico ao mesmo tempo em que a saúde humana e o meio ambiente eram preservados (FARIAS; FÁVARO, 2011; SANDRA et al., 2010).

Seus princípios são:

1. Prevenir a formação de subprodutos;
2. Economia de átomos;
3. Sínteses com compostos de menor toxicidade;
4. Desenvolvimento de compostos seguros;
5. Evitar o uso de solventes e auxiliares;
6. Diminuir a energia gasta durante um processo químico;
7. Utilização de substâncias recicladas;
8. Diminuição de derivativos;
9. Uso de catalisadores;
10. Desenvolvimento de compostos para degradação;
11. Controlar a formação de compostos tóxicos para a prevenção da poluição;
12. Uso de substâncias seguras para evitar acidentes tais com explosões e incêndios.

Formulados para atender as necessidades da química sintética e orgânica, voltadas para diferentes áreas das indústrias químicas, os doze princípios foram aprimorados de modo que os mesmos fossem aplicados diretamente em laboratórios analíticos. Nesse contexto, surgiu no início dos anos 2000 a Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry, GAC*) (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013).

A GAC visa a qualidade das metodologias analíticas de modo que os resultados atinjam parâmetros de precisão, seletividade e exatidão adequados através de alternativas ambientalmente amigáveis. Galuszka et al., (2013) listam os 12 princípios da GAC:

1. Evitar tratamento de amostras;
2. Utilizar quantidades mínimas de amostras;
3. Realizar medições *in situ*;
4. Integralizar processos analíticos com o objetivo e reduzir consumo de energia e uso de reagentes;
5. Utilizar métodos miniaturizados e automatizados;
6. Evitar derivação;

7. Gerar a menor quantidade de resíduos possível e tratá-los adequadamente;
8. Preconizar a utilização de métodos multiparamétricos;
9. Minimizar o uso de energia;
10. Utilizar reagentes sintetizados a partir de fontes renováveis;
11. Substituir reagentes tóxicos por atóxicos;
12. Aumentar a segurança do analista.

A eliminação ou redução de resíduos gerados pela CLAE pode ser alcançada através da utilização de colunas cromatográficas com maior eficiência de separação, o que permite análises mais rápidas, menor vazão e, conseqüentemente, menor consumo de solvente. Outra alternativa, não menos importante, é a substituição de solventes e modificadores orgânicos tóxicos por atóxicos. Nesta estratégia, as análises poderão se realizadas em sistemas aquecidos que permitam diminuir a viscosidade e alterar a seletividade da fase móvel (SANDRA et al., 2010)

O solvente mais utilizado nas análises por CLAE é a acetonitrila em decorrência das suas características que contribuem para a obtenção de ótimos resultados. Acetonitrila apresenta baixa acidez, reatividade química reduzida, baixa absorvância no ultravioleta, capacidade de dissolução em uma ampla gama de solutos e é compatível com a espectrometria de massas. Porém, por apresentar elevada toxicidade, a sua substituição por solventes mais verdes é prioridade (SANDRA et al., 2010).

Atrelado à preservação ambiental, a economia de tempo e energia são outros princípios fundamentais que compõem a GAC e a utilização de abordagens que visem atendê-los, concomitantemente, se faz necessária. A utilização de Planejamentos Experimentais é a melhor alternativa que colabora de maneira significativa com a redução no uso de solventes, com a diminuição de energia e, conseqüentemente, influenciam positivamente na geração de resíduos e no tempo de análise.

#### **1.4. Planejamentos Experimentais: Abordagem Multivariada**

Na maioria das vezes, estudos químicos são realizados através de abordagens univariadas, a qual pode ser considerada como um método sequencial, ou seja, a resposta ótima é investigada analisando-se um fator por vez. Porém, além de requerer uma quantidade elevada de experimentos, esta técnica não pode ser considerada eficiente em sistemas químicos, pois métodos univariados podem induzir erros na resposta final, não sendo adequados (EIRAS; COSCIONE; ANDRADE, 2000).

