

**RENATA DOS PASSOS MARASCHIN**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE VINHOS**  
***CABERNET SAUVIGNON***  
**PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA**  
(Ênfase em compostos fenólicos)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para Titulação de Mestrado, junto ao Curso de Biotecnologia - Área de Concentração Agrícola e Florestal, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

**Orientador: Prof. Marcelo Maraschin**

**Co-orientador: Prof. Miguel Soriano  
Balparda Caro**

**FLORIANÓPOLIS**

**2003**

Maraschin, Renata dos Passos

Caracterização química de vinhos Cabernet Sauvignon produzidos na região da Serra Gaúcha, RS. (Ênfase em compostos fenólicos)./Renata dos Passos Maraschin. -- Florianópolis, 2003.

130p.

Dissertação (Mestrado -- Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho ao meu marido, **Marcelo Maraschin**. A ele que devo a abertura dos meus horizontes e o despertar do sol da ciência em minha vida. A ele que me deu a “chance” que eu precisava para demonstrar e desenvolver o meu potencial. A ele que acreditou que eu seria capaz, mesmo quando havia desânimo de minha parte. A ele que me deu a honra de seu amor. A ele dedico todos os sucessos que terei em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de qualquer coisa.

Aos meus pais, Pedro Paulo dos Passos e Maurina Silva dos Passos e ao meu irmão, Rodrigo dos Passos, pelo amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin pela orientação, confiança e companheirismo destinados a mim em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro pela co-orientação e pela amizade.

A Ângela A. Cimadon, Márcio Bonotto e Carlos Zanús pela amizade e pela orientação diferenciada.

A Carla Ianssen, Luiz Felipe Vendrusculo e Paulo Fernando Dias, pela amizade e pelas diferentes contribuições.

Agradeço à Bacardi-Martini do Brasil Ltda – Divisão Casa Vinícola De Lantier, pelo apoio e confiança cedidos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

**“Para achar água é preciso  
descer terra adentro,  
encharcar-se no lodo, mas há  
os que preferem olhar os  
céus, e esperar pela chuva...”  
Oduvaldo Vianna Filho em  
“Cúmplice da Paixão”.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E LISTAS DE SIGLAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mercado brasileiro de uva e vinho. Ontem, hoje e perspectivas.....	1
1.2 Aspectos históricos ligados à descoberta e consumo do vinho tinto...	6
1.3 Constituintes fenólicos de vinhos tintos.....	10
1.3.1 Compostos fenólicos totais.....	14
1.3.2 Antocianinas e antocianidinas.....	18
1.3.3 Taninos condensados (procianidinas).....	24
1.3.4 Estilbenos (ênfase em <i>trans</i> -resveratrol).....	28
1.4 Métodos de análise aplicados ao vinho.....	35
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Geral.....	43
3.2 Específicos.....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Regiões de coleta de amostras de vinho tinto.....	45
4.2 Variedades de vinhos tintos.....	45
4.3 Extração, isolamento e purificação dos compostos fenólicos.....	45
4.4 Análise quantitativa dos compostos antociânicos.....	46
4.5 Dosagem de compostos fenólicos totais.....	46
4.6 Análise quantitativa de taninos.....	47
4.7 Espectrometria de ressonância magnética nuclear <sup>13</sup> C.....	49
4.8 Espectrometria de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup> H.....	49
4.9 Análise estatística dos dados.....	50

4.10	Espectrometria de massa por desorção/ionização em matriz orgânica assistida por laser – MALDI TOF-MS.....	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
5.1	Compostos fenólicos totais.....	52
5.2	Antocianinas .....	55
5.3	Procianidinas.....	67
5.4	Estilbenos.....	73
5.5	Análise espectrométrica por <sup>1</sup> H-RMN e <sup>13</sup> C-RMN.....	80
5.6	Análise de metabólitos secundários de interesse por MALDI-TOF..	86
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. ASPECTOS ESTRUTURAIS DE ANTOCIANIDINAS E ANTOCIANINAS DE OCORRÊNCIA FREQUENTE EM *VITIS VINIFERA* E EM VINHOS FINOS.....20
- TABELA 2. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* (MMOL/L) E TEOR DE ANTOCIANINAS (MG/L) EM VINHOS TINTOS PRODUZIDOS COM VARIEDADES DISTINTAS SOB DIFERENTES TÉCNICAS DE FERMENTAÇÃO.....22
- TABELA 3. TEOR TOTAL DE ANTOCIANINAS ( $\mu\text{M}$  - FRAÇÃO METANOL-HCL 1% *FLASH-CROMATOGRAFADA*) EM AMOSTRAS DE VINHOS E SUCOS PRODUZIDOS A PARTIR DE VARIEDADES AMERICANAS ORIUNDAS DA REGIÃO DO VALE DO RIO DO PEIXE-SC.....61
- TABELA 4. CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS TÂNICOS (mg/L) EM VINHOS E SUCOS DAS VARIEDADES BORDÔ E ISABEL, ORIUNDOS DA REGIÃO DO VALE DO RIO DO PEIXE – SC.....71
- TABELA 5. DADOS DA LITERATURA DEMONSTRANDO A CONCENTRAÇÃO DE *TRANS-RESVERATROL* (mg/L) EM VINHOS TINTOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES PAÍSES, SEGUNDO O MÉTODO DE ANÁLISE EMPREGADO.....78
- TABELA 6. ÍNDICES DE SIMILARIEDADE\* DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SAFRAS DE VINHOS *C. SAUVIGNON* PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA, DETERMINADOS POR ESPECTROSCOPIA DE  $^1\text{H-RMN}$ ,



EM RELAÇÃO À SAFRA REFERÊNCIA ORGANOLÉTICA  
(1991).....82

TABELA 7. DETECÇÃO DA PRESENÇA\* DE COMPOSTOS DE INTERESSE  
POR <sup>1</sup>H-RMN EM AMOSTRAS DE VINHOS *CABERNET*  
*SAUVIGNON* PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA .....84

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	EVOLUÇÃO DA COMERCIALIZAÇÃO DE VINHOS TINTOS E DERIVADOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, EM MILHÕES DE LITROS, AO LONGO DO PERÍODO 1970-1999....4
FIGURA 2	ESQUEMA DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO DAS ANTOCIANINAS PRESENTES EM VINHOS TINTOS .....24
FIGURA 3	ESTRUTURA BÁSICA DE PROANTOCIANIDINAS.....26
FIGURA 4	PRINCIPAIS VIAS DA BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE NATUREZA FENÓLICA E ESTILBÊNICA EM VEGETAIS (PALAZÓN, 2002), VIA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO E VIA DO N-MALONIL-CoA.....31
FIGURA 5	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS $\mu\text{g/L}$ – MÉTODO FOLIN-CIOCALTEAU) EM AMOSTRAS DE 15 SAFRAS DE VINHOS <i>CABERNET SAUVIGNON</i> PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA ( $P < 0,05$ ). .....53
FIGURA 6	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ANTOCIANINAS ( $\mu\text{M}$ - FRAÇÃO METANOI-HCl 1% <i>FLASH-CROMATOGRAFADA</i> ) EM AMOSTRAS DE 15 SAFRAS DE VINHOS <i>CABERNET SAUVIGNON</i> PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA ( $p < 0,05$ ). ...58
FIGURA 7	ESQUEMA DO MECANISMO DA CONDENSAÇÃO ENTRE FLAVONÓIDES E ANTOCIANINAS E A OXIDAÇÃO DESTAS MOLÉCULAS OCORRIDA DURANTE O ARMAZENAMENTO DE VINHOS TINTOS (RIBÉREAU-GAYON et al., 1972).....62
FIGURA 8	PERFIL ESPECTROFOTOMÉTRICO DE VARREDURA UV-VIS (200 - 750nm) DA FRAÇÃO METANOL-HCl(1%) <i>FLASH-CROMATOGRAFADA</i> , DE AMOSTRAS DE 15 SAFRAS DE VINHOS <i>CABERNET SAUVIGNON</i> , PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA.....64
FIGURA 9	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS ESPECTROS DE VARREDURA DAS FRAÇÕES <i>FLASH-CROMATOGRAFADAS</i> (SOLVENTE MeOH:HCl 1%) DE AMOSTRAS DE VINHOS <i>CABERNET SAUVIGNON</i> (A) E DENTRO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA 200nm A 350nm (B).....65
FIGURA 10	ESPECTROS DE VARREDURA (200nm – 750 nm) DAS AMOSTRAS DE VINHOS <i>C. SAUVIGNON</i> , SAFRAS 1995

	(DILUÍDA 3:1) E 1991, DAS FRAÇÕES MEOH-HCL (1%) PÓS <i>FLASH-CROMATOGRAFIA</i> .....66
FIGURA 11	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE TANINOS EM AMOSTRAS DE 15 SAFRAS DE VINHOS <i>CABERNET SAUVIGNON</i> PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA ( $P < 0,05$ ).....70
FIGURA 12	CONCENTRAÇÃO DE <i>TRANS-RESVERATROL</i> (mg/L) NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA POR <i>FLASH-</i> <i>CROMATOGRAFIA</i> DE AMOSTRAS DE VINHOS <i>CABERNET</i> <i>SAUVIGNON</i> (SAFRAS 1985-2000), PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA ( $P < 0,05$ ).....75
FIGURA 13	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE $^1\text{H-RMN}^*$ ( $\delta_{\text{PPM}}$ - 200 MHZ) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA <i>FLASH-CROMATOGRAFADA</i> DE VINHOS <i>CABERNET SAUVIGNON</i> (SAFRAS 1985, 1991 E 1994), PRODUZIDOS NA SERRA GAÚCHA. * DESLOCAMENTOS QUÍMICOS SÃO RELATIVOS A ACETONA-d6 - 2.20 ppm. ....81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{13}\text{C}$ -RMN : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

$^1\text{H}$ -RMN : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

a. C. : antes de Cristo

CCA : Centro de Ciências Agrárias

CFM : Centro de Ciências Físicas e Matemáticas

CLAE : Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY: **CO**rrelated **S**pectroscop**Y**

COX: Ciclooxygenase

EM : Espectrometria de Massa

EtOAc : Acetato de Etila

$\text{H}_2\text{SO}_4$  : Ácido Sulfúrico

HCl : Ácido Clorídrico

HPLC: **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography

LDL : **L**ow **D**ensity **L**ipoprotein

MALDI TOF-MS: **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **T**ime **O**f **F**light  
– **M**ass **S**pectrometry

MAS: **M**agic **a**ngle **s**pin

MeOH : Metanol

$\text{N}_2$  : Nitrogênio gasoso

NaOH : Hidróxido de Sódio

NOESY: **N**uclear **O**verhauser **E**nhancement **S**pectroscop**Y**

TOCSY: **T**Otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**

UFRJ : Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFSC : Universidade Federal de Santa Catarina

UV-vis. : Ultravioleta visível

## RESUMO

A exploração vitícola no Brasil é uma atividade bastante antiga, conforme demonstram os registros de cultivo de uva pelos jesuítas no Estado do Rio Grande do Sul, no século XVII. A produção de uvas no Brasil (868.349 ton., Safra 1999) esta localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Além disto, um consumo crescente de vinhos tem sido observado. Tal fato sugere uma forte expansão deste mercado, o qual deverá oferecer produtos de qualidade superior. De modo a tornar viável este último aspecto, análises qualitativas e quantitativas dos constituintes de produtos derivados de uva surgem como abordagem de interesse, principalmente quando se enfoca a avaliação de compostos de reconhecidos efeitos benéficos sobre a saúde humana. Tendo em vista os aspectos acima abordados, este trabalho buscou analisar a composição química de 15 safras de vinhos da variedade *Cabernet Sauvignon*, provenientes da região da Serra Gaúcha, através de técnicas espectroscópicas (U.V/visível e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN), acopladas ou não à técnicas de cromatografia líquida (CL). As safras 1986, 1991 e 1995 de vinhos *C. Sauvignon* apresentaram as maiores concentrações de antocianinas, fenóis totais, taninos e *t*-resveratrol, em relação a média. A análise das amostras em sistema *off-line* por cromatografia líquida e espectrometria de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN mostrou ser uma estratégia experimental apropriada para efeitos de estudos comparativos do perfil de constituintes químicos daquelas matrizes complexas. Todavia, o monitoramento dos diversos fatores (a)bióticos que estão ligados à determinação da composição química do vinho mostrou é de significativa importância para o estabelecimento de conclusões em estudos de caráter comparativo da qualidade de vinhos, notadamente devido à complexidade de sua ação. A detecção dos compostos em estudo por MALDI TOF-MS, com injeção direta de amostras de vinhos foi inadequada como estratégia experimental. Comparativamente aos dados encontrados na literatura, as amostras analisadas apresentaram teores dos compostos em estudo e de interesse à saúde humana superiores a maior parte dos relatos encontrados para vinhos estrangeiros. Os dados obtidos sugerem a possibilidade de utilização da abordagem experimental descrita como fator de marketing daquela bebida, na medida em que ressalta seu conteúdo de compostos de interesse à saúde humana, agregando-lhe valor econômico, notadamente em função do crescente interesse popular por alimentos e bebidas funcionais.

## ABSTRACT

The exploration winegrowing in Brazil is one activity very amply, conformity show the register of cultivation of grapes by jesuits on Rio Grande do Sul state, in century XVII. The production of grapes in Brazil (868.349 ton., harvest 1999) is location in the regions South, Southeast and Northeast. Additionally, one crescent consumption of wines have been observed (Melo, 2000). That fact suggest one strong expansion that business, which will apply in products of quality superior. Analysis qualitative e quantitative of compounds by products derivative of grapes appear how broach of interest, principality when focused the valuation of compounds appreciative beneficial effects on human health. Because the aspects up broached, this work searched develop analytical methods by products derivative of grapes in special, red wines *Cabernet Sauvignon*, deriving from south (Serra Gaúcha – RS), through spectrometry technics (UV-vis and nuclear resonance magnetic of hydrogen and carbon -  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ), associate or not with technics of liquid chromatography. The results showed that the harvest of wine *Cabernet Sauvignon* 1986, 1991 and 1995 presented the best concentration of pharmacological interest compounds in relation the mean; The analysis in system *off-line* by liquid chromatography and spectrometric  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  showed that this technique can be one strategic appropriate for effects of comparative studies of profile of chemical constituents that complex matrix; The monitoramento of many factors that is liked determination of the chemical composition of wine is a significative important condition for establishment of conclusions in studies of comparative character in wine quality, essentiality due the complexity of the its action; Comparison with data from international literature, the red wines *C. Sauvignon* analyzed presented tenor of compounds beneficial for human health up the major part of reports met for foreigner wines; The direct injection of the samples of wines *C. Sauvignon* in mass ionization spectrometric assisted by por laser do don't showed one adequate strategic for rapid detection of compounds in study. Nevertheless, the data obtained suggest the possibility to aggregate valor of products how factor of marketing, due the high interest popular for functional food and beverages, which bring the beneficial of vitamins and compounds with therapeutics activities.

## 1. INTRODUÇÃO

### ***1.1 Mercado brasileiro de uva e vinho. Ontem, hoje e perspectivas.***

A exploração vitícola no Brasil é uma atividade bastante antiga, conforme demonstram os registros de cultivo de uva pelos jesuítas no Estado do Rio Grande do Sul, no século XVII. No Estado de Santa Catarina, o cultivo da videira teve seu início no ano de 1864. Contudo, a introdução desta atividade no Vale do Rio do Peixe, principal região produtora naquele Estado, data do ano de 1913, tendo sido intensificada a partir de 1930, notadamente pelos colonizadores de origem italiana que imigraram do Rio Grande do Sul (Rosier & Losso, 1997).

A produção de uvas no Brasil (868.349 ton., Safra 1999) esta localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se em atividade consolidada, com importância sócio-econômica nos Estados do Rio Grande do Sul, que apresenta participação majoritária em área colhida com 58,14% (safra 1999), seguido por São Paulo (18,77%), Paraná (9,17%), Santa Catarina (4,97%), Pernambuco (4,76%), Bahia (2,89%) e Minas Gerais (1,30%). Cerca de 56,13% da produção nacional de uvas é destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados, perfazendo um total de 549.306 toneladas daquela fruta (safra 2000). Além dos Estados tradicionalmente produtores de uva, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Ceará despontam como potenciais produtores de uvas de mesa (Melo, 2002).

A produção de vinhos e derivados ocorre em doze regiões viti-vinícolas, com maior concentração no Estado do Rio Grande do Sul, onde são elaborados

anualmente 300 milhões de litros de vinho e mosto, em média,, representando 90% da produção nacional. Cerca de 20% da produção de uvas provém de variedades viníferas e 80% de variedades americanas e híbridas (Melo, 2002).

O Brasil apresenta uma característica incomum quanto à estrutura produtiva e mercadológica no setor vinícola. Enquanto em outros países somente são admitidos produtos originários de variedades de uvas finas (*Vitis vinifera*), no Brasil, além destes, existem no mercado produtos de variedades americanas e híbridas (*V. labrusca* e *V. bouquirna*), os quais representam 80% do volume total de produção (Protas, *et al.* 2002).

Segundo o cadastro vitícola do RS de 2001, a maior região produtora de uvas do Rio Grande do Sul, a região de Caxias do Sul, situa-se na Serra Gaúcha e compreende os municípios de Antônio Prado, Bento Gonçalves, Boa Vista do Sul, Coronel Pilar, Cotiporã, Fagundes Varela, Farroupilha, Flores da Cunha, Garibaldi, Monte Belo do Sul, Nova Pádua, Nova Roma do Sul, Pinto Bandeira, Santa Tereza, São Marcos, Veranópolis e Vila Flores. As propriedades na região da Serra Gaúcha são tipicamente pequenas, com 15 hectares de área total média, empregando essencialmente a mão-de-obra familiar. A região de Campanha Central no Rio Grande do Sul apresenta um perfil de propriedade vitícola que difere daquele observado na Serra Gaúcha, caracterizando-se por uma exploração empresarial em grandes áreas e uso intensivo da mecanização. A uva produzida nesta região é destinada à elaboração de vinhos finos e representa 13% da produção de uvas viníferas do Estado - média entre os anos de 1995/1997 - (Melo, 2000).



A evolução da comercialização de vinhos, suco de uva e derivados no Estado do Rio Grande do Sul, para o período de 1970 a 1999, é apresentada na Figura 1. Observa-se que houve crescimento na comercialização de vinhos de consumo corrente até 1990/94, com queda no último ano. O crescimento dos vinhos finos, por sua vez, mostrou-se acentuado até 1985/89, permanecendo praticamente constante nos períodos seguintes (Melo, 2000).

O consumo brasileiro per capita/ano de vinhos apresentou uma tendência de redução nos últimos anos e, atualmente, situa-se em 1,89 litro. Contrariamente, o consumo de suco de uva aumentou significativamente, passando de 0,15 L em 1995 para os atuais 0,33 L (Melo, 2000).

A população brasileira está consumindo mais vinho de melhor qualidade, devido a profundas alterações estruturais no parque vinícola brasileiro, fruto de esforços que permitiram um grau de evolução satisfatório em relação às exigências do mercado nacional. Aspectos como qualidade e preço são, atualmente, compatíveis com a dimensão do mercado e com as exigências da maioria dos consumidores (Lapolli *et al.*, 1995). Entretanto, mesmo empenhando todos os esforços, a produção nacional de vinhos finos não supre a demanda interna. Em 1999, o Brasil consumiu cerca de 10 milhões de caixas de vinhos finos, das quais 7 milhões eram de produtos nacionais, sendo o restante (41,5% do total, ~ 26 milhões de litros) importado. Em busca de mais espaço nesse mercado promissor, os produtores brasileiros descobriram que a melhor maneira de conseguir qualidade com produtividade está na base da viticultura: os vinhedos (Apostando ..., 2002)

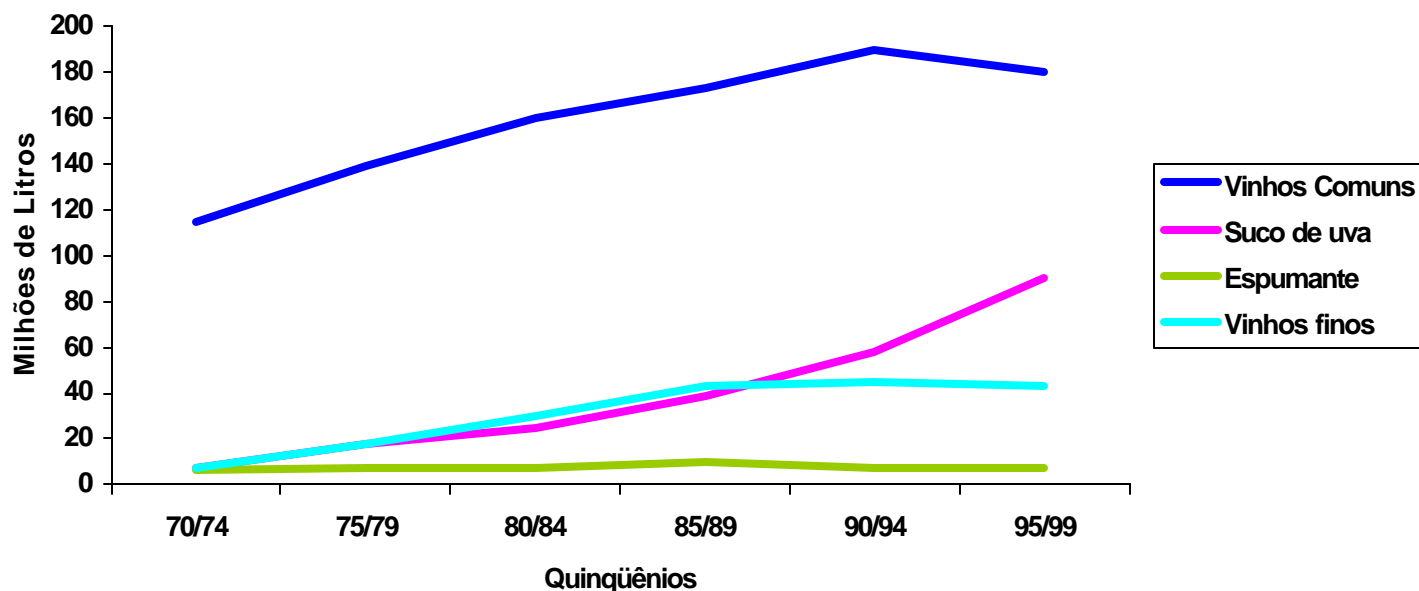


Figura 1. Evolução da comercialização de vinhos tintos e derivados no Estado do Rio Grande do Sul, em milhões de litros, ao longo do período 1970-1999 (Melo, 2000).

O nível tecnológico atingido pelo setor agro-industrial nacional para vinhos finos é comparável ao existente nos países de avançada vitivinicultura. Todavia, contraditoriamente, mesmo utilizando tecnologias avançadas de vinificação, as cantinas não têm conseguido atingir os níveis de qualidade e produtividade esperados. Em decorrência disto, como estratégia para se alcançar este objetivo, decidiu-se por investir no cultivo da videira com maior tecnificação, o que já é realidade em algumas vinícolas do Sul do país. Todavia, o mesmo não se pode

dizer para a tecnologia empregada na elaboração de vinhos de consumo corrente. Como conseqüência disso, os vinhos finos nacionais são considerados de boa qualidade, enquanto os vinhos de consumo corrente apresentam qualidade regular. Para estes últimos, há maior necessidade de investimentos em tecnologia de produção, tanto da matéria-prima quanto no processamento (Melo, 2000).

Embora a região Sul seja a principal área vitivinícola do Brasil, outras regiões têm investido nesta área. É o caso da região pernambucana do Vale do São Francisco que tem recebido atenção de alguns dos maiores produtores de vinhos do Sul.

No mercado internacional vitivinícola, o Brasil se caracteriza como um país importador, especialmente de vinhos finos e uvas passas. Até meados da década de 80, as exportações eram insignificantes, todavia, já a partir da década de 1970, o suco de uvas brasileiro passou a ingressar no mercado externo com participação sempre crescente (Melo, 2002b). Um dos aspectos mais críticos à competitividade do setor vitivinícola nacional está na tributação que incide sobre os produtos. Diversos estudos têm mostrado que, enquanto no Brasil o conjunto de impostos incidentes sobre o vinho supera a 40% do preço ao consumidor, nos principais países concorrentes como Argentina, Uruguai e Chile, este valor gira em torno de 20%. Com estas cargas tributárias a onerar os custos de produção, além de outros fatores também de ordem política (cotas com imposto de importação diferenciados para o Chile, isenção de tributação para países do Mercosul, entre outros), criou-se um cenário onde o Brasil possui baixa capacidade competitiva, tanto para vender o produto nacional no exterior, quanto para manter-se competitivo no próprio mercado interno (Protas, *et al.* 2002)

Embora o segmento do mercado de vinhos tintos finos pareça ser promissor, os investimentos nesta área devem ser cautelosos, visto que na década passada investiu-se muito na produção de vinho branco, que acreditava-se ser o produto que obteria maior aceitação no Brasil, principalmente devido ao clima do país. Contudo, após a descoberta e a divulgação das propriedades terapêuticas do vinho tinto em momentos mais recentes, este passou a ser mais consumido, levando centenas de produtores ao replantio de grandes áreas, desta vez com variedades tintas.

Segundo Protas *et al.* (2002), uma das características marcantes do setor vitivinicultor brasileiro é a sua diversidade e complexidade, havendo diversas vitiviniculturas no país, cada uma com sua realidade climática, fundiária, tecnológica, humana e mercadológica. Entretanto, para qualquer uma delas, o que se esboça neste início de século XXI é a competição acirrada nos mercados interno e externo, exigindo grande esforço de organização e política setorial.

