

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE *TRANS*-RESVERATROL EM
VINHOS TINTOS POR MEIO DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA**

MILLENO DANTAS MOTA

SALVADOR

2012

MILLENNO DANTAS MOTA

**DETERMINAÇÃO DE *TRANS*-RESVERATROL EM
VINHOS TINTOS POR MEIO DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David
Co-Orientadora: Profa. Dra. Marilena Meira.

**SALVADOR
2012**

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Mota, Milleno Dantas.

Determinação de trans-resveratrol em vinhos tintos por meio de calibração multivariada / Milleno Dantas Mota. - 2013.

81 f. : il.

Orientadora: Profª Drª Juceni Pereira de Lima David.

Co-orientadora: Profª Drª Marilena Meira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2012.

1. Antioxidantes. 2. Vinho e vinificação - Análise. 3. Resveratrol. I. David, Juceni Pereira de Lima. I. Meira, Marilena. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química.
III. Título.

CDD - 613.286

CDU - 678.048

TERMO DE APROVAÇÃO

MILLENO DANTAS MOTA

DETERMINAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM VINHOS TINTOS POR MEIO DE
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David - Orientadora Juceni Pereira de Lima David
Doutorado em Química. Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão Hugo Neves Brandão
Doutorado em Química. Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual de Feira de Santana

Prof. Dr. Jorge Mauricio David J. David
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 20 de dezembro de 2012.

Dedico essa dissertação aos meus pais, Kleber e Tudinha, que além de me presentear com o dom da vida, sempre estiveram presentes nos meus melhores momentos, e também nos mais difíceis, sempre me apoiando e confortando quando mais precisei.

Dedico também a meu irmão, Marllus, meu maior e melhor amigo, com quem sei que sempre posso contar.

Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me acompanhar e me dar forças para superar os obstáculos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Kleber e Tudinha, pelo exemplo que representam na minha vida e a meu irmão, Marllus, pela amizade e companheirismo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Juceni Pereira David, por todos os ensinamentos e pela confiança depositada em mim, pela alegria, paciência e apoio. Obrigado por nunca desistir de mim.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Marilena Meira, pelo apoio, dedicação e desprendimento, por estar presente sempre que precisei de seu auxílio, mesmo nos horários e momentos mais impróprios.

Aos amigos Emanuel, Alessandra, Mayara e Edna Maura, pela amizade e carinho e também por todo apoio que me deram durante essa batalha. Vocês foram fundamentais para a conclusão desse trabalho e isso jamais irei esquecer.

A todos os doutorandos, mestrandos e IC's dos Laboratórios de Pesquisa em Produtos Naturais, do Instituto de Química da Faculdade de Farmácia da UFBA, pela grande ajuda durante minha pesquisa.

A todos os amigos que sempre torceram por mim e acreditaram na minha capacidade, até quando eu mesmo não acreditava.

Aos meus alunos, pelo respeito, confiança, compreensão e paciência pelos últimos dias em que não estive tão presente como deveria e como eles merecem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro concedido para a execução deste projeto.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade”
(Raul Seixas)*

RESUMO

O presente trabalho objetiva apresentar um novo método testado para análise de *trans*-resveratrol em diferentes marcas e variedades de vinhos tintos por meio de calibração multivariada, no qual foram analisados os espectros das amostras, e das amostras aditivadas com o padrão de *trans*-resveratrol, obtidos por espectroscopia UV-VIS, através de tratamento quimiométrico de análise de componentes principais (PCA) e calibração multivariada. Na PCA obtida com os espectros de absorção, observou-se que com apenas 4 componentes principais foi possível agrupar amostras com base nas características de variedade e/ou região de produção. Através dos loadings ficou demonstrado que os comprimentos de onda de 230 e 260 nm foram os maiores responsáveis por esse agrupamento. A partir da construção de modelos de calibração por mínimos quadrados parciais (PLS) e por regressão linear múltipla (RLM) foi possível prever a concentração de *trans*-resveratrol das amostras que apresentaram semelhanças entre os grupos observados na PCA e as amostras utilizadas na construção dos modelos. O teor de *trans*-resveratrol predito nessas amostras variou entre 0,29 e 23,3 mg/L. A comparação do método multivariado empregado com o univariado sugere uma maior capacidade de predição das concentrações pelo primeiro, uma vez que apresentou valores mais próximos daqueles descritos na literatura.

Palavras-chaves: Quimiometria; Vinhos; *trans*-Resveratrol; Calibração multivariada.

ABSTRACT

This study presents a new method tested for analysis of *trans*-resveratrol in different varieties and brands of red wines, by multivariate calibration, in which were analyzed spectra of the samples and the samples doped with the pattern of *trans*-resveratrol obtained by UV-VIS spectroscopy by chemometric treatment of principal component analysis (PCA) and multivariate calibration. In PCA obtained with the absorption spectra, it was observed that with only four principal components it was possible grouping samples based on characteristics of variety and / or production area. Through loadings was demonstrated that the wavelengths of 230 and 260 nm were most responsible for this grouping. From the construction of calibration models by partial least squares (PLS) and multiple linear regression (MLR) it was possible to predict the concentration of *trans*-resveratrol of samples that showed similarities between the groups observed in PCA and the samples used in the construction of models. The content of *trans*-resveratrol predicted in these samples ranged between 0.29 and 23.3 mg / L. The comparison of the multivariate method used with the univariate suggests a higher ability to predict the concentrations of the first one, since it showed values more similar to those described in the literature.

Keywords: Chemometrics; Wines, *trans*-Resveratrol, Multivariate calibration.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Σ	Matriz de variância-covariância
μg	Micrograma
2D	Bidimensional
A	Absorbância
Å	Ângstron
BA	Bahia
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Ciclo-oxigenase
CP	Componentes principais
CS	<i>Cabernet Sauvignon</i>
CSV	Formato <i>Comma Delimited</i>
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
ε	Absortividade molecular
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IV	Infravermelho
ℓ	Autovetor
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAP	Método da adição de padrão
MID-IR	Espectroscopia no infravermelho médio
ONSE	Óxido nítrico sintase endotelial
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PE	Pernambuco
PLS	<i>Partial least squares</i> /Regressão por mínimos quadrados parciais
R	Matriz de correlação
R^2	R-quadrado
RIES	Riesling
RLM	Regressão linear múltipla
RS	Rio Grande do Sul

SAUVB	<i>Sauvignon Blanc</i>
SH	<i>Shiraz</i>
SY	<i>Syrah</i>
TA	<i>Tannat</i>
UV-VIS	Radiação Ultravioleta e Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Produção de vinhos no Brasil (toneladas) entre os anos de 2001 e 2010.	3
Figura 2.	<i>Vitis vinifera</i> L.	9
Figura 3.	Frutos da <i>Vitis vinifera</i> L.	10
Figura 4.	Principais substâncias fenólicas presentes nos vinhos tintos.	12
Figura 5.	Estrutura dos isômeros <i>trans</i> -resveratrol (a) e <i>cis</i> -resveratrol (b).	13
Figura 6.	Comparação das distâncias interatômicas do hormônio estradiol (a), de seus análogos <i>cis</i> -dietilestilbestrol (inativo) (b) e <i>trans</i> -dietilestilbestrol (ativo) (c) e dos isômeros <i>cis</i> (d) e <i>trans</i> -resveratrol (e).	15
Figura 7.	Lei de Lambert-Beer.	21
Figura 8.	Esquema de um espectrofotômetro.	22
Figura 9.	Equação para o cálculo das concentrações pelo método da adição de padrão.	23
Figura 10.	Aplicação do método da adição do padrão.	24
Figura 11.	Combinação da PCA com métodos rápidos de análise. A) Espectro de infravermelho médio de um conjunto de amostras de vinhos, B) e sua PCA.	28
Figura 12.	Esquema para encontrar as raízes características que formarão os autovetores.	29
Figura 13.	Gráfico <i>scree plot</i> (cotovelo) para uma análise de componentes principais.	29
Figura 14.	Modelo de regressão linear múltipla (RLM).	34
Figura 15.	Figura 15. Espectro de absorção do padrão de <i>trans</i> -resveratrol 600 mg/L no UV-VIS demonstrando a máxima absorção em 305 nm.	42
Figura 16.	Espectros originais de 16 marcas de vinhos na região de 265 a 375 nm.	44
Figura 17.	Gráfico de Autovalor x PC.	46
Figura 18.	PC1xPC2 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de vinhos.	47
Figura 19.	PC1xPC3 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de vinhos.	48
Figura 20.	PC1xPC4 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de vinhos.	49
Figura 21.	<i>Loadings</i> para PC1.	49

Figura 22.	<i>Loadings</i> para PC2.	50
Figura 23.	<i>Loadings</i> para PC3.	51
Figura 24.	<i>Loadings</i> para PC4.	51
Figura 25.	Curva de concentração x Absorbância do método de adição de padrão para a amostra CS6 no comprimento de onda de 305 nm.	52
Figura 26.	Curva de concentração x Absorbância do método de adição de padrão para a amostra SY3 no comprimento de onda de 305 nm.	54
Figura 27.	Curva de concentração x Absorbância do método de adição de padrão para a amostra TA2 no comprimento de onda de 305 nm.	55
Figura 28.	Espectros dos padrões de <i>trans</i> -resveratrol em etanol de 100–1000 µg/L, na faixa de 265-375 nm.	56
Figura 29.	Espectros da amostra CS6 pura diluída e com adição dos padrões de <i>trans</i> -resveratrol em etanol de 100–1000 µg/L, na faixa de 265-375 nm.	57
Figura 30.	Espectros da amostra SY3 pura diluída e com adição dos padrões de <i>trans</i> -resveratrol em etanol de 100–1000 µg/L, na faixa de 265-375 nm.	57
Figura 31.	Espectros da amostra TA2 pura diluída e com adição dos padrões de <i>trans</i> -resveratrol em etanol de 100–1000 µg/L, na faixa de 265-375 nm.	58
Figura 32.	Modelo PLS construído com espectros das soluções de padrões de resveratrol na faixa de 100-1000 µg/L.	58
Figura 33.	Modelo PLS construído com espectros da amostra CS6 + adição de padrão na faixa de 100-1000 µg/L.	59
Figura 34.	Modelo RLM construído com espectros da amostra CS6 + adição de padrão na faixa de 100-1000 µg/L.	59
Figura 35.	Modelo PLS construído com espectros da amostra SY3 + adição de padrão na faixa de 100-1000 µg/L.	62
Figura 36.	Modelo RLM construído com espectros da amostra SY3 + adição de padrão na faixa de 100-1000 µg/L.	62
Figura 37.	Modelo PLS construído com espectros da amostra TA2 + adição de padrão na faixa de 100-1000 µg/L.	64
Figura 38.	Modelo RLM construído com espectros da amostra TA2 + adição de padrão na faixa de 100-1000 µg/L.	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Quadro representativo do fenômeno de interação entre radiação eletromagnética com a matéria.	19
Quadro 2.	Identificação das amostras de vinhos tintos.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Posição dos principais países produtores de vinho em 2010.	2
Tabela 2.	Composição volumétrica das soluções padrões de resveratrol utilizadas na construção da curva de concentração	38
Tabela 3.	Composição volumétrica das soluções obtidas com as amostras de vinhos e aditivadas com os padrões de resveratrol para a PCA.	39
Tabela 4.	Composição volumétrica das soluções obtidas com as amostras de vinhos e aditivadas com os padrões de resveratrol para o PLS.	40
Tabela 5.	Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA.	45
Tabela 6.	Leituras observadas para a adição de padrão na amostra CS6, em comprimento de onda de 305 nm.	52
Tabela 7.	Leituras observadas para a adição de padrão na amostra SY3, em comprimento de onda de 305 nm.	53
Tabela 8.	Leituras observadas para a adição de padrão na amostra TA2, em comprimento de onda de 305 nm.	54
Tabela 9.	Concentrações preparadas e preditas pelo modelo PLS para a amostra CS6.	61
Tabela 10.	Concentrações preparadas e preditas pelo modelo RLM para a amostra CS6.	61
Tabela 11.	Concentrações preparadas e preditas pelo modelo PLS para a amostra SY3.	63
Tabela 12.	Concentrações preparadas e preditas pelo modelo RLM para a amostra SY3.	64
Tabela 13.	Concentrações preparadas e preditas pelo modelo PLS para a amostra TA2.	66
Tabela 14.	Concentrações preparadas e preditas pelo modelo RLM para a amostra TA2.	67
Tabela 15.	Predições das concentrações de resveratrol para as amostras CS.	68
Tabela 16.	Predições das concentrações de resveratrol para as amostras SY.	69
Tabela 17.	Predições das concentrações de resveratrol para as amostras TA.	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 JUSTIFICATIVA	6
4 REFERENCIAL TEÓRICO	7
4.1 O VINHO	7
4.1.1 Aspectos botânicos da <i>Vitis vinifera</i> L.	9
4.1.2 Composição Química dos Vinhos	11
4.1.2.1 <i>trans</i> -Resveratrol	13
4.1.2.1.1 Propriedades Farmacológicas do Resveratrol.....	16
4.1.2.1.2 Teor de Resveratrol em Vinhos	17
4.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	18
4.2.1 Espectroscopia no UV-VIS	20
4.3 MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO.....	22
4.4 QUIMIOMETRIA.....	24
4.4.1 Análise de Componentes Principais/<i>Principal Component Analysis</i> (ACP/PCA)	26
4.4.2 Calibração multivariada - Regressão por mínimos quadrados parciais/<i>Partial least squares</i> (PLS)	31
4.4.2.1 Regressão Linear Múltipla	33

5 PARTE EXPERIMENTAL	35
5.1 SELEÇÃO E DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS	35
5.2 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS	36
5.3 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE DE <i>trans</i> -RESVERATROL (100,0 mg/L).....	36
5.4 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO INTERMEDIÁRIA DE <i>trans</i> -RESVERATROL (1,0 mg/L)	37
5.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE <i>trans</i> -RESVERATROL PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO	37
5.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VINHOS	38
5.7 PREPARO DAS AMOSTRAS DE VINHOS PARA A PCA	39
5.8 PREPARO DAS AMOSTRAS DE VINHOS + PADRÕES DE <i>trans</i> -RESVERATROL PARA O PLS	39
5.9 ESPECTROSCOPIA UV-VIS E PCA	40
5.10 ANÁLISE UNIVARIADA DAS AMOSTRAS DE VINHOS + PADRÃO DE <i>trans</i> -RESVERATROL	41
5.11 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA (PLS) E DE REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA (RLM).....	43
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS.....	44
6.2 PCA DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DAS AMOSTRAS DE VINHOS.....	45
6.3 ANÁLISE UNIVARIADA DAS AMOSTRAS	52
6.4 MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR PLS E RLM.....	56
6.4.1 Predição das Concentrações de Resveratrol nas Amostras	67

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da sua história, o homem esteve sempre preocupado com a busca da cura de diversas doenças. Diversos produtos medicinais derivados de plantas utilizados na antiguidade são ainda hoje fontes de pesquisa, e a cada dia cresce o consumo de plantas no tratamento de diversas patologias. Em 1998, estimativas da Organização Mundial de Saúde já apontavam que grande parte dos habitantes de países em desenvolvimento utilizavam drogas vegetais como forma única de tratamento (WHO, 1998).

Muitos sucos, vinhos e bebidas derivadas de plantas apresentam em sua constituição uma mistura complexa de metabólitos de diferentes classes químicas em variadas concentrações. O monitoramento da constituição química destas bebidas é importante, pois é a base para um controle de qualidade da bebida, que pode indicar a história e também a origem desta, além de valorizar economicamente o produto.

O vinho é uma bebida presente na história da humanidade desde os tempos mais primitivos. Existem sinais de que a bebida tenha surgido há mais de 7.000 anos, provavelmente no Oriente Médio, entre os mares Negro e Cáspio. Diversos povos antigos, a exemplo dos egípcios gregos, já consumiam o vinho com propósitos medicinais. Na Grécia antiga, a partir do século V a.C., o vinho deixou de ser consumido apenas por uma minoria rica e poderosa para ser apreciado e consumido por todas as classes, incluindo trabalhadores e escravos (PHILLIPS, 2003).

O vinho é uma bebida alcoólica produzida a partir da fermentação natural ou artificial de uvas. Geralmente é produzido a partir dos frutos da videira, principalmente da espécie *Vitis vinifera*, de diversas variedades ou castas. Ele pode ser produzido com a predominância de uma única variedade de uvas, recebendo a denominação de vinho varietal ou monocasta, ou pela utilização de mais de uma variedade de uvas. Entre 75 a 85% dos vinhos consumidos no mundo são do tipo monovarietal.

O cultivo da videira e a produção de vinhos passaram a ser realizados em regiões onde até pouco tempo sequer imaginava-se poder fazê-lo (GUERRA & CZARNOBAY, 2000). Dados informados pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) indicam que o Brasil ocupava o 12º lugar no *ranking* de países produtores de vinhos no ano de 2010 (Tabela 1).

Tabela 1. Posição dos principais países produtores de vinho em 2010.

Posição	País	Produção (toneladas)
1	Itália	4.580.000,0
2	França	4.541.820,0
3	Espanha	3.610.000,0
4	Estados Unidos	2.211.300,0
5	China	1.657.500,0
6	Argentina	1.625.080,0
7	Austrália	1.133.860,0
8	África do Sul	921.700,0
9	Chile	915.238,0
10	Portugal	694.612,0
11	Alemanha	690.600,0
12	Brasil	362.200,0
13	Grécia	303.000,0
14	Sérvia	238.233,0
15	Nova Zelândia	189.800,0
16	Hungria	175.526,0
17	Áustria	173.745,0
18	Bulgária	145.000,0
19	Romênia	125.450,0
20	Suíça	103.094,0

Fonte: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
(<http://faostat.fao.org/site/636/DesktopDefault.aspx>)

O Brasil conta hoje com dois pólos importantes produtores de vinhos: o Vale dos Vinhedos, situado na região da Serra Gaúcha, no Rio Grande do Sul (RS), e; o Vale do São Francisco, abrangendo os Estados de Pernambuco e Bahia. Entre os anos de 2001 e 2010, o país produziu mais de 3 milhões de toneladas de vinhos (Figura 1).

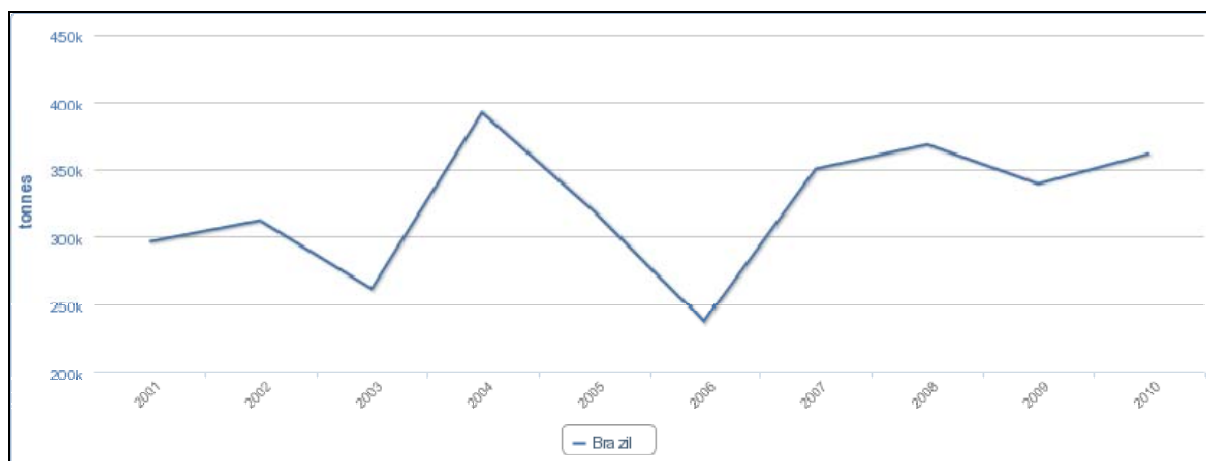


Figura 1. Produção de vinhos no Brasil (toneladas) entre os anos de 2001 e 2010.

Fonte: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
([http:// http://faostat3.fao.org/home/index.html#COMPARE](http://faostat3.fao.org/home/index.html#COMPARE))

Nas últimas décadas, um grande número de publicações científicas foi divulgado propalando que o consumo moderado de vinho tinto acarretava benefícios para a saúde humana (SCALBERT, 2000). Um dos componentes bioativos dos vinhos e suco de uva é o *trans*-resveratrol. Esta substância é um fenol de estrutura não-flavonoídica do tipo estilbeno vastamente distribuído no reino vegetal e, presente principalmente em chás, vinhos, frutas e várias plantas medicinais (AMAKURA, 2000). Além desta substância no vinho ocorrem outros fenóis tais como ácido gálico e os flavonoides quercetina e catequina.

Atualmente já existem evidências consideráveis de que o resveratrol inibe a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (FRANKEL, 1995; BELGUENDOZ, 1997) e reduz a agregação plaquetária (PACE-ASCIAR, 1995). Estas duas atividades apresentadas são fatores fundamentais que estão implicados na arteriotrombogênese, sendo, portanto, a possível explicação da ação cardioprotetora do vinho. O resveratrol apresenta atividade antioxidante mais efetiva que a vitamina E na prevenção da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL).

A quercetina também possui várias atividades biológicas comprovadas descritas na literatura. Assim, como o resveratrol esta substância protege a oxidação da fração LDL do colesterol (MAYER, 1998). Além disto, está evidenciado um efeito sinérgico entre etanol, quercetina e resveratrol na inibição da enzima óxido nítrico sintase envolvida nos danos das paredes vasculares e do DNA (CHAN, 2000). Deste modo, bebidas com alta concentração destas substâncias tendem a apresentar maior valor agregado.

Destaca-se que a presença de polifenóis em vinhos está relacionada com a cor e o sabor do produto e confere adstringência e corpo à bebida. Assim, o conhecimento da composição de polifenóis mostra-se muito importante para predizer a idade, a origem do produto e para auxiliar na solução de problemas relacionados à variação da coloração e estabilidade dos vinhos (FAUSTINO, 2003).

A obtenção de vinhos de boa qualidade depende diretamente da sua composição química. Tanto durante o processo produtivo quanto no produto acabado, faz-se necessária a realização de análises físico-químicas para identificar possíveis alterações e garantir a qualidade do produto final. Entretanto, a quantificação dos componentes químicos dos vinhos não é uma prática tão simples devido às dificuldades analíticas encontradas, como a presença de interferentes e a grande complexidade da matriz.

Visando a obter economicidade de tempo e aumento da eficiência, este trabalho propõe um método para a identificação de resveratrol em vinho por comparação do espectros obtidos por espectroscopia no UV-VIS em amostras de vinhos tintos, com os espectros correspondentes de substâncias padrões através de métodos quimiométricos, como a Análise de Componentes Principais (PCA). Além disso, também foi possível quantificar o resveratrol através de técnicas de calibração multivariada, tais como, por mínimos quadrados parciais (PLS).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método rápido, simples, sensível e de baixo custo para análise de *trans*-resveratrol em vinhos tintos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar por espectroscopia de absorção no UV-VIS vinhos tintos produzidos nas regiões do Vale do São Francisco (Bahia e Pernambuco/Brasil), Vale dos Vinhedos (Rio Grande do Sul/Brasil), Mendoza (Argentina), Santiago (Chile) e Pertuis (França);

Realizar a PCA com as matrizes de dados obtidos na técnica espectroscópica;

Realizar a calibração multivariada (PLS) com espectros de absorção no UV-VIS das amostras;

Comparar o teor de *trans*-resveratrol encontrado em vinhos tintos de diferentes variedades produzidos em diferentes regiões do país, bem como de outras regiões do mundo.

3 JUSTIFICATIVA

As análises químicas realizadas em materiais de origem natural, com composição química complexa, acabam se tornando uma prática dispendiosa, tanto em relação ao tempo quanto ao custo, uma vez que necessitam de diversos tratamentos prévios nas amostras, bem como a associação de diversas técnicas analíticas que, geralmente, levam a um consumo de tempo, equipamentos e pessoal qualificado.

Justifica-se a necessidade de se buscar desenvolver um método rápido e simples para caracterização de vinhos tintos, pois, assim sendo, otimiza-se o processo de produção de forma a se conseguir resultados com menor custo, maior rapidez e, por conseguinte, com maior eficiência.