A fim de superar este obstáculo e visto que os recursos financeiros no Brasil estão reduzidos, pesquisadores buscam alternativas rápidas, eficientes e que gerem ótimos resultados no desenvolvimento de experimentos (CUNICO et al., 2008). O método mais adequado para esta questão é a utilização de técnicas multivariadas, que se baseiam no estudo simultâneo de todas as variáveis envolvidas no processo (NEVES; SCHVARTZMAN; JORDÃO, 2002).

Além de estudar os fatores (variáveis) ao mesmo tempo, outras duas vantagens se destacam na utilização de planejamentos multivariados, tais como: a investigação da interação entre as variáveis envolvidas e a construção de funções matemáticas capazes de prever a melhor região de valores para a obtenção da melhor resposta (COSCIONE; FALCÃO; ANDRADE, 2006).

A abordagem multivariada envolve um procedimento composto de duas etapas principais. A primeira delas é a uma análise robusta com o objetivo de determinar quais variáveis e interações são as mais importantes no processo em estudo, ou seja, quais vão influenciar significativamente a resposta de interesse. A segunda consiste em um ajuste fino com o intuito de encontrar a região com a melhor combinação de valores para as variáveis (COSCIONE; FALCÃO; ANDRADE, 2006).

Na realização da primeira etapa, também chamada de “triagem”, o planejamento experimental fatorial é o mais utilizado (TEÓFILO; FERREIRA, 2005). Nele as variáveis são investigadas em dois níveis, os quais são valores que estas variáveis podem assumir, delimitando um domínio experimental em um nível inferior e superior – representado por sinal negativo e positivo, respectivamente (NOVAES et al., 2017).

O planejamento fatorial pode ser dividido em completo e fracionário. O primeiro pode ser representado por  $2^k$ , em que  $k$  representa o número de fatores investigados e o 2 a quantidade de níveis (inferior e superior). Portanto, em um sistema com 2 fatores, por exemplo, o número de experimentos realizados seriam 4. Contudo, quando o número de fatores aumenta, este planejamento torna-se irrelevante em decorrência da quantidade de experimentos necessários à medida que um fator é adicionado ao estudo (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001). Desta maneira, um planejamento fatorial fracionário pode ser utilizado quando o número de variáveis exceder 4 e, assim, obtiver as mesmas conclusões de um planejamento fatorial completo com menos esforço (TEÓFILO; FERREIRA, 2005).

Um planejamento fatorial fracionário é construído utilizando frações de um planejamento completo. Pode ser representado por  $2^{k-n}$ , em que  $k$  é o número de variáveis

e  $n$  é o tamanho da fração. No planejamento fatorial fracionário, os efeitos principais podem se confundir com efeitos de interação e esta confusão está intimamente ligada à fração, que por sua vez, determina a resolução. Resolução pode ser definida como a ordem em que os efeitos são negligenciados no planejamento. Efeito é a mudança ocorrida na resposta pela alteração da variável do nível inferior (-) para superior (+) ou vice-versa (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001).

A segunda etapa da abordagem multivariada corresponde a uma otimização, também chamada de “ajuste fino”, ou seja, encontrar os melhores valores para as variáveis, consideradas significativas na etapa de triagem, através da análise de superfícies de respostas (TEÓFILO; FERREIRA, 2005).

Os planejamentos mais utilizados na etapa de otimização são os Planejamentos de Composto Central (*Central Composite Design, CCD*), Box-Behnken (BB) e Doehlert (DoE), sendo este último considerado o mais eficiente por utilizar uma quantidade menor de experimentos e investigar as variáveis mais importantes em um número maior de níveis (PEREIRA FILHO, 2015).