### ***1.2 Aspectos históricos ligados à descoberta e consumo do vinho.***

Não se pode apontar precisamente o local e a época em que o vinho foi feito pela primeira vez. Há 2 milhões de anos, já coexistiam as uvas e o homem que as podia colher. Os arqueologistas aceitam o acúmulo de sementes de uvas como evidência probabilística da elaboração de vinhos por populações primitivas, sendo que escavações em Catal Hüyük (talvez a primeira das cidades da humanidade) na Turquia, em Damasco na Síria, em Byblos no Líbano e na Jordânia revelaram a ocorrência de sementes de uvas em locais ocupados por

povos da Idade da Pedra (Período Neolítico B, cerca de 8000 a.C.). As mais antigas sementes de uvas cultivadas foram descobertas na Geórgia (Rússia) e datam de 7000 - 5000 a.C. A idade destas amostras coincide com a mudança de hábito dos povos de culturas avançadas da Europa e do Oriente Próximo de uma vida nômade para uma vida sedentária, dando início aos primeiros cultivos (Johnson, 1989; Monografia... 2002).

Há inúmeras histórias sobre onde teria começado a produção de vinhos e a primeira delas é descrita no Velho Testamento. O capítulo 9 do Gênesis diz que Noé, após ter desembarcado os animais, plantou um vinhedo do qual fez vinho, bebeu e se embriagou (Passos, *et al.*, 2001). A mais citada de todas as lendas sobre a descoberta do vinho é uma versão persa que fala sobre Jamshid, um rei persa semi-mitológico. Na corte de Jamshid, as uvas eram mantidas em jarras para serem comidas fora da estação. Certa vez, uma das jarras estava cheia de suco e as uvas espumavam e exalavam um cheiro estranho, sendo deixadas de lado por serem impróprias ao consumo e consideradas como um possível veneno. Uma donzela do harém tentou suicídio ingerindo o referido veneno, todavia, ao invés da morte, ela encontrou alegria e um repousante sono, tendo posteriormente narrado o ocorrido ao rei que ordenou que uma grande quantidade de vinho fosse feita e toda a corte bebeu-a (Johnson, 1989; Monografia..., 2002).

O amor dos gregos pelos vinhos pode ser avaliado pelos "Simpósios", cujo significado literal é "bebendo junto". Eram reuniões (daí o significado atual) em salas especiais onde as pessoas bebiam vinhos, reclinados confortavelmente em divãs, e onde conversas se desenrolavam num ambiente de alegre convívio. Embora muitos Simpósios fossem sérios e frequentados por homens nobres e

sábios, havia outros que se desenvolviam em clima de festa, com jovens dançarinas ao som de flautas. Entre as muitas evidências da sabedoria grega para o uso do vinho merecem destaque os escritos atribuídos a Eubulus, por volta de 375 a.C. : "Eu preparo três taças para o moderado: uma para a saúde, que ele sorverá primeiro, a segunda para o amor e o prazer e a terceira para o sono. Quando essa taça acabou, os convidados sábios vão para casa. A quarta taça é a menos demorada, mas é a da violência; a quinta é a do tumulto, a sexta da orgia, a sétima a do olho roxo, a oitava é a do policial, a nona da ranzinze e a décima a da loucura e da quebradeira dos móveis" (Monografia..., 2002).

O vinho chegou no Sul da Itália através dos gregos, aproximadamente no ano de 800 a.C. Quanto ao paladar, os romanos tinham predileção pelo vinho doce, daí fazerem a colheita o mais tardiamente possível, ou, conforme a técnica grega, colhiam o fruto um pouco imaturo e deixavam-no ao sol para secar e concentrar os açúcares, originando os vinhos denominados "Passum" (Johnson, 1989; Monografia, 2002).

Da Europa , através das expedições colonizadoras, as vinhas chegaram a outros continentes, se aclimataram e passaram a fornecer bons vinhos, especialmente nas Américas do Norte (Estados Unidos) e do Sul (Argentina, Chile e Brasil) e na África (África do Sul). De forma específica, a uva foi trazida para as Américas por Cristóvão Colombo, na sua segunda viagem às Antilhas em 1493, e se espalhou para o México, Sul dos Estados Unidos e às colônias espanholas da América do Sul. Posteriormente, mudas de videiras foram trazidas da Ilha da Madeira ao Brasil, em 1532, por Martim Afonso de Souza, e plantadas por Brás Cubas, inicialmente no litoral paulista e depois, em 1551, na região de Tatuapé.

Os relatos na literatura informam que as civilizações mais antigas já haviam observado as propriedades profiláticas e terapêuticas do vinho. O primeiro registro escrito do uso medicinal do vinho data de mais de 2000 anos a.C. e foi encontrado na cidade de Nippur, no antigo Egito. O referido escrito encontra-se atualmente no museu da Universidade da Pennsylvania – EUA e relata que na Suméria, próximo à Babilônia, unguentos eram misturados com vinho para tratar doenças da pele. Papiros egípcios de cerca de 1500 a.C. também descrevem o uso do vinho como tratamento primário para a asma, constipação, epilepsia, indigestão, icterícia e depressão (Passos *et al.*, 2001):

O uso medicinal do vinho foi largamente empregado pelos gregos. Hipócrates (460-370 a.C.) fez vários relatos em sua *História da Medicina* sobre as propriedades terapêuticas daquela bebida, usada como suplemento dietético na caquexia, diurético, purgativo, antitérmico, anti-séptico, em emplastos e ainda contra a depressão durante a convalescença (Passos *et al.*, 2001). Mais recentemente, tem sido constatado que a maioria dos compostos aos quais são atribuídas as possíveis ações terapêuticas do vinho pertencem à classe dos polifenóis (Passos *et al.*, 2001).

Galeno (131-201 d.C.), o famoso grego médico dos gladiadores e, posteriormente médico particular do imperador Marco Aurélio, escreveu um tratado denominado "De antídotos" sobre o uso de preparações à base de vinho e ervas, usadas como antídotos de venenos (Monografia, 2002).

Finalmente, é importante mencionar as descobertas na área da microbiologia e fermentação feitas por Louis de Pasteur (1822-1895) e publicadas

na sua obra "Études sur le Vin". Essas descobertas constituem o marco fundamental para o desenvolvimento da enologia moderna.

A partir do século XX, a elaboração de vinhos tomou novos rumos devido aos avanços tecnológicos na viticultura e enologia, decorrentes de conquistas na área do melhoramento genético de variedades de uvas e de cepas de leveduras selecionadas, da mecanização da colheita e da utilização da técnica de fermentação "a frio" na elaboração dos vinhos brancos, por exemplo (Johnson, 1989; Monografia, 2002)

Ainda que pese o romantismo de muitos que consideram os vinhos dos séculos passados como mais artesanais, os vinhos deste século têm, certamente, níveis de qualidade e tecnologia superiores em relação aqueles de épocas passadas, o que se pode comprovar através de sua degustação.

### ***1.3 Constituintes Fenólicos de Vinhos Tintos***

Uma série de classes de compostos químicos vêm sendo estudadas no que se refere aos seus efeitos sobre a qualidade do vinho. Como exemplo disto, análises quali/quantitativas de taninos, açúcares, ácidos orgânicos e seus derivados ésteres, polifenóis e uma série de pigmentos antocianicos e derivados tem sido alvo de investigações, através de diversas técnicas analíticas. Esta linha de estudo apresenta importância significativa a nível tecnológico, por permitir uma análise consistente e uma evolução na qualidade dos vinhos (Johnson, 1994). Neste contexto, e considerando a ampla gama de compostos presentes nos vinhos, a identificação e quantificação de um composto específico tem sido usada como estratégia de avaliação do nível qualitativo destas bebidas. Sua importância



tecnológica reside no fato de que o processo de avaliação do produto é simplificado, na medida em que utiliza técnicas analíticas específicas, gerando resultados mais confiáveis e com menor consumo de tempo e de recursos financeiros.

Dentre as diversas classes de compostos presentes no vinho, as antocianinas, os polifenóis e os taninos têm despertado grande interesse devido ao seu potencial como agentes anti-oxidantes, anti-inflamatórios e anti-tumorais (Siemann & Creasy, 1992; Jeandet, *et al.*, 1997; Frémont, 2000). Como exemplo disto, alguns dos compostos fenólicos presentes nos vinhos tintos são apontados como responsáveis em parte pelo “Paradoxo Francês”: a aparente incompatibilidade entre uma dieta rica em gorduras e a baixa incidência de doenças cardiovasculares do povo francês, comparado às populações nórdicas. Neste sentido, há relatos de estudos epidemiológicos e evidências confirmadas em pesquisas *in vitro* e *in vivo* de que a ingestão regular de frutas e verduras ricas em compostos polifenólicos, assim com de vinhos, pode reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Hertog *et al.*, 1993, Vinson *et al.*, 1995). Essas evidências têm sugerido que as doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta, principalmente de compostos fenólicos. Muitos destes compostos antioxidantes atuam seletivamente em pequenas concentrações na inibição da oxidação do LDL (do inglês: *low density lipoproteins*) (Frankel *et al.*, 1993).

Sob a denominação de compostos fenólicos são englobadas diversas substâncias com características estruturais químicas heterogêneas, apresentando

em comum um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxila como substituintes. Tais compostos ocorrem em maiores concentrações na película dos frutos, sendo liberados durante o esmagamento da uva. Estas substâncias possuem uma grande importância na enologia, proporcionando aos vinhos a sua cor e em grande parte seu sabor e sendo também marcadores químicos da evolução desta bebida. Uma das principais características que estes compostos proporcionam está no sabor dos vinhos tintos ou, mais precisamente, na diferença de sabor entre os vinhos brancos e tintos, a qual deve-se maiormente aos compostos fenólicos (Peynaud, 1984).

O tipo e o teor dos compostos fenólicos totais podem variar segundo uma série de fatores, sendo que estes podem ser classificados como permanentes e não permanentes. Dentro dos fatores permanentes encontram-se aqueles denominados impostos e não impostos. Os fatores permanentes impostos são, por exemplo, o clima e o solo, enquanto os fatores não impostos são representados pelo material vegetal (espécies e variedades) e o sistema de condução da parreira, por exemplo. Incluídos nos fatores não permanentes, estão as técnicas de manejo do vinhedo e as práticas enológicas (Fernández, 2002).

As condições climáticas durante o período de amadurecimento e colheita dos frutos, além do fator casta (Bourzeix et al., 1983; Jordão, 1997; Golberg et al., 1998), são de suma importância no que concerne à biossíntese de compostos fenólicos nas videiras (Bisson, 1980; Roggero et al., 1986; Venencie et al., 1997). Assim, altos índices de precipitação pluviométrica e a alta umidade relativa do ar, acompanhados por pequena insolação são condições positivas para a ocorrência de doenças criptogâmicas de natureza fúngicas, fato que, por vezes, atua como

estimulo à síntese dos compostos em estudo. Além disto, a incidência elevada de luz ultravioleta sobre os tecidos de frutos promove uma maior produção destes metabólitos, devido à ativação dos genes responsáveis pela sua rota de síntese (Schultz, 2002).

Outros aspectos relevantes influenciam em maior ou menor grau o conteúdo final dos compostos fenólicos nos vinhos, tais como as práticas de manejo dos vinhedos e as enológicas. No primeiro caso, dado ao fato de que a empresa produtora adquire a matéria-prima de diversas fontes, torna-se difícil determinar a extensão do efeito deste fator sobre os dados obtidos, devido às possíveis variações de manejo entre os vinhedos. Dentre as práticas enológicas, o tempo de maceração das uvas assume importância porque afeta diretamente o processo de extração dos compostos de interesse. De modo geral, este período varia de 3 a 5 dias, de acordo com a qualidade sanitária e enológica da uva, maiormente o teor de antocianinas neste último caso. A temperatura de fermentação e o tipo e a frequência das remontagens também constituem-se em agentes determinantes de variação do teor de fenóis totais nos vinhos. Em geral, a remontagem é feita cerca de 3 vezes ao dia, dependendo da tecnologia envolvida na produção do vinho. Por último, a relação bagaço/mosto utilizada é considerada significativa para a composição fenólica dos vinhos, sendo o principal fator determinante da qualidade polifenólica daquela bebida (Guerra, 2002). De fato, a quantidade de películas em contato com o mosto tem uma relação direta com a quantidade de antocianinas e outros polifenóis naquele meio, enquanto a presença de engaços e sementes está maiormente ligada à presença de taninos.

A fim de proporcionar maior entendimento, este trabalho divide a análise quali/quantitativa dos compostos fenólicos nas amostras de vinhos *Cabernet Sauvignon* em 4 grandes classes, a saber: compostos fenólicos totais, antocianinas e antocianidinas, taninos ou proantocianidinas e estilbenos (neste caso, particularmente, irá estudar-se somente o composto *trans-resveratrol*).

### **1.3.1 Compostos fenólicos totais.**

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de moléculas com uma grande diversidade estrutural, caracterizando-se por apresentar um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila.

Estes compostos são produtos do metabolismo secundário e estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos. Os animais, em princípio, são incapazes de sintetizar o anel aromático, de modo que os compostos fenólicos produzidos em pequenas quantidades em seu metabolismo utilizam o anel benzênico de substâncias presentes na dieta alimentar (Carvalho *et al*, 1999).

Nos vegetais, a síntese dos compostos fenólicos ocorre através de duas rotas biogénicas, a saber: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos (eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato), ou pela via do acetato-polimalato, que inicia com a acetil-coenzima A e a malonil-coenzima A. A origem biogénica determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante, sendo que pela via do ácido chiquímico obtém-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, os quais são formados a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a

via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em posição *meta* (Geissman e Crout, 1969).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Além disto, possuem, em geral, características ácidas, podendo ser isolados através de sua solubilidade em soluções fracamente básicas como, por exemplo, em solução de carbonato de sódio (Carvalho *et al*, 1999).

Os compostos fenólicos fazem parte do metabolismo secundário das plantas, ocorrendo em maiores concentrações principalmente nos tecidos de sementes e cascas das frutas e dos caules e ramos. Geralmente, estes metabólitos possuem funções de defesa da planta ao ataque de fungos, bactérias, herbívoros e contra danos mecânicos. Em ecologia química é ressaltada, por exemplo, a participação da hidroquinona, do ácido elágico e dos ésteres do ácido gálico em mecanismos de defesa de plantas, sendo que alguns destes compostos têm sido relatados como marcantes supressores do apetite de insetos (deterrentes), além de atuarem em outros processos de inter-relação envolvendo animais e vegetais. De fato, alguns compostos fenólicos são responsáveis pela coloração de flores e frutos, variando sua cor do azul ao vermelho, e desempenhando importante função atrativa de animais polinizadores (insetos e aves, por exemplo) e dispersores de sementes. (Carvalho *et al*, 1999).

Dentre as espécies vegetais que produzem compostos fenólicos, a videira (*Vitis* spp.) destaca-se em função dos altos teores destes metabólitos presentes nos tecidos dos frutos, folhas e sementes, bem como pela variabilidade de

estruturas químicas encontradas. Nas últimas décadas, um número crescente de estudos têm focado os aspectos quali/quantitativos dos compostos fenólicos em biomassas de diversas espécies e variedades de videiras e de seus produtos, como em vinhos e sucos (Maraschin, 2002a).

As uvas de variedades tintas caracterizam-se por apresentar teores elevados de compostos fenólicos nos tecidos de película dos frutos e sementes, comparativamente às variedades brancas e rosadas. O tipo, a concentração e as peculiaridades da estrutura química destas moléculas dependem de uma série de fatores como, por exemplo, da variedade de uva, do sistema de manejo do pomar, das condições edafo-climáticas, do estágio de maturação da fruta e da duração do período de armazenamento em pós-colheita (Fernandéz, 2002).

No contexto tecnológico, o perfil de composição fenólica da uva constitui-se em fator determinante de características qualitativas de vinhos e sucos de uva, podendo ser utilizado como um parâmetro de monitoramento do processo de produção, ou ainda em estudos de controle de qualidade daquelas bebidas. Esta abordagem é de interesse devido à significativa liberação de substâncias fenólicas das cascas e sementes durante o esmagamento da uva e ao longo do processo de fermentação do mosto para a produção de vinhos. Assim, depreende-se que o conteúdo total de compostos fenólicos em vinhos é influenciado de forma direta por fatores (a)bióticos, durante as fases de pré- e pós-colheita das uvas (clima, solo e manejo, por exemplo) e também pelas condições de vinificação, de envelhecimento e de armazenamento.

A extração dos compostos fenólicos das partes sólidas e sua difusão no mosto, no curso da vinificação, variam principalmente em função do tempo. As

remontagens favorecem as retiradas destes compostos, por promoverem um maior contato do bagaço com o mosto e com o etanol presente no meio fermentativo. Além disto, o contato mecânico entre o bagaço aumenta a ruptura de membranas celulares, fazendo com que haja a liberação do conteúdo intracelular e promovendo a extração dos compostos ali presentes (Ribéreau-Gayon, et al., 1972, Guerra, 2002).

A análise destes compostos em vinhos e outras matrizes complexas tem sido realizada, classicamente, através de processos cromatográficos em sistema de camada delgada (CCD), utilizando-se como fase estacionária celulose, gel de sílica, ou poliamida. Em análises mais detalhadas, a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FR-CLAE) têm sido escolhidas como métodos preferenciais (Carvalho, *et al.*, 1999). Diversos sistemas de detecção (UV-vis, fluorimetria e espectrometria de massa, e.g.) para os compostos fenólicos e seus derivados têm sido acoplados à cromatografia líquida, fato que tem gerado alguma controvérsia no que se refere aos valores de concentração observados em diferentes laboratórios (Carvalho, *et al.*, 1999). De modo geral, no entanto, há uma predominância de sistemas de detecção baseados na espectrofotometria UV-vis.

Estudos demonstram que os compostos fenólicos estão presentes em concentrações que variam de 1 a 4% em bagaços, 1 a 2% na casca, de 5 a 8% nas sementes e de 0,1 a 0,3% em vinhos tintos (Amerine & Joslyn, 1987).

Devido às suas propriedades enológicas e farmacológicas importantes para a manutenção da qualidade e do consumo de vinho, estes compostos foram analisados neste trabalho utilizando-se para isso um método simples proposto por

Randhir *et al.*, (2002), o qual usa o reagente de Folin-Ciocalteu e a detecção e quantificação por espectrofotometria. Esta abordagem visa proporcionar à indústria vitivinícola um método rápido, de baixo custo e preciso de monitoramento da concentração destes compostos.

### **1.3.2 Antocianinas e Antocianidinas**

As antocianinas estão incluídas no grupo de pigmentos de ocorrência natural, entre os flavonóides, sendo denominadas enocianinas quando sua ocorrência se dá nos tecidos de películas de uvas. São responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura dos tecidos de diversas espécies do reino vegetal, sendo que todas as antocianinas têm em sua estrutura básica o íon 4' – hidroxiflavilium. A remoção da porção glicosilada da estrutura molecular das antocianinas por hidrólise ácida ou enzimática gera a aglicona correspondente, denominada genericamente de antocianidina (Jackman, 1987). As antocianidinas diferem entre si pelo número de grupos hidroxilas presentes na molécula e no grau de metilação desses grupos.

As antocianidinas, sendo instáveis e muito menos solúveis que as antocianinas, não se acumulam na planta (Harborne, 1967). Assim, os pigmentos que ocorrem nos tecidos de flores e frutos estão na forma glicosilada, com os açúcares conferindo solubilidade e estabilidade às antocianidinas (Timberlake *et al.*, 1966).

Nas antocianinas, a natureza e o número de unidades de açúcares, bem como o de ácidos ligados na posição 3 e 6 dos açúcares, conferem as diferenças



estruturais e funcionais a estes compostos. Adicionalmente, as antocianinas podem ocorrer sob a forma simples ou conjugada, formando oligômeros.

Na tabela 1, são mostrados alguns aspectos estruturais de antocianidinas (aglicona) e antocianinas de maior abundância em espécies do gênero *Vitis* e mais freqüentemente encontradas em vinhos.

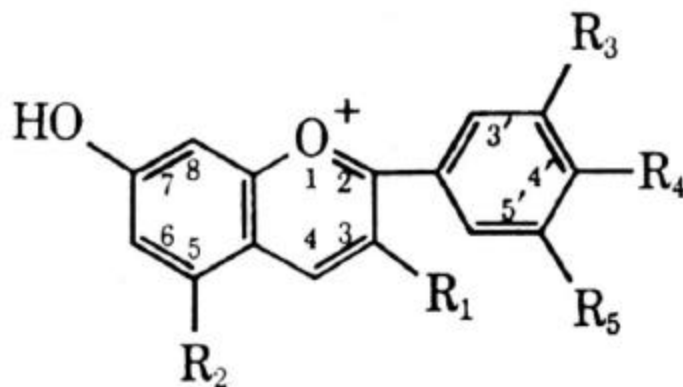
Segundo Geissman *et al.* (1962), as antocianinas são caracterizadas estruturalmente por possuírem um esqueleto carbônico C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, e, em função disto, podem estar associadas a compostos flavonóides não-antociânicos, fenômeno este relacionado a alteração da coloração dos vinhos ao longo de seu armazenamento. Por outro lado, Brouillard (1982), afirma que apesar de possuírem a mesma origem biossintética de outros flavonóides naturais (fenilpropanóides), as antocianinas diferem destes por absorverem fortemente na região visível do espectro.

Os grupos metoxila e hidroxila, juntamente com os substituintes glicosil e de natureza ácida, têm efeitos importantes na cor e na estabilidade das antocianinas. A mesma antocianina poderá apresentar cores distintas, dependendo do pH, da concentração da solução e da presença de copigmentos, por exemplo. Com o aumento do número de hidroxilas, a coloração das antocianinas muda de rosa para azul, enquanto a presença de grupo metoxila em substituição à hidroxila reverte este efeito (Mazza e Brouillard, 1987).

A cor característica das uvas tintas é fortemente influenciada pelos constituintes químicos dos tecidos de película e polpa, notadamente aqueles oriundos do metabolismo secundário, i.e., flavonóides, flavonóis e antocianinas, por exemplo. De forma similar, a coloração dos produtos derivados destas

biomassas (vinhos e sucos, e.g.) será função do conteúdo daqueles compostos, bem como das práticas enológicas empregadas, da temperatura e do tempo de armazenamento (Gomez-Plaza, *et al.*, 2000) e da exposição ao oxigênio, por exemplo (Pontallier & Ribéreau-Gayon, 1983).

Tabela 1. Aspectos estruturais de antocianidinas e antocianinas de ocorrência freqüente em *Vitis vinifera* e em vinhos finos.



<i>Nomes</i>	$R_3$	$R_4$	$R_5$
Cianidina	OH	OH	
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	OH	
Delfinidina	OH	OH	OH
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH

*Derivados antociânicos*

*Estrutura*

Monoglucosídeo  $R_1 = \text{glucose (unida na posição 1 da glucose)}$

Diglucosídeo  $R_1 \text{ e } R_2 = \text{glucose (unida na posição 1 da glucose)}$

Fonte: Amerine *et al.*, (1974).

De forma específica, as antocianinas são os pigmentos responsáveis pela coloração vermelha dos vinhos tintos, onde seu conteúdo varia de 200 a 500 mg/L nos vinhos jovens. A diversidade de estruturas químicas destas substâncias encontradas nas uvas e nos vinhos é significativa, porém o monoglicosídeo de malvidol é o principal pigmento em variedades de *Vitis vinifera*, enquanto o diglicosídeo de malvidol é específico de certas variedades americanas e híbridas (Peynaud, 1984).

Durante a conservação e o envelhecimento dos vinhos tintos, a concentração de antocianinas mostra uma tendência de redução, sendo a deglicosilação destes compostos o primeiro evento que concorre para sua instabilização e degradação. Além disto, a reação destes pigmentos de forma progressiva com compostos de natureza fenólica, particularmente os flavonóides (Jurd, 1969; Somers, 1971), contribui para a diminuição de sua concentração no estado livre. Estes fenômenos são responsáveis, em alguma extensão, pelas mudanças de coloração entre o vermelho-azulado de vinhos jovens para marrom-avermelhado de vinhos maduros, assim como o decréscimo da adstringência do vinho, observado durante o envelhecimento (Haslam, 1980).

Netzel *et al.*, (2003) demonstraram em seu trabalho o potencial antioxidante dos vinhos tintos correlacionando este potencial com o conteúdo de antocianinas, extraídas durante o processo de fermentação através de diferentes técnicas de elaboração, sendo elas: a presença de casca durante a fermentação, o aumento da temperatura de 30°C para 65°C com agitação contínua, e ambas as técnicas combinadas. Neste trabalho, foram analisadas três variedades de uva, sendo elas:

Spätburgunder (Pinot Noir), Lemberger e Cabernet Franc. Os resultados demonstram que a presença da casca durante a fermentação e o aumento da temperatura favoreceram a extração e o poder antioxidante das antocianinas, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2. Capacidade antioxidante *in vitro* (mmol/L) e teor de antocianinas (mg/L) em vinhos tintos produzidos com variedades distintas sob diferentes técnicas de fermentação.

<b>Vinhos</b>	<b>Técnica de vinificação</b>	<b>Capacidade antioxidante (mmol/L)</b>	<b>Antocianinas (mg/L)*</b>
<b>Pinot Noir</b>	Fermentação com casca	10.1	322.1
	Agitação e alta temperatura	13.6	515.8
	Ambas	17.9	532.8
<b>Lemberger</b>	Fermentação com casca	14.1	525.3
	Agitação e alta temperatura	16.4	599.6
	Ambas	19.4	630.9
<b>Cabernet Franc</b>	Fermentação com casca	9.3	282.9
	Agitação e alta temperatura	11.0	300.2
	Ambas	11.9	323.7

\* antocianinas: delphinidina-3-glucosídica, cianidina-3-glucosídica, petunidina-3-glucosídica, peonidina-3-glucosídica, malvidina-3-glucosídica.

Fonte: Netzel *et al.*, 2003 (adaptado).