O método proposto tem potencial aplicação para uso na caracterização de vinhos comparando os espectros obtidos através de uma técnica espectroscópica com espectros da substância padrão. Quando a técnica escolhida é a espectroscopia de absorção no UV-VIS, o método reúne as vantagens de rapidez e baixo custo da análise aliada à sensibilidade.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

A indústria de alimentos e bebidas enfrenta diversos desafios no controle de qualidade de seus produtos, incluindo a verificação de que os mesmos atendem às normas exigidas de composição e sabor, identificação de mudanças nos parâmetros do processo (o que pode levar a uma mudança na qualidade), detecção de adulteração em matérias-primas e produtos manufaturados, e identificação da origem geográfica das matérias-primas.

Geralmente, as pesquisas são conduzidas através da análise do efeito de apenas uma variável na matriz, podendo ser descritas como univariadas. Estas análises podem resultar em modelos que simplificam o sistema em análise. Métodos multivariados podem fornecer meios para superar as limitações das análises univariadas, podendo revelar constituintes importantes que não seriam identificados por estas (COZZOLINO *et al.*, 2009).

Durante muito tempo predominou a idéia de que se fosse necessária uma complexa análise dos dados, então o experimento não teria sido planejado de forma correta. Na atualidade reconhece-se que a maioria dos sistemas são de natureza múltipla e, assim sendo, as abordagens univariadas não podem resultar em soluções ideais (HOPKE, 2003).

4.1 O VINHO

O vinho é uma bebida consumida pelo homem desde os tempos mais antigos. Diversos registros históricos sinalizam que várias civilizações antigas, como os romanos, os egípcios e os gregos, consumiam a bebida como um produto

medicinal há mais de 2000 anos (PENNA; HECKTHEUER, 2004). Os romanos foram responsáveis pela introdução da uva e do vinho na Europa, fazendo com que a bebida apresentasse uma grande importância comercial no mundo ocidental. Com o tempo, houve um aumento da associação do vinho à saúde e qualidade de vida (SIMÕES, C; 2001).

Genericamente, vinhos são bebidas alcoólicas fermentadas obtidas pela fermentação alcoólica de um suco de fruta natural que contenha açúcares como maçã, amora, groselha, pêssego, dentre outras. Historicamente, o vinho mais antigo de que se tinha conhecimento era proveniente de mel de abelhas, e não de frutas (AQUARONE *et al*, 2008).

Diversas legislações, incluindo a brasileira e a norte americana, permitem apenas que se use o termo vinho para a bebida obtida a partir da fermentação natural, ou artificial, da uva madura e fresca, fruto proveniente da *Vitis vinifera* L., espécie de videira cultivada há milhares de anos por diversas civilizações europeias. Diversas variedades, ou castas, de uvas são utilizadas na produção de vinhos, como *Cabernet sauvignon*, *Malbec*, *Merlot*, *Pinot noir*, *Syrah*, *Tannat*, dentre outras (FERREIRA *et al*, 2010). As características organolépticas e composição química dos diferentes vinhos são determinadas pela variedade da uva empregada na sua produção, bem como as características do solo e clima da região onde estas foram cultivadas (FISCHER, *et al*, 1999).

A qualidade do vinho depende da composição química dos frutos empregados no processo de produção. É necessário que a videira sintetize e armazene substâncias químicas naturais específicas. Para isso, é necessário que o vegetal seja submetido a condições climáticas adequadas durante o período de maturação da uva (DAVID *et al*, 2007).

Existem várias formas de se classificar um vinho. Os critérios mais usuais para essa classificação são aspecto visual e cor, teor de açúcares e processo de produção (NASCIMENTO *et al*, 2010). Quanto à coloração os vinhos são classificados em branco, rosê ou tinto. Quanto ao teor de açúcares, em seco, semi-seco ou suave (FISCHER *et al*, 1999). Estas características são determinadas pela variedade da uva utilizada bem como o método de vinificação empregado.

4.1.1 Aspectos botânicos da *Vitis vinifera* L.

Vitis vinifera L. pertence à família Vitacea, família que compreende 12 gêneros. São plantas de características lenhosas e a maior parte dos membros desta família são trepadeiras e dotadas de gavinhas. Existem ainda espécies ornamentais, como algumas dos gêneros *Cissus* e *Parthenocissus*, e são usadas como revestimento de paredes (JOLY, 2002).

A *V. vinifera* L. (Figura 2) é uma planta trepadeira do tipo lenhosa e de porte arbustivo, podendo alcançar até 35 metros de altura. Habitualmente, para fins comerciais, não ultrapassa os 3 metros de altura devido ao processo de “poda produtiva”. Conhecida popularmente por videira ou parreira, é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo. As gavinhas desta espécie são responsáveis pela sustentação do vegetal nas estruturas que os suportam (SCHLEIER, 2004).



Figura 2. *Vitis vinifera* L.

Fonte: LOARN *et al*, 2007

(<http://www-sop.inria.fr/virtualplants/Publications/2007/LGLL07/AOB2007image.png>)

Suas folhas são cordiformes, dotadas de pecíolo, alternas e apresenta cinco lóbulos sinuados e dentados. Na parte inferior ela é tomentosa e glabra na parte superior. As flores são dispostas em racimos, são pequenas e apresentam coloração branco-esverdeada. Os frutos são do tipo bagas reunidas em cachos, contendo até quatro sementes e conhecidos popularmente como uvas (Figura 3) (AGUIAR, 2012).



Figura 3. Frutos da *Vitis vinifera* L.

Fonte: Atlas of Plant Pathogenic Bacteria (APPB) - Fruit trees
(<http://www.atlasplantpathogenicbacteria.it/fruit.htm>)

As videiras podem se desenvolver melhor em climas mais secos, com temperaturas variando entre 10° e 40°C. O clima da região onde o vegetal é cultivado influencia diretamente na produção das uvas. Em regiões mais frias só é possível uma safra por ano. Regiões onde o clima é mais quente e seco é possível ter duas ou mais safras por ano, como é o caso da região Nordeste do Brasil (FERREIRA, 2008). São mais bem adaptadas em solos ricos em material orgânico e com baixa umidade.

4.1.2 Composição Química dos Vinhos

A composição química do vinho influencia diretamente as características organolépticas da bebida. Estudos demonstram que o número de componentes químicos do vinho é da ordem de centenas. Esta composição sofre influência de diversos fatores relacionados à região geográfica de produção, como características do solo, condições climáticas e ambientais, variedade da uva e o processo de elaboração do vinho. Dentre esses componentes encontram-se principalmente alcoóis, compostos fenólicos, ésteres, aldeídos, ácidos orgânicos e outros componentes minoritários. Os compostos fenólicos são componentes importantes dos vinhos uma vez que são responsáveis por contribuir para as características organolépticas do produto (SAGRATINI *et al*, 2012).

Os compostos fenólicos são um grupo diversificado de metabólitos secundários, constituído por substâncias derivadas da fenilalanina e tirosina e que são referidas como essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, sendo sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta. Participam de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma nas mais diversas espécies vegetais e também desempenham a função de proteção, uma vez que também são compostos produzidos, via de regra, em resposta a condições de estresse como infecções, lesões, radiações UV, condições ambientais adversas, baixas temperaturas, ataque de micro-organismos, dentre outras (NACZK & SHAHIDI, 2004; PELEG *et al*, 1998). Estes compostos são importantes para a estabilização da cor dos vinhos tintos durante o armazenamento, sendo atualmente reconhecidos também seus valores nutricionais e terapêuticos (PORGALI, 2012).

A Figura 4 representa as estruturas químicas das substâncias fenólicas encontradas mais comumente nos vinhos.

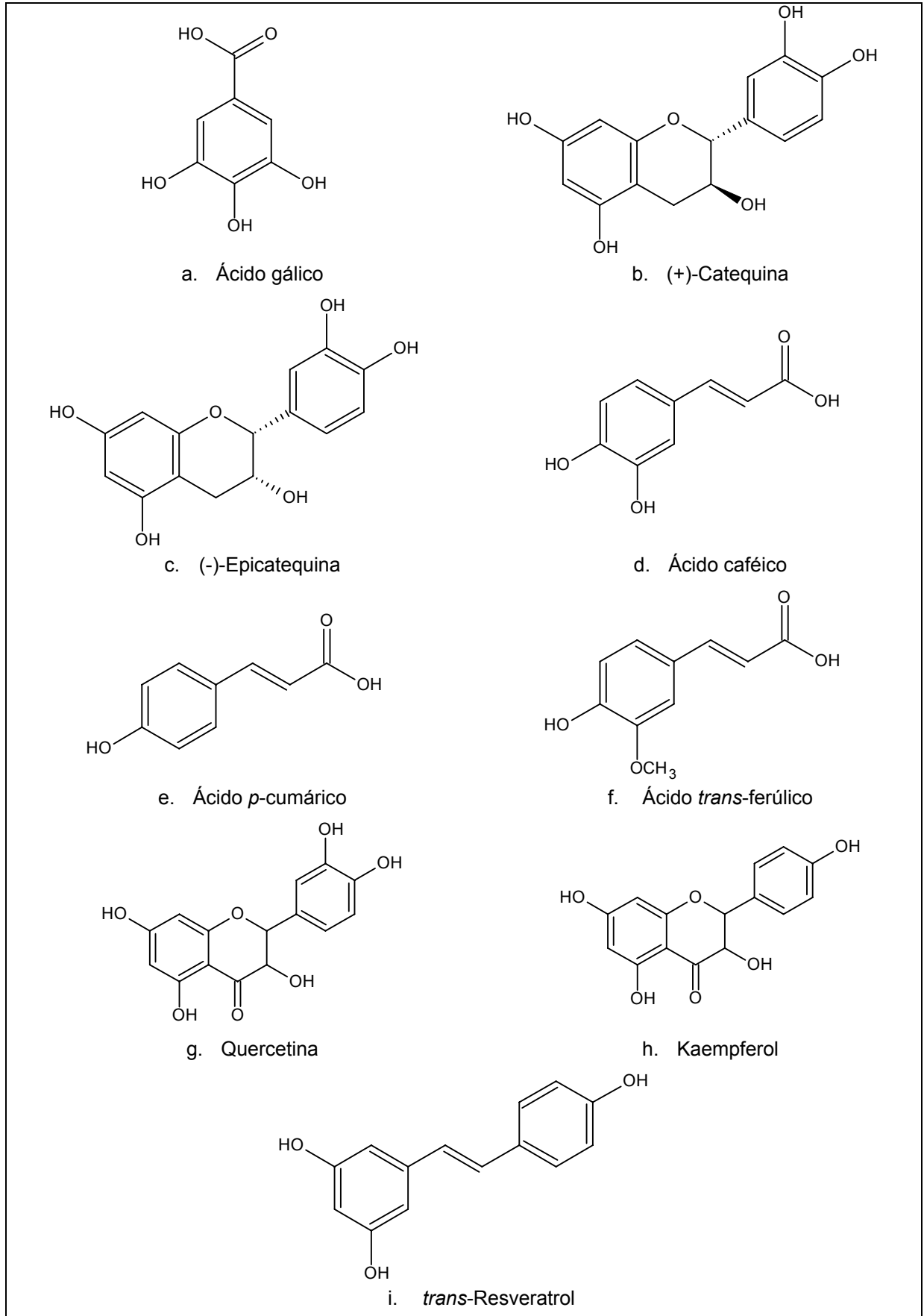


Figura 4. Principais substâncias fenólicas presentes nos vinhos tintos.

Fonte: SAGRATINI *et al*, 2012; MATSUBARA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2006.

4.1.2.1 *trans*-Resveratrol

O *trans*-resveratrol (Figura 4.g) é um composto fenólico encontrado em diversas fontes, dentre elas as uvas. Por esta razão, vinhos tintos também apresentam uma quantidade significativa deste composto. Quimicamente é conhecido como 3,5,4'-trihidroxi-estilbeno devido sua estrutura ser formada por dois anéis fenólicos unidos entre si por uma dupla ligação do tipo estireno. É encontrado na natureza na forma dos dois isômeros, *cis* e *trans* (Figura 5), entretanto, acredita-se que a forma *trans* seja a mais abundante e a que apresenta maior atividade biológica. É altamente fotossensível podendo sofrer isomerização quando exposto à radiação UV por tempos prolongados (NEVES *et al*, 2012).

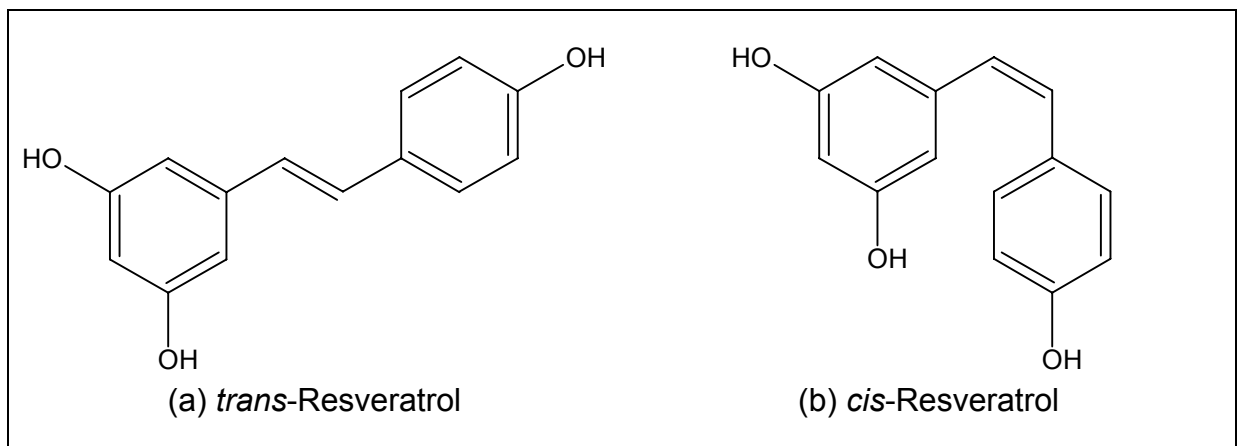


Figura 5. Estrutura dos isômeros *trans*-resveratrol (a) e *cis*-resveratrol (b).

Fonte: NEVES *et al*, 2012.

As uvas *Vitis vinifera*, *V. labrusca* e *V. muscadine* usadas na fabricação de vinhos são as fontes mais abundantes do *trans*-resveratrol. No vegetal, a substância é encontrada nas raízes, talos e sementes, entretanto o maior teor é encontrado na casca das uvas, que contém entre 50 e 100 µg/g (WATERHOUSE, 1995).

O resveratrol tem sido classificado como uma fitoalexina natural, substância de característica antimicrobiana sintetizada pelos vegetais em resposta a uma agressão, radiação UV ou ataque fúngico. A partir do início década de 1990,

quando se postulou que o resveratrol era responsável pelos efeitos cardioprotetores dos vinhos tintos, várias pesquisas relacionadas ao composto passaram a ser conduzidas. Desde então, diversos estudos têm demonstrado que a substância pode prevenir ou diminuir o avanço de diversas patologias, como cânceres, doenças cardiovasculares, doenças isquêmicas, bem como aumentar a expectativa de vida (NAKATA, 2012).

Diversos estudos foram realizados nas últimas décadas sobre os efeitos do vinho à saúde. Pesquisas médicas já concluídas, e outras que estão ainda em desenvolvimento, sugerem que o vinho tinto de boa qualidade possua propriedades medicinais preventivas. Além de auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares e na diminuição do acúmulo de colesterol, ele tem comprovadas ações antimicrobiana, orexígena, digestiva, é capaz de retardar o envelhecimento celular e possui efeito preventivo contra o câncer (WATERHOUSE, 1995; FRANKEL *et al*, 1993; DELMAS *et al*, 2005).

A descoberta de que certas populações da França apresentam menor predisposição ao desenvolvimento de doenças cardíacas, apesar destas consumirem uma dieta rica em gordura e de não realizarem exercícios físicos regularmente, levantou uma possível correlação entre o consumo de vinho tinto e a baixa incidência dessas doenças. Este fenômeno, conhecido comumente como “Paradoxo Francês”, foi de importância significativa na aceleração das pesquisas sobre os possíveis benefícios do consumo de vinho para a saúde (RENAUD *et al*, 1993).

A partir da observação de que o consumo moderado de vinho tinto é benéfico à saúde, foi levantada a hipótese de que os compostos fenólicos do vinho poderiam ser responsáveis pelas propriedades benéficas da bebida. Conseqüentemente acreditou-se que o resveratrol, como composto fenólico dos vinhos, era responsável por esses benefícios, hipótese hoje reforçada por dados recentes que mostram que esse composto possui um papel importante nas propriedades cardioprotetoras das uvas e vinhos (NEVES *et al*, 2012).

Hoje já é comprovado que o resveratrol diminui a agregação plaquetária e os níveis lipídicos no plasma, promove o aumento da fração lipoproteína de alta densidade (HDL) do colesterol, ajuda na remoção do colesterol LDL do sangue além

de prevenir a obstrução arterial (GALFI *et al*, 2005). É estruturalmente relacionado ao estrogênio sintético, o *trans*-dietilestilbestrol (Figura 6.c), apresentando, dessa forma, propriedades farmacológicas similares à do estradiol (Figura 6.a), principal estrogênio humano natural (BRADAMANTE *et al*, 2004).

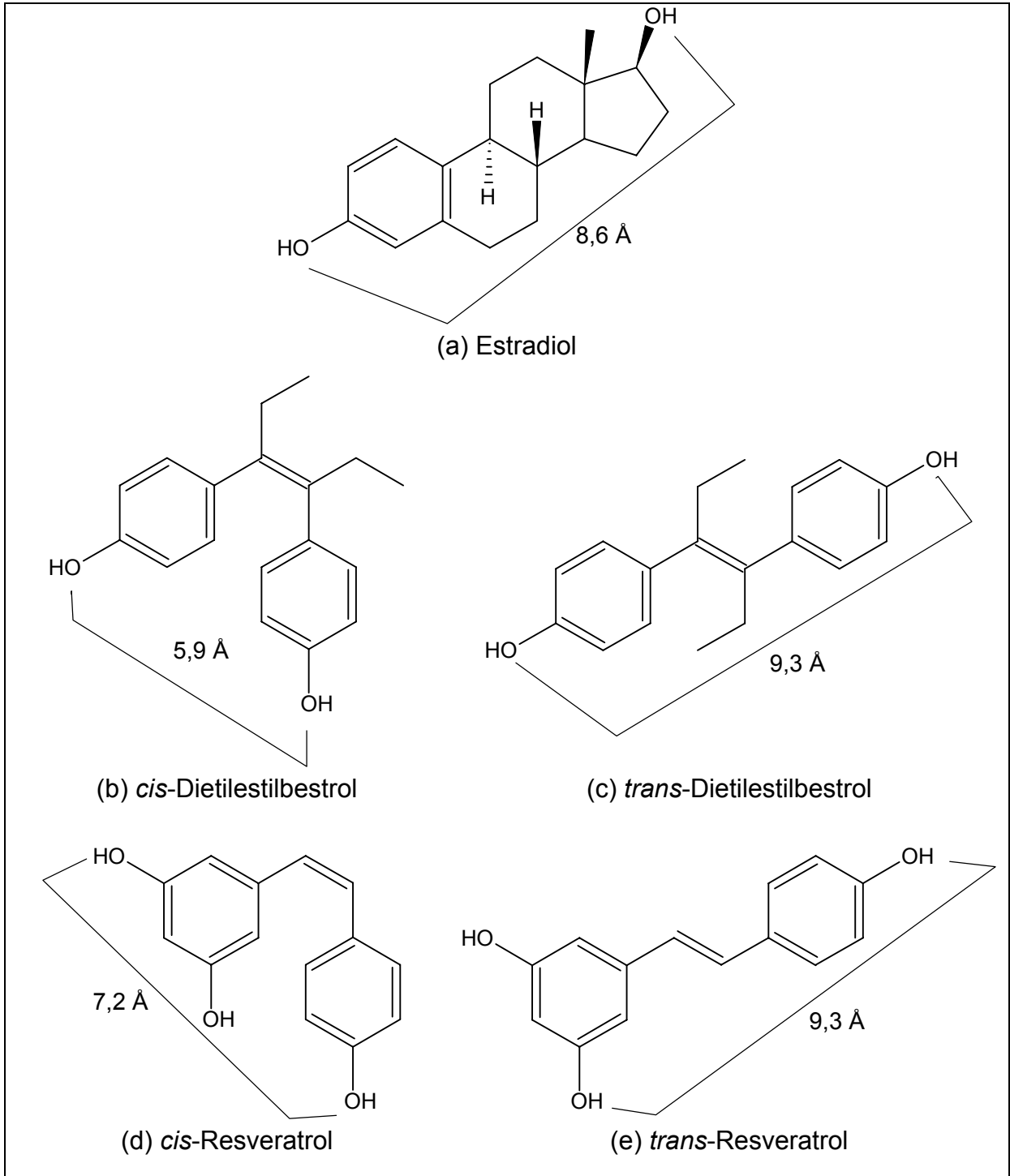


Figura 6. Comparação das distâncias interatômicas do hormônio estradiol (a), de seus análogos *cis*-dietilestilbestrol (inativo) (b) e *trans*-dietilestilbestrol (ativo) (c) e dos isômeros *cis* (d) e *trans*-resveratrol (e). Fonte: Adaptado de CARVALHO, 2003.

As distâncias interatômicas entre os grupos hidroxila do *trans*-resveratrol (Figura 6.e) são bastante similares àquelas observadas para o estradiol (Figura 6.a) e *trans*-dietilestilbestrol (Figura 6.c). Da mesma forma, as distâncias interatômicas entre os grupos hidroxila do *cis*-resveratrol (Figura 6.d) são similares àquelas observadas para o *cis*-dietilestilbestrol (Figura 6.c). Uma vez que o isômero *trans* do dietilestilbestrol apresenta maior atividade estrogênica em relação ao isômero *cis*, já que seus grupos farmacofóricos ocupam o mesmo local no receptor do estradiol, isso pode explicar a maior atividade biológica para o *trans*-resveratrol (FERNANDES, 2006).

Atualmente sabe-se que o resveratrol é produzido pela videira em resposta à agressão de fungos, sendo encontrado em maior concentração nas células da película e sementes das uvas, o que justifica fato do vinho tinto apresentar uma maior concentração da substância (FRÉMONT, 2000; GEHM *et al*, 1997). Essa maior concentração é devida ao processo de fabricação. Na processo de produção do vinho tinto as uvas vermelhas são fermentadas juntamente com as peles, talos e sementes, enquanto que, na fabricação de outros tipos de vinhos, fermenta-se somente o suco das uvas obtido por esmagamento manual ou mecânico (OAK *et al*, 2005).

4.1.2.1.1 Propriedades Farmacológicas do Resveratrol

Várias evidências indicam que o consumo moderado de vinho promove efeito cardioprotetor a curto e longo prazo, o que inclui proteção contra aterosclerose e aumento da resistência a fatores de risco (LUZ *et al*, 2012).

O resveratrol tem demonstrado a capacidade de modular uma grande variedade de sinalizadores moleculares envolvidos na carcinogênese, inflamação, ciclo de divisão celular e apoptose. O mecanismo de ação pelo qual o resveratrol exerce seu efeito anticarcinogênico não está ainda totalmente definido, mas várias

hipóteses são levantadas a fim de elucidar seu mecanismo de ação, como o efeito anti-radicais livres, atividade inibitória das ciclo-oxigenases (COX), efeito indutor da apoptose e antiproliferativo além de inibição de enzimas envolvidas no processo de replicação do DNA (JANG *et al*, 1997; SCHNEIDER *et al*, 2000; NEVES *et al*, 2012).

O dano oxidativo provocado pelos radicais livres tem sido relacionado como fator desencadeador de várias doenças, como câncer e doença de Alzheimer, e também está envolvido com o processo de envelhecimento. Estudos apontam a capacidade do resveratrol de inibir a formação de radicais livres em culturas de células. Ele também apresenta capacidade de seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) além de efeito inibitório em diversas enzimas do tipo oxidase (KONDRATYUK *et al*, 2011).

O resveratrol também tem sido associado ao efeito redutor da atividade da survivina, proteína inibidora da apoptose envolvida na regulação do ciclo celular, que normalmente não é encontrada em tecido normal (FULDA & DEBATIN, 2004). Em células de leucemia linfoblástica aguda, o resveratrol demonstrou ser capaz de induzir apoptose mediada por mitocôndrias, através da despolarização da membrana mitocondrial (DORRIE *et al*, 2001).