O Planejamento CCD é composto por três partes sendo elas um planejamento fatorial fracionário ou completo, uma parte representando os experimentos axiais e outra os experimentos no ponto central. Os pontos axiais (ou estrela) são responsáveis pela ortogonalidade do planejamento sendo equidistantes do ponto central (LUNDSTEDT et al., 1998). O número de experimentos ( $N$ ) a serem realizados pelo CCD é calculado através da Equação 1, onde  $K$  e  $C_0$  correspondem ao número de variáveis e experimentos no ponto central, respectivamente.

$$N = 2^K + 2K + C_0$$

**Equação 1.** Determinação do número de experimentos no CCD

Assim como o CCD, o planejamento BB é outra alternativa para estimar coeficientes de segunda ordem de um modelo matemático, contudo, os fatores são estudados em apenas três níveis. O número de experimentos ( $N$ ) necessários para a utilização do planejamento e dado pela Equação 2, onde  $K$  corresponde ao número de variáveis e  $C_0$  aos experimentos no ponto central.

$$N = 2k(k-1) + C_0$$

**Equação 2.** Determinação do número de experimentos no BB

Além de exigir uma quantidade menor de experimentos comparada ao CCD e Box-Behnken, o planejamento Doehlert tem a capacidade de avaliar as variáveis em um domínio experimental maior, uma vez que o número de níveis não é mesmo para cada variável em decorrência de sua importância estatística, o que comprova sua eficiência. O domínio experimental de uma matriz Doehlert pode ser circular, esférico ou hiperesférico para duas, três ou quatro variáveis, respectivamente (FERREIRA et al., 2004).

O número total de experimentos do DoE (N) é dado pela Equação 3, da qual K e  $C_0$  correspondem ao número de variáveis e experimentos no ponto central, respectivamente (FERREIRA et al., 2004),

$$N = k^2 + k + C_0,$$

**Equação 3.** Determinação do número de experimentos no DoE

Utilizado desde 1989, o DoE tem ganhado espaço na área da cromatografia sendo utilizado em métodos voltados para análises de espécies vegetais, produtos farmacêuticos, petróleo e derivados, além de sua aplicação em cromatografia capilar (HUN; MASSART, 1989, FERREIRA, et al., 2004).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que, a partir de uma abordagem multivariada, utilizando planejamentos experimentais, é possível desenvolver um método para obtenção de perfil cromatográfico de vinhos brasileiros por CLAE-DAD de uma maneira racional, rápida, eficiente e com menor número de análises do que um desenvolvimento de tentativa e erro.

O método demonstrou ser seletivo na identificação de ácido gálico, resveratrol, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, kaempferol, ácido siríngico, catequina e epicatequina em amostras comerciais de vinhos tintos.

Durante todo o processo de desenvolvimento do método cromatográfico, este trabalho utilizou alternativas seguras voltadas desde a saúde do analista até a preservação ambiental. Os conceitos de química verde estiveram presentes do início ao fim do desenvolvimento, desde a preparação da amostra até a obtenção do perfil cromatográfico, o que enaltece a sua grande vantagem em relação a outros métodos com os mesmos propósitos encontrados na literatura.

Este trabalho abordou 8 dos 12 princípios da GAC (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013):

- Pequenas quantidades de amostra foram utilizadas para as análises convergindo com o Princípio 2;
- Foi utilizado EtOH e água como fase móvel, cujo descarte pode ser realizado sem impacto ambiental convergindo com o Princípio 11 e que também está de acordo com os Princípios 10 e 12 que estabelece a segurança do analista e o uso de solventes de fontes renováveis (EtOH grau alimentício).
- Em nenhum momento durante o desenvolvimento cromatográfico houve geração de resíduos que necessitassem de um tratamento especial, o que vai de encontro com o Princípio 7.
- A utilização de planejamentos experimentais converge com o Princípio 8 que defende a utilização de abordagens multiparamétricas. Ao mesmo tempo foi responsável por reduzir o consumo de energia e solventes, o que está de acordo com os Princípios 9 e 4, respectivamente

Os resultados aqui apresentados contribuem para a utilização do método em possíveis controles de qualidade de vinhos tintos, de modo que os principais compostos

fenólicos responsáveis pelas características organolépticas dos mesmos sejam identificados.