Em estudo feito por Saint-Cricq *et al.* (1999), fora comprovado o poder antioxidante das antocianinas presentes em uvas e vinhos. Neste estudo, os autores dividem o vinho em cinco frações dealcoolizadas, sendo estas: Taninos-polissacarídicos e sais de taninos, taninos condensados, proantocianidinas e catequinas, complexos entre taninos e antocianinas e antocianinas livres. No primeiro estágio do trabalho, foi possível constatar que as antocianinas livres apresentaram a maior capacidade em combater os radicais livres (~91%) gerados pela irradiação solar em células animais usadas como modelo experimental. Os autores concluíram que as antocianinas livres apresentam-se como a fração mais potente dos polifenóis encontrados no vinho no que se refere à sua capacidade de combater os radicais livres. No entanto, não descartam o fato de que estas moléculas apresentam sinergismo com outros polifenóis encontrados naquela bebida, potencializando ainda mais os efeitos benéficos do vinho no combate aos radicais livres. Além disto, os autores inferem que a ação antioxidante deve-se em parte a estrutura das antocianinas, como pode ser visto na Figura 2- (Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999). O trabalho feito por Saint-Cricq de Gaulejac *et al.* (1999) demonstrou a importância das antocianinas em vinhos tintos para as propriedades terapêuticas e profiláticas atribuídas aos vinhos e correlacionadas ao “Paradoxo Francês”.

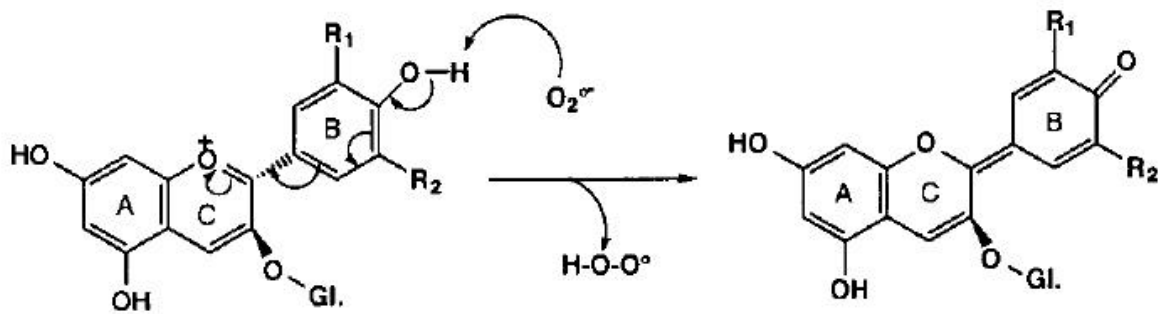


Figura 2. Esquema do mecanismo de oxidação das antocianinas presentes em vinhos tintos (Netzel, *et al.*, 2003).

### 1.3.3 Taninos condensados (*proantocianidinas*)

O termo “taninos” tem sido empregado classicamente para designar substâncias de origem vegetal utilizadas para processos de curtimento do couro de animais. Taninos são compostos facilmente encontrados em plantas e alimentos provenientes destas, em particular frutas, sementes, cereais e diferentes bebidas (vinhos, chás, chocolates e cidras, e.g. - Santos-Buelga & Scalbert, 2000). Bate-Smith e Swain definiram taninos como compostos fenólicos solúveis em água, de alto peso molecular (entre 500 e 3000 Daltons), que reagem às reações fenólicas usuais, e que apresentam propriedades especiais como, por exemplo, a habilidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas em solução (Haslam, 1989).

A proantocianidina corresponde atualmente a designação atual dada aos taninos condensados. A relevância da presença destes nos produtos de origem vegetal tem merecido destaque nos últimos anos não somente devido às suas

características enológicas, mas também pelo seus potenciais efeitos benéficos à saúde humana. Estes compostos assumem um importante papel no que se refere às características gustativas dos vinhos, assim como na cor e sabor destes devido à sua associação com as antocianinas. (Michaud et al., 1971; Czochanska et al., 1979; Lee e Jaworki, 1989; Prieur et al., 1994; De Freitas, 1995; Dallas et al., 1996 a, b; Moutounet et al., 1996).

Estruturalmente, as proantocianidinas são polímeros de unidades elementares de flavan-3-ols. As unidades de flavan-3-ols tem o esqueleto básico flavonóide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), conforme mostrado na Figura 3. Suas propriedades químicas como quelante de metais, capacidade de complexação com macromoléculas podem ser observadas durante a clarificação e estabilização do vinho, bem como durante o envelhecimento do mesmo (Riou, et al., 2002)

Além dos taninos condensados (proantocianidinas), podem ainda ocorrer na natureza os taninos hidrolizáveis, caracterizados por serem, como o próprio nome indica, facilmente hidrolizáveis (Barquette e Trione, 1998). Contudo, apesar da existência de dois grupos de compostos tânicos, somente os taninos condensados ocorrem realmente nas uvas e nos seus derivados. No caso das variedades de *Vitis vinifera* L., os principais elementos são formas monoméricas de (+)-catequina e (-)-epicatequina e ainda oligômeros e polímeros destes (Bourziex et al., 1986; Ricardo da Silva et al., 1991b; Cheynier et al., 1992; Prieur et al., 1994; Souquet et al., 1996).

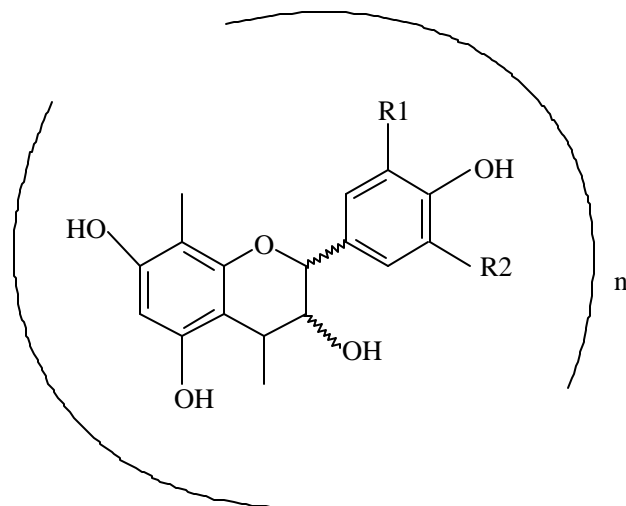


Figura 3. Estrutura básica de proantocianidinas: R1 e R2 = H, propelargonidinas; R1=H, R2=OH, proantocianidinas; R1, R2=OH, prodelfinidinas.

Recentemente, as proantocianidinas têm despertado um interesse maior na comunidade científica em virtude de lhe serem atribuídas algumas propriedades nutricionais e farmacológicas, tais como a ação vasoprotetora e antiagregante plaquetária (Bisset et al., 1991; Duarte, 1999), ação antioxidante (Teissedre et al., 1995; Riedl et al., 1998; Miyamoto et al., 1998; Leighton et al., 1998; Duarte, 1999), ação anti-hepatotóxica (Cheng et al., 1993; Melzer et al., 1991), atividade anti-tumoral (Duarte, 1999; Bomser et al., 1993), atividade anti-viral (Masquelier e Michaud, 1979; Takechi et al., 1985) e proteção em relação à aterosclerose (Michaud e Masquelier, 1973; Frankel et al., 1992; Teissedre et al., 1996), entre outras.

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos devem-se, ao menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor



grau aos dois grupos de taninos, isto é, condensados e hidrolizáveis. Estas características são a capacidade de complexação com íons metálicos (Kennedy & Powell, 1985; Marmolle, *et al.*, 1997; Powell & Rate, 1987; Scalbert, *et al.*, 2000; Cook, *et al.*, 1995; Hurrell, *et al.*, 1998; South, *et al.*, 1997), a atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres (Kehrer & Smith, 1994; Gutteridge & Halliwell, 1994; Jovanovic, *et al.*, 1998; Rice-Evans, *et al.*, 1996; Saint-Cricq de Gaulejac, *et al.*, 1999; Ricardo da Silva, *et al.*, 1991c) e a habilidade de complexar-se com outras macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (Santos & Mello, 1999; Butler & Rogler, 1992; Hagerman & Butler, 1980 e 1981; Charlton, *et al.*, 1996; Luck, *et al.*, 1994; Haslam, 1998).

Embora os resultados obtidos em testes farmacológicos em relação às proantocianidinas sejam animadores, dúvidas a respeito da biodisponibilidade destes compostos têm sido levantadas (Jordão, 2002).

Existem diferentes métodos de dosagem de taninos, os quais baseiam-se nas propriedades destes compostos como quelantes de metais e indutores de precipitação de proteínas, bem como em suas características químicas, isto é, a presença de grupamentos hidroxilas. Neste contexto, ensaios como o de desoxiribose determinam a reatividade de taninos através de suas hidroxilas (Hagerman *et al.*, 1998), enquanto experimentos com a metmioglobina analisam o potencial antioxidante destes compostos (Miller, *et al.*, 1993). Métodos de quantificação de taninos em vinhos têm sido pouco explorados, sendo usualmente trabalhosos e de alto custo, visto utilizar técnicas de alto refinamento. Tal condição é limitante à análise destes compostos de forma rotineira pelas indústrias vitivinícola, devido ao alto custo de equipamentos e de pessoal especializado. Em

função disso, este trabalho analisa a concentração de compostos tânicos em amostras de vinhos utilizando um método de fácil manipulação, com reduzido dispêndio de tempo e baixo custo para a quantificação destes compostos. Esta abordagem experimental poderá viabilizar, em momentos subsequentes, a implantação de rotinas de análises em escala adequada à demanda da indústria viti-vinícola, agregando tecnologia e contribuindo para o aumento da qualidade do produto final.

#### **1.3.4 Estilbenos (ênfase em *trans-resveratrol*)**

Uma das classes de compostos fenólicos mais amplamente estudada é a dos estilbenos, que são metabólitos encontrados em um grande número de espécies vegetais. Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada a estes compostos em decorrência de suas funções biológicas em plantas e, mais recentemente, na saúde humana (Koop, 1998; Dodrydneva *et al.*, 1999). Diversos estilbenos simples e conjugados (glicosilados, sulfatados, prenilados, e.g.) têm sido isolados a partir de uma variedade de espécies vegetais (Langkace & Pryce, 1976; Waterhouse & Lamuela-Raventos, 1994; Dercks, *et al.*, 1995).

Aproximadamente 200 tipos de compostos fenólicos do tipo estilbênico são conhecidos atualmente. Estes polifenóis têm sido encontrados em grande número em espécies vegetais arbóreas (*Pinus* e *Eucaliptus*, e.g.), localizando-se principalmente na medula do tronco. São amplamente distribuídos em plantas superiores (Gorham, 1989), na forma monomérica e como dímeros, trímeros e estilbenos poliméricos, sendo denominados nesta forma de viniferinas. Estilbenos são sintetizados, como é mostrado na Figura 4 por duas principais vias: a via do

ácido chiquímico e a via do malonil-CoA, por uma extensa faixa de espécies de plantas das famílias Dipterocarpaceae, Cyperaceae, Gnetaceae, Pinaceae, Leguminosae, Myrtaceae, Moraceae, Fagaceae, Liliaceae e Vitaceae, sendo comumente encontrados em raízes, cascas, rizomas e folhas. Entretanto, os estilbenos parecem ser mais abundantes em plantas que não fazem parte da dieta humana, ou em tecidos não comestíveis de espécies geralmente consumidas pelas populações. Assim, dentre as maiores fontes de estilbenos na alimentação humana mencionam-se as uvas e seus produtos derivados e o amendoim (Cassidy, 2000).

O composto denominado resveratrol tem gerado maior interesse após ser relatado sua ocorrência em mais de 70 espécies vegetais, incluindo amora, amendoim, uvas, coníferas (Hemingway, R. W., 1981). Este polifenol tem sido isolado de tecidos vegetais em duas formas isoméricas: *cis* e *trans*, sendo esta última de maior interesse devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas. Em espécies lenhosas, este composto tem sido identificado como o constituinte estilbênico majoritário em tecidos lignificados de caule (Pool *et al.*, 1981), com importante função de conservação da madeira (Hemingway, 1981). Apesar de sua ampla ocorrência nas espécies vegetais, as videiras (*Vitis* spp) são particularmente de interesse como fonte deste composto, devido à alta concentração encontrada em seus tecidos. Sua biossíntese tem lugar principalmente em tecido foliar (Gorham, 1989), sendo transportado à casca dos frutos (Creasy & Coffee, 1988; Jeandet, *et al.*, 1991) em resposta a estresses ambientais causados por agentes abióticos (metais pesados, radiação U.V e

extremos de temperatura ou luz), ou bióticos infecção fúngica (Jeandet, *et al.*, 1997).

A produção de *t*-resveratrol por uvas é positivamente correlacionada com a resistência das videiras às doenças criptogâmicas (Langcake, 1981; Barlass, *et al.*, 1987, Dercks & Creasy, 1989), sendo este polifenol considerado um bom marcador bioquímico para a resistência ao mofo cinza - *Botrytis cinerea* (Jeandet *et al.*, 1992).

Estudos têm demonstrado que o *t*-resveratrol é sintetizado em resposta à infecção patogênica do fungo *Botrytis cinerea* (Langkace & Pryce, 1976; Langcake & Pryce, 1977; Langcake, 1981; Barlass, *et al.*, 1987; Creasy & Coffee, 1988; Dercks & Creasy, 1989; Jeandet, *et al.*, 1991; Jeandet *et al.*, 1992; Korhammer *et al.*, 1995) sendo que o grau de infestação do patógeno deverá ser de, no máximo, 10%. Sob condições mais severas de infestação, aquele polifenol é degradado pelo metabolismo fúngico, maiormente por via enzimática - lacase (Sbaghi, *et al.*, 1996). Entretanto, os vinhos feitos a partir de uvas com algum grau de infestação por *B. cinerea*, i.e  $\leq 10\%$ , usualmente possuem teores superiores de resveratrol (Jeandet, *et al.*, 1991). Sua síntese pode também ser induzida nos tecidos vegetais por fatores abióticos de natureza química (aplicação de herbicidas e fungicidas (Macheix, *et al.*, 1990), oligossacarinas e ácido galacturônico (Blaich & Bachmann, 1980) e física, como a exposição à luz ultravioleta (Langkace & Pryce, 1976; Pool *et al.*, 1981; Blaich *et al.*, 1982; Jeandet, *et al.*, 1991), por exemplo.

Na medicina popular são encontrados registros de uso de plantas (Chung, *et al.*, 1992) que contêm estilbenos como compostos ativos. Como exemplo, cita-

se *Poligonum cuspidatum* e *Veratum formosanum* cujas raízes e rizomas, respectivamente, são utilizados na tradicional medicina chinesa para o tratamento de várias indisposições, i.e, distúrbios hepáticos, renais, cardíacos e circulatórios (Nonomura, *et al.*, 1963; Kubo, *et al.*, 1981). De fato, entre os estilbenos monoméricos, o composto *t*-resveratrol tem sido identificado como o mais ativo e o mais estudado sobre os aspectos fisiológicos e farmacológicos.

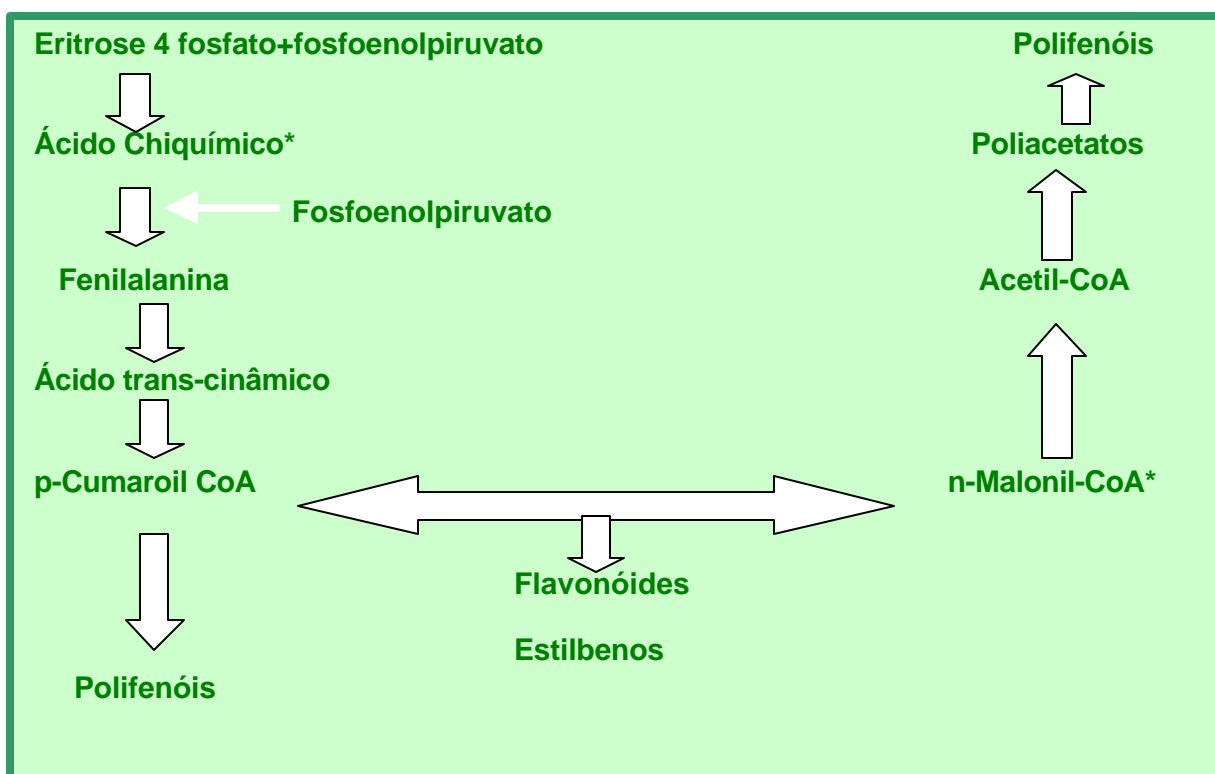


Figura 4. Principais vias da biossíntese de metabólitos secundários de natureza fenólica e estilbênica em vegetais (Palazón, 2002), via do ácido chiquímico e via do n-Malonil-CoA.

Diversas citações na literatura (Renaud, *et al.*, 1992; Gehm, *et al.*, 1997; Cassidy, *et al.*, 2000) indicam ser o *t*-resveratrol o composto responsável pelo

*Paradoxo Francês*. De fato, até 1992, pouco interesse havia neste composto no que se refere aos seus efeitos em processos bioquímicos e farmacológicos de mamíferos, ou ainda na ciência médica, a despeito do fato de ser este polifenol um componente da medicina popular oriental (Nonomura, *et al.*, 1963; Kubo, *et al.*, 1981), como descrito previamente. Todavia, naquele ano, Siemann e Creasy (1992) reportaram a presença de *t*-resveratrol em vinhos tintos. Além disto, deu-se atenção ao fato de que diversos alimentos que continham aquele polifenol faziam parte da dieta dos povos do mediterrâneo, onde havia-se observado o fenômeno do “*Paradoxo Francês*”. Contudo, os maiores avanços em estudos das propriedades farmacológicas deste composto ocorreram quando sua obtenção por síntese química tornou-se possível, bem como em função dos avanços nas técnicas analíticas, notadamente de natureza cromatográfica e espectrométrica.

Vários estudos têm demonstrado que o *t*-resveratrol é um antioxidante efetivo (Frankel, 1993; Chanvitayapongs, *et al.*, 1997; Belguendouz, *et al.*, 1998; Rotonto, *et al.*, 1998). Este composto inibe a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade – LDL, previne a citotoxicidade da oxidação do LDL e protege as células contra a peroxidação dos lipídeos. Isto pode ser devido às suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas. Esta característica confere a este composto uma maior proteção antioxidante efetiva em comparação às vitaminas C e E (Chanvitayapongs, *et al.*, 1997).

Sua ação antiinflamatória (Jang, *et al.*, 1997) parece ser maior ou similar à de anti-inflamatórios clássicos como a fenilbutazona e a indometacina, sendo relacionada à inibição das ciclooxigenases (COX - enzimas mediadoras do processo inflamatório). Além disto, a similaridade estrutural entre estrogênios não

esteróides, incluindo os estilbenos, como o dietilestilbestrol, tem promovido investigações sobre o potencial do resveratrol como um fito-estrógeno (Passos, *et al.*, 2001; Gehm, *et al.*, 1997).

O efeito quimioprotetor do *t*-resveratrol contra o câncer tem sido relatado. Este composto inibe os eventos celulares associados à iniciação, promoção e progressão de tumores, atuando através de inibição da enzima ciclooxigenase e estimulando a quinona redutase, uma enzima relacionada a vias de detoxificação de agentes cancerígenos (Jang, *et al.*, 1997). Além disso, diversos estudos indicam que os polifenóis presentes nas uvas e nos vinhos estimulam a vasodilatação endotelial, reduzem a oxidação do LDL (*low-density lipoprotein*) humano, inibem a agregação plaquetária (Dodrydneva, *et al.*, 1999) e alteram a síntese de eicosanóides pró-aterosclerogênia, um processo que possui um papel crucial no desenvolvimento de patologias em decorrência da aterosclerose.

De fato, alguns estudos têm mostrado que o consumo regular e moderado de vinhos tintos resulta numa proteção às doenças do sistema cardiovascular. Os efeitos quimioprotetores da saúde humana têm sido atribuídos a um conjunto de compostos presentes nos vinhos tintos, principalmente aqueles pertencentes à classe das antocianinas, polifenóis e taninos, devido à atividade antioxidante destas substâncias (Passos *et al.*, 2001). Quando administrado a ratos (2mg/kg), *t*-resveratrol foi absorvido, resultando uma concentração plasmática de 0,175mg/L, 15 min após sua administração (Juan, *et al.*, 1999). Foi observado que aquele composto tende a se acumular nos tecidos hepáticos e renais. Seus derivados  $\beta$ -glicosídicos são resistentes à hidrólise enzimática nos tecidos pancreáticos e sua

conjugação com moléculas de glucose pode aumentar sua absorção pelo intestino delgado (Hollman, 1997). Além disso, microorganismos presentes no cólon também poderão realizar a quebra da molécula, liberando a molécula de glucose e promovendo a formação da aglicona (Cassidy, 2000). Nos últimos anos, e em consequência dos resultados positivos obtidos em diversos estudos de atividade bioquímica e farmacológica, uma intensa análise do conteúdo deste metabólito secundário vem sendo realizada em diversas matrizes biológicas complexas, isto é, vinhos e sucos de uva (Passos, *et al.*, 1999; Maraschin, *et al.*, 2001; Maraschin, *et al.*, 2002a,b; Ianssen *et al.*, 2002), uma vez que este composto tem sido considerado como responsável, em certa medida, pelos efeitos preventivos do vinho sobre doenças degenerativas (Jeandet *et al.*, 1994).

A fácil obtenção de polifenóis de natureza estilbênica, como é o caso do resveratrol, é um ponto positivo e que concorre para a sua utilização. Sua produção é facilmente induzida em videiras submetidas a estresses, sendo as maiores concentrações encontradas nos tecidos da película do fruto. Além disto, uma série de trabalhos vêm sendo realizados buscando desenvolver métodos que permitam otimizar sua obtenção de maneira natural (engenharia genética) ou sintética. Isso faz com que um possível medicamento produzido com resveratrol possa ser barato e, portanto, acessível às populações menos favorecidas. De fato, esta abordagem já é uma realidade em países do primeiro mundo, onde o resveratrol é comercializado sob a forma de comprimidos como antioxidante e complemento alimentar (Nicholson, *et al.*, 1995). Mais recentemente no Brasil, em iniciativa pioneira e baseada na interação empresa-universidade, um produto a base de *t*-resveratrol de natureza fitoterápica e de complemento alimentar foi



desenvolvido pela Universidade Federal de Santa Catarina, junto ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal.

#### **1.4 Métodos de Análise Aplicados aos Vinhos**

Nas últimas décadas, a identificação e a quantificação de antocianinas, polifenóis e taninos em produtos derivados de uva têm sido feita por diversas técnicas cromatográficas, com destaque para a cromatografia em camada delgada (Langcake & Price, 1976; Sárdi *et al.*, 2000) cromatografia líquida de alta performance - CLAE (Siemann & Creasy, 1992; Pezet *et al.* 1994; Jeandet *et al.*, 1994, Jeandet *et al.* 1997) e a cromatografia gasosa - CG (Revel *et al.*, 1996), acopladas ou não à espectrometria de massa - EM. Além da EM, outras sistemas de detecção tais como a espectrofotometria UV-vis, a fluorimetria e a detecção eletroquímica vêm sendo utilizadas com limites de detecção característicos da ordem de  $\mu\text{g/L}$  (Frémont, 2000). Mais recentemente, a análise dos isômeros de resveratrol, por exemplo, em amostras de vinho foi realizada através da eletroforese capilar com bom nível de resolução e sem a necessidade de pré-tratamento das amostras. Este método mostrou-se bastante rápido ( $< 15$  min.), porém com pequena sensibilidade -  $300 \mu\text{g/L}$  - (Chu *et al.*, 1998). Numa estratégia de análise distinta, a separação dos isômeros de resveratrol em amostras de vinho foi realizada através da CLAE e a identificação inequívoca destes por  $^1\text{H}$ -ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H-RMN}$ ). Os resultados demonstraram que a

forma *cis* do resveratrol e alguns de seus derivados glicosilados foram predominantes no início do processo de fermentação do mosto, enquanto ao final deste processo o isômero *trans* (aglicona) ocorreu em maior concentração (Mattivi *et al.*, 1995).

Ao longo da última década, uma série de estudos vêm sendo conduzidos utilizando-se a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), por exemplo, em biomedicina (metabolismo de drogas, processos toxicológicos e doenças metabólicas) e na identificação de produtos naturais (lactose, glucose, cafeína, *t*-resveratrol; criptolepicarbolina e 2-hidroxiandrosta-1,4-dieno-3,16 diona), com requerimentos mínimos de quantidade de amostra - da ordem de  $\mu\text{L}$  ou  $\eta\text{L}$  (Nicholson, *et al.*, 1995; Passos *et al.*, 2001a). Além disto, o tempo necessário para a obtenção de um espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de uma amostra é bastante reduzido (da ordem de segundos), de modo que estas características, tomadas em conjunto, evidenciam o alto potencial de uso desta técnica em estudos com material de natureza biológica (Lacey *et al.*, 1999).