Estudos têm demonstrado a capacidade do resveratrol em estimular a atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (ONSE) o que promove o efeito vaso-protetor e vaso-dilatador em áreas isquêmicas (GAYTRI *et al*, 2012). Esta propriedade também pode estar relacionada à capacidade que ele possui de prevenir a aterogênese e promover tromboresistência (PETROVSKI *et al*, 2011). Outra propriedade capaz de explicar a atividade do resveratrol na proteção contra a aterosclerose é a capacidade de diminuir a agregação plaquetária provavelmente devido à sua atividade inibitória da isoforma 1 da COX (NEVES *et al*, 2012).

4.1.2.1.2 Teor de Resveratrol em Vinhos

A concentração de resveratrol presente nos vinhos depende não somente das características das uvas utilizadas ou da região de cultivo, mas também da

técnica empregada na produção do vinho. Considerando que a maior concentração da substância se encontra nas peles dos frutos, somente nos vinhos tintos serão encontrados teores significativos de resveratrol uma vez que, ao contrário do que ocorre na produção dos vinhos brancos, no processo de produção dos vinhos tintos as peles são fermentadas juntamente com a polpa das frutas (GUERREIRO *et al*, 2009). A concentração do resveratrol encontrada em vinhos tintos costumam variar entre 1 a 14 mg/L, entretanto é possível encontrar valores muito menores ou muito maiores a depender da variedade da uva utilizada, da região de cultivo e do tempo de maceração e fermentação (STERVBO *et al*, 2007).

Diversas técnicas analíticas são empregadas para determinação do teor de *trans*-resveratrol e outros compostos fenólicos em sucos de uva e vinhos. Dentre elas destacam-se as técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e espectroscópicas, como a espectroscopia de absorção no UV-VIS, ou a associação destas, como a cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas (LC-MS) (SAUTTER *et al*, 2005; PROESTOS *et al*, 2005; BIRSE, 2007; JAITZ *et al*, 2010).

4.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Os métodos espectroscópicos se baseiam na interação de uma amostra, que está sob análise, com a energia radiante. Eles determinam a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria, fundamentados na absorção ou emissão de radiação eletromagnética por moléculas quando os seus elétrons movimentam-se entre níveis energéticos. Diferentes intervalos no amplo espectro da radiação eletromagnética, desde os raios-X até micro-ondas, são cobertos pelos diferentes métodos ditos espectroscópicos. As interações da radiação eletromagnética com a matéria podem se processar tanto em nível atômico como em nível molecular. Desta forma, os métodos espectrométricos instrumentais compreendem emissão (emissão

atômica), luminescência (fluorescência atômica e molecular), espalhamento (turbidimetria e nefelometria) e absorção (absorção atômica e molecular) (SKOOG *et al*, 2002)

O espectro de radiações eletromagnéticas compreende radiações com diferentes energias, que vão desde as ondas de rádio, que apresentam longos comprimentos de onda (acima de 1 m) e baixa energia, até radiações de altíssima energia (como raios-X e raios-Gama) com comprimentos de onda muito curtos, compreendidos entre 10^{-10} e 10^{-15} m. No espectro também se encontram regiões de radiações com energias intermediárias, entre micro-ondas e o ultravioleta de vácuo. Do ponto de vista macroscópico, o espectro é contínuo, não existindo uma interface perfeitamente definida entre regiões adjacentes (ITO, 2004).

O Quadro 1 apresenta os principais métodos espectroscópicos empregados nas análises químicas e suas principais características.

Tipo de espectroscopia	Faixa de comprimento de onda usual	Faixa de número de onda usual cm^{-1}	Tipo de transição quântica
Emissão de raios gama	0,005 a 1,4 Å	-	Nuclear
Absorção, emissão, fluorescência e difração de raios-X	0,1 a 100 Å	-	Elétrons internos
Absorção de ultravioleta de vácuo	10 a 180 nm	1×10^6 a 5×10^4	Elétrons ligados
Absorção, emissão e fluorescência no UV-VIS	180 a 780 nm	5×10^4 a $1,3 \times 10^4$	Elétrons ligados
Absorção no IV e espalhamento Raman	0,78 a 300 μm	$1,3 \times 10^4$ a 33	Rotação/vibração de moléculas
Absorção de micro-ondas	0,75 a 375 mm	13 a 0,03	Rotação de moléculas
Ressonância de spin eletrônico	3 cm	0,33	Spin de elétrons em um campo magnético
Ressonância magnética nuclear	0,6 a 10 m	$1,7 \times 10^{-2}$ a 1×10^3	Spin de núcleos em um campo magnético

Quadro 1. Quadro representativo do fenômeno de interação entre radiação eletromagnética com a matéria. Fonte: SKOOG *et al*, 2002.

4.2.1 Espectroscopia no UV-VIS

A espectroscopia de forma genérica consiste no estudo da radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo. A espectroscopia no UV-VIS permite determinar a absorção da radiação em uma amostra, no intervalo de comprimentos de onda na faixa de 200 a 800 nm. Essa faixa compreende as regiões do ultravioleta no espectro (compreendida entre 200 a 400 nm) e do visível (entre 400 a 800 nm). As energias correspondentes para essas regiões são ao redor de 150 a 72 kcal.mol⁻¹ na região ultravioleta, e 72 a 36 kcal.mol⁻¹ para a região visível (SILVERSTEIN *et al*, 2006). Energias dessa magnitude correspondem normalmente à diferença entre os estados eletrônicos de muitas moléculas. A absorção da energia na faixa UV-VIS depende do número e do arranjo dos elétrons das moléculas ou íons absorventes. A análise do espectro permite correlacionar o pico de absorção com os tipos de ligações existentes na espécie estudada (PAVIA *et al*, 2001; SILVERSTEIN *et al*, 2006).

A energia da radiação UV-VIS tem a capacidade de promover a excitação apenas de elétrons de energias mais altas, como é o caso dos elétrons de ligações π e de valência n (não ligantes). Esta característica requer que a molécula a ser analisada apresente pelo menos um grupo funcional insaturado. Esses grupos capazes de absorver radiações UV-VIS são chamados de cromóforos (NUNES, 2008).

Para a determinação espectrofotométrica na região ultravioleta é necessário empregar células de quartzo que não absorvem nesta zona do espectro. É um método de análise baseado na propriedade de que espécies químicas iônicas ou moleculares absorvem radiações na região do ultravioleta e visível. Nestas duas regiões, as radiações envolvem fótons com energias suficientemente altas para provocar transições de elétrons de valência, sendo um processo relacionado especificamente com a estrutura molecular da espécie absorvente. A quantidade dos fótons absorvidos será sempre proporcional ao número de centros absorventes que a radiação encontra no seu percurso através da solução (SKOOG *et al*, 2002).

O método está fundamentado nos princípios teóricos da lei de Lambert-Beer, que explicam a absorção da radiação em função da espessura do meio, relacionando-a com a absorbância ou transmitância dos eletrólitos presentes na solução reacional. A lei de Lambert-Beer (Figura 7) estabelece uma relação entre a intensidade da radiação incidente sobre a amostra (I_0), e a intensidade da radiação que é transmitida pela mesma (I) (5):

$$\text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right) = A = \epsilon c l$$

Figura 7. Lei de Lambert-Beer.

A = absorbância; ϵ = absortividade molecular ou coeficiente de extinção; c = concentração do material absorvedor; l = espessura da amostra através da qual a luz passa.

A determinação da quantidade de luz que é absorvida pela amostra representa o aspecto mais importante do cálculo quântico. Os compostos orgânicos que apresentam dupla ligação na sua estrutura absorvem fortemente no ultravioleta remoto. Aqueles que possuem ligações simples e duplas alternadas, denominados sistemas conjugados, absorvem radiações em comprimentos de ondas maiores. A extensão do sistema conjugado determina os comprimentos de onda absorvidos, ou seja, quanto maior a extensão do sistema mais longo será o comprimento de onda absorvido, podendo estes chegar à região do visível (PAVIA *et al*, 2010).

A espectrofotometria é o processo ou técnica instrumental de medição que se baseia nas propriedades que os materiais têm em absorver ou emitir energia eletromagnética em determinada região do espectro eletromagnético, ou seja, que mede a radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo é designado espectrofotometria (MUSTRA, 2009).

Os espectrofotômetros são instrumentos que têm a capacidade de registrar dados relacionados às propriedades de absorbância ou transmitância de um material em função do comprimento de onda. O espectro é o registro dos dados, sendo nominado espectro de absorção ou de transmissão, a depender do dado registrado, se for absorbância ou transmitância, respectivamente. Cada espécie química apresenta um espectro de absorção característico e isso permite que se

possa identificar uma espécie química através da análise de seu espectro de absorção (VINADÉ *et al*, 2005).

Os espectrofotômetros apresentam a particularidade de selecionar radiações monocromáticas, permitindo que se realizem diversas determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. A utilização da região espectral no UV-VIS, requer a utilização de componentes óticos de quartzo além de detectores altamente sensíveis que permitam a detecção das radiações nessa faixa espectral. De uma forma geral, os espectrofotômetros contêm cinco componentes principais, que são fonte de radiação, monocromador ou seletor de comprimento de onda, recipientes para conter as soluções (cubetas), detectores e indicadores de sinal (VINADÉ & VINADÉ, 2005). Um esquema básico de um espectrofotômetro está representado na Figura 8.

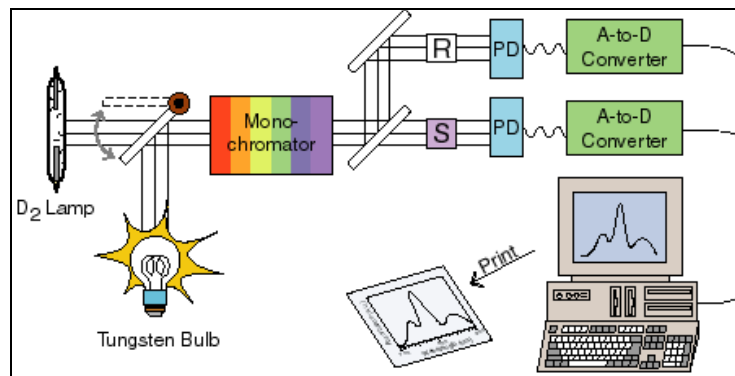


Figura 8. Esquema de um espectrofotômetro.

Fonte:

<http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm467/bioanalytical/spectroscopy/absflr.html>

4.3 MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO

Amostras naturais e de origem vegetal são matrizes de composição química bastante complexas e por este motivo podem sofrer interferências de diversos componentes indesejáveis.

O método de adição do padrão (MAP) é uma técnica muito empregada na análise de constituintes químicos por ser um procedimento fácil e rápido, podendo dispensar os procedimentos para minimização ou eliminação dos efeitos dos constituintes indesejados (MUSTRA, 2009).

Nesse método, um volume conhecido da amostra (V_x) é diluído a um certo volume final (V_i), em uma proporção adequada, e em seguida realiza-se a leitura da absorbância. Após essa leitura, toma-se uma outra alíquota da amostra contendo o mesmo volume (V_x), adiciona-se um volume determinado de uma solução padrão (V_p), de concentração conhecida (C_p), e em seguida dilui-se a mistura para o mesmo volume final (V_T) e realiza-se a leitura da absorbância (GASPARETTO, 2010). Após essas leituras, é possível determinar a concentração procurada (C_x) a partir da equação apresentada na Figura 9.

$$A = \epsilon b \frac{C_x V_x}{V_T} + \epsilon b \frac{C_p V_p}{V_T}$$

Figura 9. Equação para o cálculo das concentrações pelo método da adição de padrão.

Nessa equação, o primeiro termo corresponde ao coeficiente linear e representa a absorbância da amostra antes da adição do padrão, na qual se encontra a concentração procurada da amostra (C_x). Este valor é constante para qualquer volume de padrão adicionado. O segundo termo traz o coeficiente angular e a partir dele é possível se determinar o valor de ϵb , que será depois utilizado para calcular a C_x .

Outra forma de se determinar a concentração da substância de interesse na amostra é pela extrapolação da reta, encontrando o valor da concentração negativa quando a absorbância cai a zero (MUSTRA, 2009) (Figura 10).

Vale ressaltar que este método tem aplicabilidade principalmente em análises de amostras que contenham apenas um cromóforo em solução. A presença de diferentes cromóforos em solução leva à ocorrência de superposição de bandas de absorção, trazendo resultados inexatos (CORRER, 2004).

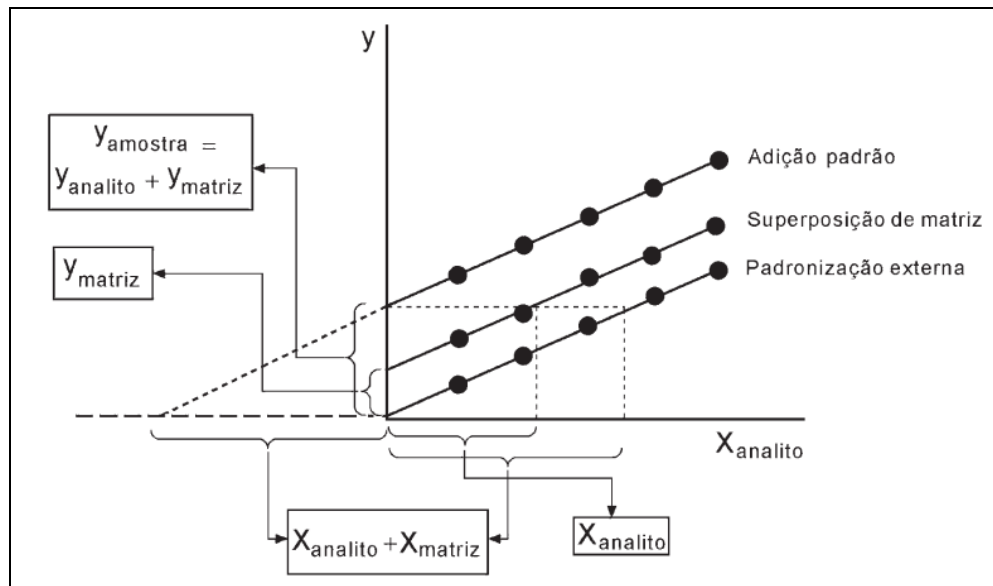


Figura 10. Aplicação do método da adição do padrão.
 Fonte: RIBANI *et al*, 2004.

Destaca-se que a precisão deste método aumenta à medida que se aumentam também o número de soluções utilizadas na análise. A adição de uma única concentração de padrão pode ser utilizada quando a precisão não é tão necessária, e nesse caso realiza-se o cálculo com os valores encontrados antes e após a adição do padrão.

4.4 QUIMIOMETRIA

A análise de dados representa um fator fundamental para o sucesso na obtenção de resultados em procedimento analítico. Dependendo da forma como é conduzida, esta análise pode ser do tipo univariada ou multivariada. Quando uma única variável é medida sistematicamente para várias amostras, está é chamada de análise univariada de dados, sendo esta uma forma de tratamento de dados bastante utilizada. A análise multivariada de dados químicos consiste na verificação da relação entre grupos de variáveis dependentes coletadas sobre a mesma

amostra e corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, de forma simultânea, todas as variáveis para a interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (MOURA *et al*, 2006).

O uso de equipamentos cujas análises de uma amostra resultam em um único valor, como fotômetros de filtro e condutivímetros, geram dados univariados. Quando se utilizam equipamentos que fornecem um conjunto de variáveis para cada amostra, como os espectrômetros e cromatógrafos, são gerados dados multivariados (CÔCCO, 2008).

Para se identificar técnicas capazes de utilizar todas as variáveis disponíveis, de forma simultânea, na interpretação de dados resultantes das análises são utilizados os termos Análise Multivariada ou Quimiometria. A Quimiometria é uma importante ferramenta que encontra aplicações nas mais diversas áreas tecnológicas, isto porque as novas tecnologias têm gerado um grande número de informações que necessita de um processamento prévio para ser utilizado nas análises químicas. As ferramentas estatísticas fornecidas pela Quimiometria ajudam na interpretação e processamento destes dados sem que haja perda de informação relevante (MEIRA *et al*, 2010; MEIRA *et al*, 2011; MEIRA *et al*, 2012).

A Quimiometria teve seu desenvolvimento a partir da associação de técnicas analíticas instrumentais, capazes de fornecer dados multivariados para as amostras analisadas, à disponibilidade de computadores, bem como de programas estatísticos sofisticados (SENA *et al*, 2000). Esta é definida como uma área da Química que tem como objetivo o planejamento ou otimização da seleção de procedimentos experimentais, empregando métodos matemáticos e estatísticos na análise dos dados resultantes que terminam por fornecer o máximo possível de informações químicas relevantes (FERREIRA *et al*, 1999; HOPKE, 2003).

Novas ferramentas destinadas ao tratamento de dados foram desenvolvidas a partir do crescimento da Quimiometria. Suas aplicações são distintas de acordo com o objetivo da pesquisa, como por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados e as determinações qualitativas e quantitativas.

Existem diversos métodos de análise multivariada empregados com

finalidades bem diversas entre si, sendo os mais comuns a Análise de Componentes Principais (PCA) e Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Através da PCA é possível uma visão do conjunto de dados através de uma redução do número de variáveis a algumas poucas componentes principais, que são capazes de explicar em maior proporção o conjunto original, permitindo com isso, verificar como as amostras se relacionam entre si, ou seja, o quanto estas se assemelham segundo as variáveis utilizadas no trabalho (MEIRA *et al*, 2010).

4.4.1 Análise de Componentes Principais/*Principal Component Analysis* (ACP/PCA)

A análise de componentes principais é provavelmente a técnica multivariada mais antiga, sendo inicialmente descrita por Pearson em trabalho publicado no ano de 1901. Neste trabalho ele buscava demonstrar como ocorria uma transformação linear ortogonal de um conjunto de medidas num espaço p -dimensional em outro conjunto num espaço m -dimensional (onde $m \leq p$). O termo *Principal Component Analysis* (PCA) foi utilizado pela primeira vez em 1933, por Hotelling, que adaptou esta técnica (ABDI & WILLIAMS, 2010). Na tradução para o português, o termo é conhecido como “Análise de Componentes Principais (ACP)”.

A PCA é uma técnica matemática de análise multivariada que permite realizar pesquisas com um grande número de dados coletados. Esta técnica possibilita ainda que sejam identificadas aquelas medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, isso sem que ocorram perdas significativas de informações. A PCA objetiva principalmente a redução do número de variáveis originais.

Através da PCA é possível obter a transformação de um conjunto original de variáveis em outro conjunto, denominado “componentes principais” (CP), que apresenta dimensões equivalentes. Essa transformação ocorre com a menor perda

de informação possível, sendo que também busca eliminar algumas variáveis originais que não apresentam informação relevante. A redução das variáveis somente ocorrerá caso as variáveis originais não sejam independentes e possuam coeficientes de correlação não-nulos (BEEB *et al*, 1997).

As CP são obtidas pela transformação de um conjunto de variáveis aleatórias correlacionadas em um conjunto de variáveis não correlacionadas e ortogonais entre si. Essas variáveis são combinações lineares das variáveis originais nas quais a primeira componente principal fornece a maior variância dos dados originais. A segunda variável é responsável pela maior variância restante, sem haver correlação com a primeira, e assim por diante (VICINI, 2005).

As combinações lineares das variáveis iniciais são distribuídas em ordem decrescente por suas variâncias uma vez que a importância relativa das componentes principais diminui da primeira para a última. Dessa forma, os últimos componentes serão responsáveis pela explicação de uma pequena parte da variação total dos dados (SMITH & VERDINELLI, 1980). É importante ressaltar que o número de componentes principais pode ser menor ou igual ao número de variáveis (SCREMIN, 2003).

As componentes principais podem ser descritas como uma combinação linear das variáveis originais, que são escritas por meio dos autovalores (λ) e dos autovetores (l). Os autovalores de uma matriz de correlação correspondem à variância de cada componente principal. Por sua vez, os autovetores são a base para a construção das cargas fatoriais (VICINI, 2005).

Na análise de componentes principais, os indivíduos são agrupados de acordo com sua variação, isto é, eles são agrupados segundo suas variâncias ou seu comportamento dentro da população, que pode ser identificado pela variação do conjunto de características capazes de definir o indivíduo. Isto quer dizer que, nesta técnica, os indivíduos de uma população são agrupados de acordo com a variação de suas características (KHATTREE & NAIK, 2000).

Na análise de vinhos, a combinação de métodos analíticos rápidos com a PCA permite a classificação das amostras de vinhos analisadas de acordo com suas características, como por exemplo a variedade do vinho (COZZOLINO *et al*, 2009). A

Figura 11 apresenta a combinação da espectroscopia no infravermelho médio (MID-IR) com a PCA na análise de vinhos de três variedades (*Shiraz* – SH, *Riesling* – RIES, e *Sauvignon Blanc* – SAUVB) demonstrando a dificuldade de identificação dos grupos de amostras relacionados às variedades. A partir da PCA é possível observar uma separação entre as amostras analisadas de acordo com as variedades.

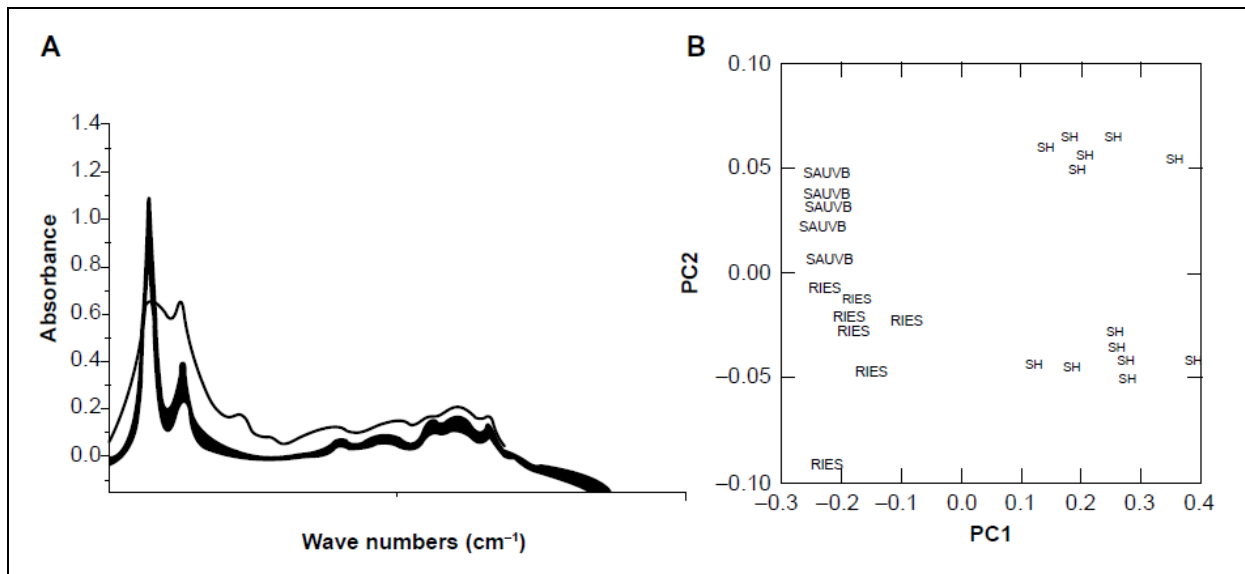


Figura 11. Combinação da PCA com métodos rápidos de análise. A) Espectro de infravermelho médio de um conjunto de amostras de vinhos, B) e sua PCA.

Fonte: COZZOLINO et al, 2009.

Os passos necessários para a determinação das componentes principais são calcular inicialmente a matriz de variância-covariância (Σ) ou de correlação (R), encontrar os autovalores e os autovetores. Levando em conta que os autovalores representam a variabilidade de cada componente, a soma dos mesmos equivale ao número de variáveis. Caso as componentes sejam extraídas da matriz de correlação, a soma dos componentes explicará 100% dos dados, sem perda de informação. Um esquema prático para determinação dos componentes principais está descrito na Figura 12.

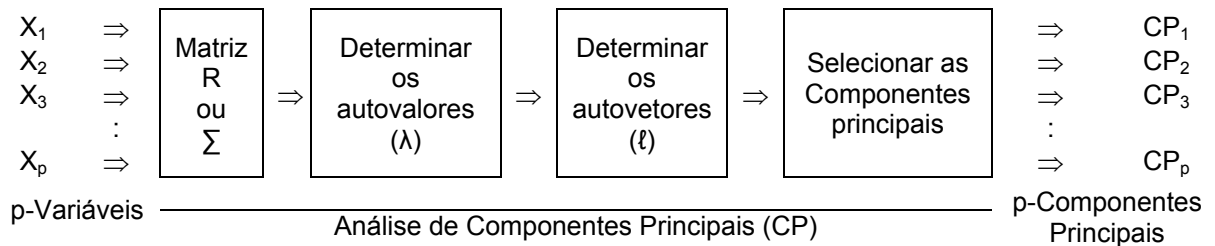


Figura 12. Esquema para encontrar as raízes características que formarão os autovetores. Fonte: SOUZA, 2000.