É importante ressaltar que é possível conseguir métodos tão verdes quanto o método desenvolvido, mesmo com solventes tóxicos, como ACN e MeOH, utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), cujo sistema utiliza quantidades em escala micro.

O método desenvolvido neste trabalho mostrou-se compatível com equipamentos para CLAE comuns, com pressão abaixo de 15 Mpa, cuja instrumentação requer menor investimento, quando comparado com o sistema CLUE, o que favorece a utilização desse método por pequenos laboratórios.



## REFERENCIAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V. DA; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 166, de 25 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/353660>>. Acesso em: 30 dez.2018.

ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER HEYDEN, Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 1, p. 1–8, 2007.

ALFONSI, K.; COLBERG, J.; DUNN, P. J.; et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.

ANASTAS, P. T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167–175, 1999.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998. 135 p.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista Institucional Adolfo Iutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ARSEGO, Josiane Luci. **Composição polifenólica de vinhos Bordô, Isabel, Seyve Villard e Niágara Branca, produzidos no alto Vale do Rio do Peixe-SC**. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Energéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BARROS NETO, Benicio de; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edwards. **Como fazer experimentos**. Campinas: Unicamp, 2001.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927–934, 2007.

COSCIONE, A. R.; FALCÃO, A. DE A.; ANDRADE, J. C. DE. O Uso Do Gráfico De Resíduos No Modelamento De Dados Químicos. **Chemkeys**, p. 1–8, 2006. Disponível em: <[www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com)>. .

RODRIGUES, Clenilson Martins. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais Tese**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O.G.; Zawadzki, S. F.; Peralta-Zamora, P.; Peralta-Zamora, P. Planejamento Fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2008.

DALL´ANTONIA, L. H.; ARCHELA, E. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193, 2013.

DE DIAS, F. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Determination of phenolic acids and quercetin in Brazilian red wines from vale do São Francisco region using liquid-liquid ultrasound-assisted extraction and HPLC-DAD-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1055–1059, 2016.

DIAS, F. DE S.; LOVILLO, M. P.; BARROSO, C. G.; DAVID, J. M. Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 17–20, 2010.

EIRAS, S. D. P.; COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C. DE. Métodos de Otimização em Química. **Chemkeys**, p. 1–18, 2000. Disponível em: <[www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com)>. .

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: Conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1089–1093, 2011.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L. DOS; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, v. 64, n. 4, p. 1061–1067, 2004.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Journal of Great Lakes Research**, v. 66, n. 8, p. 663–673, 2000.

GABER, Y.; TÖRNVALL, U.; KUMAR, M. A.; ALI AMIN, M.; HATTI-KAUL, R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2021–2025, 2011.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GAN, F.; YE, R. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, n. 1–2, p. 100–105, 2006.

GARCÍA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F.; REVILLA, E. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5622–5629, 2003.

GRIS, Eliana Fortes. **Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades Vitis vinifera cultivadas em São Joaquim - SC - Brasil.** 2010. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010

GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M.C.; CAMARGO, U.A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. **Embrapa.** Uva e Vinho (Documentos). Bento Gonçalves, 69 p. 2009.

HIRUMA-LIMA, CA ; RODRIGUES, C.M. ; Dos SANTOS, LC ; Da SILVA, VC ; VILEGAS, W . Coleção Farmácia - Volume 7 - Farmacognosia. Capítulo 19: Flavonoides. In: Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado; Rodrigo Cassio Sola Veneziani; Sérgio Ricardo Ambrósio. (Org.). Coleção Farmácia - Volume 7 - Farmacognosia. Capítulo 19: Flavonoides. 1ed.: , 2017, v. 7, p. 387-406.

HENDERSON, R. K.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, C.; CONSTABLE, D. J. C.; et al. Expanding GSK's solvent selection guide - Embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. **Green Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 854–862, 2011.

HERDERICH, M. J.; SMITH, P. A. Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. **Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 205–214, 2005.

HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; CARLAVILLA, D.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*. **Anais...** . v. 563, p.116–125, 2006.