A importância da espectroscopia de RMN de alta resolução em estudos de amostras líquidas e sólidas, nas diversas áreas de investigação, tem crescido continuamente devido ao rápido desenvolvimento instrumental e de programas de gerenciamento (*softwares*) nos últimos anos. Seu potencial como técnica analítica tem sido demonstrado em muitos estudos enfocando aplicações clínicas e no metabolismo de células vegetais, através de diferentes abordagens experimentais – COSY, TOCSY, DOSY, MAS e ROESY, por exemplo - em sistemas líquidos e sólidos (Schripsema & Verpoorte, 1991).

Mais recentemente, com a introdução da versátil e potente técnica de desorção/ionização a laser de amostras adsorvidas em matriz [*matrix-assisted laser desorption/ionization* – MALDI] (Karas *et al.*, 1985; Karas & Hillenkamp, 1988; Overberg *et al.*, 1990) o desenvolvimento e a otimização de espectrômetros de tempo de voo tem sido estimulado. Isto se deve ao fato de que a espectrometria de massa requer que o composto a ser analisado encontre-se sob a forma de íon em fase gasosa, dentro do sistema de vácuo do espectrômetro. Esta condição pode ser facilmente alcançada para moléculas pequenas, através das técnicas clássicas de ionização (sublimação ou desorção térmica, e.g.), todavia, é bastante difícil no caso de biopolímeros com pressão de vapor muito baixa, essencialmente. Este problema foi parcialmente resolvido com a descoberta das técnicas de ionização por MALDI, para a produção de íons em fase gasosa de macromoléculas. Em MALDI, a amostra é combinada com uma matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico, e.g.) e depositada sobre um suporte (*probe*) onde sofre um processo de desidratação, gerando a formação de uma dispersão cristalina e heterogênea. Subseqüentemente, este material é irradiado com um pulso de laser (10 ns, e.g.) em um comprimento de onda absorvido pela matriz ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ , e.g.), mas preferencialmente não absorvido pelos compostos em análise, volatilizando assim a amostra e produzindo os íons em fase gasosa que são então analisados pelo espectrômetro de massa. O processo de adsorção é bastante brando, com a energia do feixe de laser sendo absorvida principalmente pelos componentes da matriz em relação aos constituintes da amostra. Neste processo, os íons moleculares são formados pela adição de uma ou mais cargas

aos compostos, através da ligação de prótons ou íons alcalinos (modo de operação de íon positivo), enquanto no modo de operação de íon negativo, os compostos adquirem carga pela abstração de prótons. A interface de MALDI parece ser bastante adequada à análise de misturas complexas, uma vez que os íons gerados possuem predominantemente uma carga elétrica apenas. Os espectrometristas de massa podem manipular o processo de desorção/ionização para aumentar a produção de íons da amostra e também para controlar a fragmentação induzida no processo. Além disto, utilizando-se diferentes matrizes, alterando-se o solvente e modificando-se a irradiação de laser durante a análise, é possível a obtenção de um espectro para a maioria das amostras. Um outro aspecto importante desta técnica diz respeito à velocidade de aquisição do espectro, sendo que menos de um milissegundo é requerido para cada espectro de MALDI (Smith, 1996; Talbo & Wade, 1996).

Atualmente, MALDI é uma das técnicas de ionização mais importantes para compostos não voláteis de alto peso molecular. Esta interface tem sido largamente utilizada na análise por EM de biomoléculas não voláteis tais como peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e oligossacarídeos, bem como polímeros sintéticos de alto peso molecular, em estudos de polidispersão, distribuição de grupos terminais e espaçamento de oligômeros (Muddiman *et al.*, 1997; Zenobi & Knochenmuss, 1998). De fato, uma série de exemplos demonstram a viabilidade da utilização desta interface em espectrometria de massa, em diversas áreas de aplicação, incluindo a análises quantitativas do metabolismo de drogas *in vitro* e *in vivo* em matrizes biológicas (Muddiman *et al.*, 1995, 1996 e 1997) e metabólitos secundários vegetais (Maraschin *et al.*, 1999). A quantificação simultânea de

ciclosporina A (CsA) e seu principal metabólito (AM1) em amostras de sangue obtidas de pacientes transplantados foi realizada usando espectrômetro de massa de tempo de voo (EM/TDV) e interface de desorção/ionização a laser das amostras adsorvidas à matriz (MALDI), em dois experimentos independentes (Muddiman *et al.*, 1994 e 1995). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram de 10 e 33 ng/mL, respectivamente e os coeficientes de variação situaram-se entre 4 e 8%. Os resultados obtidos apresentaram uma boa correlação com dados obtidos previamente em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência para ambos os compostos. Numa abordagem instrumental similar, a identificação e quantificação simultânea do composto bioativo Tacrolimus e seus metabólitos hepáticos em babuínos evidenciou uma alta sensibilidade do método e tolerância à contaminação, com uma pequena fragmentação dos compostos de interesse. Esta estratégia tem permitido uma fácil identificação e quantificação dos metabólitos produzidos *in vitro*, sem a necessidade de um extensivo trabalho de preparo de amostras. A utilização da interface de MALDI viabilizou a identificação, em experimento de curso de tempo, de sete metabólitos de Tacrolimus: demetilado, di-demetilado, hidroxilado, dihidroxilado, demetilado hidroxilado, di-hidrodiol, e di-demetilado hidroxilado (Gusev *et al.*, 1996).

A identificação do esteróide pregnânico velutinol A ( $m/z$  362) foi realizada utilizando-se EM/TDV/MALDI, em frações obtidas a partir da extração com fluido supercrítico (EFS) de biomassa de culturas celulares (1g – peso seco) de *Mandevilla velutina*. Além disto, esta abordagem permitiu a identificação de um derivado metilado deste esteróide ainda não descrito. Analisando-se estes dados

em conjunto, constata-se a potencialidade desta abordagem como ferramenta de identificação de metabólitos secundários vegetais de interesse farmacológico, bem como a possibilidade de sua utilização em processos de seleção precoce de linhagens celulares de alto potencial produtivo de metabólitos, em função da pequena quantidade de material amostral requerido (Maraschin *et al.*, 1999).

## 2. JUSTIFICATIVA

A cultura da videira (*Vitis* spp.) está implantada há muitos anos nos Estados do Sul e Centro-Sul do Brasil. No ano de 1993, a área ocupada pela cultura no país abrangia 60.200 ha, havendo maior concentração nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com 77% da área plantada no país. Estes dois Estados respondem por cerca de 95% da produção nacional de vinhos, um mercado que se encontra em franca expansão (Melo, 2000).

Em função do exposto, observa-se que a produção de vinhos e derivados de uva no Estado RS é de grande importância sócio-econômica. Além disto, um consumo crescente de vinhos tem sido observado (Melo, 2000). Tal fato sugere uma forte expansão deste mercado, o qual deverá oferecer produtos de qualidade superior. De modo a tornar viável este último aspecto, análises qualitativas e quantitativas dos constituintes de produtos derivados de uva surgem como abordagem de interesse, principalmente quando se enfoca a avaliação de compostos de reconhecidos efeitos benéficos sobre a saúde humana, conforme acima descrito. Como consequência, poder-se-á criar um conceito de produto a nível de mercado, com qualidade e características diferenciadas. Esta linha de estudo permitirá, como resultado direto e a curto prazo, a possibilidade de se agregar valor aos produtos já comercializados, i.e. vinhos, através da análise de seu potencial como agentes de valor profilático e/ou terapêutico em saúde humana.

Nos últimos anos, poucos trabalhos têm sido realizados com o intuito de avaliar quantitativa/qualitativa os polifenóis, as antocianinas e os compostos

tânicos em derivados de uva, isto é, vinhos e sucos, produzidos a partir de matéria-prima oriunda de regiões tradicionalmente produtoras do Sul do Brasil (Polenta, 1996, Passos *et al.*, 1999; Alves, 2000; Maraschin *et al.*, 2000, Maraschin *et al.*, 2001). Assim, a identificação e a análise quantitativa destes compostos em vinhos produzidos nos Estados do RS e SC é de interesse, notadamente pelas condições climáticas que predispõem à sua síntese, bem como por seus efeitos benéficos à saúde humana, conforme acima descrito. Tal abordagem, por certo, agregará valor aos produtos comercializados, permitindo a criação de um conceito de produto, com características diferenciadas a nível de mercado.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

- Avaliação da composição de vinhos de uvas da variedade *Cabernet Sauvignon*, oriundos de regiões tradicionalmente produtoras do Estado do Rio do Grande do Sul (Serra Gaúcha), notadamente no que se refere aos conteúdos de polifenóis, antocianinas e taninos.

#### 3.2 Específicos:

- Quantificação de antocianinas, polifenóis, taninos e *t*-resveratrol em amostras de vinhos de 15 safras de vinho *Cabernet Sauvignon*, a saber: 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1999 e 2000;
- Análise comparativa do perfil de composição química das amostras em estudo via cromatografia líquida, ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H-RMN}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C-RMN}$ ) e análise estatística multivariada;
- Determinação do perfil espectrofotométrico de varredura (UV-vis) da fração metanólica *flash*-cromatografada, para fins de estudos comparativos de composição química entre safras;

- Avaliar a possibilidade de detecção dos metabólitos secundários em estudo por injeção direta das amostras em espectrômetro de massa de tempo de voo, equipado com interface de desorção/ionização a laser (MALDI TOF-MS);
- Classificação das safras em estudos segundo os teores de metabólitos secundários de interesse em relação às safras referência: safra de 1991 (padrão enológico) e a safra de 1995 (padrão composição química)
- Avaliação comparativa dos teores de metabólitos secundários de interesse entre as safras em estudo, safras referência (1991 e 1995) e dados da literatura.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

**4.1 Regiões de coleta de amostras de vinho tinto:** Com o intuito de restringir a origem da matéria-prima (uva) utilizada na elaboração dos vinhos ao Estado do Rio Grande do Sul, as amostras desta bebida foram coletadas diretamente junto à empresa produtora, a saber Casa Vinícola De Lantier (Divisão Bacardi-Martini do Brasil), localizada na Serra Gaúcha (Garibaldi – RS). Por solicitação do fornecedor das amostras, os nomes dos produtos comerciais foram mantidos em sigilo, sendo que a manipulação destes materiais foi feita através de sua codificação.

**4.2 Variedades de vinhos tintos:** Os estudos consideraram a análise dos compostos de interesse a partir de amostras de vinhos da variedade vinífera *Cabernet Sauvignon* safras: 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1999 e 2000.

**4.3 Extração, isolamento e purificação dos compostos fenólicos e antociânicos:** A 300 mL de cada amostra foi adicionado igual volume de acetato de etila (EtOAc), incubando-se a mistura por 24h no escuro. A fase orgânica foi coletada em funil de separação e o EtOAc removido por evaporação sob vácuo (55-60°C). O resíduo foi dissolvido em metanol/clorofórmio 1:1 (10 ml), centrifugado (2.8 Krpm/10 min) e *flash*-cromatografado em suporte de sílica gel (20 mL), como previamente descrito (Maraschin *et al.*, 2001). As frações (60 mL)

eluídas com EtOAc e metanol acidificado [MeOH-HCl 1%] foram coletadas (3mL) para análise dos compostos de interesse, respectivamente polifenóis e antocianinas.

**4.4. Análise quantitativa dos compostos antociânicos:** As frações MeOH-HCl (1%) de cada amostra, purificadas por meio de *flash*-cromatografia (ver item 4.3), foram filtradas em funil de vidro sinterizado e submetidos à análise quantitativa dos compostos antociânicos. O conteúdo de antocianinas foi determinado a partir da leitura da absorvância das soluções amostrais a 460, 525 e 750 nm, conforme descrito por Madhavi *et al.*, (1996) em espectrofotômetro Shimadzu UV 1203 A concentração de antocianinas foi calculada usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $3.01 \times 10^4$  sugerido por Callebaut *et al.*, (1990).

**4.5 Dosagem de compostos fenólicos totais:** A determinação do conteúdo de fenóis totais nas amostras em estudo foi realizada conforme o método descrito por Randhir *et al.*, (2002), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu. A saber, a 1 mL de amostra adicionaram-se 5 mL de etanol a 95%. 1mL desta solução foi retirada e acrescida de 1 mL de etanol a 95%, 5 mL de água destilada e 0.5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. A solução foi homogeneizada em agitador vortex e permaneceu em repouso durante 5 minutos. Após este período, adicionou-se 1 mL de carbonato de sódio (5%, p/v), seguida de nova agitação e repouso por 60 minutos. A absorvância da solução foi lida em

espectrofotômetro Shimadzu UV 1203 no comprimento de onda de 725 nm. Para efeitos de análise estatística, três repetições/amostra foram utilizadas em um sistema de leitura seqüencial, sendo a concentração final do composto de interesse o valor médio obtido para cada amostra. Os valores médios de concentração de compostos fenólicos foram analisados comparativamente através do teste de *t*-student, com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism (versão 2.0). A curva de calibração foi preparada utilizando-se concentrações de ácido gálico, um polifenol de ocorrência natural, entre 0 e 100 µg/0.1mL. Devido à heterogeneidade estrutural dos compostos fenólicos, os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico (Blanco *et al.*, 1998).

**4.6 Análise quantitativa de taninos:** O processo de extração e quantificação de taninos em vinhos baseou-se em suas propriedades de precipitação de proteínas como no caso da gelatina. Como substância padrão para obtenção da curva padrão utilizou-se o ácido tânico (4 - 16mg/L). Foi seguida a metodologia descrita por Valdés *et al.*, (2000), adaptando-se para as amostras de vinhos. Esta metodologia apresenta duas etapas, sendo a primeira a quantificação de compostos fenólicos totais e a segunda etapa a de quantificação dos compostos fenólicos residuais depois do seqüestro dos taninos por gelatina, conforme descrito a seguir:

- *Primeira etapa:* Mediu-se 4 mL de amostra e transferiu-se a um recipiente aforado de 250 mL com tampa; adicionou-se água destilada até a medida de 250 mL. Desta solução retiraram-se alíquotas de 5 mL, transferindo-as para recipientes

aforados de 25 mL, onde foram adicionados 4 mL de água destilada. O branco desta etapa constitui-se de 5 mL de água destilada em um recipiente de 25 mL.

- *Segunda etapa:* 20 mL de amostra foram coletados e transferidos para um recipiente aforado de 250 mL com tampa, seguido da adição de 80 mL de água destilada, 50 mL de solução de gelatina a 25%, 100 mL de solução saturada de cloreto de sódio acidificado (1%) e 10 g de Caolin. O meio de reação permaneceu em agitação por 30 minutos e em repouso por no mínimo 5 min., sendo subsequentemente filtrado em funil de vidro sinterizado. Alíquotas de 10 mL/amostra foram coletadas do filtrado e transferidas para um recipiente de 50 mL, completando-se com água destilada. Após a diluição, 5 mL foram transferidos para um recipiente de 25 mL; adicionando-se 4 mL de água destilada. O branco desta etapa consistiu-se de 100 mL de água destilada, 50 mL de solução de gelatina a 25%; 100 mL de solução saturada de cloreto de sódio acidificado (1%); 10 g de Caolin em um erlenmyer de 250 mL, passando pelos mesmos procedimentos das amostras.

A cada recipiente aforado de 25 mL, com as respectivas amostras da primeira e da segunda etapa, brancos e padrões, adicionaram-se 2 mL do reativo de Folin-Ciocalteu, agitou-se, e deixou-se repousar por 5 minutos. Logo após, adicionou-se 1 mL de carbonato de sódio a 20%, agitou-se, completou-se com água destilada, homogenizou-se e filtrou-se novamente. Após transcorridos 2 minutos a absorvância destas soluções foi lida a 700 nm.

**4.7 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ :** Para efeitos de obtenção dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras, alíquotas (3 mL)

das frações EtOAc *flash*-cromatografada foram concentradas sob fluxo de nitrogênio para remoção do solvente orgânico. As amostras foram ressuspensas em 750  $\mu\text{L}$  de acetona- $\text{d}_6$  e os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em condição padrão, em equipamento Bruker AC 200 - 4,7 tesla, (Maraschin *et al.*, 2001). Os dados de deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{ppm}}$ ) foram coletados e submetidos à análise multivarida conforme descrito subsequente (item 4.9).

**4.8 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ :** Para efeitos de comprovação da ocorrência dos compostos de interesse (*t*-resveratrol, quercitina, ácidos cinâmico, málico, ferúlico, gálico e cafeico), nas frações em estudo, alíquotas (3 mL) dos extratos EtOAc das amostras foram concentradas sob fluxo de  $\text{N}_2$  para remoção do solvente orgânico. As amostras foram ressuspensas em 750  $\mu\text{L}$  de acetona- $\text{d}_6$  e os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foram obtidos em condição padrão, em equipamento Bruker AC 200, operando em frequência de ressonância de 200 MHz, tempo de relaxação de 3s, pulso de irradiação de  $45^\circ$ , 16 varreduras, tempo de aquisição de 0,6 s e temperatura de  $25^\circ\text{C}$  (Maraschin *et al.*, 2000). Os dados de deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{ppm}}$ ) foram coletados e submetidos à análise multivarida conforme descrito no item 4.9.

**4.9 Análise estatística dos dados:** Os dados de concentração dos compostos de interesse foram analisados estatisticamente através do programa

PrismGraph (versão 2.0), para determinação dos valores médios, desvio padrão e teste de separação de médias (*t*-student,  $p < 0,05$ ). Os perfis espectrais de  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN de cada amostra foram submetidos a um sistema de análise multivariada (*cluster analysis*), onde foram determinados os coeficientes de similaridade e dissimilaridade das amostras, utilizando-se o software NTSys (v. 2.0), conforme descrito previamente (Maraschin *et al.*, 2002b). Para fins de cálculos estatísticos, adotou-se uma diferença máxima entre os deslocamentos químicos dos núcleos de carbono e hidrogênio de 0,04 ppm e 0,02086 ppm, respectivamente. Para efeito de controle, as amostras das safras 1991 e 1995 foram escolhidas como safras de referência, para fins de análises comparativas, no que concerne às características organolépticas e de conteúdo de compostos de interesse à saúde humana, respectivamente.

**4.10 Espectrometria de massa por desorção/ionização em matriz orgânica assistida por laser – MALDI TOF-MS:** Os compostos de interesse isolados por cromatografia líquida e as frações dos solventes acetato de etila e metanol:HCL (1%) foram concentradas sob fluxo de nitrogênio. As amostras concentradas foram solubilizadas em volume mínimo de MeOH, centrifugadas e analisadas por MALDI TOF-MS para confirmação inequívoca da identidade dos compostos. Os espectros de massa das frações foram obtidos em espectrômetro de tempo de voo (PerSeptive Biosystems Voyager), equipado com uma fonte de laser (387 nm), com uma voltagem de aceleração de partículas de 28 kV. As amostras foram misturadas à matriz orgânica (10 mg de ácido  $\alpha$ -ciano-4-



hidroxicinâmico, solubilizado em 1 ml de solução 1% de ácido trifluoracético:água:acetonitrila – 1:4:5), aplicando-se 1 µl desta mistura ao suporte de amostras. Os materiais foram mantidos a temperatura ambiente para evaporação dos solventes, efetuando-se as análises espectrométricas subsequêntemente (Maraschin *et al.*, 2001).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais não sofreram grandes variações de concentração no decorrer das 15 safras analisadas, como mostra a figura 5. A análise dos dados de conteúdo destes metabólitos secundários ao longo das 15 safras de vinhos *C. Sauvignon* demonstrou um valor médio geral de 3,65g/L e uma amplitude de distribuição de valores de 3,14g/L (safra 1986) a 4,18g/L (safra 1999), semelhante à observada na literatura (Shahidi e Nacz, 1995; Blanco *et al.*, 1998) para vinhos tintos de procedências e castas diversas. O teste *t*-student revelou a não existência de diferenças significativas entre os valores médios encontrados para cada safra, comparativamente à media geral. O cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação dos experimentos indicou valores de 0,28 e 7,7%, respectivamente, os quais foram considerados bastante satisfatórios para o método de quantificação adotado.

Os compostos fenólicos podem variar segundo uma série de fatores, conforme discutido no item *introdução*. No entanto, deve-se ressaltar que o fator casta está intimamente ligado à concentração destes compostos, devido principalmente à resistência que estes compostos conferem às videiras contra a ação de fatores de estresse (a)biótico.

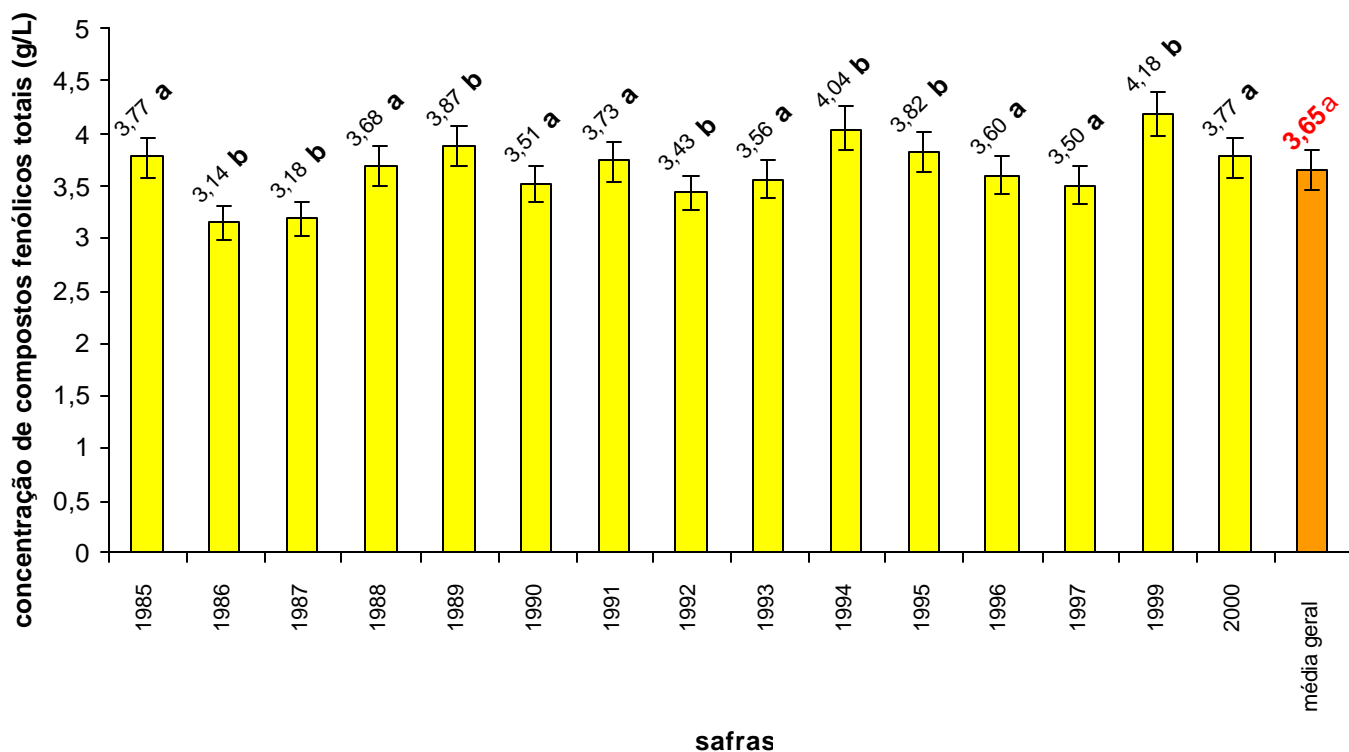


Figura 5 . Teor de compostos fenólicos totais (g/L – método Folin-Ciocalteu) em amostras de 15 safras de vinhos *Cabernet Sauvignon* produzidos na Serra Gaúcha ( $p < 0,05$ ).

Estudos similares avaliaram o teor de compostos fenólicos em 60 amostras de vinhos varietais de origem francesa (Teissedre & Landrault, 2000) e espanhola (5 amostras, López *et al.*, 2001), utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Concentrações de 2,0 g/L, 2,6 g/L, 2,27 g/L e 0,24 g/L foram observadas para os vinhos franceses *Merlot*, *Cabernet Sauvignon*, *Syrah* e *Chardonnay*, respectivamente. Os vinhos espanhóis, por sua vez, apresentaram valores médios de 2,0 g/L e, em todos os casos, nota-se que a concentração total de compostos fenólicos foi inferior àquela encontrada para as amostras de vinhos *C. Sauvignon*

em estudo, revelando uma característica de superioridade de produção daqueles metabólitos secundários dos vinhedos cultivados na região da Serra Gaúcha, independente da safra considerada (1985 → 2000). De modo geral, taxas elevadas de biossíntese/acúmulo destes metabólitos secundários são correlacionadas com uma maior probabilidade de ocorrência de moléstias criptogâmicas, determinada por condições de elevada precipitação pluviométrica, alta umidade relativa e altas temperaturas, como freqüentemente observado ao longo do período de maturação das uvas na região serrana do RS. Contudo, e devido à grande variedade e complexidade de fatores que influenciam a concentração de compostos fenólicos na uva e nos vinhos, houve, conseqüentemente, uma clara dificuldade no estabelecimento dos parâmetros que mais efetivamente modulam os processos determinantes de variações do teor destes compostos para as amostras em estudo. No entanto, investigações têm sido realizadas para melhor elucidar este aspecto, as quais sugerem a existência de uma condição derivada do somatório de fatores (a)bióticos, cuja natureza e modo de ação mostram-se complexos em sua análise (Fernandéz, 2002). No que concerne às amostras em estudo, infelizmente, uma análise mais detalhada do efeito das práticas enológicas empregadas para a obtenção das safras não se mostrou possível, haja vista a impossibilidade de localização dos dados junto à empresa. Este aspecto assume importância devido às inúmeras diferenças encontradas a cada safra, no que concerne às práticas envolvidas desde o manejo do vinhedo ao engarrafamento, não sendo possível considerar um procedimento padrão adotado na elaboração dos vinhos. Estas diferenças nas práticas

enológicas aplicadas a cada safra devem-se ao fato de que, a cada ano, o vinhedo, e mais especificadamente, a uva, apresentam características distintas, devido não apenas as práticas de manejo do pomar empregadas ao longo de todo o ano anterior à safra, mas também às condições climáticas e, principalmente, às condições fitossanitárias das uvas no momento da colheita.