Várias ferramentas são utilizadas para a escolha do número de componentes principais. Uma das ferramentas utilizadas nessa escolha é o gráfico *scree plot* proposto por Cattle (1966), que consiste de um gráfico dos autovalores distribuídos em função da ordem das componentes principais. Este gráfico representa o percentual de variância explicada por componente. À medida que a porcentagem se reduz e a curva se torna quase paralela ao eixo das abscissas, podem-se excluir os componentes correspondentes (Figura 13).

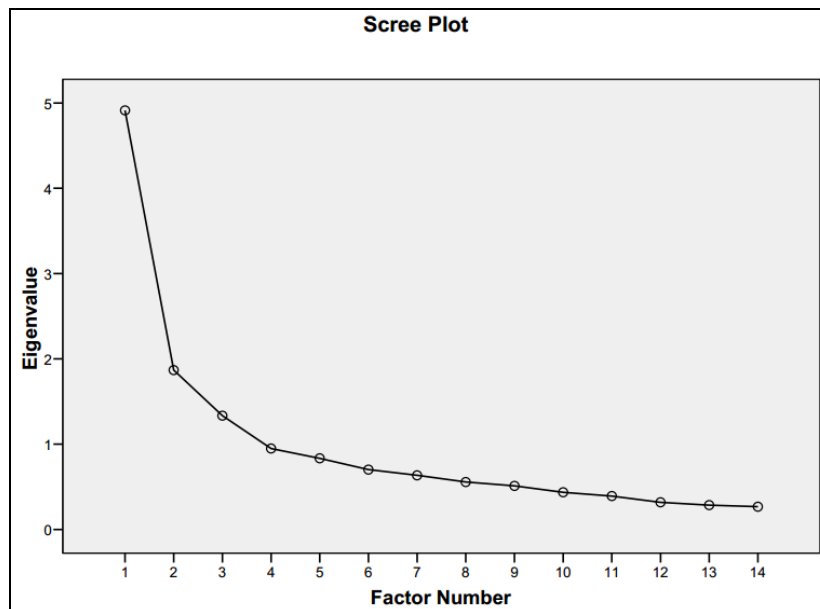


Figura 13. Gráfico *scree plot* (cotovelo) para uma análise de componentes principais.

Fonte: PARKS et AL, 2002.

Este gráfico ilustra de que forma a variabilidade dos dados está distribuída nos eixos da ordenação. Isso permite a identificação do número de eixos mais significativos. A partir do *scree plot* apresentado na Figura 11, pode-se observar que o número de componentes principais é $k = 4$, ponto no qual se observa a estabilização da inclinação na curva. O número das componentes principais a serem utilizados também pode ser determinado incluindo-se somente aquelas componentes cujos autovalores (*eigenvalue*) são superiores a um. Este critério foi sugerido por Kaiser (1958).

A PCA constitui um método exploratório capaz de separar informações importantes das incertas, desnecessárias e repetidas. Ela também auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados (PANERO & DA SILVA, 2008).

A PCA é um método capaz de reduzir, mediante combinações lineares das variáveis originais, a extensão do conjunto dos dados e identificar novas variáveis significantes. É possível reduzir um grande número de variáveis correlacionadas a um pequeno número de componentes artificiais não correlacionados, determinados mediante combinações lineares das variáveis observadas, sem perda das informações relevantes dos dados brutos.

Registre-se que apesar de ser uma ferramenta importante para a análise e avaliação de dados, cujo surgimento data de 1901, a utilização em larga escala das técnicas multivariadas só ocorreu após o advento dos computadores, pois sem o auxílio de aplicativos específicos para análise de dados complexos, não haveria possibilidade de se gerar com rapidez, eficiência e clareza, os gráficos que permitem examinar o inter-relacionamento das variáveis (VICINI, 2005).

4.4.2 Calibração multivariada - Regressão por mínimos quadrados parciais/*Partial least squares* (PLS)

Denomina-se calibração univariada a técnica em que se estabelece uma relação matemática entre uma única variável dependente e uma única variável independente. Quando a relação é entre mais de uma variável denomina-se calibração multivariada. Uma das técnicas de calibração multivariada mais usual é a calibração por Mínimos Quadrados Parciais, do inglês *Partial Least Square* (PLS) (MEIRA *et al*, 2011).

O princípio básico da calibração multivariada é a quantificação de uma variável dependente, mediante a utilização concomitante de muitas variáveis independentes para quantificar. A calibração multivariada passou a ser largamente empregada nas análises químicas, principalmente nos casos em que os resultados da análise gerados pelo equipamento apresentam superposição de sinais e quando se deseja fazer determinações simultâneas de analitos. É uma técnica aplicada a matrizes reais complexas, onde os procedimentos de separação e tratamentos químicos necessários para aplicar a calibração usual simples são caros e demorados. Dentre os métodos de calibração multivariada, destaca-se, por ser um dos empregados com maior frequência, o método de regressão por mínimos quadrados parciais (SALDANHA *et al*, 1999).

O método dos mínimos quadrados parciais foi introduzido por Wold (1975) e é um modelo baseado em variáveis latentes, ou fatores, no qual cada fator representa uma combinação linear das variáveis dependentes (matrizes X) ou independentes (matrizes Y) originais. Desta forma, constitui um método linear de calibração multivariada pois os dados das variáveis independentes X e dependentes Y são utilizados para estabelecer um modelo de regressão linear. O método consiste em decompor ou modelar as matrizes originais, tanto a matriz X como a matriz Y, formando dois conjuntos de fatores lineares ou grupos de matrizes denominados de escores (*scores*) e pesos (*loadings*), sendo, por conseguinte, um método bilinear (SALDANHA *et al*, 1999; ARAÚJO *et al*, 2001).

A regressão por mínimos quadrados parciais consiste em encontrar um conjunto de componentes principais (vetores base) para os dados espectrais e um conjunto separado de componentes principais para os dados de concentração, relacionando, em seguida, um conjunto com o outro, buscando encontrar uma perfeita linearidade entre os escores, ou seja, entre as projeções dos dados espectrais e dos dados de concentração sobre seus respectivos fatores.

Para a calibração por PLS é possível utilizar toda a informação instrumental ou selecionar previamente as variáveis sabidamente mais importantes. Em geral, o desempenho é melhorado significativamente quando se efetua uma seleção de variáveis. Através do PLS é possível encontrar uma relação matemática entre uma das variáveis denominada de variável dependente e o restante das variáveis que descrevem o sistema que é denominado de variáveis independentes. Uma vez encontrada a relação matemática, sua grande aplicação é fazer predição de valores para a variável dependente quando se têm determinado as variáveis independentes. Ou seja, a calibração por PLS pode ser usada na predição de resultados analíticos significativos (MEIRA *et al*, 2010; MEIRA *et al*, 2011; MEIRA *et al*, 2012).

Para avaliar o modelo PLS podem ser usadas várias medidas estatísticas tais como, correlação, coeficiente angular e valor do R-quadrado. A correlação é uma medida estatística largamente usada e nunca pode ser maior do que +1 ou menor que -1. Quando a correlação é próxima a zero isto indica que as duas variáveis não estão relacionadas. Uma correlação positiva indica que quando uma cresce a outra também cresce e a relação é forte quanto mais a correlação se aproxima de um. Uma correlação negativa é indicativo de que as duas variáveis movem-se em direções opostas. O coeficiente angular da reta próximo a 1, indica que o ângulo é de 45° sinalizando a eficiência do modelo nas predições das propriedades consideradas. Já os coeficientes lineares próximos a zero indicam pouca ocorrência de erros determinados na predição dos modelos desde quando o coeficiente linear é a intercepção da reta do modelo PLS, ou seja, o valor que Y (predito) terá quando Y(referência) é zero. O valor do R² ou R-quadrado da regressão indica a proporção de variabilidade em Y que é explicada por X. Um valor de R-quadrado próximo de 1 ou -1 indica uma forte relação entre as duas variáveis (MEIRA *et al*, 2010; MEIRA *et al*, 2011; MEIRA *et al*, 2012).

Para validação do modelo PLS são utilizadas duas técnicas: a validação externa, em que novos dados são introduzidos para avaliar a eficiência da capacidade preditiva do modelo, e a validação interna, em que o mesmo conjunto de calibração serve também como conjunto de validação. Em geral, a validação externa é recomendada por utilizar amostras não utilizadas na construção do modelo de calibração. A validação interna pode ser através da validação cruzada e pelo processo “*leave-one-out*”. A validação cruzada consiste em selecionar subconjuntos do conjunto de calibração que serão utilizados na predição do modelo. O processo “*leave-one-out*” consiste em deixar de fora do modelo uma amostra de cada vez (COSCIONE, 2001).

Uma vez construído o modelo PLS, este pode ser utilizado para estimar parâmetros em novas amostras, entretanto, ele não permite uma interpretação físico-química direta dos resultados. Isto ocorre devido ao fato deste método realizar a regressão no domínio dos dados processados, problema que pode ser contornado através da aplicação da regressão linear múltipla, técnica que realiza a regressão no domínio dos dados originais (NUNES, 2008).

4.4.2.1 Regressão Linear Múltipla

A análise de regressão é um procedimento estatístico utilizado na análise de dados para estudar e modular a relação existente entre variáveis. Através da análise de regressão é possível estimar parâmetros desconhecidos de um modelo (COELHO-BARROS *et al*, 2008).

A regressão linear múltipla (RLM) busca estabelecer uma relação linear entre uma variável dependente (Y) e k variáveis independentes (X_k). Nas análises por espectroscopia a variável Y representa as concentrações (ou outra propriedade) e as variáveis X_k representam as absorvâncias (em k comprimentos de ondas diferentes). As variáveis independentes são também chamadas variáveis de

predição, já que podem ser usados na predição de valores de Y (ESTEVEES & SOUSA, 2007; NUNES, 2008).

O modelo de RLM descreve uma variável dependente como função de várias variáveis independentes. A equação do modelo geral é descrita na Figura 14, onde Y_i é a variável dependente, X_i são variáveis independentes, β_i são os coeficientes de regressão (parciais) e ε_i representam os erros aleatórios do modelo obtido (COELHO-BARROS *et al*, 2008).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon_i$$

Figura 14. Modelo de regressão linear múltipla (RLM).

Este modelo (Figura 14) é chamado de regressão linear múltipla pois envolve mais de um coeficiente de regressão. O termo “linear” indica que este modelo é linear em relação aos coeficientes de regressão β ($\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$) e não porque Y_i é uma função linear dos X_k .

Construído o modelo, é possível se estimar as concentrações de novas amostras analisadas.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 SELEÇÃO E DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de vinhos tintos secos monovarietais foram adquiridas em lojas especializadas de Salvador-BA, ou diretamente através dos fabricantes da região do Vale do São Francisco (Bahia e Pernambuco) e Vale dos Vinhedos (Rio Grande do Sul) no período de Janeiro a Março de 2012. Foram adquiridas 16 marcas comerciais diferentes (Quadro 2).

Código	Variedade	Região
CS1	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Mendoza, Argentina
CS2	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Mendoza, Argentina
CS3	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Santiago, Chile
CS4	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Santiago, Chile
CS5	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Bento Gonçalves, RS
CS6	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Santa Maria da Boa Vista, PE
CS7	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Santa Maria da Boa Vista, PE
CS8	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Bento Gonçalves, RS
CS9	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Bento Gonçalves, RS
SY1	<i>Syrah</i>	Pertuis, França
SY2	<i>Syrah</i>	Santana do Sobrado, Casa Nova, BA
SY3	<i>Syrah</i>	Santana do Sobrado, Casa Nova, BA
SY4	<i>Syrah</i>	Lagoa Grande, PE
TA1	<i>Tannat</i>	Bento Gonçalves, RS
TA2	<i>Tannat</i>	Santa Maria da Boa Vista, PE
TA3	<i>Tannat</i>	Bento Gonçalves, RS

Quadro 2. Identificação das amostras de vinhos tintos.

As amostras foram subdivididas em 3 grupos de acordo com a variedade do vinho, sendo eles: *Cabernet Sauvignon* (9 marcas, designadas CS1 a CS9), *Syrah* (4 marcas, designadas SY1 a SY4) e *Tannat* (3 marcas, designadas TA1 a TA3).

5.2 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Em virtude da grande absorção das amostras na região espectral estudada, foram realizados testes com várias diluições das mesmas com etanol para se avaliar qual deveria ser a proporção ideal para a pesquisa.

Foram preparadas diluições das amostras de vinhos em etanol nas proporções 1:10, 1:20, 1:25, 1:50, 1:80 e 1:100. Todas as diluições foram testadas em espectrofotômetro UV-VIS na faixa espectral compreendida entre 800 e 200 nm.

Das diluições testadas, aquela que mostrou maior aplicabilidade, sem saturação das medidas de absorbância na faixa espectral de trabalho, foi a de proporção 1:100.

5.3 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE DE *trans*-RESVERATROL (100,0 mg/L)

Foi pesada uma massa de 10 mg de padrão de *trans*-resveratrol (fabricante MPI, lote 8153H) que depois de dissolvida em quantidade suficiente de uma solução aquosa de etanol, foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL. Em seguida o volume do balão foi completado com a solução aquosa de etanol

até obter uma solução estoque contendo *trans*-resveratrol na concentração de 100,0 mg/L.

5.4 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO INTERMEDIÁRIA DE *trans*-RESVERATROL (1,0 mg/L)

Foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL um volume de 1,0 mL da solução estoque de *trans*-resveratrol (100,0 mg/L). Em seguida o volume do balão foi completado com etanol até obter uma solução intermediária contendo *trans*-resveratrol na concentração de 1,0 mg/L.

5.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE *trans*-RESVERATROL PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO

A partir das soluções estoque e intermediária de *trans*-resveratrol, foram retiradas alíquotas e posteriormente diluídas conforme a Tabela 2. As concentrações finais das soluções utilizadas para a construção da curva de concentração ficaram entre 100 µg/L e 1000 µg/L.

Tabela 2. Composição volumétrica das soluções padrões de resveratrol utilizadas na construção da curva de concentração

Balão	Volume da solução Padrão de Resveratrol (1 mg/L)	Volume final (mL)	Concentração final do padrão de <i>trans</i> -resveratrol (mg/L)
1	1,0	10,0	0,1
2	2,0	10,0	0,2
3	3,0	10,0	0,3
4	4,0	10,0	0,4
5	5,0	10,0	0,5
6	6,0	10,0	0,6
7	7,0	10,0	0,7
8	8,0	10,0	0,8
9	9,0	10,0	0,9
10	10,0	10,0	1,0

5.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VINHOS

Foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL uma alíquota de 1,0 mL da amostra de vinho e em seguida o volume foi completado com etanol até o volume final do balão.

5.7 PREPARO DAS AMOSTRAS DE VINHOS PARA A PCA

Para cada amostra de vinho foram realizadas diluições em balão volumétrico com etanol, conforme Tabela 3. Todas as soluções obtidas foram analisadas em seguida por espectroscopia de absorção no UV-VIS.

Tabela 3. Composição volumétrica das soluções obtidas com as amostras de vinhos e aditivadas com os padrões de resveratrol para a PCA.

Balão	Solução de Vinho (mL)	Volume da solução Padrão de Resveratrol (1 mg/L)	Volume final (mL)	Concentração final do padrão de resveratrol (mg/L)
1	1,0	-	10,0	-
2	1,0	5,0	10,0	0,5

5.8 PREPARO DAS AMOSTRAS DE VINHOS + PADRÕES DE *trans*-RESVERATROL PARA O PLS

Para a construção dos modelos PLS foram selecionadas as amostras CS6, SY3 e TA2. As amostras foram analisadas em solução etanólica. As soluções para a análise foram preparadas conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Composição volumétrica das soluções obtidas com as amostras de vinhos e aditivadas com os padrões de resveratrol para o PLS.

Balão	Solução de Vinho (mL)	Volume da solução estoque de Resveratrol (100 mg/L)	Volume da solução Padrão de Resveratrol (1 mg/L)	Volume final (mL)	Concentração final do padrão de resveratrol (mg/L)
1	1,0	-	-	10,0	-
2	1,0	-	1,0	10,0	0,1
3	1,0	-	2,0	10,0	0,2
4	1,0	-	3,0	10,0	0,3
5	1,0	-	4,0	10,0	0,4
6	1,0	-	5,0	10,0	0,5
7	1,0	-	6,0	10,0	0,6
8	1,0	-	7,0	10,0	0,7
9	1,0	-	8,0	10,0	0,8
10	1,0	-	9,0	10,0	0,9
11	1,0	0,1	-	10,0	1,0

5.9 ESPECTROSCOPIA UV-VIS E PCA

Para a análise por espectroscopia no UV-VIS foram analisadas as soluções descritas na Tabela 3 (pág. 39).

As soluções foram analisadas em triplicata no espectrofotômetro Marca Varian, Modelo Cary 50, à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa espectral de 200 a 800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e capacidade de 4 mL.

Os espectros foram salvos no formato *Comma Delimited* (CSV) e exportados para o software OriginPro[®] 8. Na sequência os espectros foram exportados para o Matlab[®] 6.1.

Para fazer a PCA com as amostras comerciais os dados espectrais foram organizados em uma matriz bidimensional (2D) com dimensões de 16 (média das leituras das triplicatas das amostras) x 121 (comprimentos de onda de absorção). A matriz 2D foi centrada na média e submetida à análise covariante.

5.10 ANÁLISE UNIVARIADA DAS AMOSTRAS DE VINHOS + PADRÃO DE *trans*-RESVERATROL

Foi realizada a análise univariada das amostras puras diluídas de vinhos e aditivadas com padrão de resveratrol em concentrações compreendidas entre 100-1000 µg/L. Esta análise foi realizada para se comparar com o modelo multivariado empregado posteriormente.

Para realização dessa análise, foram feitas leituras em triplicata, no espectrofotômetro Marca Varian, Modelo Cary 50, à temperatura ambiente, na faixa espectral de 200 a 800 nm, das soluções descritas na Tabela 4 (pág. 40).

Para análise dos dados, foram utilizadas as médias das absorbâncias obtidas para cada solução, no comprimento de onda de 305 nm, comprimento de onda de maior absorção do resveratrol (Figura 15). Os dados foram tratados no software Microsoft Office Excel[®] 2007, construída a curva de concentração e determinação da equação da reta.

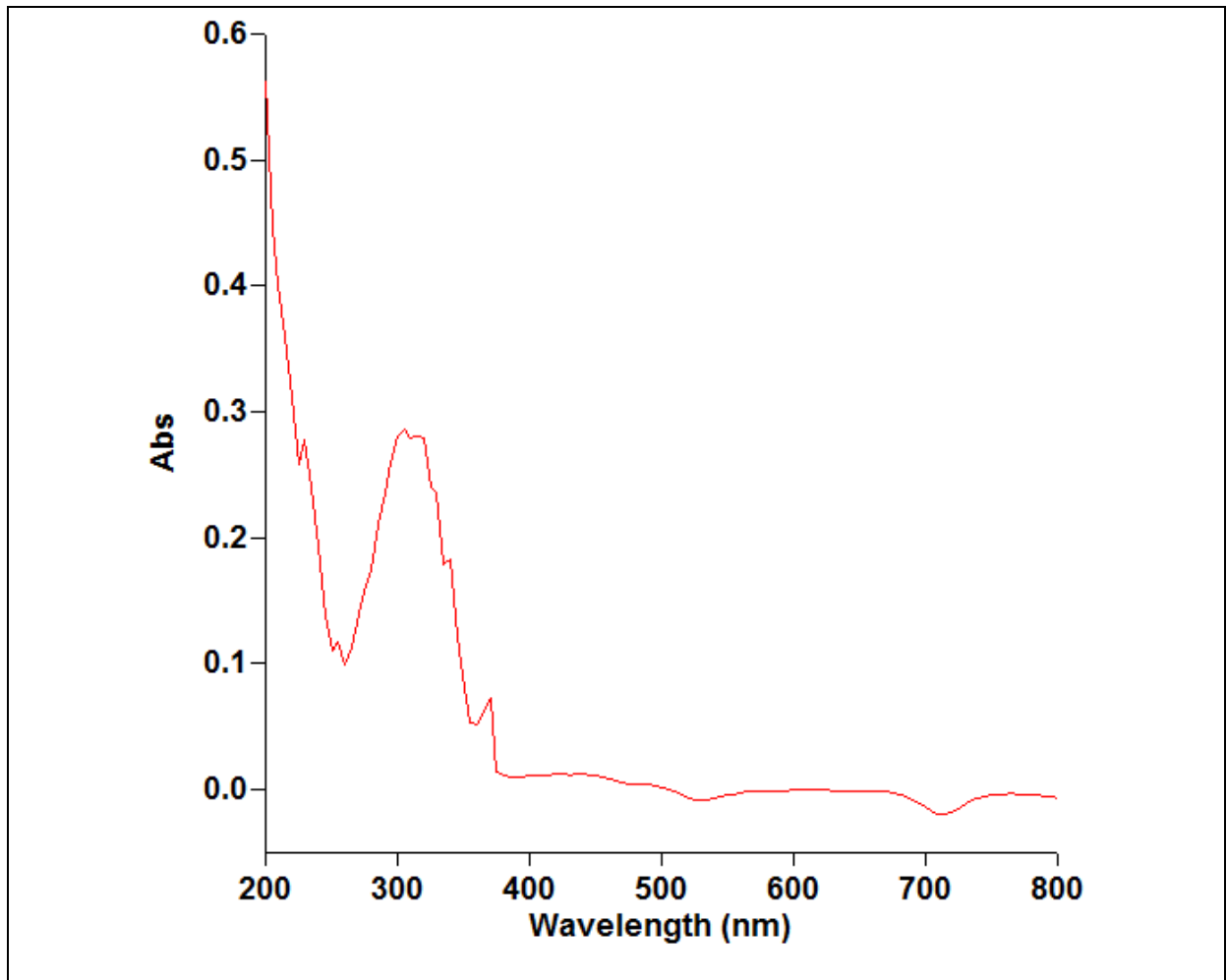


Figura 15. Espectro de absorção do padrão de *trans*-resveratrol 600 mg/L no UV-VIS demonstrando a máxima absorção em 305 nm.

5.11 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA (PLS) E DE REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA (RLM)

Para a construção dos modelos de calibração multivariada e de regressão linear múltipla foram analisadas por espectroscopia no UV-VIS as soluções descritas na Tabela 4 (pág. 40).

Estas soluções também foram analisadas em triplicata no espectrofotômetro Marca Varian, Modelo Cary 50, à temperatura ambiente, na faixa espectral de 200 a 800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e capacidade de 4 mL.

Os modelos de calibração foram construídos usando a técnica de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) empregando o software comercial Unscrambler® X10.0.1 (CAMO COMO, Oslo, Noruega). Também foi empregada a regressão linear múltipla (RLM) na construção dos modelos.

As matrizes espectrais de cada substância foram organizadas em uma matriz geral centrada na média em que as amostras estavam nas linhas. Na sequência, por inserção de uma nova coluna para esta matriz geral, foram adicionados os valores de concentração da substância. Através do software definiu-se a coluna das concentrações como a variável dependente e os espectros de absorção como as variáveis independentes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS

Ao se observar os perfis espectrais das 16 amostras de vinhos analisadas, percebeu-se que os espectros obtidos na região compreendida entre os comprimentos de onda de 265 a 375 nm trazem mais informações sobre os vinhos (Figura 16), uma vez que esta é a faixa de absorção do resveratrol.