HU, Y.; MASSART, D. L. Uniform shell designs for optimization in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 485, n. C, p. 311–323, 1989.

IVANOVA-PETROPULOS, V.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; BOROS, B.; et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 1–14, 2015.

LANÇAS, FERNANDO M. **Cromatografia Líquida Moderna – HPLC/CLAE.** Campinas: Átomo, 2009

LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( HPLC ) Temperature Effects in High Performance Liquid Chromatography ( HPLC ). **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 13–19, 2012.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, C. F.; SILVEIRA, C.C. “Green Chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LINS, Aline Regina; SARTORI, Giliani Veloso. Qualidade fenólica e atividade antioxidante de vinhos tintos produzidos no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 16, n. 1, p.69-76, dez. 2012.

- LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; et al. Experimental Design and Optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3–30, 1995.
- MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559–1568, 2010.
- MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOVSEK, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7692–7702, 2006.
- MORAES, V. DE; LOCATELLI, C. Vinho : uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência - Ciência e Tecnologia**, v. 10, n. 1–2, p. 57–68, 2010.
- NEVES, C. DE F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. DE A. M.; JORDÃO, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 327–329, 2002.
- NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B. .; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I : Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.
- PADILHA, C. V. DA S.; CAMARÃO TELLES BIASOTO, A.; CORRÊA, L. C.; DOS SANTOS LIMA, M.; PEREIRA, G. E. Phenolic compounds profile and antioxidant activity of commercial tropical red wines (*Vitis vinifera* L.) from São Francisco Valley, Brazil. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 1–9, 2017.
- PEREIRA FILHO, Edenir Rodrigues. **Planejamento Fatorial em Química**: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: Editora da Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738–744, 2003.
- PRAT, D.; WELLS, A.; HAYLER, J.; et al. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 288–296, 2015. Royal Society of Chemistry.
- PROTAS, J. F. da S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. de . **A viticultura brasileira**: Realidade e perspectivas. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/539461/a-viticultura-brasileira-realidade-e-perspectivas>>. Acesso em: 30 dez. 2018.
- RATOLA, N.; FARIA, J. L.; ALVES, A. Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo region (Portugal). **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 125–130, 2004.
- REVILLA, E.; GARCÍA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F.; MARTÍN-ORTEGA, G.; RYAN, J. M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the

differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1–2, p. 53–60, 2001.

REVILLA, E.; RYAN, J. M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1–2, p. 461–469, 2000.

RIZZON, L.A; DALL'AGNOL, I. **Embrapa**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

RIZZON, L. A.; ZANUZ, C. M.; MANFREDI, S. **Embrapa. Bento Gonçalves** : Embrapa Informação Tecnológica, 1994.

SANDRA, P.; VANHOENACKER, G.; DAVID, F.; SANDRA, K.; PEREIRA, A. Green chromatography (Part 1): Introduction and liquid chromatography. **LC-GC Europe**, v. 23, n. 5, p. 242–259, 2010.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; Mallmann, C. A.; Penna, N.G.; Hecktheuer, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 437–442, 2005.

SILVA, R.DA; LAGO-VANZELA, E.S.; BAFFI, M.A; **Uvas e vinhos: química, bioquímica e microbiologia**. São Carlos: Unesp, 2015

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59–64, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOH, L.; ECKELMAN, M. J. Green solvents in biomass processing. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 11, p. 5821–5837, 2016.

SOUZA, G. G. DE; MENEGHIN, L. O.; SANDRO, P.; JUNE, F. A uva roxa , *Vitis vinifera* L . (Vitaceae ) – seus sucos e vinhos na prevenção de doenças cardiovasculares. **Natureza online**, v. 4, p. 80–86, 2006.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. . Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais , um tutorial. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2005.

The Plant List (2013). Versão 1.1. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 21 dez. 2018

VIAN, M. A.; TOMAO, V.; GALLET, S.; COULOMB, P. O.; LACOMBE, J. M. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by

high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 224–229, 2005.