## **5.2 Antocianinas**

A evolução da cor durante a vinificação e o envelhecimento do vinho têm sido atribuído às progressivas mudanças de natureza quali/quantitativa dos compostos fenólicos extraídos das uvas. Neste contexto, as antocianinas extraídas dos tecidos das uvas parecem ser os principais compostos determinantes da cor vermelha-púrpura dos vinhos jovens e estão progressivamente envolvidos em mecanismos que levam à formação de moléculas de pigmentos mais estáveis. Estas alterações de natureza química-estrutural das antocianinas contribuem para a alteração da coloração dos vinhos com maior tempo de envelhecimento, os quais apresentam uma cor vermelha intensa típica (Vivar-Quintana *et al.*, 2002).

O conteúdo de compostos antociânicos encontrados nas amostras das 15 safras de vinhos *C. Sauvignon* em estudo apresentou grandes variações, conforme mostrado na figura 6. Os valores desta variável apresentaram uma amplitude de distribuição entre 135,45 $\mu$ M (safra 1995) e 55,06 $\mu$ M (safra 1988), com média geral de 83,43 $\mu$ M ( $\approx$  41,12 mg/L em equivalentes de malvidina-3-

glucosídeo) e desvio padrão de 23 pontos. A amplitude dos valores observados foi considerada de particular interesse devido aos inúmeros fatores ecológicos que podem influenciar o conteúdo de antocianinas totais, notadamente de natureza climática (número de horas de sol, irradiação e precipitação pluviométrica), durante a fase de maturação dos frutos. De fato, a ocorrência de variações nos parâmetros climáticos da Serra Gaúcha é fenômeno comumente observado ao longo das safras, implicando em alterações de conteúdo de compostos de importância enológica como os pigmentos antociânicos.

Em estudo recente, valores de concentração de antocianinas em frações orgânicas de vinhos tintos varietais, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, apresentaram uma amplitude de 0,3 mg/g a 81,7 mg/g, indicando uma discrepância entre os valores extremos de aproximadamente 272 ordens de magnitude (Shrikhande, 2000). Estes resultados estão em conformidade ao observado no presente estudo e reforçam o fato de que a formulação de conclusões em caráter definitivo em estudos comparativos do teor destes pigmentos entre biomassas deve ser feita de forma cautelosa, notadamente quando os métodos de extração e dosagem são distintos.

Comparativamente à safra de 1991 (referência organolética), as amostras dos anos de 1985, 1987, 1988, 1989, 1990, 1992, 1993 e 2000 apresentaram menores teores de antocianinas, sendo que todas as safras apresentaram conteúdos inferiores à safra 1995 (referência composição química). Enologicamente, as antocianinas são importantes principalmente por estas conferirem coloração aos vinhos tintos, enquanto farmacologicamente estes

compostos são de grande valor devido às suas propriedades antioxidantes (Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999).

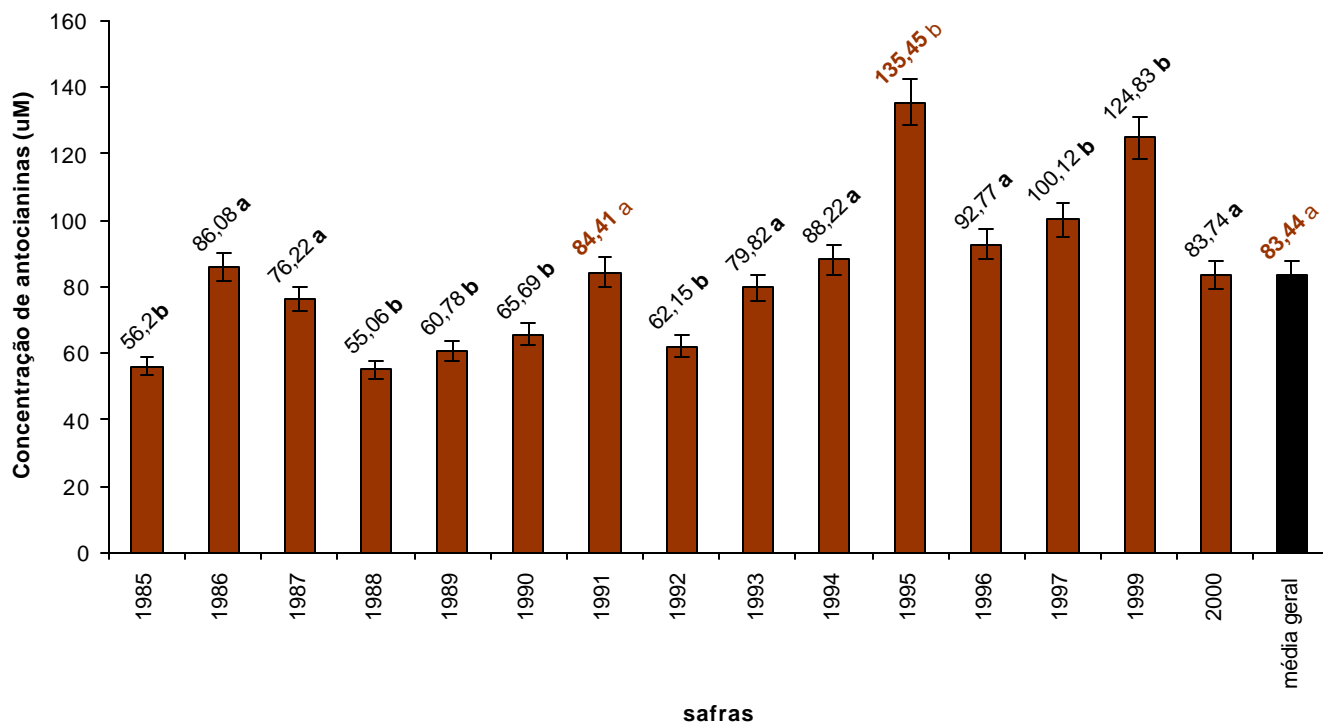


Figura 6. Concentração total de antocianinas ( $\mu\text{M}$  - fração metanol-HCl 1% *flash*-cromatografada) em amostras de 15 safras de vinhos *Cabernet Sauvignon* produzidos na Serra Gaúcha ( $p < 0,05$ ).

Da análise da figura 6, pode-se depreender que as cinco últimas safras em estudo apresentaram valores de concentrações de antocianinas superiores à média e ao controle organolético, com exceção feita à safra de 2000, fato que se deve, em parte, à menor intensidade de oxiredução destes compostos nos vinhos mais jovens, comparativamente aqueles de safras mais antigas (Ribéreau-Gayon,

et al., 1972), o que faz com que o conteúdo de antocianinas totais livres diminua nestes últimos devido à sua precipitação

Em momentos pós-colheita e durante a fase de vinificação, um dos fatores determinantes de alterações de conteúdo destes pigmentos é a duração do período fermentativo. Durante os primeiros momentos da maceração e fermentação do mosto, a intensidade de cor daquela biomassa aumenta devido à extração/dissolução das antocianinas. A partir do 6<sup>o</sup>-8<sup>o</sup> dia, coincidindo com o final do período de fermentação ativa, observa-se a redução da cor do mosto, principalmente devido à refixação destes compostos sobre a superfície celular das leveduras e igualmente sobre os materiais sólidos da uva - bagaço (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 1972). Sabendo-se disto, nos últimos anos, algumas vinícolas têm demonstrado uma maior preocupação com o monitoramento e a dosagem deste compostos durante a fermentação. Com esta medida, é possível interromper a fermentação no momento em que começa a decair o conteúdo de antocianinas. Para as amostras em estudo, o monitoramento do conteúdo destes compostos foi realizado ao longo da vinificação em todas as safras, de modo que o conteúdo de antocianinas totais extraído foi o máximo alcançado (Zanus, 2003 - comunicação pessoal).

A redução da concentração de antocianinas nas amostras com maior idade decorre da ação de dois principais fatores: o primeiro deles está ligado à forma como se procedia a fermentação. Nos anos anteriores a safra de 1995, era comum a fermentação natural dos mostos, ou seja, o mosto transformava-se em vinho naturalmente, não havendo a adição de leveduras. Isto, de certa forma, aumentava o tempo de fermentação e reduzia a eficiência do processo extrativo



daqueles pigmentos, o que explica, em alguma extensão, os menores valores de concentração encontrados nas amostras de safras anteriores a 1995. O segundo aspecto reside no fato de que estas moléculas formam copolímeros com taninos condensados e flavonas durante a conservação e o envelhecimento dos vinhos tintos, como demonstrado na figura 7 (Jurd, 1967; Liao *et al.*, 1992; Santos-Buelga *et al.*, 1995; Fscribano-Bailón *et al.*, 1996; Ribéreau-Gayon, 1973; 1974). Segundo Somers (1971), este fenômeno conduz à formação dos verdadeiros “pigmentos dos vinhos”, cuja estrutura química tem no componente antociânico o elemento responsável pela cor (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). Por último, Hrazdina & Borzell (1971), ressaltam a possibilidade da reação das antocianinas com um núcleo floroglucinol, gerando um pigmento amarelo (xantila), o qual poderá intervir na cor dos vinhos mais envelhecidos.

A qualidade da uva que se emprega na vinificação também é um fator significativo do conteúdo de pigmentos antociânicos nos vinhos. Entende-se que uvas que apresentarem bagas grandes, as quais possuem grande quantidade de água, produzirão vinhos com baixos teores de antocianinas e demais compostos fenólicos, devido ao aumento da relação mosto/bagaço. Com maiores volumes de mosto e pouco bagaço, os compostos fenólicos, e especialmente as antocianinas, poderão ser mais diluídos, determinando uma redução da coloração do vinho, um efeito não desejado para as variedades tintas como *C. Sauvignon*, por exemplo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

Em estudos recentes (Passos *et al.*, 2001b e Silva *et al.*, 2001) foram quantificados o conteúdo de antocianinas totais em vinhos e sucos produzidos na região do Vale do Rio do Peixe - SC, a partir de variedades americanas (Bordô,

Isabel e Concord – tabela 3), utilizando a mesma metodologia empregada no presente trabalho (Madhavi *et al.*, 1996). Comparativamente ao teor médio de concentração dos pigmentos antociânicos, as às amostras de vinhos *C. Sauvignon* mostraram-se inferiores em 2,46 ordens de magnitude em relação às variedades americanas, um resultado esperado devido às diferenças genéticas entre as variedades produtoras. De fato, usualmente as variedades labruscas tintas (*Vitis labrusca* = Bordô e Isabel) apresentam concentrações de antocianinas superiores às viníferas (*Vitis vinifera* = *C. Sauvignon*), sendo por isto denominadas variedades tintóreas. De outra forma, o conteúdo de pigmentos antociânicos nos vinhos *C. Sauvignon* em estudo superou a média observada nos sucos das variedades americanas (tabela 3), sendo estas discrepâncias explicadas principalmente em função dos métodos de processamento utilizados na elaboração daquelas bebidas. Neste contexto, durante a vinificação, a maceração e a fermentação do mosto contribuem de forma significativa para a extração de antocianinas das películas das uvas através do aumento da superfície de extração dos tecidos (maceração) e da produção de etanol (fermentação), um solvente com grande afinidade pelos compostos antociânicos (Maraschin *et al.* 2002c). Adicionalmente, é preciso considerar que as diferenças entre os dados observados advêm, em alguma extensão, das regiões de origem das biomassas (Serra Gaúcha-RS e Vale do Rio do Peixe-SC), cujas características edafo-climáticas lhes são peculiares, e dos sistemas de manejo dos vinhedos.

Tabela 3. Teor total de antocianinas ( $\mu\text{M}$  - fração metanol-HCl 1% *flash*-cromatografada) em amostras de vinhos e sucos produzidos a partir de variedades americanas oriundas da região do Vale do Rio do Peixe-SC.

<b>Variedade</b>	<b>Produto</b>	<b>Concentração de antocianinas (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
<b>Bordô</b>	Vinho	202 $\mu\text{M}$	Passos, <i>et al.</i> , 2001b
<b>Isabel</b>	Vinho	208 $\mu\text{M}$	Passos, <i>et al.</i> , 2001b
<b>Média</b>		205 $\mu\text{M}$	
<b>Isabel</b>	Suco	47,61 $\mu\text{M}$	Silva, <i>et al.</i> , 2001
<b>Concord</b>	Suco	53,08 $\mu\text{M}$	Silva, <i>et al.</i> , 2001
<b>Média</b>		50,34	

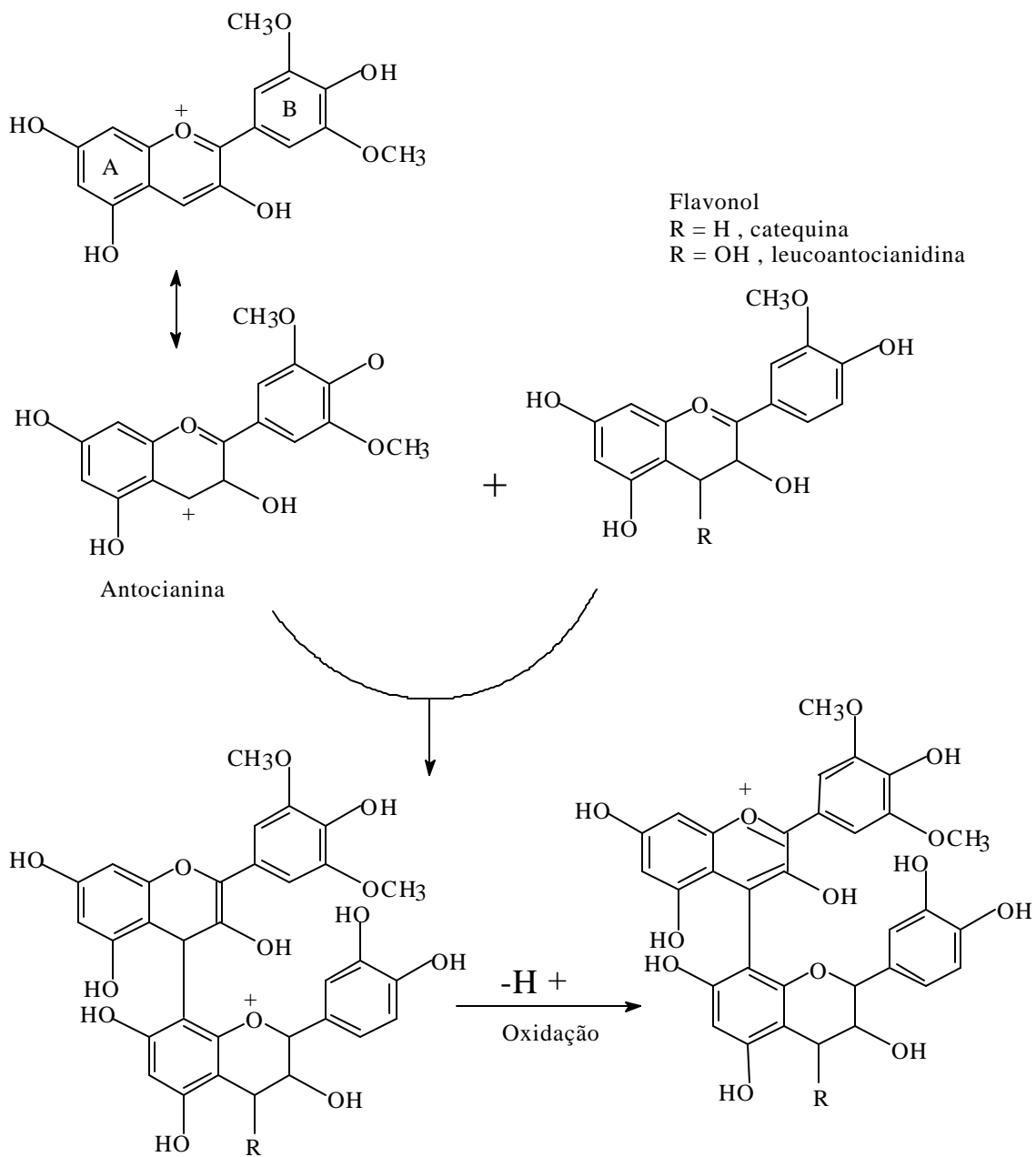


Figura 7: Esquema do mecanismo que demonstra a condensação entre flavonóides e antocianinas e a oxidação destas moléculas ocorrida durante o armazenamento de vinhos tintos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

Numa segunda abordagem metodológica, estudos comparativos entre as safras têm sido realizados através da técnica de espectrofotometria de UV-vis (Maraschin, *et al.*, 2000). Esta abordagem pode servir como estudo comparativo preliminar de composição qualitativa entre amostras de vinhos, assumindo-se como pressuposto metodológico o estabelecimento de um espectro de varredura UV-vis como referência (padrão), obtido de uma amostra cuja qualidade é superior segundo critérios enológicos e/ou químicos. A partir daí, poder-se-á analisar as demais amostras quanto à semelhança do perfil espectrométrico em relação aquele padrão. Além disto, dentro do perfil espectral, poder-se-á estabelecer uma região específica para análises mais detalhadas. No presente estudo, e para efeito de análise comparativa das amostras, foram considerados especificamente os comprimentos de onda de absorção das antocianinas, isto é,  $\lambda = 460\text{nm}$ ,  $525\text{nm}$  e  $750\text{nm}$ ).

Adicionalmente à quantificação de antocianinas na fração MeOH-HCl (1%) das amostras, procedeu-se à determinação e análise dos espectros de varredura (UV-vis,  $200\text{nm} - 750\text{nm}$ ) daquelas amostras, a qual revelou a existência de perfis de composição química distintos para as amostras em estudo, conforme mostrado na figura 8.

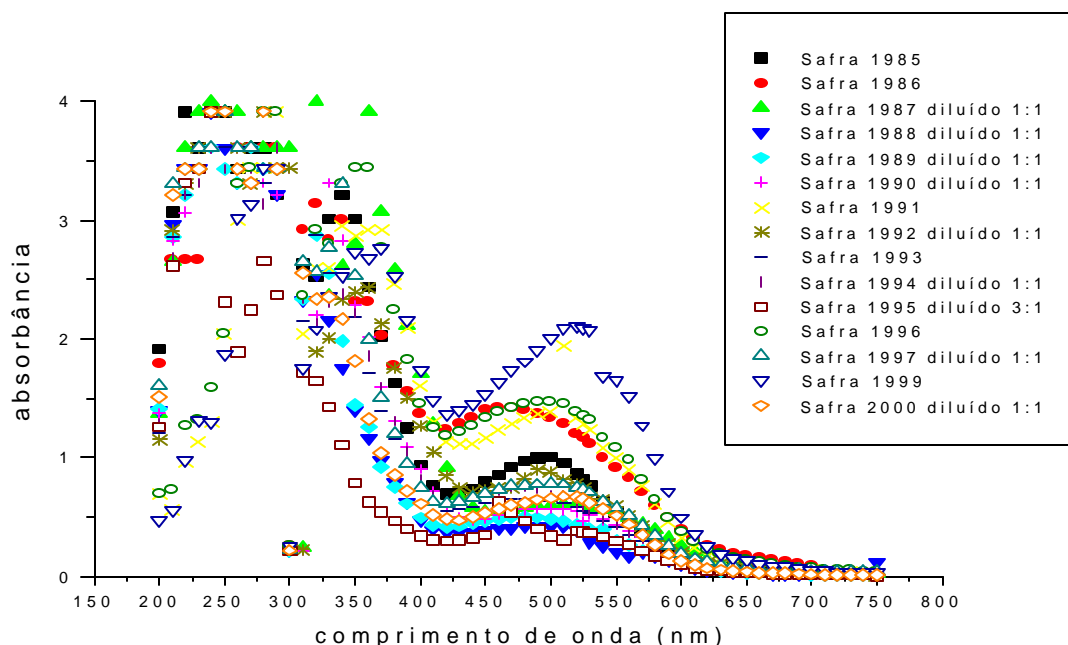


Figura 8. Perfil espectrofotométrico de varredura UV-vis (200 - 750nm) da fração Metanol-HCl(1%) *flash*-cromatografada, de amostras de 15 safras de vinhos *Cabernet Sauvignon*, produzidos na Serra Gaúcha.

É interessante ressaltar a maior similaridade dos perfis espectrais na faixa de comprimentos de onda de 350nm a 750nm. Abaixo de 350nm, contudo, foram observadas diferenças proeminentes entre os espectros das amostras como mostra a figura 8. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que na faixa de comprimentos de onda de 200-350nm são detectadas as diversas possibilidades de substituições do anel benzênico observadas nos compostos fenólicos (Silverstein, 1994). Assim, os dados obtidos sugerem que, em alguma extensão, a composição química da fração metanólica destas amostras é bastante semelhante na faixa de ocorrência de sinais de compostos antociânicos, isto é,

entre 350nm e 750nm, sendo que as maiores discrepâncias no perfil composicional das amostras foram ditadas pelos ácidos fenólicos simples (200nm-350nm).

Devido à especificidade de extração de compostos fenólicos simples e antocianinas, as frações metanólicas das amostras de referência 1991 e 1995 foram analisadas de forma comparativa, quanto ao seus perfis espectrais de varredura. A safra 1991 foi amplamente premiada e dentre as 15 safras analisadas foi a que mais destacou-se segundo os enólogos responsáveis (Carlos Zanus e Ângela M. A. Cimadon – comunicação pessoal). Os espectros de varredura obtidos para estas safras são mostrados na figura 9.

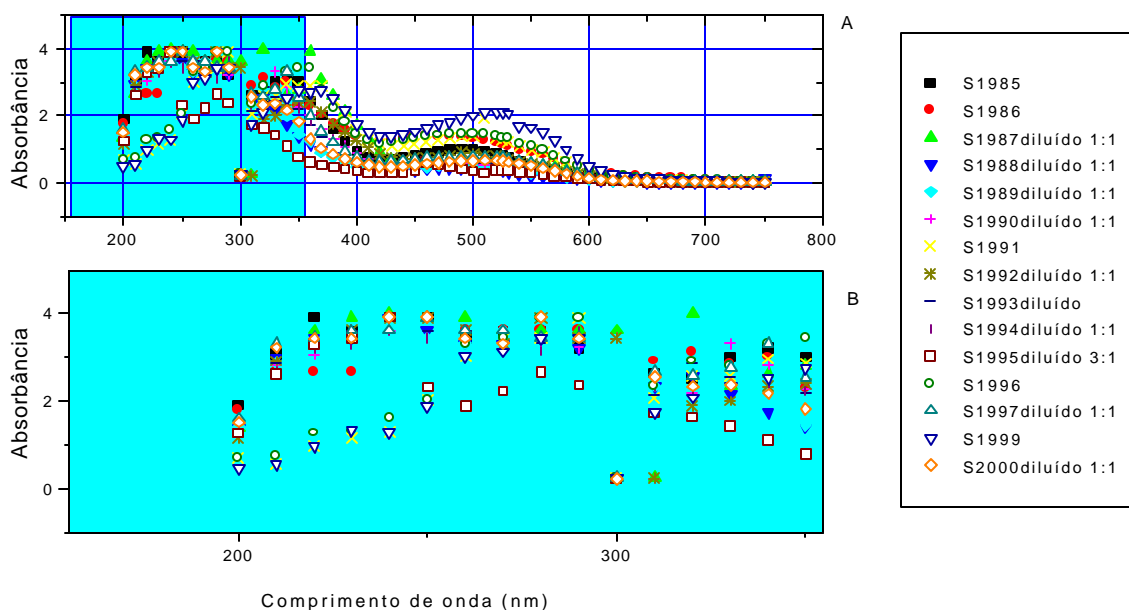


Figura 9. Análise comparativa entre os espectros de varredura das frações *flash*-cromatografadas (solvente MeOH:HCl 1%) de amostras de vinhos *Cabernet Sauvignon* (A) e dentro dos comprimentos de onda 200nm a 350nm (B).

As safras de melhor característica organolética (1991) e de melhor concentração de compostos benéficos a saúde (1995), apresentaram diferenças no perfil espectrofotométrico (absorbância e comprimento de onda), o que sugere que aparentemente não existe uma relação direta entre o melhor sabor e as maiores concentrações de compostos benéficos à saúde humana (figura 10).

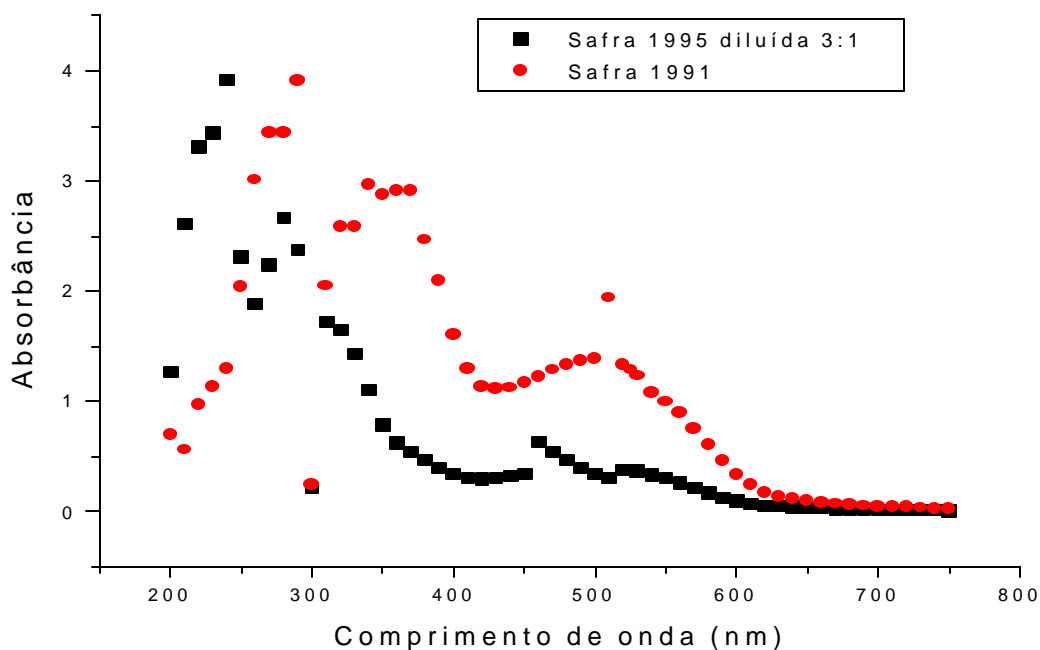


Figura 10. Espectros de varredura (200nm – 750 nm) das amostras de vinhos *C. Sauvignon*, safras 1995 (diluída 3:1) e 1991, das frações MeOH-HCl (1%) pós *flash*-cromatografia.