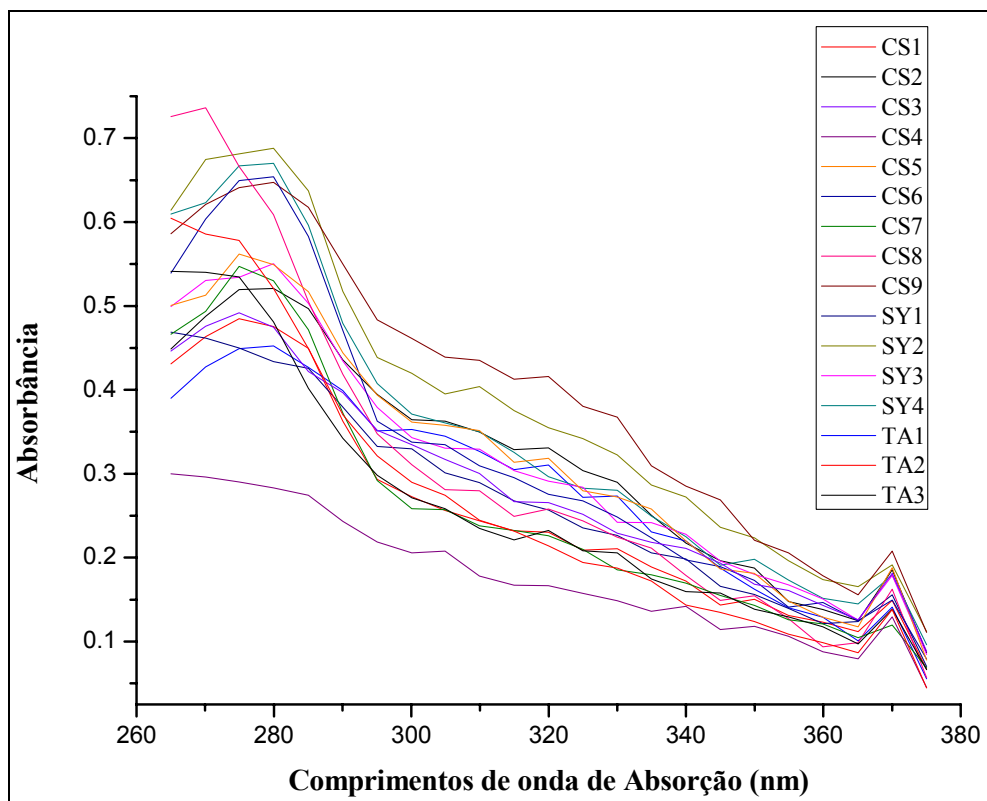


Figura 16. Espectros originais de 16 marcas de vinhos na região de 265 a 375 nm.

6.2 PCA DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DAS AMOSTRAS DE VINHOS

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV-VIS das amostras verificou-se que foram necessários 4 componentes principais para explicar 98,23% da variância dos dados (Tabela 5). A Figura 17 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é necessário selecionar os quatro primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

Tabela 5. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA.

PC	Autovalor	% de variância capturada com este PC	% total de variância capturada
1	1,68E+000	90,7	90,70
2	5,38E-002	2,90	93,60
3	4,40E-002	2,37	95,97
4	4,18E-002	2,26	98,23
5	1,90E-002	1,02	99,25
6	5,52E-003	0,30	99,55
7	3,68E-003	0,20	99,75
8	1,52E-003	0,08	99,83
9	1,25E-003	0,07	99,90
10	5,77E-004	0,03	99,93
11	4,72E-004	0,03	99,95
12	3,25E-004	0,02	99,97
13	2,43E-004	0,01	99,98
14	1,97E-004	0,01	100,00
15	9,07E-005	0,00	100,00
16	1,90E-017	0,00	100,00

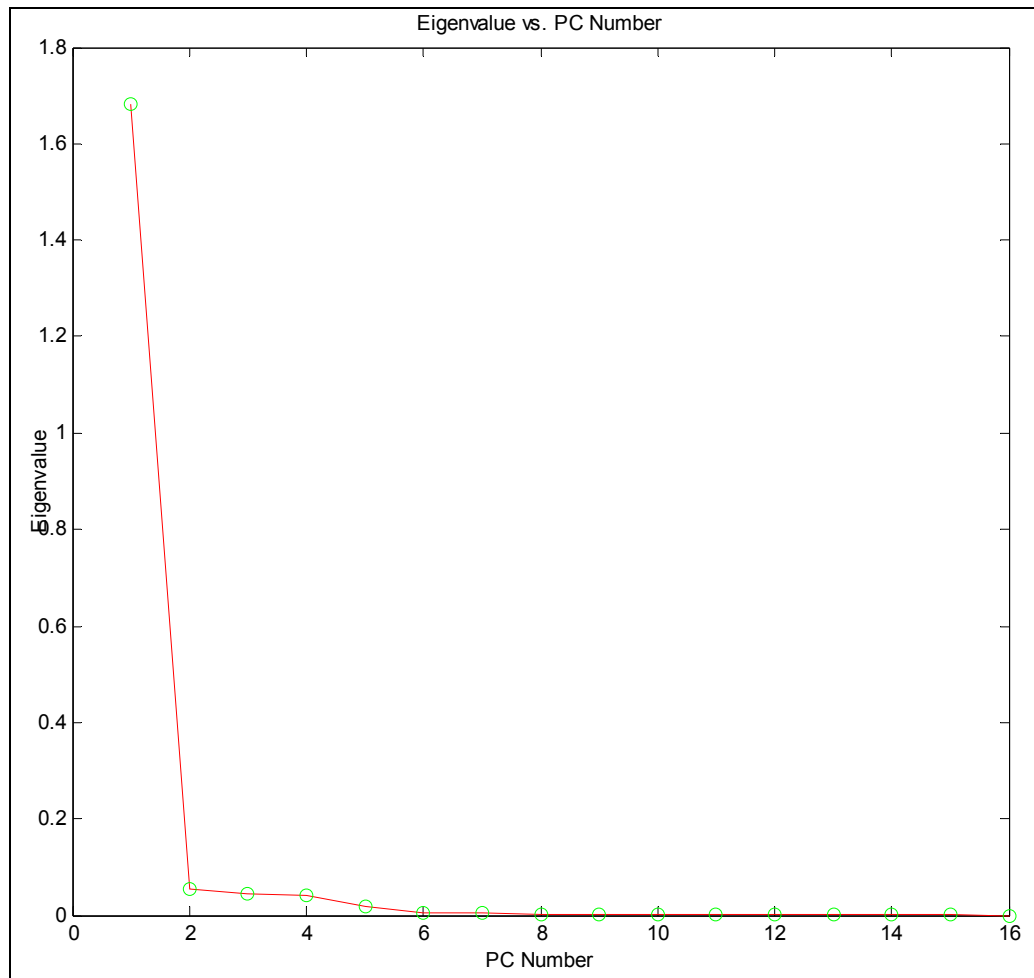


Figura 17. Gráfico de Autovalor x PC.

Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1xPC2 (Figura 18), é possível observar que na primeira componente principal as amostras CS2 e CS4 apresentam os valores mais negativos separando-se das demais, enquanto que as amostras CS9 e TA3 apresentam os escores mais positivos em PC2 e as amostras CS4, CS6 e SY4 apresentam os escores mais negativos e se separam das demais. As demais amostras encontram-se próximas umas das outras nestas duas componentes.

Estas separações podem ser explicadas pelas semelhanças das regiões onde estas amostras foram produzidas. As amostras CS9 e TA3, apesar de serem de variedades diferentes, são produzidas na mesma região (Bento Gonçalves, RS). As amostras CS6 e SY4 são produzidas no estado de Pernambuco (Brasil).

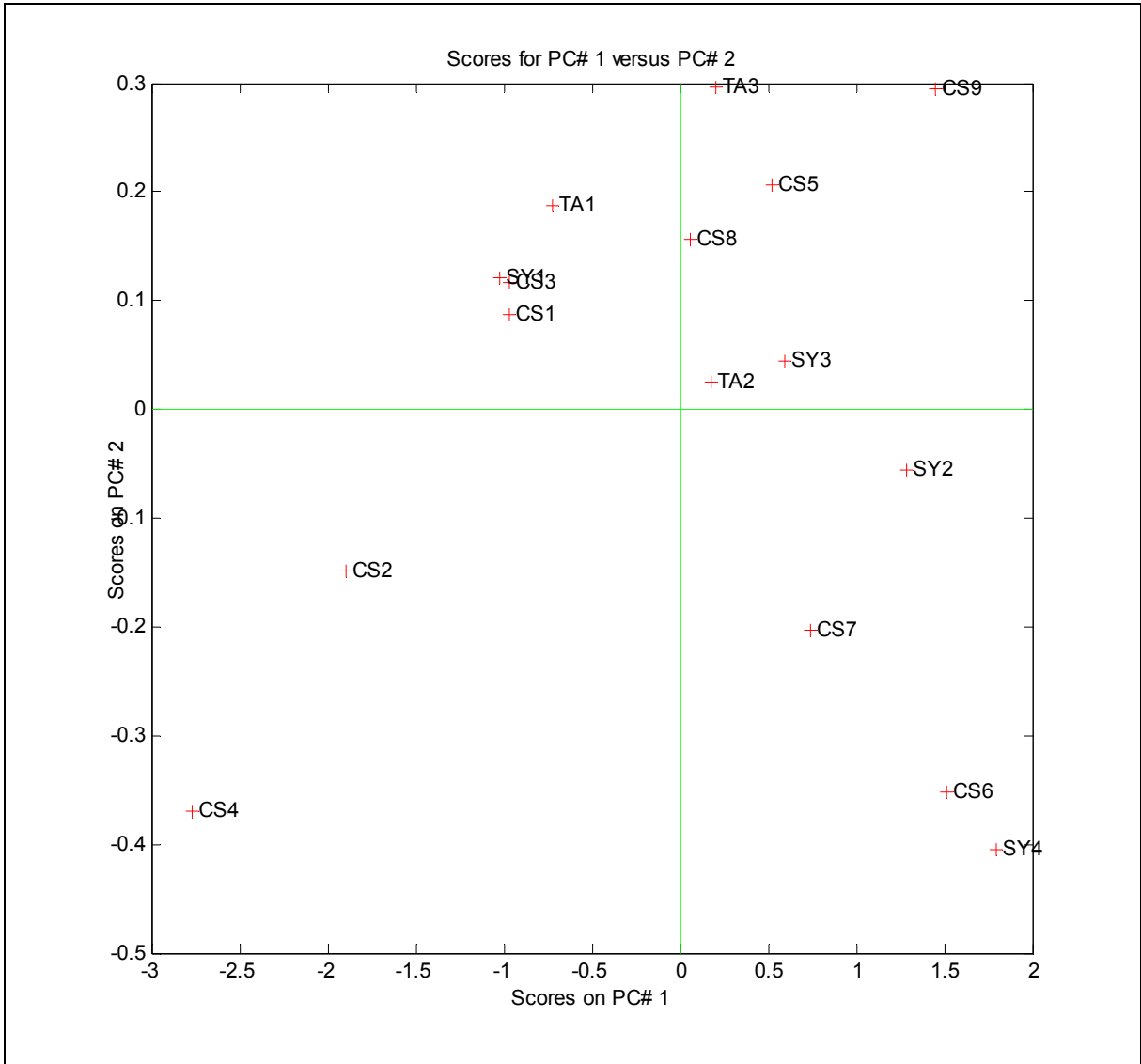


Figura 18. PC1xPC2 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de vinhos.

A Figura 19 apresenta o gráfico de PC1xPC3. Nela, é possível observar que as amostras da variedade Tannat (TA1, TA2 e TA3) e CS4 apresentam escores mais negativos em PC3, se separando das demais. A amostra CS8 apresenta valor mais positivo nesta componente, se separando também das demais.

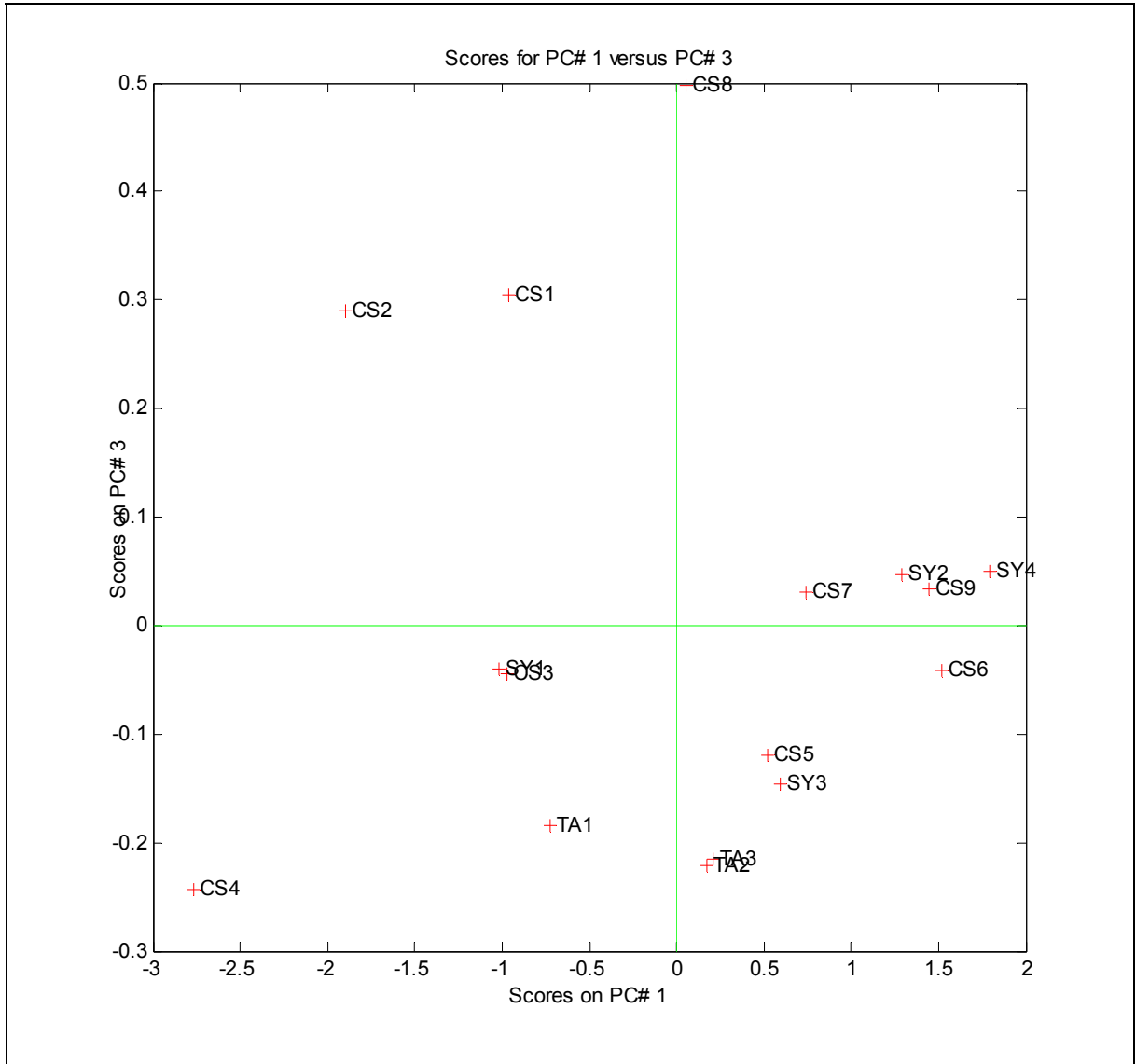


Figura 19. PC1xPC3 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de vinhos.

Através do PC4 (Figura 20) é possível observar a separação entre as amostras SY4 (com valores mais negativos) e SY2 (com valores mais positivos) das demais.

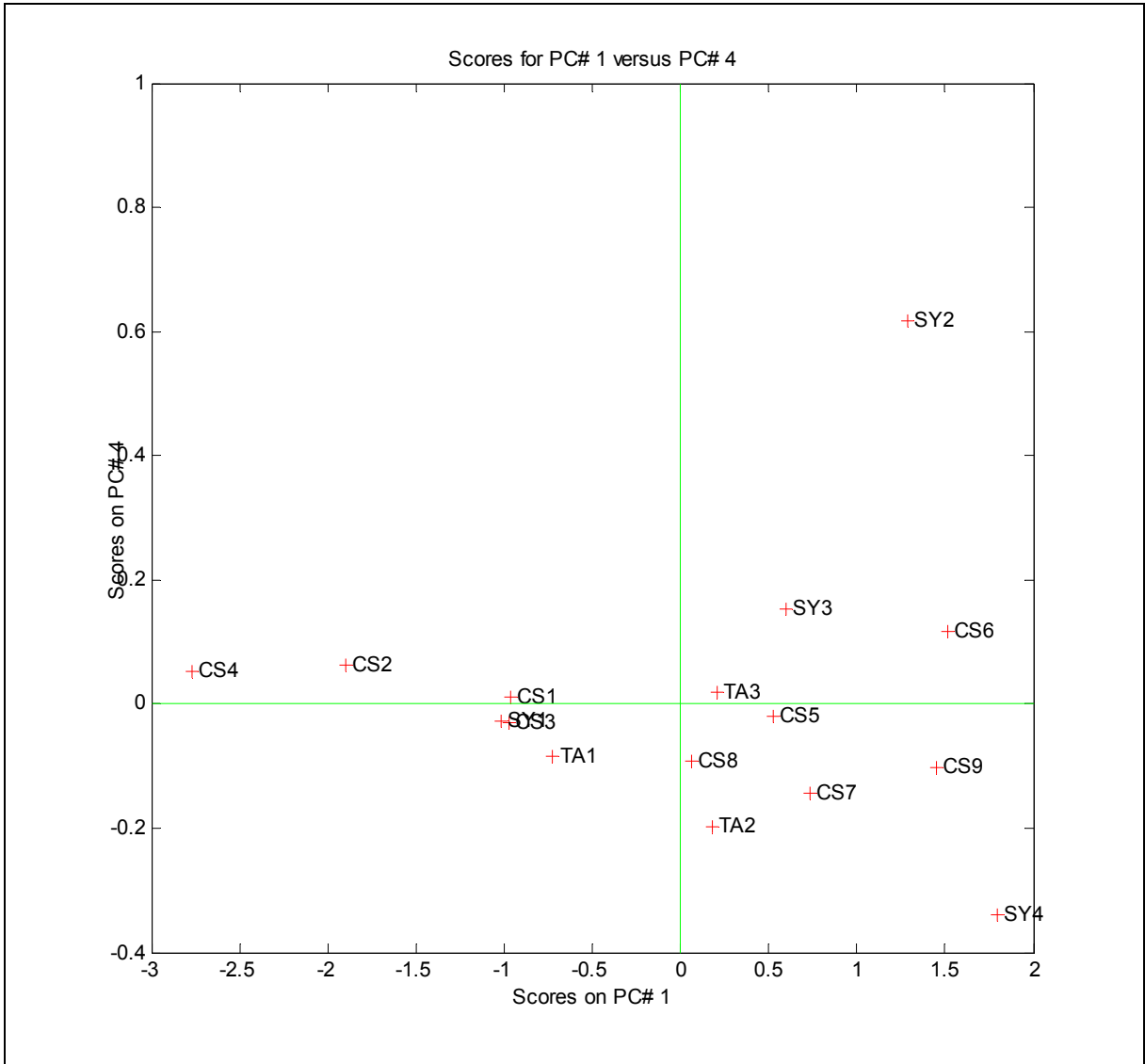
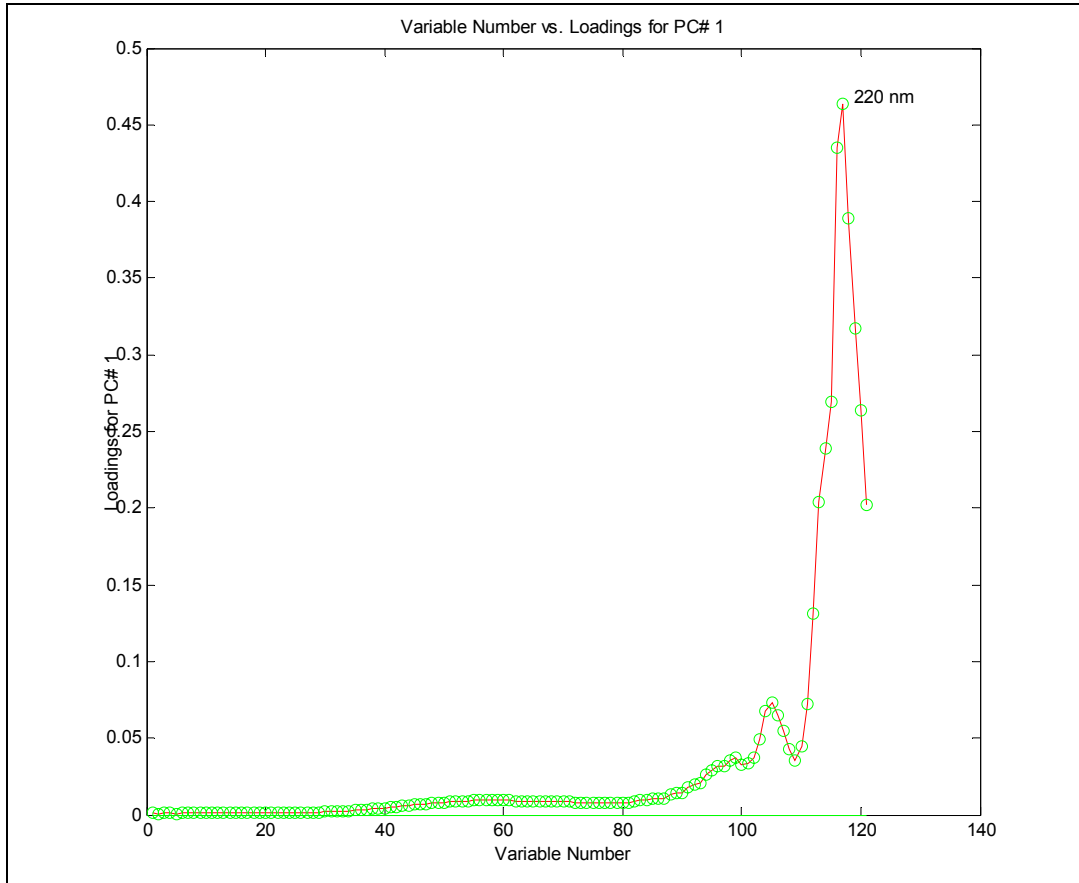
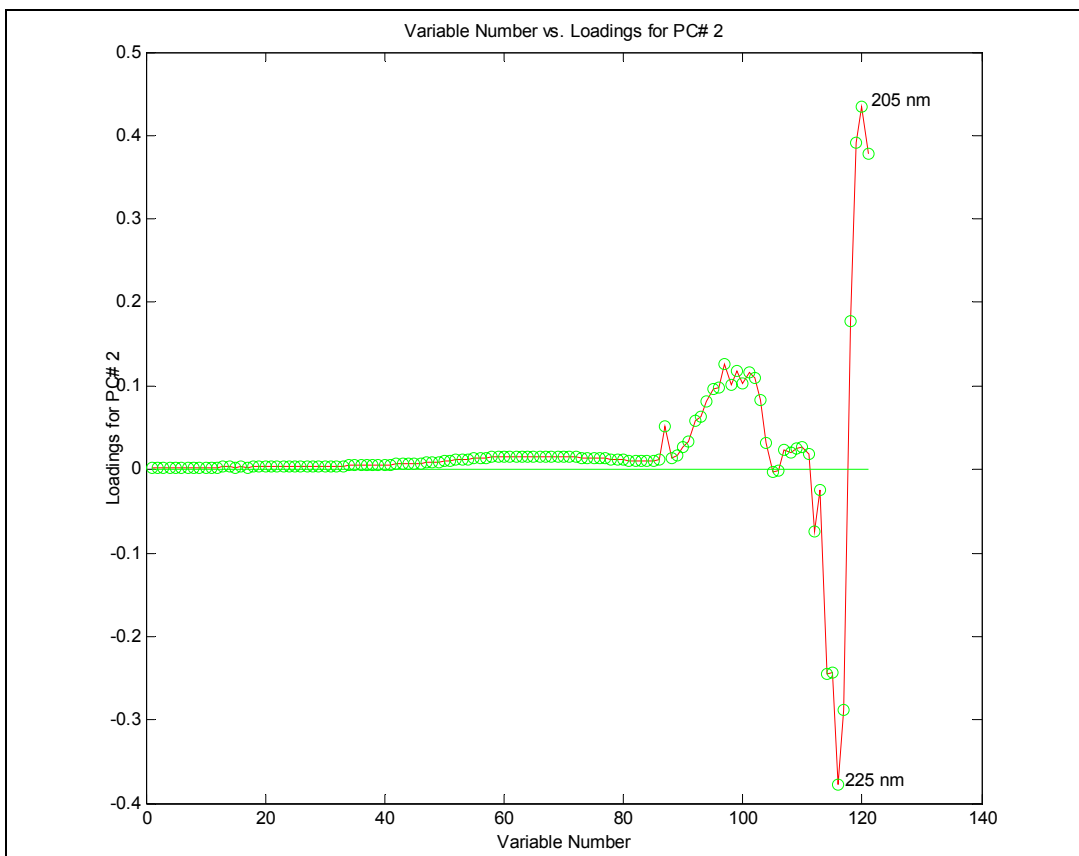
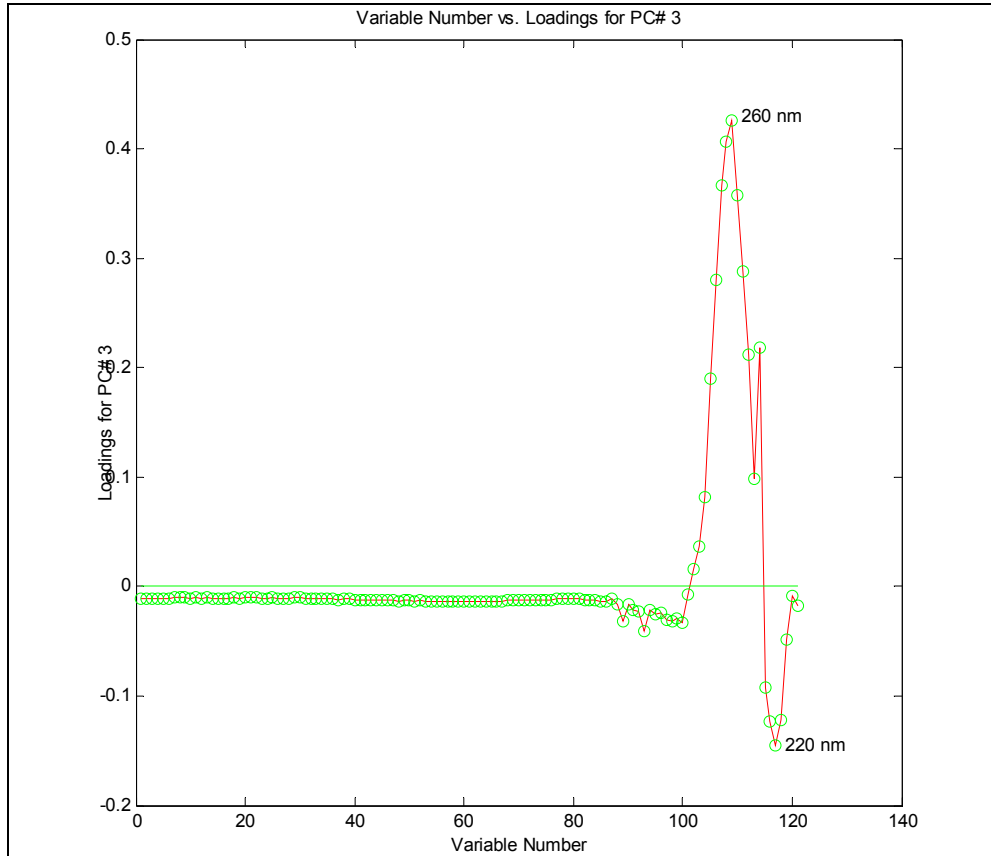
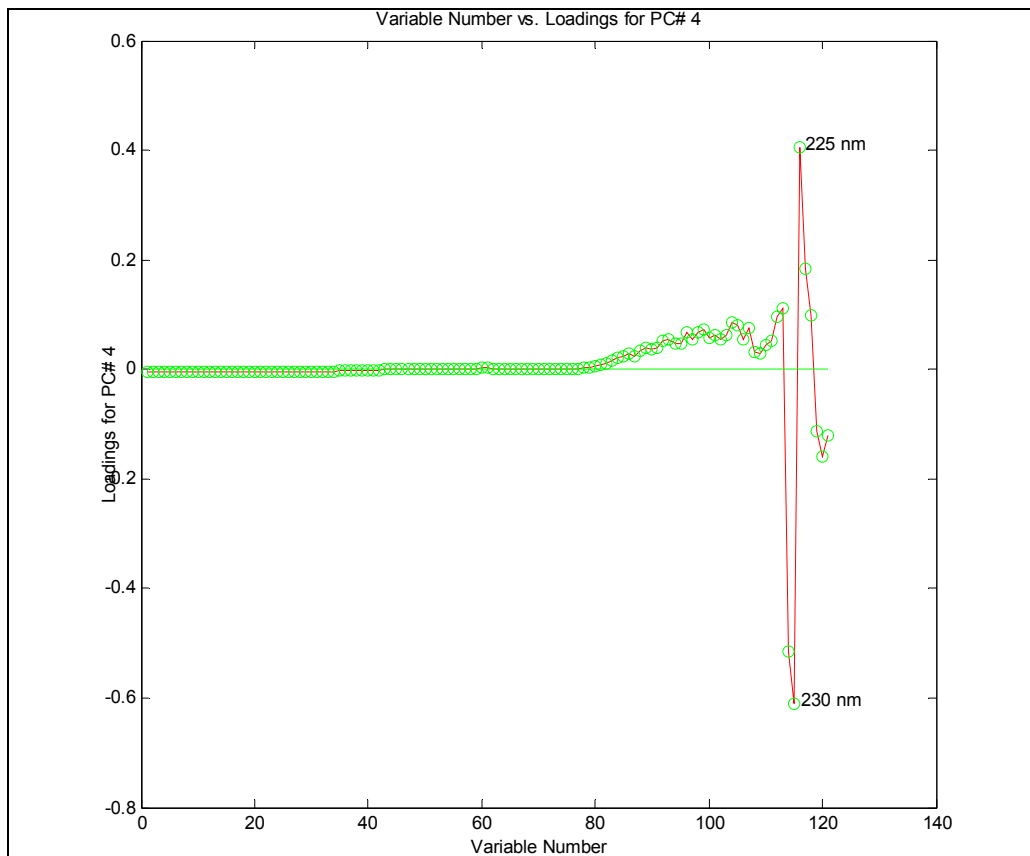


Figura 20. PC1xPC4 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de vinhos.

Os gráficos de *loadings* (Figuras 21 a 24) apresentam os comprimentos de onda que mais influenciam cada componente principal. Na PC3 (Figura 23) é possível observar que o comprimento de onda 260 nm foi responsável por uma influência positiva nesta componente, explicando o agrupamento das amostras já que é uma região onde os compostos fenólicos absorvem a radiação. Já na PC4 (Figura 24), observa-se que o comprimento de onda 230 nm foi responsável por uma influência negativa para o agrupamento das amostras.

Figura 21. *Loadings para PC1.*Figura 22. *Loadings para PC2.*

Figura 23. *Loadings para PC3.*Figura 24. *Loadings para PC4.*

6.3 ANÁLISE UNIVARIADA DAS AMOSTRAS

A Tabela 6 apresenta as absorvâncias encontradas nas leituras da amostra CS6 pura e adicionada dos padrões, no comprimento de onda de 305 nm.

Tabela 6. Leituras observadas para a adição de padrão na amostra CS6, em comprimento de onda de 305 nm.

Concentração do padrão (C_p) adicionado (mg/l)	Absorbância
0,000	0,334310627
0,100	0,433061461
0,200	0,449195841
0,300	0,520384139
0,400	0,535611247
0,500	0,523081928
0,600	0,607204685
0,700	0,64357783
0,800	0,69033366
0,900	0,733912783
1,000	0,721151749

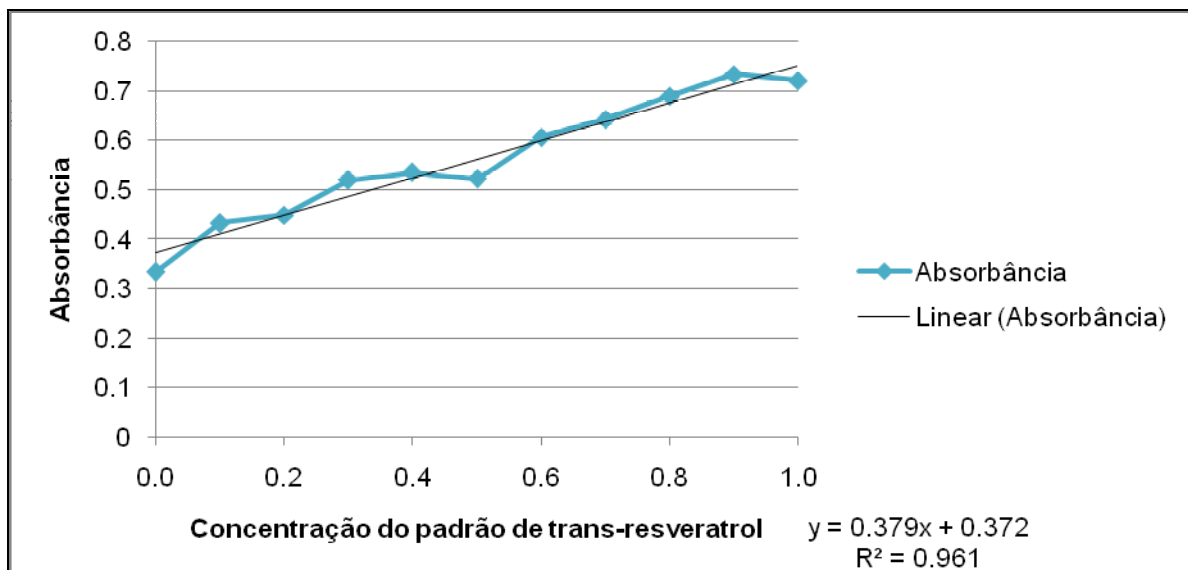


Figura 25. Curva de concentração x Absorbância do método de adição de padrão para a amostra CS6 no comprimento de onda de 305 nm.

A Figura 25 mostra a curva obtida a partir das absorvâncias encontradas para a adição do padrão à amostra CS6. Pode-se observar a partir desta curva uma grande correlação entre as absorvâncias e concentrações dos padrões, uma vez que o valor de R-quadrado ($R^2 = 0,961$) se aproxima a 1.

Ao aplicar-se a equação da reta ($y = 0,379x + 0,372$) para determinação da concentração negativa de resveratrol na amostra CS6 quando a absorvância (y) cai a zero, foi encontrado um valor de 98,15 mg/L.

As absorvâncias encontradas nas leituras da amostra SY3 pura diluída e adicionada dos padrões, no comprimento de onda de 305 nm estão listadas na Tabela 7.

Tabela 7. Leituras observadas para a adição de padrão na amostra SY3, em comprimento de onda de 305 nm.

Concentração do padrão (C_p) adicionado (mg/l)	Absorvância
0,000	0,330501103
0,100	0,459933654
0,200	0,46336747
0,300	0,503104277
0,400	0,550103554
0,500	0,530099353
0,600	0,63023139
0,700	0,659909173
0,800	0,730672283
0,900	0,736410654
1,000	0,736188768

A Figura 26 mostra a curva obtida a partir das absorvâncias encontradas para a adição do padrão à amostra SY3. Pode-se observar a partir desta curva uma grande correlação entre as absorvâncias e concentrações dos padrões, uma vez que o valor de R-quadrado ($R^2 = 0,947$) se aproxima a 1.

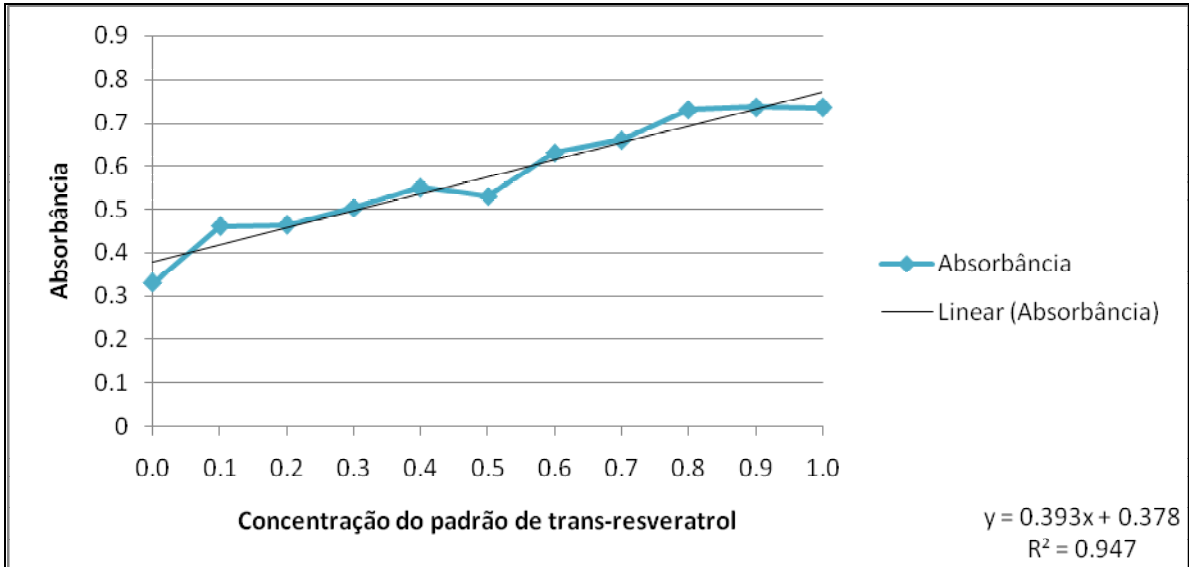


Figura 26. Curva de concentração x Absorbância do método de adição de padrão para a amostra SY3 no comprimento de onda de 305 nm.

Ao aplicar-se a equação da reta ($y = 0,393x + 0,378$) para determinação da concentração negativa de resveratrol na amostra SY3 quando a absorbância (y) cai a zero, foi encontrado um valor de 96,18 mg/L.

Na Tabela 8 são apresentadas as absorbâncias encontradas nas leituras da amostra TA2 pura e adicionada dos padrões, no comprimento de onda de 305 nm.

Tabela 8. Leituras observadas para a adição de padrão na amostra TA2, em comprimento de onda de 305 nm.

Concentração do padrão (C_p) adicionado (mg/l)	Absorbância
0,000	0,256018761
0,100	0,391618401
0,200	0,404896284
0,300	0,45138678
0,400	0,472197485
0,500	0,464439211
0,600	0,538562077
0,700	0,570069971
0,800	0,593449135
0,900	0,589578955
1,000	0,64196081

A Figura 27 mostra a curva obtida a partir das absorvâncias encontradas para a adição do padrão à amostra TA2. Pode-se observar a partir desta curva uma grande correlação entre as absorvâncias e concentrações dos padrões, uma vez que o valor de R-quadrado ($R^2 = 0,926$) se aproxima a 1.

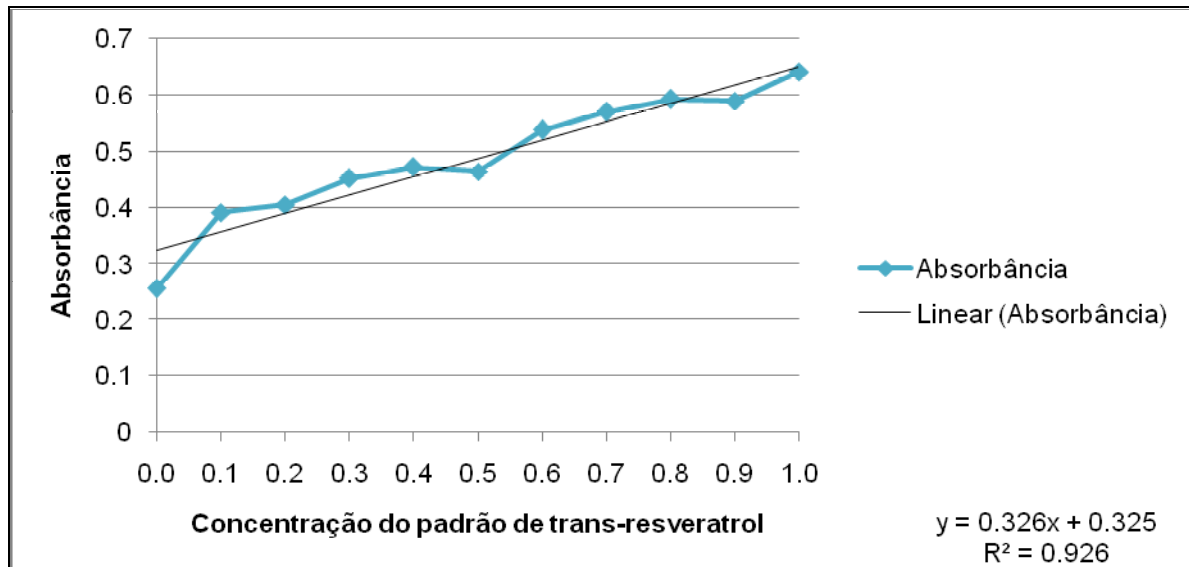


Figura 27. Curva de concentração x Absorvância do método de adição de padrão para a amostra TA2 no comprimento de onda de 305 nm.

Ao aplicar-se a equação da reta ($y = 0,326x + 0,325$) para determinação da concentração negativa de resveratrol na amostra TA2 quando a absorvância (y) cai a zero, foi encontrado um valor de 99,69 mg/L.

Considerando que os teores encontrados nas amostras a partir da análise univariada dos dados, pelo método da adição do padrão e leitura em um único comprimento de onda, encontram-se muito acima dos valores descritos na literatura para teores de *trans*-resveratrol em vinhos (1,0 a 14,0 mg/L), é provável que esses teores sejam referentes a outros compostos fenólicos presentes nas amostras, como a quercetina e kaempferol. Isso leva à uma superposição de bandas de absorção e, conseqüentemente, interferências nos resultados. Estes valores podem representar o teor de fenólicos totais, não somente de resveratrol.

6.4 MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR PLS E RLM

O PLS consiste de dois passos, denominados de calibração e validação. No passo de calibração o software estima a relação entre os espectros e as concentrações do conjunto de amostras padrões. No passo de validação o software avalia a capacidade do modelo de realizar determinações, isto é, a sua capacidade preditiva.

A curva do modelo PLS foi construída usando como variáveis independentes os espectros de absorção no UV-VIS na faixa de absorção do resveratrol (375 – 265 nm) e como variáveis dependentes as concentrações adicionadas dos padrões. Para esta curva foram utilizados os espectros obtidos pelas leituras das soluções padrões de *trans*-resveratrol (Tabela 2) (Figura 28) e das soluções de vinhos puras diluídas e aditivadas com o padrão (Tabela 4) para as amostras de vinhos CS6, SY3 e TA2 (Figuras 29 a 31).

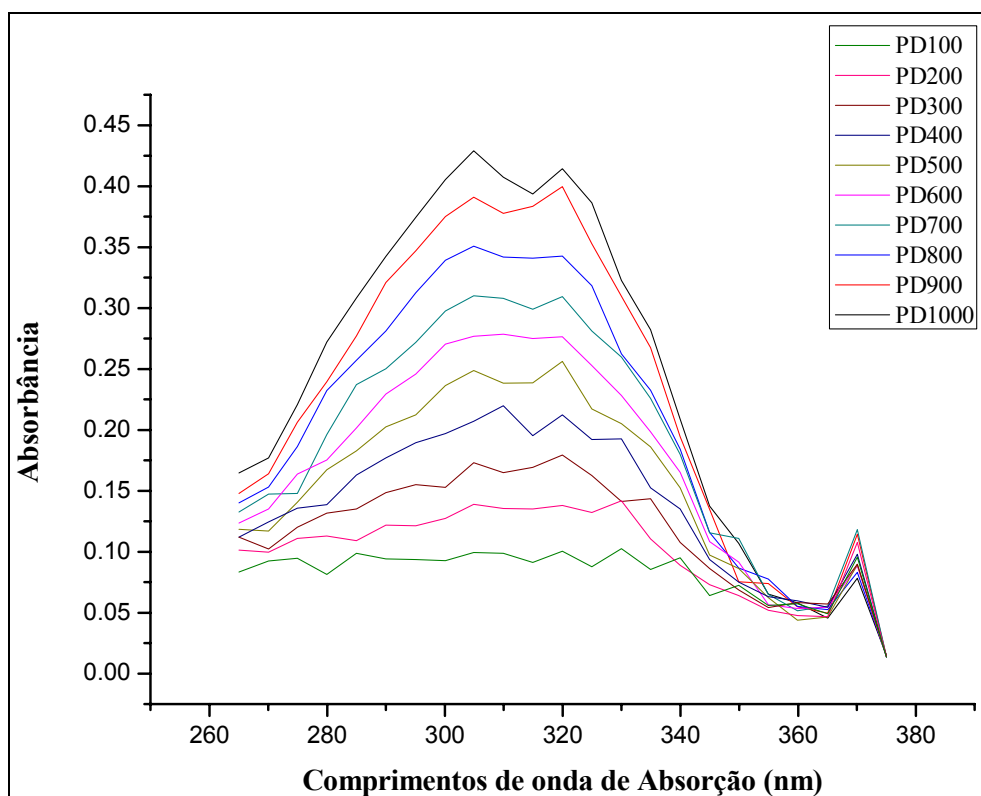


Figura 28. Espectros dos padrões de *trans*-resveratrol em etanol de 100–1000 µg/L, na faixa de 265-375 nm.

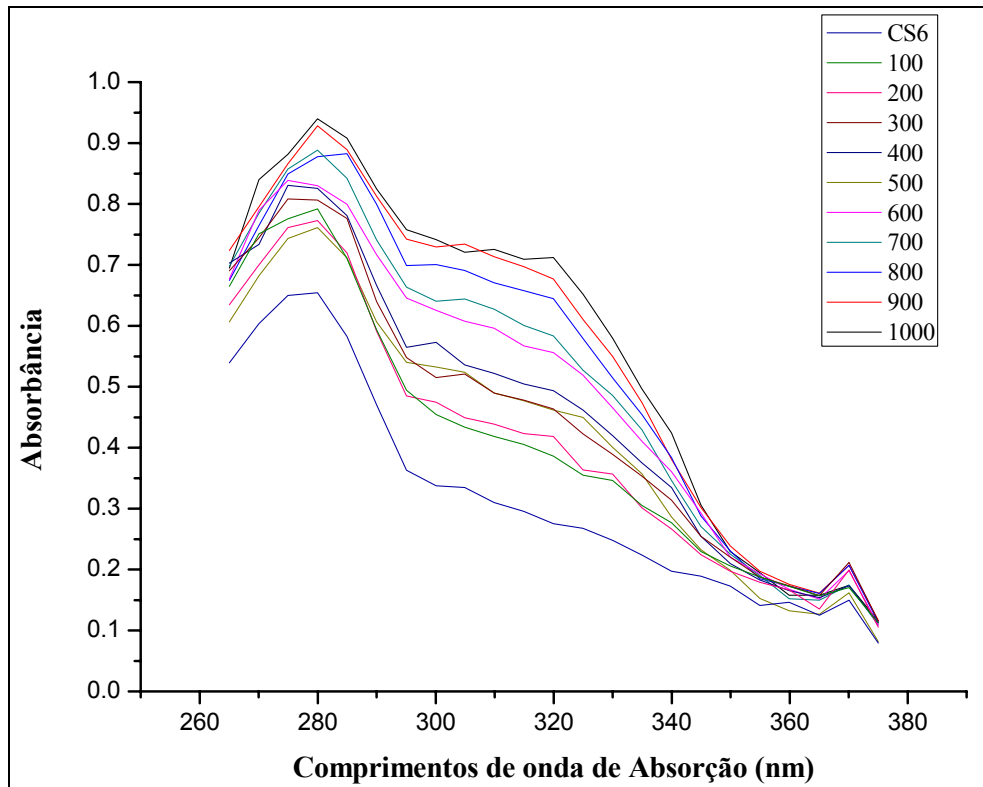


Figura 29. Espectros da amostra CS6 pura diluída e com adição dos padrões de *trans*-resveratrol em etanol de 100–1000 $\mu\text{g/L}$, na faixa de 265–375 nm.