### **5.3 Proantocianidinas**

Uma série de fatores podem afetar a concentração de compostos fenólicos presentes nos vinhos, sendo muito deles correlacionados. Dos fatores mais importantes que afetam a evolução dos valores de fenóis presentes nas uvas ao longo da maturação destacam-se as condições climáticas (Goldberg et al., 1998, Bisson, 1980; Roggero et al., 1986; Venencie et al., 1997) e a casta (Ribéreau-Gayon, 1971; Dumarzet et al., 1973; Bourzeix et al., 1986; Romeyer et al., 1986; Lee e Jaworski, 1989; Dumon et al., 1991; Ricardo da Silva et al., 1991 b, 1992 a, b; Fernandez de Simon et al., 1992; Fuleki e Ricardo da Silva, 1997; De Freitas, 1995, Bourzeix et al., 1983; Jordão, 1997; Golberg et al., 1998). Além disto, outro fator significativo são as práticas de manejo realizadas na vinha, antes e no decorrer da maturação das uvas. Assim, alguns trabalhos referem as adubações (Lepadatu et al., 1972; Morris et al., 1983), a forma de condução da vinha (Carbonneau, 1991) e ainda a própria prática da desfolha (Ribéreau-Gayon, 1990) como fatores determinantes da alteração de composição de metabólitos secundários das uvas e, conseqüentemente, de seus produtos derivados (vinhos e sucos, e.g.).

Atualmente, encontra-se estabelecido que as proantocianidinas apresentam-se essencialmente nas partes ditas sólidas do cacho de uva, como engaços, gavinhas, sementes e películas. Por ordem decrescente de concentração destes compostos nos tecidos tem-se as gavinhas, os engaços e as películas (Romeyer et al., 1986; Bourzeix et al., 1986; Ricardo da Silva et al., 1991

a; 1992 ab; Hmamouchi et al., 1994; Teissedre et al., 1996; Sun et al., 1998 a). Sendo assim, as proantocianidinas estarão presentes principalmente em vinhos onde houve também a maceração dos elementos do bagaço (película, engaço e sementes) durante a vinificação.

Em vinhos jovens, as proantocianidinas são encontradas principalmente na forma de dímeros e trímeros, porém, durante o envelhecimento de vinhos tintos, as antocianinas e os taninos condensados reagem formando pigmentos de maior peso molecular e com grau de polimerização de 8 a 10 unidades monoméricas (Amerine, 1980; Santos-Buelga e Scalbert, 2000). Estes polímeros caracterizam-se por sua maior complexidade em relação aos polímeros de taninos condensados encontrados nos tecidos das uvas, sendo menos reativos com proteínas e também menos adstringentes em relação aos polímeros de taninos de mesmo peso molecular encontrados em vinhos jovens. Um vinho jovem, devido aos seus compostos tânicos é, geralmente, no contexto sensorial, mais picante, adstringente e/ou áspero. Todavia, ao longo do processo de envelhecimento, a intensidade destas características é reduzida e os vinhos tornam-se mais apreciáveis ao paladar (Kantz e Singleton, 1991). Além disto, ao longo do processo de envelhecimento dos vinhos, ocorrem modificações substanciais na quantidade total de fenóis simples e conjugados (taninos hidrolizáveis, por exemplo) devido, por exemplo, à sua extração a partir da madeira dos barris. Ao longo desta etapa, os compostos fenólicos são o principal substrato do oxigênio nesta bebida, sendo o conteúdo total destas substâncias uma medida da captação de oxigênio e da habilidade do vinho em resistir à oxidação (Polenta, 1996).

De forma similar ao observado em relação ao teor de antocianinas, os valores de conteúdo de compostos tânicos apresentaram grandes variações no decorrer das 15 safras analisadas, como demonstrado na figura 11. A análise estatística dos dados de conteúdo destes metabólitos secundários proantocianidinas demonstrou uma amplitude de distribuição de valores entre 17,84mg/L (safra 1987) e 4,22mg/L (safra 1996), com média geral de 9,71mg/L, ao longo das 15 safras de vinhos *Cabernet Sauvignon*. O cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação dos experimentos indicou valores de 3,4 e 34,54%, respectivamente, os quais foram considerados bastante satisfatórios para o método de quantificação adotado, visto que este foi adaptado para a análise de vinhos e também em função dos diversos fatores que influenciam a composição química dos vinhos.

Pode-se observar na Figura 11 que as safras 87 e 92 apresentaram os maiores valores. Estes resultados podem ser explicados, em alguma extensão, pela utilização de novas barricas de carvalho no envelhecimento destas safras. As barricas de carvalho são responsáveis pela presença de taninos pirogálicos ou hidrolizáveis, sendo que estes também podem ser dosados pelo método escolhido. Além disto, as barricas de carvalho contribuem para a composição dos compostos aromáticos que farão parte do “bouquet” de aromas dos vinhos tintos (Diaz-Plaza, *et al.*, 2002a, 2002b).

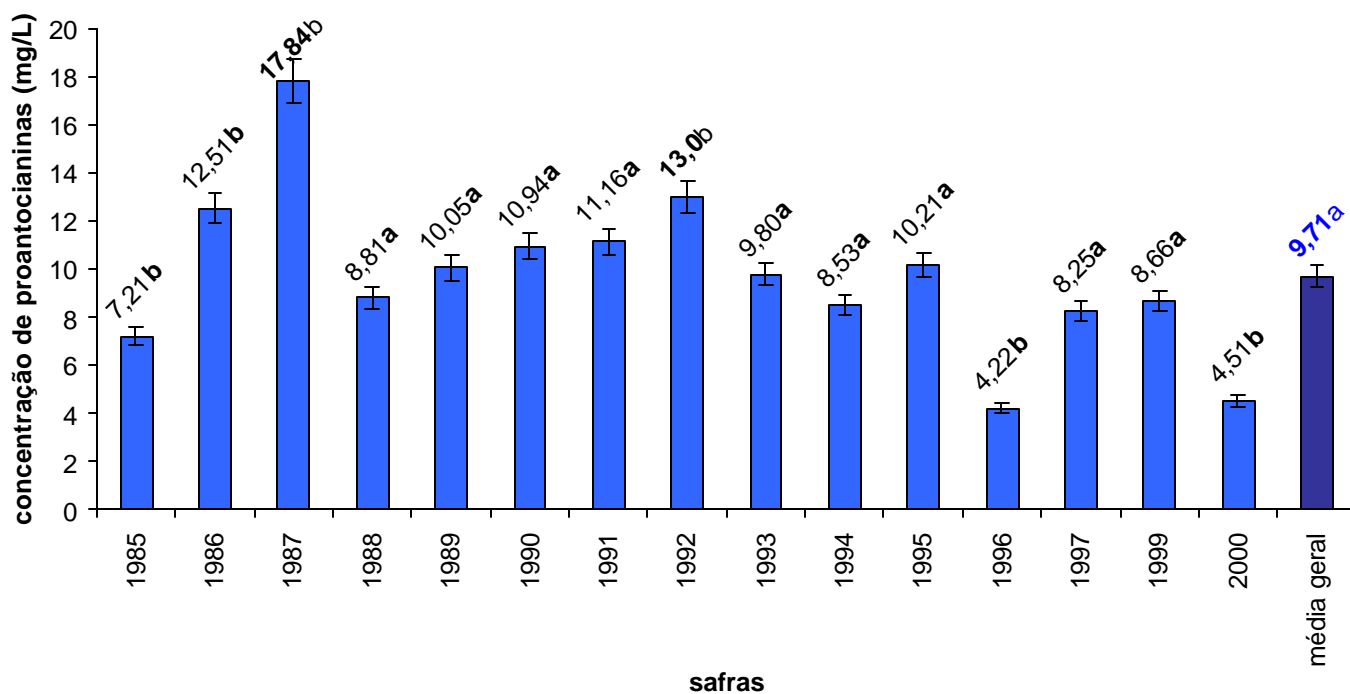


Figura 11. Concentração total de taninos em amostras de 15 safras de vinhos *Cabernet Sauvignon* produzidos na Serra Gaúcha ( $p < 0,05$ ).

Estudos feitos com vinhos tintos da região de Bordeaux (França) demonstraram valores de concentração de taninos entre 1,5 e 4g/L (Ribéreau-Gayon, et al., 1972). Estes dados diferem daqueles observados no presente trabalho (média = 9,71mg/L), porém esta discrepância pode ser atribuída, em alguma extensão, ao fato de que as regiões geográficas são diferentes, assim como a constituição do solo, as variedades, as práticas adotadas na viticultura e enológicas, além dos processos pós-fermentação como o armazenamento e envelhecimento destes vinhos em barricas de carvalho. Além disto, os autores comentam que as técnicas utilizadas para a determinação destes compostos são antigas e, em função disto, citam a realização de outros estudos que

proporcionaram melhores resultados, porém não os apresentam (Ribéreau-Gayon, et al., 1972). Mais recentemente, Santos-Buelga e Scalbert (2000) descrevem uma grande amplitude de valores de concentração de proantocianidinas em vinhos tintos (traços → 500 mg/L) obtidos por diferentes métodos, os quais assemelham-se aos resultados encontrados no presente trabalho.

Ianssen *et al.*, (2002), utilizando a mesma metodologia descrita neste trabalho, descreveram a presença de taninos em vinhos e sucos produzidos a partir das variedades americanas Bordô e Isabel, oriundas do Vale do Rio do Peixe (SC), em concentrações (tabela 4) próximas àsquelas observadas nos vinhos tintos provenientes de castas viníferas da Serra Gaúcha (*C. Sauvignon e Merlot*). Este resultado é de interesse, uma vez que o nível tecnológico empregado para a produção de sucos e vinhos de variedades americanas (vinhos comuns) no Brasil é bastante inferior ao empregado na elaboração dos vinhos tintos finos analisados neste trabalho.

Tabela 4. Concentração de compostos tânicos (mg/L) em vinhos e sucos das variedades Bordô e Isabel, oriundos da região do Vale do Rio do Peixe – SC.

<b>Variedade</b>	<b>Produto</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
<b>Isabel</b>	Suco	10,91 mg/L
<b>Isabel</b>	Vinho	5,9 mg/L
<b>Bordô</b>	Vinho	3,07 mg/L

Fonte: Ianssen, *et al.*, 2002.

Nas safras iniciais, 1985 a 1990 (média = 11,23 mg taninos/L), a fermentação era totalmente realizada em recipientes de aço inox chamados de fermentinos, onde não era possível controlar o processo como acontece nos atuais sistemas vinomatik. As remontagens nos fermentinos eram feitas através de bombeamento do mosto, enquanto nas vinomatiks o sistema de remontagem, além de ser mais eficiente, é menos agressivo no que concerne à extração dos compostos tânicos da biomassa em fermentação. Assim, e considerando que após 1990 as vinificações passaram a ser realizadas em vinomatiks, foi possível detectar a redução (média = 8,70 mg/L) do conteúdo daqueles metabólitos nas amostras analisadas resultante da modificação da tecnologia empregada na vinificação.

Outros fatores como a presença de agentes clarificantes como a clara de ovo, a gelatina, a bentonite são utilizados para a precipitação de complexos entre proteínas e taninos, devido estes compostos estarem ligados a turbidez apresentada pelos vinhos (Krug, 1968). A clara de ovo e a gelatina são utilizadas principalmente para a precipitação de compostos fenólicos como taninos e outros compostos oxidados, enquanto a bentonite é utilizada para precipitar as proteínas restantes deste processo. Em todas as safras em estudo foram acrescentados agentes clarificantes. No entanto, novas tecnologias tem sido empregadas nos últimos 8 anos, como a utilização de terras filtrantes e de filtros à vácuo, para a retirada de material em suspensão (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

#### 5.4 Estilbenos

O composto *t*-resveratrol, citado neste trabalho como referência de compostos estilbênicos, encontra-se em vinhos em duas formas isoméricas *cis* e *trans*. Neste trabalho, enfocou-se somente a forma isomérica *trans*, porque os relatos de propriedades farmacológicas mencionam apenas este isômero como de interesse (Jeandet, *et al.*, 1991; Adrian *et al.*, 2000). De fato, até o presente momento, e para o melhor de nosso conhecimento, o isômero *cis* daquele estibeno parece não apresentar atividades farmacológicas de interesse.

A concentração deste composto nos vinhos é função de uma série de fatores, principalmente devido a estresses ambientais causados por agentes abióticos como os metais pesados, a radiação U.V e extremos de temperatura ou luz, ou bióticos como infecções fúngicas. Além disto, após a fabricação dos vinhos, estes podem sofrer oxidações durante seu envelhecimento em barricas de carvalho (o que neste caso é desejável) e fotooxidação já dentro de suas embalagens finais, o que deve ser impedido. No caso específico de *t*-resveratrol, sua fotosensibilidade é de interesse porque com a incidência de luz sobre o mosto ou o vinho, inclusive durante a análise destes, poderão ser obtidos valores de concentrações variáveis, conforme o cuidado e rigor experimental tomado diante destas situações (Orea *et al.*, 2001). No presente trabalho tomaram-se todas as precauções cabíveis para a análise deste composto fotossensível.

O conteúdo do composto *t*-resveratrol apresentou-se variável durante as 15 safras analisadas, como mostra a figura 12. A análise estatística dos dados de concentração de *t*-resveratrol nas amostras das 15 safras de vinhos *C. Sauvignon*

revelou uma amplitude de distribuição de valores entre 6,52 mg/L (safra 1995) e 2,18mg/L (safra 1985), com média geral de 3,62mg/L, desvio padrão de 1,4 e coeficiente de variação dos experimentos de 41,79%, respectivamente. O elevado valor do coeficiente de variação é atribuído, em alguma extensão, ao efeitos dos diversos fatores (a)bióticos sobre o metabolismo secundário da planta que levam à produção/degradação deste composto, bem como às possibilidades de variação das práticas de manejo da biomassa em pre- e pós-colheita e às distintas abordagens de vinificação. Do ponto de vista bioquímico e tomados em conjunto os dados de concentração deste estilbeno em relação aos dados observados de conteúdo dos demais compostos em estudo, é possível observar que o teor de *t*-resveratrol foi mais fortemente influenciado pela gama de fatores que modulam o metabolismo vegetal. No contexto da análise orgânica, contudo, é preciso considerar que a abordagem comparativa dos resultados deve ter em conta o fato de que os valores de concentração de antocianinas e fenóis provêm de uma classe de compostos, implicando em uma menor probabilidade de variação de conteúdos, contrariamente ao enfoque dado ao *t*-resveratrol.



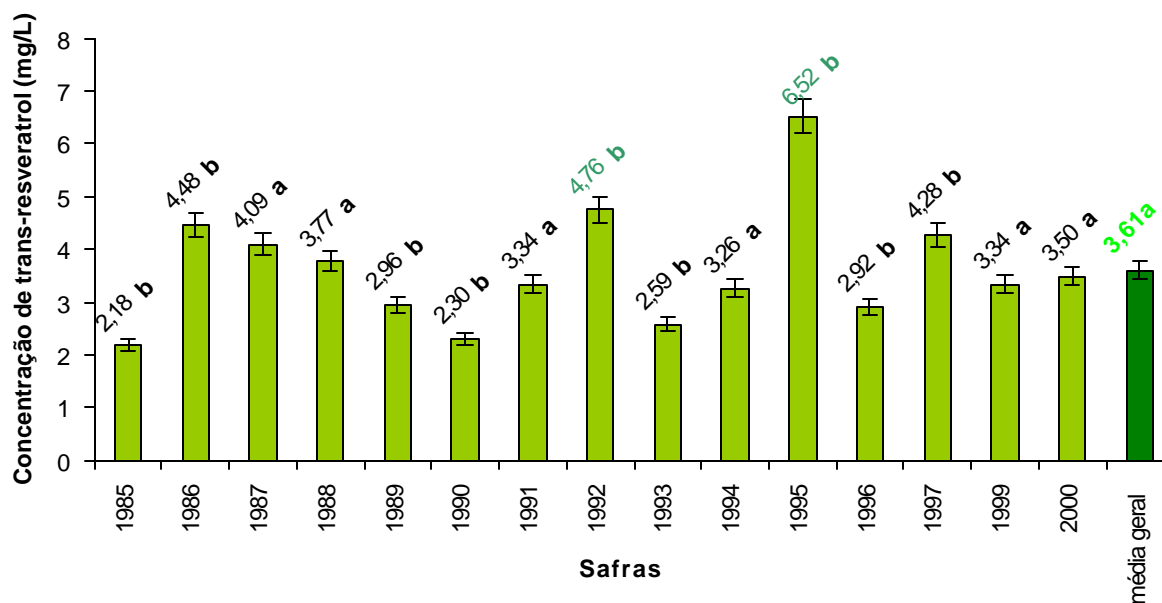


Figura 12. Concentração de *trans*-resveratrol (mg/L) na fração acetato de etila obtida por *flash*-cromatografia de amostras de vinhos *Cabernet Sauvignon* (safras 1985-2000), produzidos na Serra Gaúcha ( $p < 0,05$ ).

Durante o processo de vinificação, a extensão da maceração das películas dos frutos (cascas) e a temperatura da fermentação são considerados fatores significativos que determinam a concentração de estilbenos em vinhos (Pezet e Cuenat, 1996; Ector *et al.*, 1996; Netzel *et al.*, 2003). De fato, uma concentração elevada de resveratrol em vinhos tintos requer, além dos fatores anteriormente mencionados, relativamente uma extensa maceração das cascas para uma extração eficiente (Jeandet, *et al.*, 1995, Pezet & Cuenat, *et al.*, 1996, Lamuela-Raventos, 1997). Entretanto, as concentrações presentes também dependem de outras técnicas enológicas empregadas como, por exemplo, as cepas de

leveduras utilizadas (Vrhovsek *et al.*,1997), os agentes filtrantes e o tempo exposto às barricas de carvalho (Jeandet *et al.*, 1995).

A análise comparativa dos resultados de concentração de *t*-resveratrol (Fig. 13) em relação aos valores encontrados na literatura indicou a ocorrência de teores geralmente superiores àqueles observados em amostras de vinhos tintos oriundos de países tradicionalmente produtores (Itália, França e EUA). Esses valores podem variar de acordo com a origem geográfica do produto, a cultivar, a ocorrência de infecções fúngicas e das práticas enológicas envolvidas no processo de fabricação do produto. Assim, análises comparativas diretas de dados deverão considerar as diversas possibilidades de fontes de variação experimental acima mencionadas, de modo a não gerar conclusões errôneas. Além disto, deve-se considerar que a literatura, em alguns casos, traz a concentração de resveratrol total, ou seja, valores relativos ao somatório dos conteúdos dos isômeros *cis* e *trans*, o que não acontece no presente trabalho que abordou a dosagem apenas do composto biologicamente ativo, o que não acontece com o isômero *cis* daquele polifenol.

Do ponto de vista ecológico, os maiores valores de *t*-resveratrol observados nas amostras em estudo, comparativamente aos teores observados em vinhos estrangeiros, podem estar relacionados às condições climáticas comumente encontradas nas regiões produtoras de uva gaúchas. Estas se caracterizam por altos índices de precipitação pluviométrica e altas temperaturas, durante a fase de crescimento e amadurecimento dos frutos. A ação isolada e/ou interativa destes fatores climáticos é favorável à incidência de doenças fúngicas em tecidos de frutos da videira. Como mecanismo de resposta bioquímica aquele estresse

biótico, as plantas podem aumentar a síntese de compostos com ação fungicida e/ou fungistática, i.e., fitoalexinas, (Verpoorte, 1998) tais como o *t*-resveratrol. De fato, esta abordagem tem sido utilizada em diversos estudos que demonstram a existência de incrementos na taxa de síntese daquele metabólito secundário, quando a planta encontra-se exposta à perturbações de natureza abiótica ou biótica (Dercks & Creasy, 1989; Hain *et al.*, 1990; 1993; Calderón *et al.*, 1993).

Mais recentemente, a ocorrência de resveratrol em produtos derivados da uva e, particularmente, em vinhos foi observada, com valores de concentração variando de 0,45 a 32 mg/L (Siemann & Creasy, 1992; Goldberg, *et al.*, 1996; Adrian, *et al.*, 2000; Frémont, 2000; Ianssen, *et al.*, 2002) . Como regra, os vinhos tintos apresentam teores superiores de *t*-resveratrol, em relação aos vinhos brancos e rosados, variando segundo a casta de uva empregada. Em vinhos tintos, a concentração de *t*-resveratrol, varia principalmente de acordo com a variedade da uva empregada, como pode ser visto na tabela 5. Bavaresco (1993) e Jeandet *et al.*, (1992) relataram diferenças na produção de *t*-resveratrol em diversas castas, relacionando sua presença como indicativo de resistência das videiras às infecções de microrganismos. De fato, este composto pode ser usado como marcador bioquímico e taxonômico para este propósito.

Tabela 5. Dados da literatura demonstrando a concentração de *trans*-resveratrol (mg/L) em vinhos tintos produzidos em diferentes países, segundo o método de análise empregado.

<b>Variedade</b>	<b><i>trans</i>-resveratrol (mg/L)</b>	<b>Método de análise</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
<b>Pinot Noir</b>	6,3	FR-HPLC	Adrian, <i>et al.</i> , 2000
<b>Chianti</b>	1,28	FR-HPLC	Goldberg, <i>et al.</i> , 1996
<b>Cabernet Sauvignon</b>	2,23	FR-HPLC	Goldberg, <i>et al.</i> , 1996
<b>Isabel</b>	4,01	UV-vis	Ianssen, <i>et al.</i> , 2002
<b>Bordô</b>	3,61	UV-vis	Ianssen, <i>et al.</i> , 2002
<b>Shiraz</b>	2,26	FR-HPLC	Goldberg <i>et al.</i> , 1996
<b>Média</b>	<b>3,28</b>	-	-

Em vinhos rosados, os níveis estão na faixa entre 1,38 e 2,93 mg/L (Lamuela-Raventos, *et al.*, 1995), enquanto para os vinhos brancos, que são usualmente feitos sem a presença das cascas na maceração, valores inferiores têm sido observados (0,1mg/L para a variedade Chardonnay e 1,2mg/L para a variedade Sauvignon Blanc (Romero-Perez *et al.*, 1996), por exemplo. Em sucos de uvas tintas, teores deste polifenol entre 0,69 e 14,47mg/L (média 4,73mg/L) têm sido relatados, sendo que para sucos de uvas brancas, valores máximos de 1,44mg/L - média de 0,49mg/L - são encontrados (Romero-Perez, 1999). Em função disto, os dados obtidos revelam que as concentrações deste polifenol nos

vinhos *C. Sauvignon* em estudo foram superiores, em termos médios, ao observado na literatura (Tabela 5).

Em uma segunda abordagem experimental, a presença de *t*-resveratrol nas amostras de vinhos *Cabernet Sauvignon* foi investigada segundo por  $^1\text{H}$ -RMN através da comparação dos valores de deslocamentos químicos daquele polifenol, os quais foram obtidos através de espectros do composto de referência. Todas as amostras, com exceção da amostra da safra de 1985, apresentaram sinais característicos da presença de *t*-resveratrol. No entanto, a não detecção deste polifenol na safra de 1985 pode ter ocorrido devido à interferência (sobreposição) de sinais de deslocamento químicos de outros compostos durante os experimentos de RMN.

A concentração de um composto deve ser suficiente para gerar uma adequada relação sinal/ruído no espectro. Este aspecto é função do nível de sensibilidade do espectrômetro de ressonância, mas valores em torno de 0,005 mg/mL têm sido considerados como limites de detecção para  $^1\text{H}$ -RMN, em espectrômetros operando em frequência de ressonância de hidrogênio de 300 MHz (Verpoorte & Scripsema, 1994). Resultados prévios da análise de polifenóis (*t*-resveratrol, e.g.) por 1D- $^1\text{H}$ -RMN (Maraschin *et al.*, 2000) em vinhos tintos demonstraram a viabilidade desta estratégia analítica, devido à ocorrência de concentrações superiores ao limite de detecção do método. Os dados demonstraram a particularidade de composição das amostras de vinhos tintos, sugerindo a possibilidade de utilização destas técnicas analíticas no monitoramento de compostos de interesse.

### **5.5 Análises espectrométricas por $^1\text{H}$ -RMN e $^{13}\text{C}$ -RMN**

As análises por espectrometria de  $^1\text{H}$ -RMN das amostras em estudo demonstraram que a composição química dos vinhos *C. Sauvignon* não apresentou diferenças proeminentes nas safras estudadas, considerando os perfis espectrais observados. Estudos comparativos preliminares dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta_{\text{ppm}}$  – Figura 13) indicaram que as amostras em estudo apresentaram diferenças mínimas no que diz respeito à sua composição química, conforme demonstrado na figura 13.

A análise dos fatores que concorrem para explicar os resultados observados é dificultada pela diversidade destes e pela factual possibilidade de ocorrência de efeitos interativos. Todavia, a abordagem metodológica utilizada é de interesse quando se busca a análise comparativa de safras em relação a um dado padrão de qualidade enológica e/ou química superior, podendo servir como modelo de análise para definição de valor do produto.