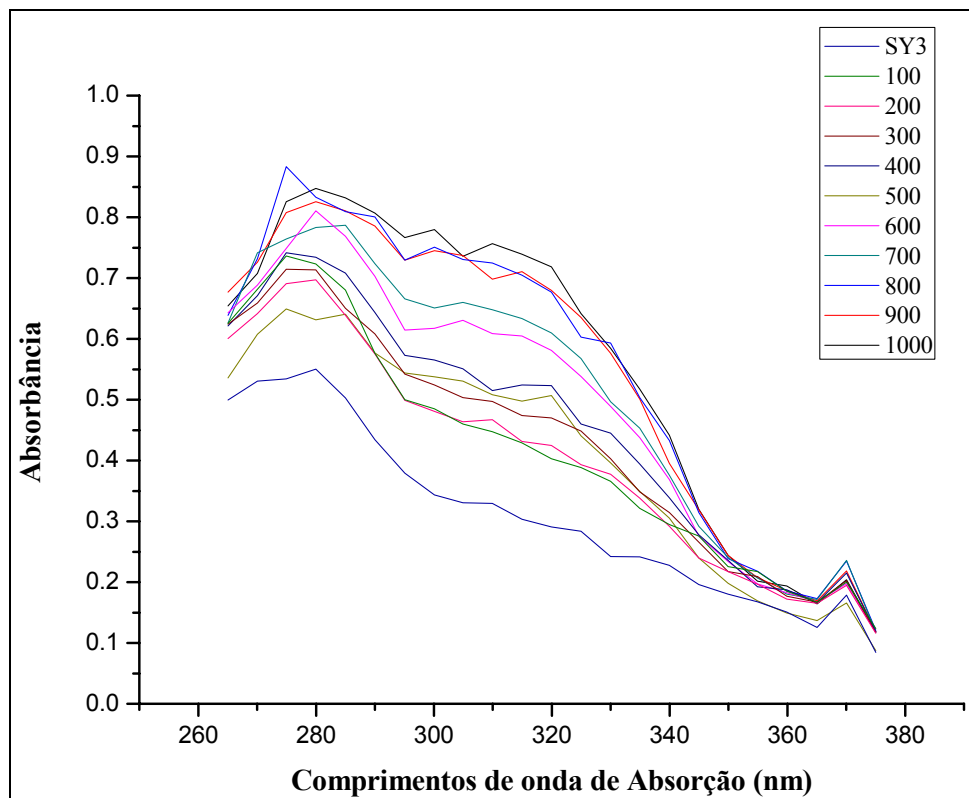


Figura 30. Espectros da amostra SY3 pura diluída e com adição dos padrões de *trans*-resveratrol em etanol de 100–1000 $\mu\text{g/L}$, na faixa de 265–375 nm.

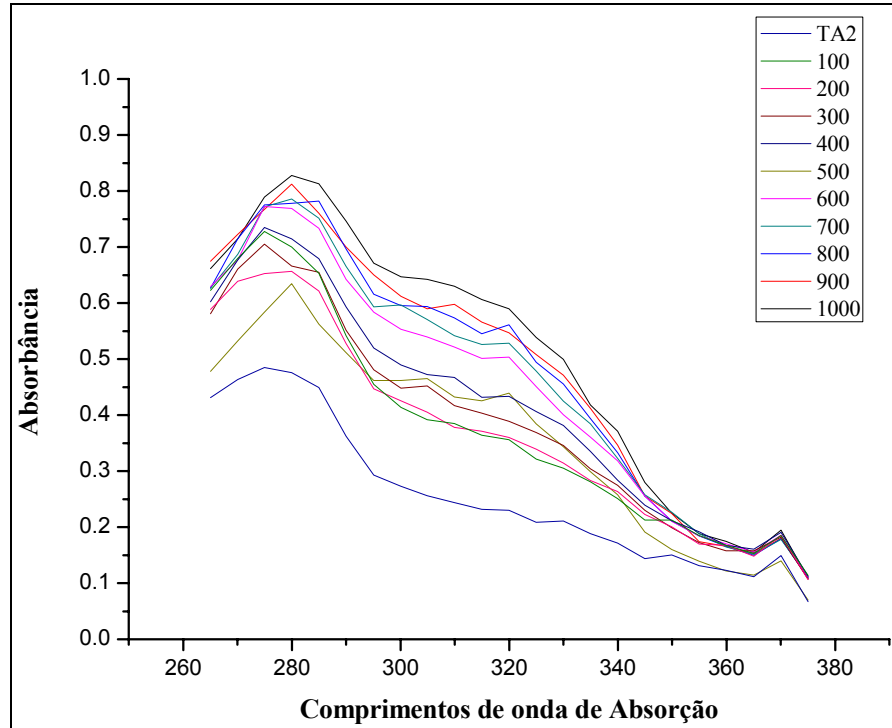


Figura 31. Espectros da amostra TA2 pura diluída e com adição dos padrões de *trans*-resveratrol em etanol de 100–1000 µg/L, na faixa de 265-375 nm.

A Figura 32 apresenta a curva do modelo PLS construído utilizando as soluções padrões de resveratrol na faixa de 100-1000 µg/L. O gráfico mostra a validação do modelo PLS através da validação cruzada, feita pelo software Unscrambler®, que é mostrada como uma linha vermelha. Quanto mais próxima a linha azul (calibração) estiver da linha vermelha (validação) mais eficiente o modelo.

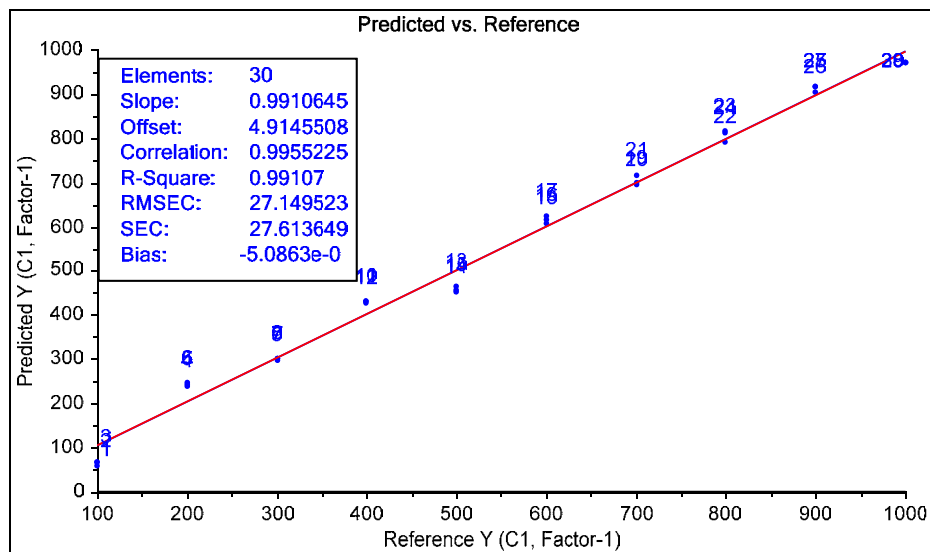


Figura 32. Modelo PLS construído com espectros das soluções de padrões de resveratrol na faixa de 100-1000 µg/L.

Para a construção dos modelos (PLS e RLM) para as amostras CS6, SY3 e TA2 aditivadas de padrão, utilizou-se como padrões de calibração as concentrações 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

As Figuras 33 e 34 mostram a validação dos modelos PLS e RLM, respectivamente, através da validação cruzada, da amostra CS6 aditivada do padrão nas concentrações entre 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

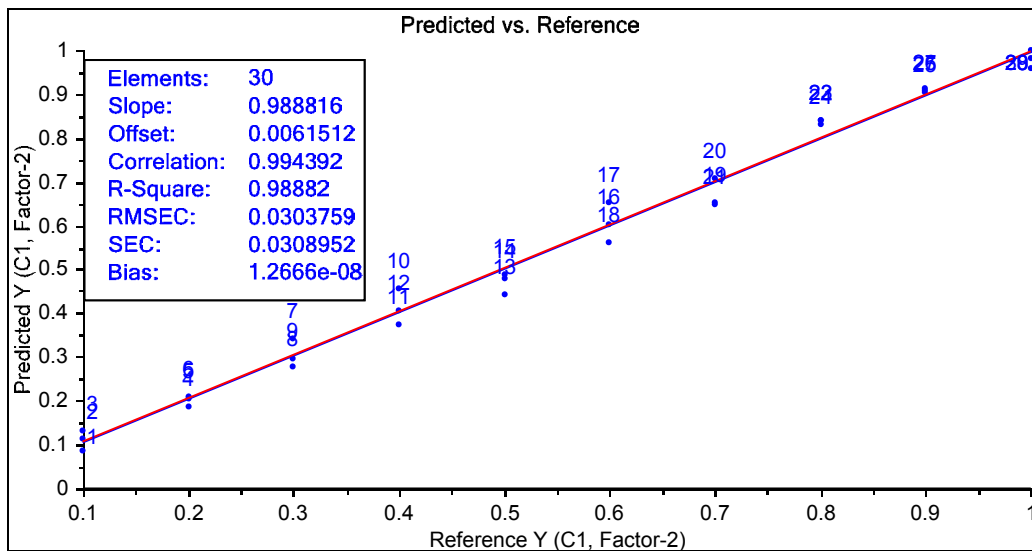


Figura 33. Modelo PLS construído com espectros da amostra CS6 + adição de padrão na faixa de 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

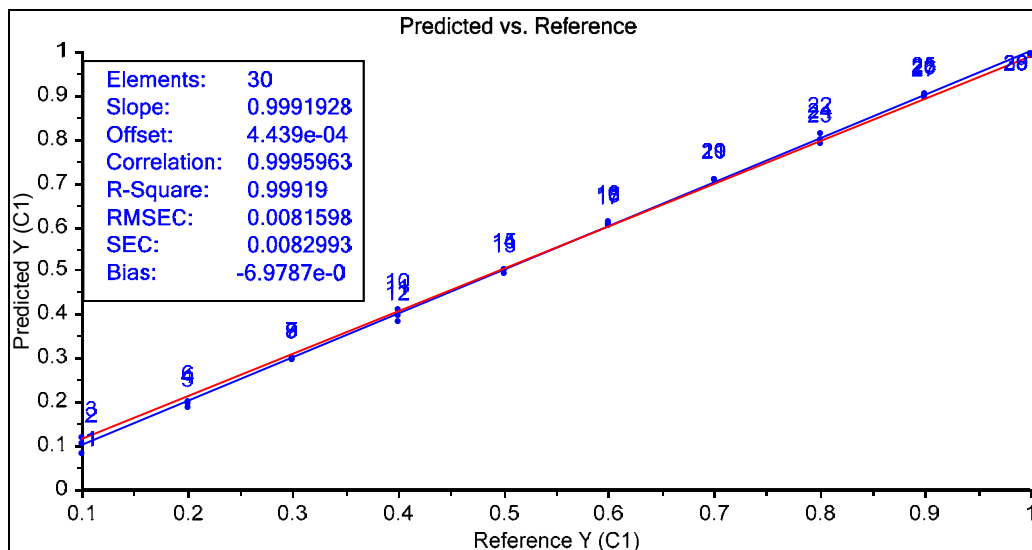


Figura 34. Modelo RLM construído com espectros da amostra CS6 + adição de padrão na faixa de 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

Os coeficientes de correlação de 0,9944 para o PLS e de 0,9996 para o

RLM mostram a forte correlação entre os dados da análise espectrofotométrica e os dados das concentrações adicionadas dos padrões. As variáveis dependentes e independentes estão perfeitamente correlacionadas positivamente movendo-se essencialmente em perfeita proporção na mesma direção.

Os valores de R-quadrado de 0,98882 para o PLS e de 0,99919 para o RLM (ambos próximos a 1) indicam uma forte relação entre as duas variáveis (espectros de absorção e concentrações dos padrões).

Os coeficientes angulares (*slope*) das retas de 0,988816 para o PLS e de 0,99919 para o RLM (ambos próximos a 1), indicam que os ângulos são de 45° sinalizando a eficiência dos modelos nas predições das concentrações. Já os baixos valores dos coeficientes lineares (*offset*) de 0,00615 para o PLS e de 0,0004439 para o RLM, indicam pouca ocorrência de erros determinados na predição pelos modelos desde quando os coeficientes lineares representam a intercepção da reta dos modelos, ou seja, o valor que Y (predito) terá quando Y (referência) é zero.

Todos esses fatores demonstram uma maior eficiência do modelo de calibração quando se utiliza a regressão linear múltipla.

A concentração de resveratrol da solução de vinho CS6 foi predita pelo modelo PLS como - 44,5 µg/L (Tabela 9). O modelo prediz uma concentração negativa, devido ao fato de ser construído pelo método da adição de padrão e considerar como variáveis dependentes apenas as concentrações adicionadas dos padrões. A absorção no UV-VIS de cada padrão é devida não só à absorção do resveratrol adicionado, mas, também devido à concentração de resveratrol na amostra e ao efeito dos interferentes. O método corrige este último efeito porque as diferentes concentrações dos padrões são adicionadas a volumes iguais de amostra, permitindo que qualquer interferente presente na amostra afete de forma similar o padrão. Considerando que a solução de vinho foi preparada na concentração de 1 mL de vinho para 100 mL de etanol, a concentração de resveratrol da amostra de vinho é de 4450 µg/L, o que corresponde a 4,450 mg/L.

Tabela 9. Concentrações preparadas e preditas pelo modelo PLS para a amostra CS6.

Número do padrão no PLS	Concentração preparada (mg/L)	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
-	-	-0.0445	0.0177
1	0,100	0,1121	0,0153
2	0,200	0,2011	0,0131
3	0,300	0,3054	0,0124
4	0,400	0,4122	0,0168
5	0,500	0,4691	0,0162
6	0,600	0,6070	0,0179
7	0,700	0,6690	0,0159
8	0,800	0,8375	0,0165
9	0,900	0,9077	0,0231
10	1,000	0,9789	0,0211

Pelo modelo RLM, a concentração de resveratrol predita para a solução de vinho CS6 foi de - 63,4 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 10). Considerando a diluição do vinho nessa solução, a concentração de resveratrol da amostra de vinho é de 6340 $\mu\text{g/L}$, o que corresponde a 6,340 mg/L.

Tabela 10. Concentrações preparadas e preditas pelo modelo RLM para a amostra CS6.

Número do padrão no PLS	Concentração preparada (mg/L)	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
-	-	-0.0634	0.0146
1	0,100	0,1022	0,0117
2	0,200	0,1955	0,0121
3	0,300	0,2983	0,0118
4	0,400	0,3975	0,0123
5	0,500	0,4989	0,0124
6	0,600	0,6085	0,0124
7	0,700	0,7066	0,0123
8	0,800	0,8014	0,0123
9	0,900	0,8984	0,0125
10	1,000	0,9927	0,0125

As Figuras 35 e 36 mostram a validação dos modelos PLS e RLM, respectivamente, através da validação cruzada, da amostra SY3 aditivada do padrão nas concentrações entre 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

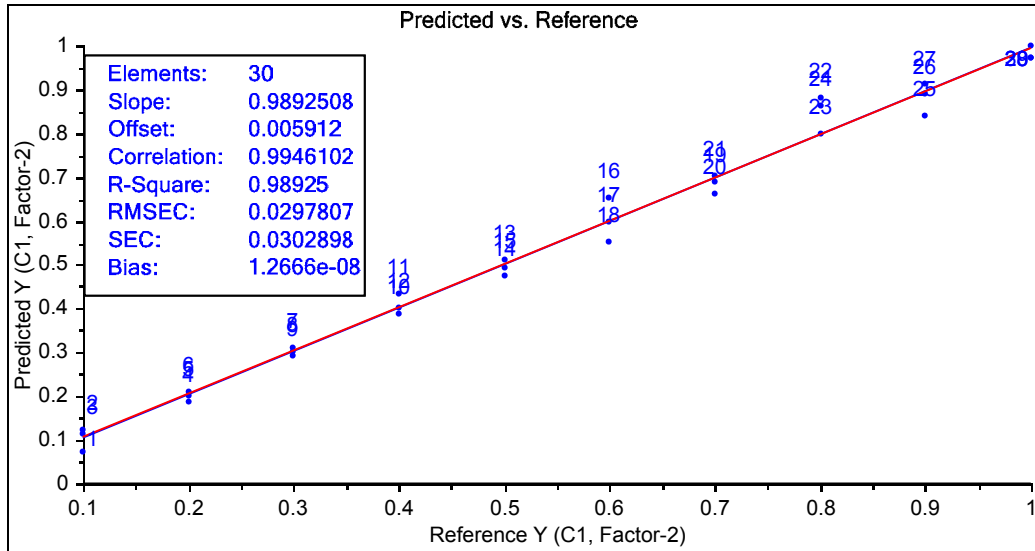


Figura 35. Modelo PLS construído com espectros da amostra SY3 + adição de padrão na faixa de 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

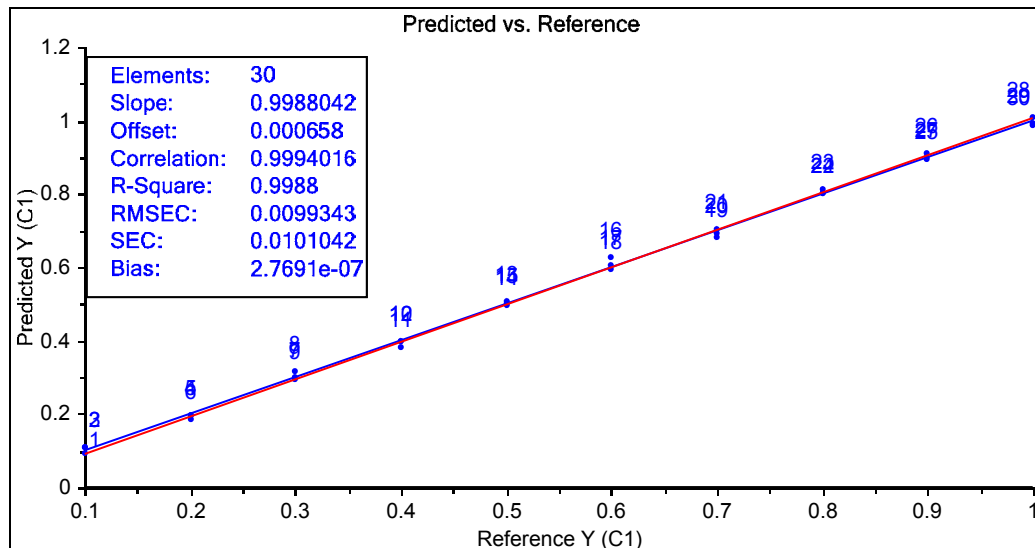


Figura 36. Modelo RLM construído com espectros da amostra SY3 + adição de padrão na faixa de 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

Os coeficientes de correlação de 0,9946 para o PLS e de 0,9994 para o RLM mostram a forte correlação entre os dados da análise espectrofotométrica e os dados das concentrações adicionadas dos padrões. As variáveis dependentes e independentes estão perfeitamente correlacionadas positivamente movendo-se essencialmente em perfeita proporção na mesma direção.

Os valores de R-quadrado de 0,98925 para o PLS e de 0,9988 para o RLM (ambos próximos a 1) indicam uma forte relação entre as duas variáveis (espectros de absorção e concentrações dos padrões).

Os coeficientes angulares (*slope*) das retas de 0,9892508 para o PLS e de 0,9988042 para o RLM (ambos próximos a 1), indicam que os ângulos são de 45° sinalizando a eficiência dos modelos nas predições das concentrações. Já os baixos valores dos coeficientes lineares (*offset*) de 0,00591 para o PLS e de 0,000658 para o RLM, indicam pouca ocorrência de erros determinados na predição pelos modelos.

Todos esses fatores demonstram uma maior eficiência do modelo de calibração quando se utiliza a regressão linear múltipla.

A concentração de resveratrol da solução de vinho SY3 foi predita pelo modelo PLS como - 2,9 µg/L (Tabela 11). Considerando que a solução de vinho foi preparada na concentração de 1 mL de vinho para 100 mL de etanol, a concentração de resveratrol da amostra de vinho é de 290 µg/L, o que corresponde a 0,290 mg/L.

Tabela 11. Concentrações preparadas e preditas pelo modelo PLS para a amostra SY3.

Número do padrão no PLS	Concentração preparada (mg/L)	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
-	-	-0,0029	0,0179
1	0,100	0,1041	0,0135
2	0,200	0,2000	0,0124
3	0,300	0,3018	0,0140
4	0,400	0,4071	0,0132
5	0,500	0,4934	0,0147
6	0,600	0,5997	0,0169
7	0,700	0,6851	0,0162
8	0,800	0,8474	0,0193
9	0,900	0,8807	0,0165
10	1,000	0,9807	0,0161

Pelo modelo RLM, a concentração de resveratrol predita para a solução de vinho SY3 foi de - 1,0 µg/L (Tabela 12). Considerando a diluição do vinho nessa solução, a concentração de resveratrol da amostra de vinho é de 100 µg/L, o que corresponde a 0,100 mg/L.

Tabela 12. Concentrações preparadas e previstas pelo modelo RLM para a amostra SY3.

Número do padrão no PLS	Concentração preparada (mg/L)	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
-	-	-0,0010	0,0142
1	0,100	0,1044	0,0138
2	0,200	0,1919	0,0137
3	0,300	0,3037	0,0138
4	0,400	0,3915	0,0137
5	0,500	0,4972	0,0136
6	0,600	0,6069	0,0140
7	0,700	0,6949	0,0138
8	0,800	0,8067	0,0146
9	0,900	0,9041	0,0138
10	1,000	0,9939	0,0143

As Figuras 37 e 38 mostram a validação dos modelos PLS e RLM, respectivamente, através da validação cruzada, da amostra TA2 aditivada do padrão nas concentrações entre 100-1000 µg/L.

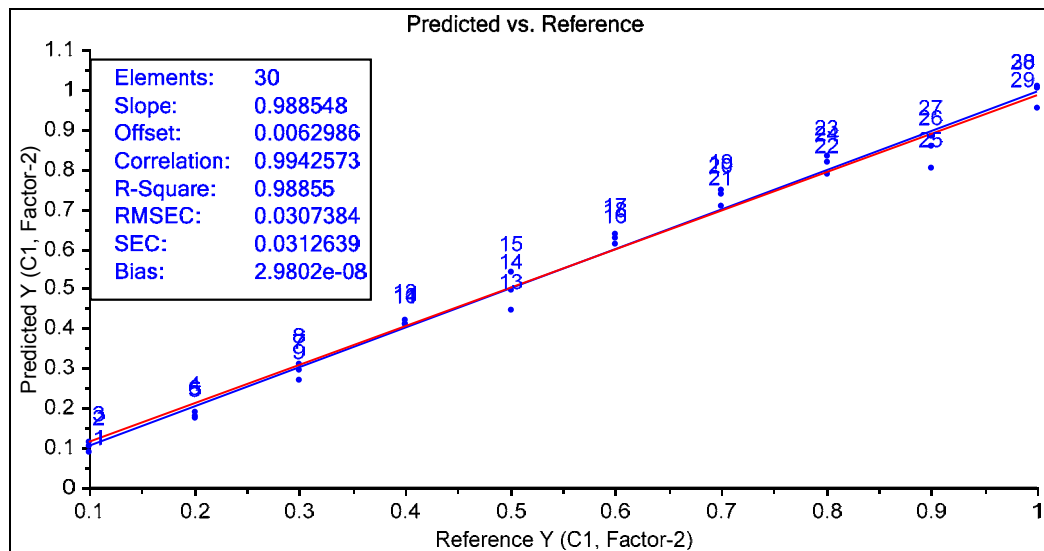


Figura 37. Modelo PLS construído com espectros da amostra TA2 + adição de padrão na faixa de 100-1000 µg/L.

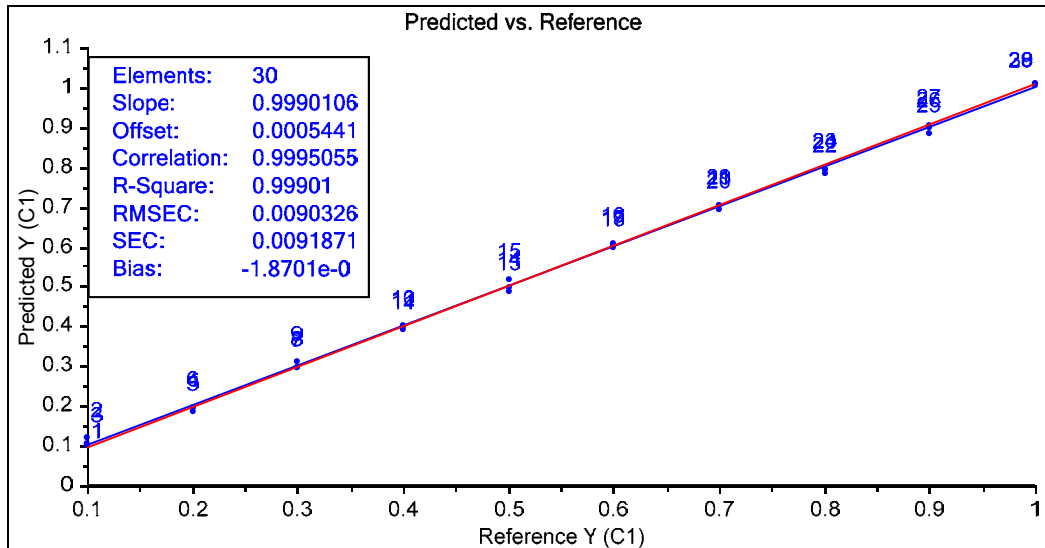


Figura 38. Modelo RLM construído com espectros da amostra TA2 + adição de padrão na faixa de 100-1000 $\mu\text{g/L}$.