O conjunto de sinais de deslocamentos químicos dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN das amostras foi utilizado para o cálculo do índice de similaridade das safras, via análise estatística multivariada (*cluster analysis* - Gorham, 1989; Dercks, *et al.*, 1995; Maraschin, *et al.* 2002b), tendo a safra 1991 (referência organolética) como controle para efeitos comparativos. As safras 1990 e 1994 apresentaram os maiores valores de índice de similaridade em relação ao controle (67,74%),

contrariamente ao observado para a safra de 1985 (24,19%), conforme demonstrado na tabela 6.

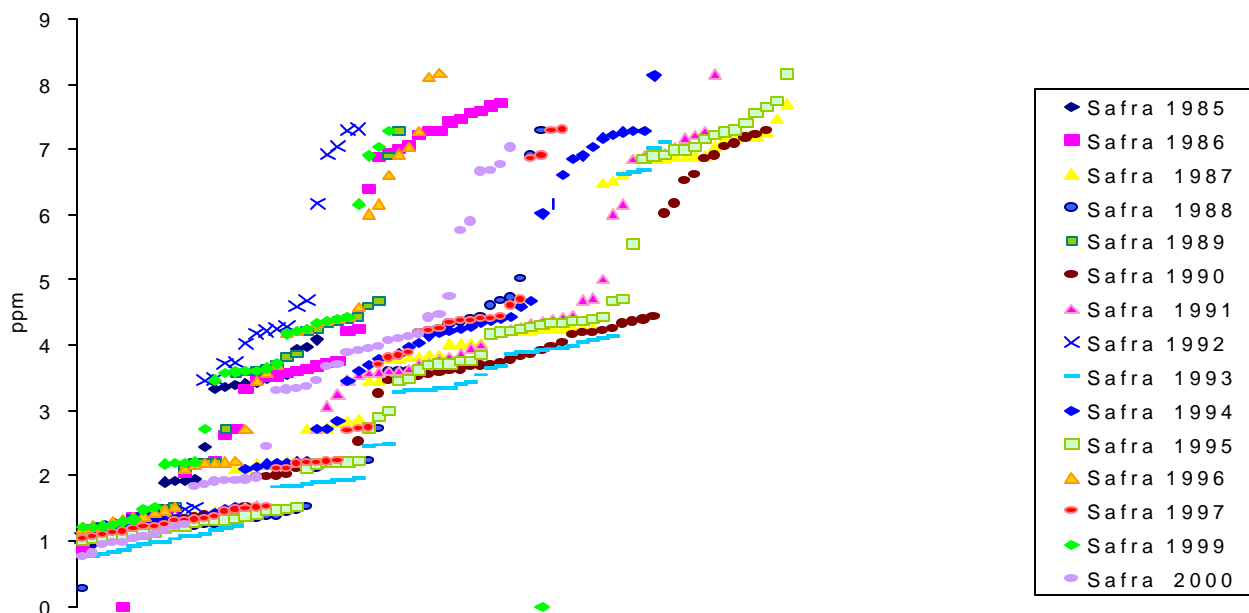


Figura 13. Deslocamentos químicos de  $^1\text{H-RMN}^*$  ( $\delta_{\text{ppm}}$  - 200 MHz) da fração acetato de etila *flash*-cromatografada de vinhos *Cabernet Sauvignon* (safras 1985-2000), produzidos na Serra Gaúcha. \* deslocamentos químicos são relativos a acetona-d6 - 2.20 ppm.

Tabela 6. Índices de similaridade\* de composição química das safras de vinhos *C. Sauvignon* produzidos na Serra Gaúcha, determinados por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN, em relação à safra referência organolética (1991).

<b>Safra</b>	<b>Similaridade com a safra 1991</b>
<b>1985</b>	24,19 %
<b>1986</b>	33,87 %
<b>1987</b>	40,32 %
<b>1988</b>	53,22 %
<b>1989</b>	38,70 %
<b>1990</b>	67,74%
<b>1992</b>	48,38 %
<b>1993</b>	56,45 %
<b>1994</b>	67,74 %
<b>1995</b>	58,06%
<b>1996</b>	45,16 %
<b>1997</b>	50,00 %
<b>1999</b>	50,00 %
<b>2000</b>	56,45 %

\* calculados com o auxílio do programa NTSys 2.0 (para detalhes ver Material e Métodos).



Em uma segunda abordagem, as amostras de vinhos *Cabernet Sauvignon* foram investigadas quanto à presença de compostos polifenólicos de interesse por comparação dos valores de deslocamentos químicos de  $^1\text{H-RMN}$  ( $\delta_{\text{ppm}}$ ), os quais foram obtidos através de espectros dos compostos de referência. Adicionalmente, e para a comprovação da ocorrência de um composto específico (*t*-resveratrol, por exemplo), fez-se a adição de microvolumes (~ 10-15 $\mu\text{L}$ ) de solução padrão (5 mg/mL) do composto de interesse às amostras em estudo, seguido da avaliação do aumento da intensidade dos sinais com deslocamentos químicos específicos. Esta estratégia metodológica permitiu detectar de forma rápida a ocorrência de sinais de ressonância típicos de compostos tais como *t*-resveratrol ( $\delta_{\text{H}} = 6.88$  e 6,29 ppm), quercitina ( $\delta_{\text{H}} = 6,40; 6,41; 6,67$  e 12,32 ppm) e de ácidos fenólicos simples como o ácido gálico ( $\delta_{\text{H}} = 1,11; 1,14$  e 1,43 ppm) e o ácido ferúlico ( $\delta_{\text{H}} = 6,48; 7,27$  e 7,48 ppm), bem como o ácido málico ( $\delta_{\text{H}} = 2,76; 2,80; 2,84; 2,88$  e 4,67 ppm). No entanto, por usar-se apenas alguns dos muitos deslocamentos químicos encontrados nos padrões, e devido à coincidência de alguns deslocamentos dentre estes, os resultados demonstrados na tabela 7 não são definitivos, sendo que a função destes é apenas mostrar que é viável a detecção da presença destes compostos, dentro das limitações da técnica.

Assim, mesmo em amostras com resultados negativos quanto à ocorrência de compostos de interesse, poderão haver concentrações satisfatórias destes compostos. Isto pode ser explicado pelo fenômeno de interação entre os núcleos dos compostos alvo e de outras moléculas presentes na solução. Outro fator de extrema relevância é a possibilidade de sobreposição dos sinais dos

deslocamentos químicos. Em função disto, estudos aprofundados sobre este tema continuarão a ser realizados pelo grupo onde este trabalho foi desenvolvido.

Tabela 7. Detecção da presença\* de compostos de interesse por  $^1\text{H-RMN}$  em amostras de vinhos *Cabernet Sauvignon* produzidos na Serra Gaúcha

Safras	<i>t</i> -resveratrol	Ácido gálico	Ácido ferúlico	Ácido málico	Quercitina
1985					
1986					
1987					
1988					
1989					
1990					
1991					
1992					
1993					
1994					
1995					
1996					
1997					
1999					
2000					

\* Áreas hachuradas significam a presença do composto, enquanto áreas em branco indicam sua ausência nas amostras.

As análises de índices de similaridade utilizando os deslocamentos químicos dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras indicaram que a safra 1997 apresentou a maior similaridade (76,92%) em relação ao controle, enquanto a safra 1985 diferiu em maior extensão daquele (12,82%), similarmente ao observado nos estudos com  $^1\text{H}$ -RMN. É interessante ressaltar a discrepância entre os resultados obtidos nos cálculos dos índices de similaridade através dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN e  $^1\text{H}$ -RMN, no que se refere às safras cuja composição química apresentou maior semelhança ao controle, 1997 e 1990/1994, respectivamente. Estas diferenças entre os resultados podem ser atribuídas a diversos fatores de ordem experimental, tais como a sensibilidade do equipamento à captação das energia de ressonância dos núcleos e  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , a sobreposição de sinais de deslocamentos químicos, o desdobramento dos sinais, a interação entre as estruturas de compostos e a formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas da amostras, os quais podem influenciar nos resultados tanto na RMN de carbono como na RMN de hidrogênio, fazendo com os resultados apresentem-se de maneira distinta. Em função disto, os resultados obtidos recomendam a continuidade dos estudos, de modo a possibilitar um melhor entendimento destes fatores, especialmente quando se busca estabelecer um método de comparação dos perfis de composição química via RMN, com o intuito de estabelecer-se referenciais consistentes em base química no que tange à qualidade dos vinhos. Esta inovação tecnológica, por certo, poderá ser utilizada como instrumento de agregação de valor aquela bebida. De fato, a versatilidade da espectrometria de  $^1\text{H}$ -RMN faz com que esta ferramenta seja cada dia mais utilizada para análises qualitativas de constituintes químicos, em complexas

amostras biológicas, devido à extensa gama de compostos que podem ser investigados em cada espectro. Adicionalmente, o aprofundamento das investigações por RMN permitirá a elaboração de um banco de dados que, num segundo momento, viabilizará a realização de trabalhos visando a caracterização daquela bebida através da denominação de origem, um aspecto bastante difundido na Europa e de significativa importância comercial.

### **5.7 Análise de metabólitos secundários de interesse por MALDI TOF-MS**

A utilização de MALDI TOF-MS têm se mostrado adequada à determinação do peso molecular de biomoléculas como proteínas, oligossacarídeos, oligonucleotídeos, glicoproteínas e flavonóides (Sugui, *et al.*, 1998). A alta eficiência da detecção destes compostos através desta técnica viabiliza a execução de rotinas de análises com baixas concentrações do analito (fentomoles - Pfenninger *et al.*, 1999), além de permitir a obtenção de informações de compostos de alto peso molecular e não-voláteis através da ionização de suas estruturas. A alta sensibilidade e a rapidez da técnica podem ser importantes quando se busca detectar metabólitos secundários de plantas (que geralmente apresentam-se em baixas concentrações), ou novos compostos com potencial farmacêutico (Maraschin *et al.*, 2001b).

Os experimentos realizados neste trabalho não lograram êxito quanto a detecção dos metabólitos secundários em estudo, e especialmente de *t*-

resveratrol, quando da introdução direta da amostra no espectrômetro de massa. Este fato pode ter ocorrido devido a inúmeros fatores como, por exemplo, a falta de interação entre a amostra e a matriz escolhida, a necessidade de uma etapa de extração dos compostos e/ou pré-tratamento das amostras, ou ainda decorrente de problemas de estabilidade das amostras no ambiente da matriz. Em consequência disto, estudos envolvendo o pré-tratamento das amostras encontram-se em andamento pela equipe de trabalho, a fim de promover um maior entendimento do processo, de modo a permitir o estabelecimento de um protocolo de trabalho que permita a detecção dos compostos naquela matriz complexa de forma rápida e com baixo custo operacional. De forma similar ao observado nos experimentos de RMN, o desenvolvimento de métodos de análise rápidos e de baixo custo constitui uma abordagem tecnológica de interesse quando se objetiva uma melhor caracterização dos componentes químicos dos vinhos, maiormente aqueles de interesse à saúde humana.

## 6. CONCLUSÕES

- As safras de vinhos *C. Sauvignon* 1986, 1991 e 1995 apresentaram as melhores concentrações de compostos de interesse farmacológico em relação a média;
- A análise em sistema *off-line* por cromatografia líquida e espectrometria de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN (CL- $^1\text{H}$ -RMN, CL- $^{13}\text{C}$ -RMN ) de amostras de vinhos *Cabernet Sauvignon*, produzidos no Sul do Brasil, pode ser uma estratégia apropriada para efeitos de estudos comparativos do perfil de constituintes químicos daquelas matrizes complexas;
- As safras 1988, 1990, 1994, 1995 e 2000, apresentaram os maiores valores de similaridade ao controle organolético (1991), conforme demonstrado por CL- $^1\text{H}$ -RMN e análise multivariada;
- A detecção de compostos de interesse à saúde humana por  $^1\text{H}$ -RMN revelou que as safras 1987, 1988, 1989, 1991, 1993, 1995 e 1997 de vinhos *C. Sauvignon* apresentaram um perfil qualitativo superior de composição química;
- O monitoramento dos diversos fatores (a)bióticos que estão ligados à determinação da composição química do vinho é condição de significativa importância para o estabelecimento de conclusões em estudos de caráter comparativo da qualidade de vinhos, notadamente devido à complexidade de sua ação;

- Comparativamente aos dados encontrados na literatura, os vinhos tintos *C. Sauvignon* analisados apresentaram teores de compostos benéficos à saúde humana superiores a maior parte dos relatos encontrados para vinhos estrangeiros;
- A injeção direta de amostras de vinhos *C. Sauvignon* em espectrômetro de massa com ionização assistida por laser não se mostrou uma estratégia adequada à detecção rápida dos compostos em estudo;
- Os dados obtidos sugerem a possibilidade de valorização do produto como fator de marketing, devido ao grande interesse popular por alimentos e bebidas funcionais, os quais trazem os benefícios das vitaminas e compostos com atividades terapêuticas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAN, M., JEANDET, P. BREUIL, A. C., LEVITE, D. DEBORD, S. BESSIS, R. - Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. **Am. J. Enol. Vitic.**, **51**:37-41, 2000.

ALVES, J.S. **Estudo da cor e composição fenólica durante a fermentação de quatro cultivares de *Vitis vinifera***. Santa Maria/RS, 2000. 88p. (Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria)

AMERINE, M. A & JOSLYN, M. A – **Table wines: the technology of their production berkeley**. University of California Press, 1987.

AMERINE, M. A. *et al.*, **Technology of wine making**. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 1980.

AMERINE, M.A. & OUGH, C.S. **Analisis de vinos y mostos**. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha, 1976.

AMES, B. N. - Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxigen radicals and degenerative diseases. **Science**, **221**:1256-1264, 1983.

APOSTANDO na uva. Disponível em: [www.academiadovinho.com.br](http://www.academiadovinho.com.br) — acesso em: 18/06/2002.

BARLASS, M.; MILLER, R.M.; DOUGLAS, T.J. - Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. II. Resveratrol production. **Am. J. Enol. Vitic.** **38**:65-68, 1987.



BARQUETTE, B. & TRIONE, D. - **Les tanins**. Actas do 4<sup>o</sup> Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo. Vol II : 255-261, 1998.

BAVARESCO, L. - Action du potassium sur la synthese induite du stilbene chez differents varietes de vignes. **Bull OIV**, 676-689, 1993.

BELGUENDOZ, L., FRÉMONT, L.; GOZZELINO M. - Interaction of Transresveratrol with Plasma Lipoproteins. **Biochem. Pharmacol.**, **55**: 811-816, 1998.

BISSET, N. G.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J. - Some current trends in medicinal plant research. In: **The Medical Plant Industry**. Ed. Wigesekera, R.O.B., 1991.

BISSON, J. - **Aplication de l'étude des matières colorantes du raisin noir à la selection variétale**. Bordeaux, 1980. (Thèse Docteur en Oenologie-Ampélogie. Université de Bordeaux II) .

BLAICH, R. & BACHMANN, O. - Die resveratrolsynthese bei Vitaceen: Induktion und zytologische beobachtungen. **Vitis** **19**:230-240, 1980.

BLAICH, R.; BACHMANN, O.; STEIN, U. - Causes biochimiques de la resistance de la vigne a *Botrytis cinerea*. **EPPO Bull** **12**:167-170, 1982.

BLANCO , V. Z. *et al.*, Effect of processing on phenolics of wines. **Advances in Experimental Medicine and Biology** **434**:327-340, 1998.

BOMSER, J. - In virus anticancer activity of fruit extracts from Vaccinium species. **Planta Medica**, **62**: 212-216, 1993.

BOURZEIX, M.; HEREDIA, N.; KOVAC, V. - Richesse de différents cépages en composés phénoliques totaux et en anthocyanes. **Progrès Agricole et Viticole**, **17**: 421-428, 1983.

BOURZEIX, M.; WEYLAND, D.; HEREDIA, N. - Étude des catéchines et des procyanidols de la grape de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. **Bull. de l'O.I.V.**, **669-670**: 1175-1254, 1986.

BRESCIA, M.A. *et al.*, - Characterization of the geographical origin of italian red wines based on tradicional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. **Analytica Chimica Acta** **458**:177-186, 2002.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In MARKAKIS, P (Ed.), **Anthocyanins as food colours**. New York: Academic Press, 1982.

BUTLER, L. G. & ROGLER, J. C. – Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. In: **Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. I. Analysis, Occurrence and Chemistry**. Ed. by HO, C.T.; LEE, C.Y.; HUANG, M. T. American Chemical Society, Washington, DC, pp298-304, 1992.

CALLEBAUT, A. *et al.* - Anthocyanins in cell cultures of *Ajuga reptans*. **Phytochemistry**, **29**: 2153-2158, 1990.

CARBONNEAU, A. - Conduite du vignoble et qualité du vin: des faux debats sur la densité de plantation à la "lyriculture". **Riv. Viti. Enol.**, **4**: 329-333, 1991.

CARVALHO, J. C. T. *et al.*, - Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões, C. M. O. *et al.*, **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC,. 821p, 1999.

CASSIDY A. *et al.* - Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potencial importance to human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture** **80**:1044-1062, 2000.

CHANVITAYAPONGS, S.; DRACZYNSKA-LUSIAK, B.; SUN, A. Y. - Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. **Neuroreport** **8**:1499-1502, 1997

CHARLTON, A J., et al., - Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. **FEBS Lett** **382**:289-292, 1996.

CHENG, J. T. et al., - Antihypertensive principles from the leaves of *Melastoma candidum*. **Planta Medica**. **59**: 405-407, 1993.

CHEYNIER, V.; RIGAUD, J.; RICARDO-DA-SILVA - Structure of procyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties. In: **Plant polyphenols**. Ed. R. W. Hemingway and P.E. Laks, Plenum Press, New York, 281-294. (1992)

CHU, Q.; O'DWYER, M.; ZEECE, M. G.; Direct Analysis of Resveratrol in Wine by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis. **J. Agric. Food Chem.**; **46**; 509-513 1998.

CHUNG M. I., et al. An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. **Plant Med** **58**:274-275, 1992.

COOK, J. D.; REDDY, M. B.; HURRELL, R. F. – The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** **61**:800-8004, 1995.

CREASY LL & COFFEE M, Phytoalexin production potential of grape berries. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** **113**:230-234, 1988.

CZOCHANSKA, Z.; FOO, L. Y.; PORTER, L. J. - Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. **Phytochemistry**, **18**: 1819-1822, 1979.

DALLAS, C.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O. - Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. **J. Agric. Food Chem.**, **70**: 493-500, 1996a.

DALLAS, C.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O. - Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. **J. Agric. Food Chem.**, **44**: 2402-2407, 1996b.

DE FREITAS, V. A. P. - **Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin.** Bourdeaux, 1995. (Thèse. Université de Bourdeaux II).

DE FREITAS, V. A. P.; PEREIRA, E. L.; GODINHO, S.M.A.C.; RUÃO, P. - Study of polyphenol composition of Port wine enriched with procyanidins from grape seeds. XXIII CONGRESSO DO O.I.V., Lisboa, 1998. **Actas**. Lisboa, 1998. vol. II: 510-514.

DERCKX W & CREASY LL, The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. **Physiol Mol Plant Pathol** **34**:189-202, 1989.

DERCKX W *et al.* Stilbene phytoalexins and disease resistance in *Vitis*. In : **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**, Daniel M & Purkayastha RP (eds.), New York, 1995. pp. 287-315.

DIAZ-PLAZA, E. M. *et al.*, - Comparison of wine aromas with different tannic content aged in French oak barrels. **Analytica Chimica Acta** **458**: 139-145, 2002b.

DIAZ-PLAZA, E. M. *et al.*, - Influence of oak wood on the aromatic composition and quality of wines with different tannin contents. **J. Agric. Food Chem.** **50**:2622-2626, 2002a.

DOBRYDNEVA Y *et al.* *Trans-resveratrol* inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. **Br. J. Pharmacol.**, **128**: 149-57, 1999.

DUARTE, N. M. - **Contribuição para o estudo do pó de cortiça e da cortiça: Extracção de proantocianidinas**. Lisboa, 1999. (Tese de Mestrado em Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa).

DUMAZERT, G.; MARGULIS, H.; MONTREAU, F. R. - Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation d'un *Vitis vinifera* blanc: le Mauzac. **Ann. Technol. Agric.**, **22**: 137, 1973.

DUMON, M. C.; MICHAUD, J.; MASQUELIER, J. - Dosages des procyanidols des pépins de raisin de cépages rouges et blancs du Bordelais. **Bull. de l'O.I.V.** **725-726**: 533-542, 1991.

ECTOR, B.J. *et al.*, - Resveratrol concentration in Muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines. **Am. J. Enol. Vitic.** **47**:57-62, 1996.

ESCRIBANO-BAILÓN, T.; DANGLES, O.; BROIULLARD, R. – Coupling reactions between Flavylium ions and catechin. **Phytochemistry** **41**:1585, 1996.

FERNANDÉZ, F.M.T., - Viticultura de calidad: factores que afectan al contenido de compuestos fenólicos. **ACE Revista de Enología**. Disponível em: [http://www.rubes.es/ace/ciencia59\\_1.htm](http://www.rubes.es/ace/ciencia59_1.htm). Acesso em 10/06/2002.

FERNANDEZ-DE-SIMON, B.; HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I.; GOMEZ-CORDOVÉS, C. - Variation in phenol content in grapes during ripening: low-molecular-weight phenols. *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **194**: 351, 1992.

FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B.; DAVIS, P. A. - Headspace gas chromatography to determine human low density lipoprotein oxidation. *Lipids*, **27**: 1047-1051, 1992.

FRANKEL, E., WATERHOUSE, A., AND KINSELLA, J. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*. **341**: 1103-1104, 1993

FRÉMONT L. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, **66**:663-673, 2000.

FULEKI, T. & RICARDO-DA-SILVA, J.M. - Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 1156-1160, 1997.

GAST, M.J. - Tissue selectivity and estrogen action. *Curr. Opin. Endocrinol. Diab.*, **5**: 341-349, 1998.

GEHM, B. D.; McANDREWS, J. W; CHIEN, P. Y; JAMERSON, J. L. - Resveratrol a polyphenolic compounds found grapes and wine, is na agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:14138-14143, 1997.

GEISSMAN, T. A - The pharmacological and other activies of flavonoid compounds in food. In T. W. Goodwin (Ed.), **Chemistry and Biochemistry of plant pigments**. London: Academic Press, 1962.

GEISSMAN, T. A & CROUT, D.H.G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. Freeman, Cooper, San Francisco, 1969.

GOLDBERG, D. M.; KARUMANCHI, A.; TSANG, E; SOLEAS, G. J. - Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. **Am. J. Enol. Vitic.**, **49**: 23-33, 1998.

GOMEZ-PLAZA, et al., - Color and Phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. **J. Agric. Food Chem.** **48**:736, 2000.

GORHAM J, Silbenes and phenanthrenes, vol 1 of **Methods in plant biochemistry**. Academic Press, New York, 1989. pp 159-189.

GUERRA, C.C.Maturação da uva e condução da vinificação para a elaboração de vinhos finos. In: **Viticultura e Enologia - Atualizando Conceitos**. Andradas, EPAMIG, 2002. v. 1, p179-192. Anais do Viticultura e Enologia - atualizando conceitos, 2002.

GUSEV, AI; MUDDIMAN, DC; PROCTOR, A; SHARKEY, AG; HERCULES, DM; TATA, PNV; VENKATARAMANAN, R. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **10**: 1215, 1996.

GUTTERIDGE, J.M.C. & HALLIWELL, B. – **Antioxidants in nutrition, health, and disease**. Oxford University Press, Oxford, 1994.

HAGERMAN, A. E. & BUTLER, L. G. – Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins. **J. Agric. Food Chem.**, **28**:947-952, 1980.

HAGERMAN, A. E. & BUTLER, L. G. – The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **J. Biol. Chem.** **256**: 4494-4497, 1981.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, N. K.; RITCHARD, N.T; HARTZFELD, P. W., RIECHEL, T. L. – Plant polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, **46**:1887-1892, 1998.

HARBONE, J. B. **Comparitive biochemistry of flavonoids**. New York. Academic Presss, 1967.

HASLAM , E. **Plant polyphenols, vegetable tannins revisited**. Cambridge University Press, Cambridge, 1989.

HASLAM, E. - In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry** **19**:2577, 1980.

HASLAM, E. – **Practical Polyphenolics – from structure to molecular recognition and physiological action**. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

HEMINGWAY, R.W. Bark: its chemistry and prospects for chemical utilization. In: **Organic Chemicals from Biomass**, Goldstein, IS (ed.), Boca Raton, pp.190-248, 1981.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLMANN, P.C.H.; KATAN, M. B.; KRONHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. **Lancet** **342**: 1007-1011, 1993.

HMAMOUCHE, M., ESSAFI, N.; BOUBEKRI, C.; BOURZEIX, M.; ESSASSI, E. M. - Qualitative and quantitative analysis for cluster proanthocyanidins of four grape varieties issuing from Morocco. **Bull. O.I.V.**, **67**: 901, 1994.

HOLLMAN, P.C.H. - Bioavailability of flavonoids. **Eur J Clin Nutr** **51**:S66-S69, 1997.

HRAZDINA G. & BORZELL E. A. **Phytochemistry** **10**:2211, 1971.



HURRELL, R.F.; REDDY, M.; COOK, J. D. – Inhibition of non-heme iron absorption in man by herb teas, coffee and black tea. **Br. J. Nutr.** **81**:289-295, 1998.

IANSEM, C.; MARASCHIN, R.P.; ARSEGO, J. L.; CAPEL, L. S.; CARO, M.S.B.; MARASCHIN, M. Potencial antioxidante in vitro de vinhos Bordô e Isabel (safra 2000) produzidos no Vale do Rio do Peixe-SC. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2002, Porto Alegre, 2002. **Anais**. Porto Alegre, 2002.

JACKMANN, R. L.; YADA, R. Y. & TUNG, M. A. A review: separation chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry.** **29**: 279-308, 1987.