Os coeficientes de correlação de 0,9943 para o PLS e de 0,9995 para o RLM mostram a forte correlação entre os dados da análise espectrofotométrica e os dados das concentrações adicionadas dos padrões. As variáveis dependentes e independentes estão perfeitamente correlacionadas positivamente movendo-se essencialmente em perfeita proporção na mesma direção.

Os valores de R-quadrado de 0,98855 para o PLS e de 0,9990 para o RLM (ambos próximos a 1) indicam uma forte relação entre as duas variáveis (espectros de absorção e concentrações dos padrões).

Os coeficientes angulares (*slope*) das retas de 0,98855 para o PLS e de 0,99901 para o RLM (ambos próximos a 1), indicam que os ângulos são de 45° sinalizando a eficiência dos modelos nas predições das concentrações. Já os baixos valores dos coeficientes lineares (*offset*) de 0,006299 para o PLS e de 0,000544 para o RLM, indicam pouca ocorrência de erros determinados na predição pelos modelos.

Todos esses fatores demonstram uma maior eficiência do modelo de calibração quando se utiliza a regressão linear múltipla.

A concentração de resveratrol da solução de vinho TA2 foi predita pelo modelo PLS como - 180,9 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 13). Considerando que a solução de vinho foi preparada na concentração de 1 mL de vinho para 100 mL de etanol, a concentração de resveratrol da amostra de vinho é de 18090 $\mu\text{g/L}$, o que corresponde a 18,090 mg/L.

Tabela 13. Concentrações preparadas e preditas pelo modelo PLS para a amostra TA2.

Número do padrão no PLS	Concentração preparada (mg/L)	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
-	-	-0,1809	0,0229
1	0,100	0,1041	0,0158
2	0,200	0,1839	0,0167
3	0,300	0,2922	0,0156
4	0,400	0,4144	0,0149
5	0,500	0,4953	0,0164
6	0,600	0,6272	0,0160
7	0,700	0,7311	0,0173
8	0,800	0,8129	0,0202
9	0,900	0,8497	0,0196
10	1,000	0,9891	0,0187

Pelo modelo RLM, a concentração de resveratrol predita para a solução de vinho TA2 foi de - 134,6 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 14). Considerando a diluição do vinho nessa solução, a concentração de resveratrol da amostra de vinho é de 13460 $\mu\text{g/L}$, o que corresponde a 13,460 mg/L.

Tabela 14. Concentrações preparadas e previstas pelo modelo RLM para a amostra TA2.

Número do padrão no PLS	Concentração preparada (mg/L)	Concentração prevista (mg/L)	Desvio (mg/L)
-	-	-0,1346	0,0210
1	0,100	0,1079	0,0132
2	0,200	0,1924	0,0136
3	0,300	0,3023	0,0134
4	0,400	0,3975	0,0135
5	0,500	0,5017	0,0138
6	0,600	0,6021	0,0133
7	0,700	0,7002	0,0136
8	0,800	0,7909	0,0135
9	0,900	0,8974	0,0138
10	1,000	1,0077	0,0137

6.4.1 Predição das Concentrações de Resveratrol nas Amostras

Para a predição das concentrações de resveratrol nas demais amostras, as mesmas foram divididas em três grupos de acordo com as variedades (*Cabernet Sauvignon* – CS; *Syrah* – SY; *Tannat* – TA) e depois foram utilizados os modelos de PLS obtidos das amostras CS6, SY3 e TA2 aditivadas com o padrão para as amostras de mesma variedade.

A Tabela 15 apresenta os valores previstos pelo modelo PLS para as amostras da variedade *Cabernet Sauvignon* (CS). As amostras CS3, CS4, CS5 e CS9 não puderam ter suas concentrações previstas uma vez que apresentaram maior afastamento na PCA em relação à amostra CS6 utilizada na construção do modelo PLS para esta variedade (Figura 18, pág. 47).

Tabela 15. Predições das concentrações de resveratrol para as amostras CS.

Amostra	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
CS1	-0,15421	0,065956
CS2	-0,09218	0,064265
CS3*	0,124526*	0,073392*
CS4*	0,071113*	0,097671*
CS5*	0,184587*	0,055674*
CS6	-0,02667	0,026111
CS7	-0,0745	0,040724
CS8	-0,23238	0,081767
CS9*	0,315981*	0,059733*

* Amostras que não puderam ter suas concentrações preditas devido à variação na matriz utilizada na construção do modelo PLS.

O modelo PLS empregado tem a capacidade de realizar as predições com maior precisão quando as demais amostras apresentam semelhanças com as matrizes utilizadas na sua construção. Considerando as semelhanças demonstradas na PCA (Figura 18, pág. 47) pelas amostras CS6 e CS7 (ambas produzidas na mesma região, Santa Maria da Boa Vista, PE), o modelo apresenta uma maior eficiência na predição das concentrações de resveratrol para estas duas amostras. As concentrações preditas para os vinhos CS6 e CS7 pelo modelo são, respectivamente, 2,7 mg/L e 7,45 mg/L. As concentrações preditas para as amostras CS1, CS2 e CS8 são respectivamente 15,4 mg/L, 9,2 mg/L e 23,3 mg/L. As amostras CS3, CCS4, CS5 e CS9 não puderam ter suas concentrações preditas pelo modelo utilizado devido à variação na matriz utilizada na construção do modelo.

A Tabela 16 apresenta os valores preditos pelo modelo PLS para as amostras da variedade *Syrah* (SY). As amostras SY2 e SY4 apresentaram maior semelhança na PC1 em relação à amostra SY3 utilizada na construção do modelo PLS para esta variedade (Figura 17, pág. 46). As três amostras são produzidas na região Nordeste do Brasil (Bahia e Pernambuco) o que pode explicar essas semelhanças. Desta forma, este modelo tem maior eficiência na predição das concentrações para estas três amostras. As concentrações preditas pelo modelo

para as amostras SY2, SY3 e SY4 são, respectivamente, 3,12 mg/L, 0,29 mg/L e 12,9 mg/L. Para a amostra SY1 o teor predito foi de 1,2 mg/L.

Tabela 16. Predições das concentrações de resveratrol para as amostras SY.

Amostra	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
SY1	-0,01203	0,0495
SY2	-0,03121	0,03254
SY3	-0,00287	0,037267
SY4	-0,1292	0,037925

Na Tabela 17 são apresentados os valores preditos pelo modelo PLS para as amostras da variedade *Tannat* (TA). As amostras TA1 e TA3 apresentaram maior afastamento na PC2 em relação à amostra TA2 utilizada na construção do modelo PLS para esta variedade (Figura 18, pág. 47). Estas duas amostras são provenientes da região Sul do Brasil (Bento Gonçalves, RS), enquanto que a amostra utilizada na construção do modelo é da região Nordeste (Santa Maria da Boa Vista, PE), regiões com grandes diferenças climáticas. Desta forma, este modelo não pode ser utilizado na predição das concentrações das amostras TA1 e TA3. A concentração predita pelo modelo para a amostra TA2 é de 17,2 mg/L.

Tabela 17. Predições das concentrações de resveratrol para as amostras TA.

Amostra	Concentração predita (mg/L)	Desvio (mg/L)
*TA1	0,167334974	0,063552916
TA2	-0,172274321	0,046090566
*TA3	0,166579336	0,054542791

*Amostras que não puderam ter suas concentrações preditas devido à variação na matriz utilizada na construção do modelo PLS.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vinho é uma bebida que acompanha o homem desde os primórdios de sua história. Atualmente, ele apresenta uma importância cultural e comercial significativa, mas é na área da saúde que ele vem despertando interesses especiais.

A composição química dos vinhos tintos, rica em substâncias fenólicas que apresentam atividades antioxidantes, como o *trans*-resveratrol, faz com que ele seja um produto capaz de promover diversos benefícios à saúde humana, como cardioproteção, atividade anti-inflamatória e anticarcinogênica. Entretanto, diversos fatores podem influenciar na qualidade e quantidade de compostos químicos produzidos pelas uvas e, conseqüentemente, interferir nas propriedades organolépticas e medicinais da bebida.

É importante que se possa avaliar a qualidade dos vinhos de forma rápida e sem custos elevados, ainda durante o seu processo de produção, para que desta forma seja possível garantir que o produto, além das propriedades sensoriais desejadas pelos consumidores, possa apresentar uma composição química capaz de trazer os benefícios medicinais já descritos.

As análises químicas realizadas em materiais de origem natural, com composição química bastante complexa, acabam se tornando uma prática dispendiosa, tanto em relação ao tempo quanto ao custo, uma vez que necessitam de diversos tratamentos prévios nas amostras, bem como a associação de diversas técnicas analíticas que, geralmente, levam a um significativo consumo de tempo, equipamentos e pessoal qualificado.

Neste trabalho, foi demonstrado que é possível se economizar tempo e recursos financeiros com o uso da calibração multivariada, associada a métodos espectroscópicos, na avaliação da qualidade de vinhos tintos e na quantificação ou predição de substâncias fenólicas, como o resveratrol.

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV-VIS das 16 amostras de vinhos tintos, foi possível observar que com apenas 4 componentes principais foi possível agrupar amostras com base nas características de variedade

e/ou região de produção. Também foi possível identificar através dos *loadings* os comprimentos de onda responsáveis por esse agrupamento.

Além disso, foi também possível prever o teor de *trans*-resveratrol através de técnicas de calibração multivariada, tais como PLS e RLM. Foram obtidos modelos de calibração PLS e RLM a partir dos espectros de absorção no UV-VIS para as soluções padrões e soluções de vinhos puras e aditivadas com os padrões. Através da análise do coeficiente de correlação, do R-quadrado e do coeficiente angular verificou-se que os modelos construídos foram eficientes para realizar as previsões das concentrações a partir dos espectros de absorção, principalmente para as amostras que apresentaram semelhanças identificadas na PCA com aquelas utilizadas na construção dos modelos. Também foi possível realizar a validação do modelo PLS utilizado, através da validação cruzada feita pelo software Unscrambler®.

A comparação do método multivariado empregado com o univariado sugere uma maior capacidade de previsão das concentrações pelo primeiro, uma vez que apresentou valores mais próximos daqueles descritos na literatura. A confirmação desta capacidade em prever os valores pode ser feita pela comparação destes resultados com outros métodos analíticos (como CLAE, por exemplo).

A partir da quantificação de *trans*-resveratrol nas amostras foi possível observar que os vinhos produzidos no Brasil apresentam teores variáveis da substância, a depender da variedade do vinho e da região, entretanto esses teores encontram-se dentro dos limites descritos na literatura e são comparáveis aos valores encontrados em vinhos internacionais.

As dificuldades encontradas na previsão do teor de resveratrol em algumas das amostras analisadas se devem pelas diferenças observadas entre essas amostras e as matrizes empregadas na construção dos modelos de calibração, o que representa a principal limitação do método. Entretanto, essas dificuldades podem ser resolvidas pela construção dos modelos de calibração com base nas semelhanças observadas pelos grupos de amostras na PCA.

REFERÊNCIAS

ABDI, H.; WILLIAMS, L. Principal component analysis. **Computational Statistics**, v. 2, n. 4, p. 433-459, Julho/Agosto 2010.

AGUIAR, C. **Botânica para ciências Agrárias e do Ambiente**. Volume III. Instituto Politécnico de Bragança. Escola Superior Agrária de Bragança. 2012.

AMAKURA, Y.; OKADA, M.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 891, p. 183-188, 2000.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**, v. 4. 2ª reimpressão. Editora Blucher. São Paulo, 2008.

ARAÚJO, M. C. U.; SALDANHA, T. C. B.; GALVAO, R. K. H.; YONEYAMA, T.; CHAME, H. C.; VISANI, V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 57, n. 2, p. 65-73, 2001.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. 1ª ed. John Wiley & Sons, New York, 1997.

BELGUENDOZ, L.; FREMONT, L.; LINARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 9, p. 1347-1355, 1997.

BIRSE, M.J. **The color of red wine**. 2007. Tese de Doutorado. The University of Adelaide. School of Agriculture, Food & Wine. Faculty of Sciences.

BRADAMANTE, S.; BARRENGHI L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. **Cardiovascular Drug Reviews** v. 22, n. 3, p. 169-188, 2004.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de Química Farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CATTLE, R.D. The scree test for the number of factors. **Multivariate Behavioral Research**, v. 1, n. 2, p. 245-276, 1966.

CHAN, M. M-Y.; MATTIACCI, J. A.; HWAGANG, H. S.; SLIAH, A.; FONG, D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 10, p. 1539-1548, 2000.

CÔCCO, L.C. **Previsão de propriedades físico-químicas e composição química da gasolina a partir de espectros no infravermelho**. Curitiba, 2008, 244p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia - PIPE, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

COELHO-BARROS, E.A.; SIMÕES, P.A.; ACHCAR, J.A.; MARTINEZ, E.Z.; SHIMANO, A.C. Métodos de estimação em regressão linear múltipla: aplicação a dados clínicos. **Revista Colombiana de Estadística**, v. 31, n. 1, p. 111-129, 2008.

CORRER, C.S. **Uso da calibração multivariada na determinação de ácido fólico em forma farmacêutica de uso tópico**. Dissertação de Mestrado. Curitiba 2004. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 142 p.

COSCIONE, A.R. **O uso de calibração multivariada para determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro: aplicação na análise de plantas e solos**. Campinas, 2001. Tese de doutorado. Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

COZZOLINO, D.; CYNKAR, W.U.; SHAH, N.; DAMBERGS, R.G.; SMITH, P.A. A brief introduction to multivariate methods in grape and wine analysis. **International Journal of Wine Research**, v. 1, p. 123-130, 2009.

DAVID, J.M.P.; DAVID, J.P.; SANTOS, V.L.C.S.; SANTOS, M.L.S.; MOTA, M.D. Resveratrol: ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos & Ciência**. Ano 5, n. 10. 2007.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition & Food Research** v.49, n. 5, p.377-395, 2005.

DORRIE, J.; GERAUER, H.; WACHTER, Y.; ZUNINO, S. J. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 12, p. 4731-4739, 2001.

ESTEVEES, E.; SOUSA, C. **Análise de Dados e Planejamento Experimental. Apontamentos para as aulas da disciplina no Curso de Engenharia Alimentar.** Universidade do Algarve. Escola Superior de Tecnologia. Área Departamental Engenharia Alimentar. 36 p. Faro, 2007.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Statistics Division. Disponível em < <http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acessado em 10/10/2012.

FAUSTINO, R. S.; SOBRATTEE, S.; EDEL, A. L.; PIERCE, G. N. Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. **Molecular and Cellular Biochemistry** v. 249, n. 1-2, p. 11-19. 2003.

FERNANDES, F.A. **Efeito do *trans*-resveratrol sobre a longevidade e o metabolismo de glicogênio de *Drosophila melanogaster* em diferentes idades.** Porto Alegre, 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biociências.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, E.T.D.; ROSINA, C.D.; MOCHIUTTI, F.G. **Processo de produção de vinho fino tinto.** IV Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial. Campo Mourão. 2010.

FERREIRA, P. Brasil inova na produção de vinhos tropicais. **Inovação em Pauta.** 2ª edição. 2008. Disponível em: <<http://www.flip3d.com.br/web/pub/finep//index.jsp?edicao=838>>. Acessado em: 10/10/2012.

FISCHER, U.; ROTH, D.; CHRISTMANN, M. The impact of geographic origin, vintage and wine estate on sensory properties of *Vitis vinifera* cv. Riesling wines. **Food Quality and Preference**, v. 10, n. 4-5, p. 281-288, 1999.

FORBES, S.L. **The influence of individual characteristics, product attributes and usage situations on consumer behavior: An exploratory study of the New Zealand, Australian, UK and US wine markets.** Lincoln University, 2008, 198p. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Marketing at Lincoln University.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**, v. 341, n. 8852, p.1103-1104, 1993.

FRANKEL, F. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDRE, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 890-894, 1995.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Science**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. **Cancer Research**, v. 64, n. 1, p. 337-346, 2004.

GALFI, P.; JAKUS, J.; MALMAR, T.; NEOGRADY, S.; CASORDAS, A. Divergent effects of resveratrol, a poly phenolic phytostilbene, on free radical levels and type of cell death induced by the histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 1-3, p. 39-47, 2005.

GASPARETTO, J.C. **Determinação de metabólitos secundários do guaco nas especialidades farmacêuticas xarope e solução oral via CLAE-DAD e CLAE-EM/EM.** Curitiba, 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

GAYTRI, A.; RANA, A.C.; RAMICA, S. An update on pharmacological properties of resveratrol. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 8, p. 56-60, 2012.

GEHM, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P-Y.; JAMESON, J. L. **Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is the agonist for the estrogen receptor.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA v.94, p.1438-1443, 1997.

GUERRA, C. C; CZARNOBAY, A. **A Evolução da Ciência sob a Ótica do Vinho.** In: PROJETO SBPC NA COMUNIDADE, 1. 2000, Santa Mana. Anais Eletrônicos. Santa Mana: SBPC, 2000. Disponível em <<http://www.ufsm.br/antartica/Palestra%205.htm>>. Acesso em: 11 out. 2012.

GUERRERO, R. F.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Wine, Resveratrol and Health: a Review. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 5, p. 635-658, 2009.

HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 365-377, 2003.

ITO, J. A. **Técnicas espectroscópicas em Biofísica.** Caderno de Física da UEFS, v. 3, n. 1, p. 21-29, 2004.

JAITZ, L.; SIEGL, K.; EDER, R.; RAK, G.; ABRANKO, L.; KOELLENSPERGER, G.; HANN, S. LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 366-372, 2010.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5291, p. 218-220, 1997.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à Taxonomia vegetal.** 777 p. 13ª Ed. Companhia Editora Nacional. São Paulo, 2002.

KAISER, H.F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, v. 23, n. 3, p. 187-200, 1958.

KHATTREE, R. & NAIK, D.N. **Multivariate data reduction and discrimination with SAS software.** Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2000. 558 p.

KONDRATYUK, T.P.; PARK, E.J.; MARLER, L.E.; AHN, S.; YUAN, Y.; CHOI, Y.; YU, R.; BREEMEN, R.B.; SUN, B.; HOSHINO, J.; CUSHMAN, M.; JERMIHOV, K.C.; MESECAR, A.D.; GRUBBS, C.J.; PEZZUTO, J.M. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 8, p. 1249-1265, 2011.

LOUARN, G.; GUÉDON, Y.; LECOEUR, J.; LEBON, E. Quantitative analysis of the phenotypic variability of shoot architecture in two grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). **Annals of Botany**, v. 99, n. 3, p. 425-437, 2007.

LUZ, P.L.; TANAKA, L.; BRUM, P.C.; DOURADO, P.M.M.; FAVARATO, D.; KRIEGER, J.E.; LAURINDO, F.R.M. Red wine and equivalent oral pharmacological doses of resveratrol delay vascular aging but do not extend life span in rats. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 1, p. 136-142, 2012.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 380-385, abr.-jun. 2006.

MAYER, A. S.; HEINOMEN, M.; FRANKEL, F. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human DLD oxidation. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 71-75, 1998.

MEIRA, M.; QUINTELLA, C.M.; COSTA NETO P.R.; PEPE, I.M.; SILVA, H.R.G.; TANAJURA, A.S. **Patente tipo PI Nacional em fase de sigilo**, 2010, PI 011100001114.

MEIRA, M.; QUINTELLA, C.M.; TANAJURA, A.A.; SILVA, H.R.G.; FERNANDO, J.E.S.; COSTA NETO, P.R.; PEPE, I.M.; SANTOS, M.A.; NASCIMENTO, L.L.. Determination of the oxidation stability of biodiesel and oils by spectrofluorimetry and multivariate calibration. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 430-434, 2011.

MEIRA, M.; QUINTELLA, C.M.; PEPE, I.M.; COSTA NETO, P.R.; TANAJURA, A.S.; SILVA, H.R.G. Prediction of properties of biodiesel-diesel blends using spectrofluorimetry and multivariate calibration. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 1328-1337, 2012.

MOURA, M. C. S.; LOPES, A. N. C.; MOITA, G. C.; MOITA NETO, J. M.. Estudo Multivariado de Solos Urbanos da Cidade de Teresina. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 429-435, 2006.

MUSTRA, C.J.G.O. **Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metaloides em amostras biológicas: Preparação de amostras por digestão com a tecnologia microondas**. Lisboa, 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina de Lisboa. Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses.

NAKATA,R.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Recent Advances in the Study on Resveratrol. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 273-279, 2012.

NEVES, A.R.; LÚCIO, M.; LIMA, J.L.C.; REIS, S. Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1663-1681, 2012.

NUNES, P.G.A. **Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS e NIR**. João Pessoa, 2008. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.

OAK, M. H.; EL BEDOUI, J.; SCHINI-KERTH, V. B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2005.

PACE-ASCIAK, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, F. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet-aggregation and eicosanoid synthesis - implications for protection against coronary heart-disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, n. 2, p. 207-219, 1995.

PANERO, F. S.; DA SILVA, H. E. B. Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil. **Microchemical Journal**, v. 88, n. 2, p. 194-200, 2008.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 1ª ed. Cengage Learning. 2010, p. 716.

PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H.R. Vinho e Saúde: uma revisão. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, p. 64-67, 2004.

PETROVSKI, G.; GURUSAMY, N.; DAS, D.K. Resveratrol in cardiovascular health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 22-33, 2011.

PHILLIPS, R. **Uma breve história do vinho**. Record. Rio de Janeiro, 2003.

PORGALI, E.; BÜYÜKTUNCEL, E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography

and spectrophotometric methods. **Food Research International**, v. 45, n.1, p. 145-154, 2012.

PROESTOS, C.; BAKOGIANNIS, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A.; KANELLAKI, M.; KOMAITIS, M. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. **Food Control**, v. 16, n. 4, p. 319-323, 2005.

RENAUD, S.; DELORGERIL, M.; RYLANDER, R.; HENNIG, B.; HEIMBURGER, D. The french paradox - dietary factors and cigarette smoking-related health risk. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 686, n. 1, p. 299-309, 1993.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SAGRATINI, G.; MAGGI, F.; CAPRIOLI, G.C.; RICCIUTELLI, M.; TORREGIANI, E.; VITTORII, S. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marche and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME-GC-MS and HPLC-MS. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1592-1599, 2012.

SALDANHA, T.C.B; ARAÚJO, M. C.; BARROS NETO, B. Simultaneous multicomponent analysis by UV-VIS spectrophotometry. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 847-53, 1999.

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, jul.-set. 2005.

SCALBERT, A.; WILLIANSO, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHNEIDER, Y.; VINCENT, F.; DURANTON, B.; BADOLO, L.; GOSSE, F.; BERGMANN, C; SÉLLER, N.; RAUL, F. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 158, n. 1, p. 85-91, 2000.

SCHLEIER, R. **Constituintes fitoquímicos de Vitis vinifera L. (uva)**. Monografia de Especialização. Instituto Brasileiro de estudos homeopáticos. Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo. 2004.

SCREMIN, M. A. A. **Método para a Seleção do Número de Componentes Principais com Base na Lógica Difusa**. Florianópolis, 2003, 124p. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção Universidade Federal de Santa Catarina.

SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 547-556, 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª. ed., Editora LTC, Rio de Janeiro, 2006, 508p.

SIMÕES, C. **Vinhos Medicinais**. In: Roteiro gastronómico de Portugal. 2001. Disponível em <<http://www.gastronomias.com/vinhos-medicinais/>>. Acesso em: 10/10/2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIENAM, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Tradução: Ignez Caracelli et al. 5ª ed. Bookman: Porto Alegre, 2002, 1024p.

SMITH, A. F. M. & VERDINELLI, I. Uma nota sobre Designs Bayes para Inferência utilizando um modelo hierárquico linear. **Biometrika**, v. 67, n. 3, p. 613-619, 1980.

SOUZA, A. M. **Monitoração e ajuste de realimentação em processos produtivos multivariados**. Tese. Doutorado Engenharia de Produção – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 449-457, 2007.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. UFSM, CCNE, 2005. 215 p.

VINADÉ, M. E. C.; VINADÉ, E. R. C., **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**. 1ª ed. UFSM. 2005. 272p.

WATERHOUSE, A. L. Wine and heart disease. **Chemistry & Industry**, p. 338-341, mai.1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998, **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review.**