JANG, M. et al. - Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science** **275**:218-220, 1997.

JEANDET, P. et al. - HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. **Anal. Chem.**, **69**: 5172-5177, 1997.

JEANDET, P. et al., Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. **J. Agric. Food Chem.** **43**:316:319, 1995.

JEANDET, P., BESSIS, R., SBAGHI, M. ET MEUNIER, P. - Occurrence of a resveratrol-b-D-glucoside in wine : preliminary studies. **Vitis**, **33**:183-184, 1994.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. - The production of resveratrol (3, 5, 4')-trihydroxystilbene by grape berries in different development stages. **Am J Enol Vitic** **42**:41-46, 1991.

JEANDET, P.; SBAGHI, M.; BESSIS, R. - The production of resveratrol (3,4,5'-trihydroxystilbene) by grapevine in vitro cultures, and its application to screening for grey mould resistance. **J Wine Res** 3:47-57, 1992.

JOHNSON H. (1994). *Nouvel Atlas Mondial du Vin*, 4<sup>o</sup> ed, Robert Laffont Ed., Paris, 320p.

JOHNSON H. **The story of wine**. Mitchell-Beazley, Londres, 1989

JORDÃO A. M. Estrutura e composição das proantocianidinas da uva. Evolução ao longo da maturação. Disponível em: [http://www.ipv.pt/millennium/19\\_spec8.htm](http://www.ipv.pt/millennium/19_spec8.htm). acesso em: 17/12/2002

JORDÃO, A. M. - **Evolução das antocianinas e proantocianidinas ao longo da maturação de uvas tintas das castas periquita e touriga francesa (Vitis vinifera L.): Incidência da prática da rega**. 1997. (Relatório de Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial, ISA-UTL).

JORDÃO, A.M. - **Caracterização das proantocianidinas dos engaços em Vitis vinifera L. Evolução ao longo da maturação das castas Touriga Francesa, Castelão Francês e Viosinho**. Lisboa, 1999. (Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa)

JOVANOVIC, S. V. *et al.*, - Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals. In: **Flavonoids in Health and Disease**. Ed. by Rice-Evans, C. *et al.*, New York, pp 137-161, 1996.

JUAN, M.E. *et al.* - Determination of *trans*-resveratrol in plasma by HPLC. **Anal Chem** 71:747-750, 1999.

JURD, L. – Anthocyanins and related compounds. XI. Catechin-flavylium salt condensation reactions. **Tetrahedron** 23:1057-1064, 1967.

JURD, L. – Review of polyphenol condensation reaction and their possible occurrence in the aging of wines. **Am. J. Enol. Vitic.** **20**:191-195, 1969.

KANTZ, K. ; SINGLETON, V. L. - Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using sephadex LH-20. **Am. J. Enol. Vitic.** **42**:309-316, 1991.

KARAS, M; BACHMANN, D; HILLENKAMP, F. **Anal. Chem.**, **57**: 2935, 1985.

KARAS, M; HILLENKAMP, F. **Anal. Chem.**, **60**: 2299, 1988.

KEHRER, J.P. & SMITH, C.V. – Free radicals in biology: sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: **Natural Antioxidants**, Ed. by FREI, B. Academic Press, New York, pp25-62, 1994.

KENNEDY, J. A & POWELL, K. J. – Polyphenol interactions with aluminium (III) and iron (III): their possible involvement in the podzolization process. **Aust. J. Chem.** **38**:879-888, 1985.

KOPP P. - Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? **European Journal of Endocrinology** **138**:619-620, 1998.

KORHAMMER, S.; RENIERO, F.; MATTIVI; F. - An oligostilbene from Vitis roots. **Phytochemistry** **38**:1501-1504, 1995.

KOSIR, I. J. & KIDRIC, J. – Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. **Analytica Chimica Acta** **458**:77-84, 2002.

KRUG, K – Die ursachen der eiweissnachtrubungen bei wein des ausfall deer eiweisschönungen. **Wein-wiss**, **23**: 8-29, 1968.

KUBO, M., KIMURA, Y., SHIN, H., HANEDA, T., TANI, T., K. NAMBA. Studies on the antifungal substance of crude drug: 2. On the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae). **Shoyakugaku Zasshi** **35(1)**: 58-61, 1981.

LACEY, M. E.; SUBRAMANIAN, R.; OLSON, D. L.; WEBB, A. G.; SWEEDLER, J. V.; High-Resolution NMR Spectroscopy of Sample Volumes from 1 nL to 10 L. **Chem. Rev.**; **99**: 3133-3152, 1999.

LAMUELA-RAVENTOS, R. M. et al., - Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. **J Agric Food Chem** **43**:316-319, 1995.

LAMUELA-RAVENTOS, R.M., et al. - Resveratrol e piceid levels in wine production and in finished wines. In: **Wines: nutritional and therapeutical benefits**. Ed by Watkins TR. American Chemical Society, Washington, DC, pp 56-68, 1997.

LANGCAKE, P. - Disease resistance of *Vitis* spp. And the production of the stress metabolites resveratrol,  $\delta$ -viniferin,  $\beta$ -viniferin and pterostilbene. **Physiol Plant Pathol** **18**:213-226, 1981.

LANGCAKE, P. & PRYCE, R.J. - The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. **Phytochemistry** **16**:1193-1196, 1977.

LANGCAKE, P. & PRYCE, R.J. - The production of resveratrol by *Vitits vinifera* and other members of the Vitaceaeas a response to infection or injury. **Physiol. Plant Pathol.**, **9**: 77-86, 1976.

LAPOLLI, J. N. et al. **A competitividade da vitivinicultura brasileira: Análise setorial e programa de ação com destaque para o Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, RS: BANRISUL/EMBRAPA-CNPUV/SEBRAE/RS, 1995.

LEE, C. Y. & JAWORSKI, A. - Major phenolic compounds in ripening white grapes. **Am. J. Enol. Vitic.**, **1**: 43-46, 1989.

LEIGHTON, F.; URQUIAGA, I.; DIEZ, M. S. - Propriétés antioxydantes du vin et de ses composants. **Bull. de O.I.V.**, **807-808**: 463-490, 1998.

LEPADATU, V.; ALEXU, A.; MUDJABA, F. - Les anthocyanes. Variation de leur teneur selon le cépage et l'écosystème. **Bull. de O.I.V.**, **497-498**: 650-666, 1972.

LIAO, H.; CAI, Y. HASLAM, E. – Polyphenol interactions. Anthocyanins: co-pigmentation and colour changes in red wines. **J. Sci. Food Chem.**, **59**:299-305, 1992.

LÓPEZ, M. *et al.*, - Analysis of phenolics constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** **922**:359-363, 2001.

l'incidence du cépage, du terroir et du mode de conduite de la vigne. **Bull. de O.I.V.**, **738-784**: 433-443, 1996.

LUCK, G. *et al.* – Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. **Phytochemistry** **37**:357-371, 1994.

MACHEIX J-J, FLEURIET A E BILLOT J, **Fruit Phenolics.** CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.

MADHAVI, D.L. et al. - Characterization of anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa Cell Cultures. **J. Agric. Food Chem.**, **44**: 1170-1176, 1996.

MARASCHIN M *et al.* Isolation and *trans*-resveratrol analysis in brazilian red wine by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance. In: (Webb, GA *et al.*, Eds) - **Magnetic resonance in food science – a view to the future**. Royal Society of Chemistry, Cambridge,. 2001. pp. 136-141.

MARASCHIN, M. *et al.*, - Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of velutinol A from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cells and MALDI-TOF MS analysis. **Biotchnology Letters**, **23**: 77-82, 2001b.

MARASCHIN, M; PASSOS; R.; DIAS; P.F; ARAUJO, P.S; OLTRAMARI, A.C.; FONTANA, J; CARO, M.S.B. Isolation and *trans*-resveratrol analysis in brazilian red wine by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance. In: Fifth International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food Science, Aveiro, 2000. **Proceedings**. University of Aveiro-Portugal, 2000. p. 37.

MARASCHIN, R. P.; ARSEGO, J L; CAPEL, L S; IANSSEM, C; CARO, MIGUEL S B; MARASCHIN, M. Análise química de vinhos catarinenses - dosagem de fenóis totais e antocianinas. In: **Viticultura e Enologia - Atualizando Conceitos**. Andradas, EPAMIG, 2002. v. 1, p321-323. Anais do Viticultura e Enologia - atualizando conceitos, 2002a.

MARASCHIN, R. P.; IANSSEN, C; ARSEGO, J L; CAPEL, L S; ZANUS, C.; CIMADON, A.M.A.; CARO, M.S.B.; MARASCHIN, M. Flash-chromatography and <sup>1</sup>H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon wines - A chemical composition

similarity study. In: VII JORNADA BRASILEIRA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, Maringá, 2002. **Anais**. Rio de Janeiro, 2002b. v. 1, p. 25-25.

MARASCHIN, R. P. *et al.*, - Análise de protocolos de extração de antocianinas a partir de resíduos da fermentação vinícola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA EM ALIMENTOS. Porto Alegre. 2002. **CD-ROOM**. Porto Alegre, 2002c.

MARMOLLE, F. *et al.*, Polyphenol metallic complexes: characterization by electrospray mass spectrometric and spectrophotometric methods. **Analisis** **25**:M53-M55, 1997.

MASQUELIER, J.; MICHAUD, J. - Action bactéricide et antivirale du vin. C.R. 104e Congrès National des Sociétés Savantes, Bourdeaux Sciences, Fasc. II: 447-457, 1979.

MATTIVI, F., RENIERO F., KORHAMMER, S; Isolation, Characterization, and Evolution in Red Wine Vinification of Resveratrol Monomers. **Journal of Agricultural and Chemistry** **43**:1820-1823,1995.

MAZZA, G. & BROUILLARD, R. – Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanin in aqueous solutions. **Journal of Agricultural and Chemistry** **35**:422-426, 1987.

MELO L.M.R.. Mercado brasileiro de uvas e vinhos. Embrapa/CNPUV, Bento Gonçalves, **Instrução Técnica** 001, 2000.

MELO, L. M. R. *et al.* *Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos*. [www.cnpuv.embrapa.br/atuamerc.html](http://www.cnpuv.embrapa.br/atuamerc.html) (29/052002b).

MELO, L. M. R. *et al.* *Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos*. [www.vinhosnet.com.br/midiauva.asp](http://www.vinhosnet.com.br/midiauva.asp) (29/05/2002)

MELZER, R.; FRICKE, U.; HOLZL, J. - Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. **Arzneimittelforschung**, **41**: 481-483, 1991..

MICHAUD, J.; LACAZE, P.; MASQUELIER, J. - Fractionnement des oligomeres flavanoliques du raisin. **Bull. Soc. Pham., Bordeaux**, **110**: 111-116, 1971.

MICHAUD, J.; MASQUELIER, J. - Quelques aspects nouveaux de la connaissance des tannins catéchiques, leurs relations avec la vitamine C2 (P). **Prod. Prob. Pharm.**, **28**: 499-520, 1973.

MILLER, M., et al.,- A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, **84**:407-412, 1993.

MIYAMOTO, K.; MURAYAMA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. - Host-mediated anticancer activities of tannins. In: THIRD TANNIN CONFERENCE, Bend, 1998. **Proceedings**. Oregon, 1998. p. 137-138

MONOGRAFIA sobre vinho. Disponível em:  
<http://www.bvbv.hpg.ig.com.br/acervo/une/une14.html>. Acesso em 20/12/2002

MORRIS, J. R.; CAWTHON, D. L.; SIMS, C. A. - Effects of excessive potassium levels on pH, acidity and color of fresh and stored grape juice. **Am. J. Enol. Vitic.**, **34**: 35-39, 1983.

MOUTOUNET, M.; RIGAUD, J.; SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V. - Caractérisation structurale des tanins de la baie de raisin. Quelques exemples de MUDDIMAN, DC; GUSEV, AI; HERCULES, DM. **Mass Spectrom. Rev.**, **14**: 383, 1995.



- MUDDIMAN, DC; GUSEV, AI; MARTIN, LB; HERCULES, DM.  
**Fresenius' J. Anal. Chem., 354:** 103, 1996.
- MUDDIMAN, DC; GUSEV, AI; STOPPEK-LANGNER, K; PROCTOR, A;  
HERCULES, DM; TATA, P; VENKATARAMANAN, R; DIVEN, WJ. **Mass  
Spectrom., 30:** 1469, 1994.
- MUDDIMAN, DC; GUSEV, AI; PROCTOR, A; HERCULES, DM;  
VENKATARAMANAN, R; DIVEN, W. (1994). **Anal. Chem., 66:** 2362, 1995.
- MUDDIMAN, DC; NICOLA, AJ; PROCTOR, A; HERCULES, DM. **Applied  
Spectrosc., 50:** 161, 1996.
- MUDDIMAN, DC; BAKHTIAR, R; HOFSTADLER, AS; SMITH, RD. **J.  
Chem. Education, 74:** 1288, 1997.
- NETZEL, M., STRASS, G., BITSCH, I., KÖNITZ, M., CHRISTMANN, M.  
BITSCH, R. - Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red  
wine. **Journal of Food Engineering 56:**223-228, 2003.
- NICHOLSON, J.K., et al., 750 MHz <sup>1</sup>H and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of  
Human Blood Plasma. **Anal. Chem., 67:**793-811; 1995.
- NONOMURA, S. et al. Chemical constituents of polygonaceous plants.  
Studies on the components of Ko-jo-Kon (*Poligonun cuspidatum* SIEB et ZUCC).  
**Yakugaku Zashi.83:** 988-90, 1963.
- OREA, J.M . *et al.*, analysis of *trans*-resveratrol by laser desorption coupled  
with resonant ionization spectrometry. Application to *trans*-resveratrol content in  
vine leaves and grape skin. **Analytical Chemistry 73:**5021-5929, 2001.
- OVERBERG, A; KARAS, M; BAHR, U; KAUFMANN, R; HILLENKAMP, F.  
**Rapid Commun. Mass Spectrom., 4:** 293, 1990.

PACE-ASCIAC CR et al. - The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. **Clin. Chim. Acta**, **235**: 207-219, 1996.

PALAZÓN, J., CUSIDÓ, R.M., E MORALES, C. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. [http://www.rubes.es/ace/ciencia55\\_2.htm](http://www.rubes.es/ace/ciencia55_2.htm), 9/junho/2002.

PASSOS, R., et al. - A saúde vem embalada em garrafas de vinho. **Ciência Hoje 7**: , 2001.

PASSOS, R.; MOREIRA, F. M.; BORGHEZAN, M.; VOLTOLINI, J. A.; SILVA, A. L.; MARASCHIN, M. - U.V visible spectrophotometry analysis of *trans*-resveratrol in commercially available red wines: a validation approach. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, Bento Gonçalves, 1999. **Anais**. Bento Gonçalves: UVIBRA, 1999. v. 1, p. 160-160.

PASSOS, R.; OLTRAMARI, A. C.; SILVA, A. L.; CARO, M.S.B; MARASCHIN, M. - Análise de *trans*-resveratrol por <sup>1</sup>H-RMN em vinhos tintos produzidos no sul do Brasil. In: VIII ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - I ENCONTRO LUSO-BRASILEIRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, Mangaratiba, 2001. **Anais**. Rio de Janeiro: AUREMN, 2001. v. 1, p. 107-108.

PASSOS, R. *et al.*, Perfil espectrofotométrico e teor de antocianinas em frações metanólicas de vinhos tintos produzidos no sul do Brasil. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Florianópolis, 2001. **CDROOM**. Florianópolis, 2001b, p. AA32

PEYNAUD, E. **Enologia practica: conocimiento y elaboracion del vino..**  
Madrid, Mundi Prensa, 2º edição, 1984.

PEZET, R. & CUENAT, P., - Resveratrol in wine: extractio from skins during fermentation and post-fermentation standing of must from Gamay grapes. **Am J Enol Vitic 47**:287-290, 1996.

PEZET, R. et al. - Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection. **J. Chromatogr. A, 663**: 191-197, 1994.

PFENNINGER, A.; KARAS, M.; FINKE, B.; STAHL, B.; SWATZKI, G. Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk. **J. Mass. Spectr. 34**: 98-104, 1999.

POLENTA, G.A. **Evolução dos compostos fenólicos durante a fermentação de mostos provenientes de três regiões do Rio Grande do Sul, submetidos a diferentes tratamentos.** Santa Maria, 1996. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria).

PONTALLIER, P. RIBEREAU-GAYON. - **Connaissance de la vigne et du vin.** 17:105, 1983.

POOL, R.M. et al., - Resveratrol and the viniferins, their application to screening for diseases resistance in grape breeding programs. **Vitis, 20**: 136-145, 1981.

POWELL, H. K. J. & RATE, A W. - Aluminium-tannin equilibria: a potentiometric study. **Aust. J. Chem. 40**:2015-2022, 1987.

PRIEUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. - Oligomeric and Polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, **36**: 781-784, 1994.

PROTAS, J. F. S., CAMARGO, U. A., MELO, L. M. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: **Viticultura e Enologia** – atualizando conceitos. EPAMIG. Belo Horizonte, 2002

REDDY, V.S. et al., - Ultraviolet-B-Responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine Ammonia Lyase Biosynthesis. **Plant Physiol.**, **105**: 1059-1066, 1994..

RENAUD, S. & LORGERIE, M. - Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease. **Lancet**, **339**: 1523-1526, 1992.

REVEL G et al. - Analyse du *cis*- et *trans*-resveratrol dans les vins produits au Portugal .**J. Intern. Sci. Vigne et du Vin**, **30**:31-37, 1996.

RIBÉREAU-GAYON, F. - Observation sur les composés phénoliques dans les vins rouges du Bordelais en 1987. **Revue Française d'Œnologie**, **123**: 25-33, 1990.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBÉREAU-GAYON. **Ciencias y tecnicas del vino – analisis y control de los vinos**. Vol. 1., 1972.

RIBÉREAU-GAYON, P. - Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. **Conn. Vigne Vin**, **5**: 247-261, 1971.

RIBÉREAU-GAYON, P. **The Chemistry of Wine Making**. A. D. Webb éd. American Chemical Society, Washington, 1974.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Vitis**. **12**:119, 1973.

RICARDO-DA-SILVA, J. M. - Estrutura e composição das proantocianidinas da uva e do vinho. Efeitos potenciais na saúde. In: 3º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO. **Actas**. Alentejo, 1995. p. 343-356.

RICARDO-DA-SILVA, J. M.; BELCHIOR, A. P.; SPRANGER, M. I.; BOURZEIX, M. - Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. **Sciences des Aliments**, **12**: 223-237, 1992 a.

RICARDO-DA-SILVA, J. M.; BOURZEIX, M.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. - Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. **Vitis**, **30**: 245-252, 1991 a.

RICARDO-DA-SILVA, J. M.; CHEYNIER, V.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M. - Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. **J. Agric. Food Chem.**, **57**: 111-125, 1991 b.

RICARDO-DA-SILVA, J. M.; ROSEC, J. PH.; BOURZEIX, M.; MOURGUES, J.; MOUTOUNET, M. - dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre. **Vitis**, **31**: 55-63, 1992 b.

RICARDO-DA-SILVA, J. M; *et al.*, Oxygen Free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. **J. Agric. Food Chem.** **39**: 1549-1552, 1991c.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. – Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** **20**: 933-956, 1996.

RIEDL, K. M.; HAGERMAN, A. E.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RICHARD, N. T.; RIECHEL, T. L.; HARTZFELD, P. W. - Tannins as biological antioxidants. In:

THIRD TANNIN CONFERENCE, Bend, 1998. **Proceedings**. Oregon, 1998. p. 169-170.

RIOU, V. et al., Aggregation of grape seed tanins in model wine – effect of wine polysaccharides. **Food Hydrocolloids 16**:17-23, 2002.

ROGGERO, J. P.; COEN, S.; RAGONNET, B. - High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in reponing grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. **Am. J. Enol. Vitic., 37**: 77-83, 1986.

ROMERO-PÉREZ, A. I. et al., - Levels of *cis*- e *trans*-resveratrol and piceid isomers in rose and white *Vitis vinifera* wines. **J Agric Food Chem 44**:2124-2128, 1996.

ROMERO-PÉREZ, A. I. et al., - Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. **J Agric Food Chem 43**:1533-1536, 1999.

ROMERO-PÉREZ, A. I. et al., - Resveratrol and piceid as varietal markers of white wines. **J Agric Food Chem 44**:1975-1978, 1996.

ROMEYER, F. M.; MACHEIX, J. J.; SAPIST, J. C. - Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. **Phytochemistry, 25**: 219-221, 1986.

ROSIER, J.P. & LOSSO, M. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Vitivinicultura. **EPAGRI, Boletim Técnico**, 1997. 83:41.

ROTONDO S. et al. - Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. **British Journal of Pharmacology 123**:1691-1699, 1998.

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N. et al. - Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International** **32**:327-333, 1999.

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N., Provost, C., Vivas, N. Comparative study of polyphenols scavenging activities estimated by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **47**:425-443, 1999.

SANTOS, S. C., MELLO, J. C. P. Taninos. In: Simões, C. M. O. et al. (ed.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999, p.517-544.

SANTOS-BUELGA, C. & SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J Sci Food Agric** **80**:1094-1117, 2000.

SANTOS-BUELGA, C. et al., **Unters. Forsch.** **201**:269-274, 1995.

SÁRDI É et al. *Proc. VII Int. Symp. on Grapevine and Breeding*. In: **Acta Horticulturae** **528**: 597-603, 2000.

SBAGHI, M., JEANDET, P., BESSIS, R.; LEROUX, P. - Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. **Plant Pathol** **45**:139-144, 1996.

SBAGHI, M., JEANDET, P., FAIVRE, B., BESSIS, R. ET FOURNIOUX, J.C. Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine in vitro cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). **Euphytica, Int. J. Plant Breed.**, **86**: 41-47, 1995.

SCALBERT, A. *et al.*, - Polyphenols, metal ion complexation and biological consequences. In: **Plant polyphenols. 2. Chemistry and Biology**. Ed. by Gross, G. G. *et al.*, New York, 2000.

SCHRIPSEMA J & VERPOORTE R. **Phytochemical Analysis**, **2**: 155-162, 1991.

SHRIKHANDE, A.J. – Wine by-products with health benefits. **Food Research Internacional** **33**:469-474, 2000.

SIEMANN EH & CREASY LL. - Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **Am. J. Enol. Vitic.**, **43**: 49-53, 1992.

SILVA, J.M.O.D. *et al.*, Avaliação quantitativa de compostos antociânicos em sucos de uva de diferentes variedades. In: FARMAPOLIS 2001. Florianópolis, 2001. **CDROOM**. Florianópolis, 2001. p 105.

SMITH, RD; LOO, JA; EDMONDS, CG; BARINAGA, CJ; UDSETH, HR. **J, Chromatogr.**, **516**:157, 1990.

SOMERS, T. C. The polymeric nature of wine pigments. **Phytochemistry** **10**:2175, 1971

SOUQUET, R. M.; CHENIER, V.; MANCHADO, P.S.; MOUTOUNET, M. (1996) - Les composés phénoliques du raisin. J. Int. Sc. Vigne et Vin, Hors Série, Martillac, France: 99-107.

SOUTH, P. K.; HOUSE, W. A.; MILLER, D.D. – Tea consumption does not affect iron absorption in rats unless tea and iron are consumed together. **Nutr. Res.** **17**:1303-1310, 1997.

SUGUI, J. A.; *et al.*, - Maldi-tof analysis of mixtures of 3-deoxyanthocyanins and anthocyanins. **Phytochemistry** **48**:1063-1066, 1998.

SUN, B. S.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; SPRANGER, M. I. - Proanthocyanidin content of several grape vine varieties from Portugal. In: XXIII CONGRESSO DO O.I.V. **Actas**. Lisboa, 1998. p: 651-655.



TAKECKI, M., TANAKA, T.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. - Structure and antileherpetic activity among the tannins. **Phytochemistry**, **24**: 2245-2250, 1985.

TALBO, G; WADE, JD. **Today's Life Science**, **26**:34, 1996.

TEISSEDRE, P. L.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. - Principal phytochemicals in French Syrah and Grenache Rhône wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. **J. Int. Sci. Vigne Vin**, **12**: 1-8, 1995.

TEISSEDRE, P. L.; WATERHOUSE, A. L.; WALZEM, R.L.; GERMAN, J. B.; FRANKEL, E. N.; EBELER, S. E.; CLIFFORD, A. J. - Composés phénoliques du raisin et du vin et santé. **Bull. de O.I.V.**, **781-782**: 252-277, 1996.

TEISSECRE, P.L. & LANDRAULT, N. – Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. **Food Research Internacional** **33**:461-467, 2000.

TIMBERLAKE, C. F. & BRIDLE, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. **Am. J. Enol. Vitic.**, **27**: 97-105, 1976

VALDÉS, H. L.; LEYES, E.R.; REGO, H.P.L. SANABIA, M.L.G. – Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. **Rev. Cubana Plant Med.** **5**: 17-22, 2000.

VENENCIE, C.; UVEIRA, N.; GUIET, S. - Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. **Revue Française d'Oenologie**, **167**: 36-41, 1997.

VERPOORTE, R. & SCHRIPSEMA, J. **The Alkaloids**, **15**: 1-22, 1994.

VINSON, J. A; DABBAGH, Y. A; SERRY, M.M; JANG, J. – Plant flavonoids, especially tea flavonoids are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. **J. Agric. Food Chem.** **43**:2800-2802, 1995.

VIVAR-QUINTANA, et al., Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. **Analytica Chimica Acta**, **458**: 147-155, 2002.

VRHOVSEK, U., WENDELIN, S.; EDER, R., - Effects of various vinification techniques on the concentration of *cis*- and *trans*-resveratrol and resveratrol glucosides isomers in wine. **Am J Enol Vitic** **48**:214-219, 1997.

WATERHOUSE, A. L. & LAMUELA-RAVENTOS, R.N. -. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. **Phytochemistry**, **37**: 571-573, 1994.

ZENOBI, R; KNOCHENMUS, R. **Mass Spectrom. Rev.**, **17**: 337, 1998.